

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

**Resistência a inseticidas diamidas e caracterização molecular
de mutações no receptor de rianodina em populações de
Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no
Brasil**

Daniela Miyuki Okuma

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

**Piracicaba
2022**

**Daniela Miyuki Okuma
Engenheira Agrônoma**

Resistência a inseticidas diamidas e caracterização molecular de mutações no receptor de rianodina em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2022**

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

Okuma, Daniela Miyuki

Resistência a inseticidas diamidas e caracterização molecular de mutações no receptor de rianodina em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Daniela Miyuki Okuma. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

112 p.

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

1. Manejo da resistência de insetos 2. Monitoramento da resistência 3. Frequência alélica 4. Mecanismos de resistência 5. Padrão de herança 6. Flubendiamide 7. Tetraniliprole I. Título

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli pelos conselhos, orientação, apoio e pela disponibilização do laboratório para realização de parte do trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), em especial aos colegas Aline Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Nascimento, Dionei Muraro, Douglas Amado, Dyrson Abbade Neto, Eloisa Salmeron, Fernando Semmelroth, Ingrid Kaiser, Juliana Rodrigues e Rubens Kanno, pelo suporte e pelos conhecimentos transmitidos na condução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos (ESALQ/USP), em especial a Aline Pereira Rank pela colaboração e auxílio prestados.

Aos colegas da Bayer S.A., Ana Cuenca, Davi Fernandes, Douglas Franco, Edmea Santos, Fabiana Ometto, Francisco Lozano, Marcio Adoryan, Milena Caye, Renato Horikoshi, Ralf Nauen e Thabata Imatomi, pelo apoio e auxílios prestados na condução deste trabalho.

Ao meu marido Makoto Okuno, por todo amor, compreensão e apoio incondicional. Muito obrigada pelo estimo e dedicação em me auxiliar e orientar sempre.

À minha família, em especial aos meus pais Vanda e Paulo, pelo amor, incentivo e por sempre me auxiliarem e contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por todas as oportunidades concedidas e por ser um berço de conhecimento.

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

À empresa Bayer S. A. por conceder e apoiar o desenvolvimento deste trabalho.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia da Biblioteca Central (ESALQ/USP), pelo auxílio na formatação deste trabalho.

A todos que estiveram envolvidos nessa jornada, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
Referências.....	18
2. MONITORAMENTO FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DA RESISTÊNCIA A FLUBENDIAMIDE EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL	25
Resumo	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução	26
2.2 Material e Métodos	28
2.2.1 Coletas das populações de campo e criação no laboratório	28
2.2.2 Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	28
2.2.3 Frequência de alelos associados à resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	32
2.2.4 Discriminação alélica e mapeamento da frequência dos genótipos I4790, M4790, K4790 associadas à resistência <i>S. frugiperda</i> a diamidas no Brasil	34
2.3 Resultados	35
2.3.1 Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	35
2.3.2 Frequência de alelos associados à resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	41
2.3.3 Discriminação alélica e mapeamento da frequência dos genótipos I4790, M4790, K4790 associadas a resistência <i>S. frugiperda</i> à diamidas no Brasil	45
2.4 Discussão	52
2.5 Conclusões	54
Referências.....	54
3 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A	

FLUBENDIAMIDE: PADRÃO DE HERANÇA E RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTRAS DIAMIDAS	61
Resumo	61
Abstract	61
3.1 Introdução	62
3.2 Material e Métodos	64
3.2.1 Seleção das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a flubendiamide	64
3.2.2 Caracterização da herança da resistência de diferentes linhagens associada à resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide.....	66
3.2.3 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole e ciantraniliprole)	69
3.2.4 Dominância funcional da resistência das linhagens de <i>S. frugiperda</i> resistentes a flubendiamide.....	69
3.2.5 Sequenciamento da região II a VI do receptor de rianodina das linhagens resistentes a flubendiamide.....	70
3.3 Resultados.....	71
3.3.1 Seleção das linhagens de BA-R e TF-R <i>Spodoptera frugiperda</i> resistente a diamidas.....	71
3.3.2 Caracterização da resistência das linhagens BA-R e TF-R de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	71
3.3.2.1 Herança da resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide	71
3.3.2.2 Dominância da resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide.....	72
3.3.2.3 Número de genes associados à resistência de <i>S. frugiperda</i> a flubendiamide.....	74
3.3.2.4 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole, ciantraniliprole e tetraniliprole)	74
3.3.2.5 Dominância funcional da resistência das linhagens de <i>S. frugiperda</i> resistentes a flubendiamide.....	75
3.3.2.6 Sequenciamento da região II a VI do receptor de rianodina das linhagens resistentes a flubendiamide.....	77
3.4 Discussão	78
3.5 Conclusões.....	80
Referências	81

4 LINHAS-BÁSICAS DE SUSCETIBILIDADE A TETRANILIPROLE EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	87
Resumo	87
Abstract.....	87
4.1 Introdução	88
4.2 Material e Métodos	89
4.2.1 Populações de campo e linhagens.....	89
4.2.2 Linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de <i>S. frugiperda</i>	90
4.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a tetraniliprole	92
4.2.4 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e tetraniliprole.....	93
4.2.5 Dominância funcional e eficiência agrônômica de tetraniliprole em linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível e resistentes a flubendiamide em condições de laboratório.....	94
4.3 Resultados.....	95
4.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de <i>S. frugiperda</i> do Brasil	95
4.3.2 Monitoramento da resistência de <i>S. frugiperda</i> a tetraniliprole.....	98
4.3.3 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e tetraniliprole.....	101
4.3.4 Dominância funcional e eficácia de tetraniliprole em linhagens de <i>S. frugiperda</i> resistentes a flubendiamide em condições de laboratório	102
4.4 Discussão	103
4.5 Conclusões	105
Referências.....	105
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111

RESUMO

Resistência a inseticidas diamidas e caracterização molecular de mutações no receptor de rianodina em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada uma das pragas mais destrutivas em diversos cultivos de importância econômica, principalmente nas culturas da soja, milho e algodão no Brasil. Os inseticidas do grupo das diamidas são importantes ferramentas no manejo de *S. frugiperda*; no entanto, já existem publicações de resistência a estes inseticidas em populações desta praga no Brasil. Sendo assim, estudos que fomentem a implementação de estratégias de manejo de resistência são fundamentais para prolongar a vida útil desse grupo químico. Os objetivos desse trabalho foram: (i) Monitorar a suscetibilidade a flubendiamide em populações brasileiras de *S. frugiperda* e mapear a frequência alélica das mutações no receptor de rianodina responsáveis pela resistência a diamidas; (ii) Selecionar linhagens de *S. frugiperda* resistentes a flubendiamide e caracterizar as bases genéticas envolvidas; e (iii) Caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de grãos e avaliar a resistência cruzada a flubendiamide. O monitoramento da suscetibilidade a flubendiamide foi realizado em mais de 70 populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas de milho e algodão nas safras agrícolas de 2018/19 a 2020/21. Em geral, não foi detectada uma alteração significativa na suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide no decorrer das safras agrícolas; com exceção para as populações amostradas durante a entressafra no Estado da Bahia que apresentaram sobrevivências superiores a 50% na dose diagnóstica. Resultados de F₂ screen de 31 populações amostradas em todas as regiões representativas de produção de milho e algodão, confirmaram a estabilidade da frequência alélica associada à resistência a diamidas, com frequência média de 0,0423 (0,0364 – 0,0486) em 2018/19, 0,0275 (0,0206 – 0,0355) em 2019/20 e de 0,0375 (0,0272 – 0,0435) em 2020/21. Em geral, foi verificada baixa frequência das mutações no receptor de rianodina (RyR), variando entre 0 e 38% para I4790M e 0 a 10% para I4790K, a partir de genotipagem de populações do campo utilizando o ensaio de discriminação alélica TaqMan™, confirmando assim os resultados do monitoramento fenotípico da resistência. Duas linhagens resistentes de *S. frugiperda* a flubendiamide foram selecionadas, sendo uma a partir de uma população coletada em São Desidério-BA (BA-R) e outra em Tasso Fragoso-MA (TF-R), com razões de resistência > 4500 vezes para ambas as linhagens. A partir de cruzamentos recíprocos entre as linhagens resistentes e a linhagem suscetível, verificou-se que a resistência a flubendiamide é autossômica e incompletamente recessiva para ambas as linhagens resistentes. Os retrocruzamentos da progênie F₁ dos cruzamentos recíprocos com o parental resistente revelaram caráter monogênico para as duas linhagens. O sequenciamento da região II a VI do receptor de rianodina identificou a presença das mutações I4790M e I4790K nas linhagens resistentes, as quais apresentaram razão de resistência (RR) cruzada de 692 vezes e 3917 vezes para clorfaniliprole e de 1799 vezes e 7475 vezes para ciantraniliprole, respectivamente. A mutação I4790M foi predominante nas populações de *S. frugiperda* do Brasil, sendo possível identificar a presença da mutação I4790K apenas nas populações da Bahia, Mato Grosso e São Paulo. A partir das linhas-

básicas de suscetibilidade a tetraniliprole, foram verificadas uma variação de 1,43 a 5,71 vezes na suscetibilidade entre as populações de *S. frugiperda* avaliadas. Em geral, o monitoramento fenotípico revelou elevada suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* a tetraniliprole em populações amostradas em 2021/22, com exceção da população de Sorriso (MT) que apresentou sobrevivência acima de 20% na dose diagnóstica. Foi detectada presença de alta resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole, ciantraniliprole e tetraniliprole). Os resultados obtidos nesse trabalho servem como subsídios para a implementação efetiva de estratégias de manejo de resistência de *S. frugiperda* a diamidas no Brasil.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos, Monitoramento da resistência, Frequência alélica, Mecanismos de resistência, Padrão de herança, Flubendiamide, Tetraniliprole

ABSTRACT

Diamide resistance and molecular characterization of ryanodine receptor mutations in populations of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is considered one of the most destructive pests of maize and cotton in Brazil. Diamides insecticides are an important tool for management of *S. frugiperda*; however, resistance cases to these insecticides have already been reported in Brazilian populations of *S. frugiperda*. Thus, studies that support the implementation of resistance management strategies are fundamental to prolong the lifetime of this chemical group. The main objectives of this study were: (i) To monitor the susceptibility to flubendiamide in Brazilian populations of *S. frugiperda* and map the allele frequency of the ryanodine receptor mutations responsible for diamide resistance; (ii) To select strains of *S. frugiperda* resistant to flubendiamide to understand the inheritance of resistance; (iii) To characterize baseline susceptibility to tetraniliprole in *S. frugiperda* populations sampled in the main maize-growing regions and evaluate cross-resistance to flubendiamide. The susceptibility monitoring to flubendiamide was conducted in more than 70 populations of *S. frugiperda* collected in maize and cotton crops between 2018/19 and 2010/21. In general, there was no significant shift in *S. frugiperda* susceptibility to flubendiamide throughout crop seasons; except for populations sampled in the state of Bahia during fallow seasons showing survival of >50% at diagnostic dose. Results of F₂ screen conducted in 31 populations of *S. frugiperda* collected from major maize and cotton production regions confirmed that the frequency of diamide resistance alleles remained rather stable showing an average of 0.0423 (0.0364 – 0.0486), 0.0275 (0.0206 – 0.0355) and 0.0375 (0.0272 – 0.0435) in 2020/21. Genotyping of field-collected samples using a TaqMan-based allelic discrimination assay revealed a low frequency of ryanodine receptor (RyR), varying from 0 to 38% for I4790M and 0 to 10% for K mutations, confirming the results of phenotypic monitoring of resistance. Two strains of *S. frugiperda* resistant to flubendiamide were selected, one from a population collected in São Desidério, Bahia State (BA-R) and another in Tasso Fragoso, Maranhão State (TF-R), showing resistance ratios of >4,500-fold for both strains. Reciprocal crosses of flubendiamide-resistant strains and susceptible strains indicated that resistance to flubendiamide is autosomal incomplete recessive for both resistant strains. The backcrosses of the F₁ progeny of reciprocal crosses with the parental resistant strain revealed a monogenic trait for both strains. The sequencing of the region II to VI of the ryanodine receptor identified I4790M and I4790K mutations in the resistant strains which presented a cross-resistance ratio (RR) of 692-fold and 3,917-fold for chlorantraniliprole and; 1,700-fold and 7,475-fold for cyantraniliprole, respectively. The I4790M mutation was predominant in populations of *S. frugiperda* in Brazil, and the mutation I4790K was identified only in populations of Bahia, Mato Grosso and São Paulo. Furthermore, results of baseline susceptibility to tetraniliprole revealed a variation of 1.43 a 5.71-fold between populations of *S. frugiperda* evaluated. In general, the phenotypic monitoring presented high susceptibility to tetraniliprole in most of the populations sampled during 2021/22 season, except for Sorriso (MT) showing survival > 20% at diagnostic dose. Presence of high cross-resistance was detected between flubendiamide and anthranilic diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and tetraniliprole). Our

findings will help to implement effective resistance management strategies of *S. frugiperda* to diamides in Brazil.

Keywords: Insect resistance management, Resistance monitoring, Allele frequency, Resistance mechanisms, Inheritance pattern, Flubendiamide, Tetrilaniprole

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade ao inseticida flubendiamide nas safras de 2018/19-2020/21.....28
- Figura 2.2. Monitoramento fenotípico de populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante as safras de 2018/19 (A), 2019/20 (B), 2020/21 (C) e um resumo da suscetibilidade de cada safra (D) utilizando a dose diagnóstica de flubendiamide (2,38 µg i.a./cm²) em ensaios de aplicação superficial em dieta.40
- Figura 2.3. Mortalidade das populações de *Spodoptera frugiperda* na dose diagnóstica de flubendiamide (bioensaios de aplicação superficial na dieta 2,38 µg i.a. flubendiamide/cm²) em 70 populações, amostradas nas safras 2019 (2018/19), 2020 (2019/2020) e 2021 (2020/21).....41
- Figura 2.4. Frequência estimada dos alelos associados à resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide utilizando a metodologia de F₂ screen. No total, 1044, 461 e 469 isolinhas foram testadas nas safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21, respectivamente.44
- Figura 2.5. Frequência alélica dos genótipos 4790 I/I, 4790 I/M, 4790 I/K, 4790 M/M, 4790 K/K e 4790 M/K identificadas por Taqman™ em populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras 2018/19 (2019) e 2019/20 (2020) e 2020/21 (2021).....50
- Figura 2.6. Frequência do alelo I4790 (suscetível) no receptor de rianodina em 64 populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas nas safras 2019 (2018/19), 2020 (2019/2020) e 2021 (2020/21).....51
- Figura 2.7. Regressão linear entre os resultados de mortalidade dos bioensaios de monitoramento fenotípico (aplicação superficial na dieta, 2,38 µg a.i./cm²) e frequência do alelo suscetível (SS) identificado por Taqman™ apresentaram correlação significativa (F = 188, gl = 1, 60, P < 0.0001).52
- Figura 3.1. Efeito da dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em função da concentração do inseticida das linhagens suscetível, resistentes BAR-R e TF-R e heterozigotos.73
- Figura 3.2. Mortalidade e intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens BA-R (A), TF-R (B), suscetível e heterozigotos em folhas de milho imersas em soluções inseticidas na dose recomendada em bula dos produtos Belt® (Flubendiamide), Prêmio® (Clorantraniliprole), Benevia® (Ciantraniliprole).76
- Figura 3.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos das linhagens suscetível, BA-R e TF-R da região parcial do receptor de rianodina compreendendo a região G4946E.77

Figura 3.4. Alinhamento da sequência de aminoácidos de três indivíduos, utilizando primers senso e antissenso, da região parcial do receptor de rianodina compreendendo a região I4790M/K, alinhados com a tradução do receptor de *Plutella xylostella* (GenBank AET09964). 78

Figura 3.5. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da região parcial do receptor de rianodina de espécies de lepidópteros pragas compreendendo a região I4790M/K associada a resistência à diamidas e linhagens suscetível, resistentes (BA-R; TF-R) de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide. O número de acesso da sequências referenciadas são: *P. xylostella* (AET09964), *Tuta absoluta* (APC65631), *Spodoptera exigua* (AFC36359), *S. frugiperda* (MK226188), Sf_sus (MK805909.1), BA-R (ON653045), TF-R 4790M (ON653048), TF-R 4790K (ON653047) and TF-R 4790K/M (ON653046). 78

Figura 4.1. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para a caracterização da linha-básica de suscetibilidade a tetraniliprole durante as safras 2018/19 e 2020/21. 91

Figura 4.2. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade ao inseticida tetraniliprole nas safras de 2021/22. 93

Figura 4.3. Curvas de concentração-resposta de tetraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas nas safras 2018/19, 2021/22 e linhagem suscetível de referência. 97

Figura 4.4. Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole em populações amostradas em diferentes localidades brasileiras durante a primeira e segunda safra de 2021/22 na concentração diagnóstica da população suscetível de referência de 0,44 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ (A) e baseline de suscetibilidade de 0,74 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ (B). 100

Figura 4.5. Mapa de calor comparativo da mortalidade larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante a primeira e segunda safra 2021/22 expostas a concentrações diagnósticas de tetraniliprole de 0,44 e 0,74 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ 101

Figura 4.6. Mortalidade e intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens suscetível, BA-R, TF-R e heterozigotos (Sus ♀ x ♂ BA-R/TF-R; ♂ Sus x ♀ BA-R/TF-R) em folhas de milho imersas em solução inseticida de Vayego® (Tetraniliprole 200 SC) na concentração de 150 mL/ha. 102

Figura 4.7. Mortalidade e intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens TF-R e suscetível em folhas de milho imersas em soluções inseticidas com diferentes concentrações do produto Vayego® (Tetraniliprole 200 SC). 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Populações utilizadas para o monitoramento fenotípico e discriminação alélica (Taqman™) da suscetibilidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> a flubendiamide amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21.	30
Tabela 2.2. Populações utilizadas para estimativa da frequência alélica (F ₂ Screen) do alelo que confere resistência a flubendiamide em populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21.	33
Tabela 2.3. Iniciadores e sondas utilizados nos ensaios de fluorescência por Taqman™ para discriminação alélica da resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a diamidas.	35
Tabela 2.4. Mortalidade de lagartas de 3 ^o instar de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20, 2020/21 submetidas a ensaios de ingestão por aplicação superficial na dieta de flubendiamide utilizando dose diagnóstica (2,38 µg i.a./cm ²).	36
Tabela 2.5. Frequência estimada de alelos associados à resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2018/19....	41
Tabela 2.6. Frequência estimada do alelo associado à resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2019/20....	43
Tabela 2.7. Frequência estimada de alelos associados à resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2020/21....	44
Tabela 2.8. Frequência alélica dos genótipos 4790 I/I, 4790 I/M, 4790 I/K, 4790 M/M, 4790 K/K e 4790 M/K em populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> coletadas na safra de 2020/2021 por meio de ensaios de discriminação alélica Taqman™.	47
Tabela 3.1. Linhagens resistentes de <i>Spodoptera frugiperda</i> à diamidas selecionadas pela metodologia de F2 screen.	65
Tabela 3.2. Iniciadores utilizados para no sequenciamento parcial do receptor de rianodina de <i>Spodoptera frugiperda</i> (região II a VI do domínio intramembranar).....	70
Tabela 3.3. Concentração-mortalidade das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível (Sus) e resistentes (BA-R; TF-R) a flubendiamide e heterozigotos provenientes de cruzamentos recíprocos.....	71
Tabela 3.4. Efeito da dominância da resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a flubendiamide em função da concentração do inseticida das linhagens suscetível, resistentes BA-R e TF-R e heterozigotas.....	73

Tabela 3.5. Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre as linhagens resistentes e a progênie F_1 (cruzamentos recíprocos entre as linhagens BA-R, TF-R e Sus) de *Spodoptera frugiperda* para diferentes concentrações de flubendiamide. 74

Tabela 3.6. Dose-mortalidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e resistente a flubendiamide (BA-R e TF-R) em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial às moléculas inseticidas flubendiamide, clorantraniliprole e ciantraniliprole..... 75

Tabela 3.7. Mortalidade % e intervalo de confiança 95% (IC 95%) das linhagens BA-R, TF-R, suscetível e heterozigotos em folhas de milho imersas em soluções inseticidas na dose recomendada em bula dos produtos Belt® (Flubendiamide), Prêmio® (Clorantraniliprole) e Benevia® (Ciantraniliprole)..... 76

Tabela 4.1. Populações utilizadas para caracterização da linha-básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole durante as safras 2018/19 e 2020/21..... 91

Tabela 4.2. Populações utilizadas para o monitoramento fenotípico da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole amostradas durante as safras de 2020/21..... 93

Tabela 4.3. Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a tetraniliprole para populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas na cultura do milho na safra 2018/19 e 2020/21..... 96

Tabela 4.4. Concentração-mortalidade de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e análise das curvas de concentração-resposta conjunta de treze populações coletadas na safra 2018/2019 e 2020/21 (linha-básica de suscetibilidade)..... 97

Tabela 4.5. Mortalidade larval (%) e intervalo de confiança (IC 95%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas as concentrações diagnósticas de tetraniliprole..... 99

Tabela 4.6. Dose-mortalidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e resistente a flubendiamide (BA-R e TF-R) em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial à molécula inseticida tetraniliprole..... 102

1. INTRODUÇÃO

Inseticidas do grupo das diamidas agem seletivamente nos receptores de rianodina (RyR), localizados na membrana do retículo sarcoplasmático de tecidos musculares dos insetos. Estes canais têm como função a regulação homeostática de cálcio presente nos estoques intracelulares, levando a contração muscular (Nauen, 2006; Sattelle; Cordova & Cheek, 2008). Sintomas típicos de intoxicação por inseticidas diamidas são a rápida cessação da alimentação, contração muscular permanente e, conseqüentemente, a morte do inseto. Devido a sua elevada eficácia de controle, ausência de resistência cruzada com outros grupos de inseticidas, baixa toxicidade a mamíferos e insetos benéficos, os inseticidas diamidas têm sido uma importante ferramenta no manejo integrado de pragas (MIP) sendo um dos produtos mais utilizados para o controle de lepidópteros-praga no mundo (Jeanguenat, 2013; Sparks; Nauen, 2015; Tohnishi et al., 2005), correspondendo a 11% das vendas globais de inseticidas (Spark, 2019).

Flubendiamide, inseticida diamida derivado do ácido ftálico, desenvolvido pela empresa Nyhon Nohyaku CO, LTD a partir do derivado benzeno dicarboxamida (Tohnishi et al., 2005) em parceria com a Bayer CropScience, foi a primeira molécula do grupo das diamidas introduzida no mercado (Tohnishi et al., 2005). Em seguida, foram desenvolvidas pela empresa DuPont as diamidas antranílicas clorantraniliprole e ciantraniliprole, as quais foram otimizadas com o terminal ftálico-2-metil-4-trifluorometil, apresentando aumento da atividade inseticida e do espectro de ação (Cordova et al., 2006). Mais recentemente, foram desenvolvidos novos quimiotipos ciclaniliprole (ISK Bioscience) e tetraniliprole (Bayer CropScience), sendo derivadas das moléculas clorantraniliprole e ciantraniliprole, respectivamente (ISKBC 2017, Richardson, 2019). Ambos os tipos de diamidas se ligam diretamente no receptor de rianodina (RyR), presente nos tecidos neuromusculares dos insetos ativando a liberação de cálcio, o qual leva a uma contração descontrolada dos músculos e, conseqüentemente, a morte do inseto (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006).

O primeiro caso de resistência a diamidas foi reportado para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Trocza et al., 2012), seguidos de relatos para diversas outras pragas-alvo, tais como *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae) (Sial et al., 2010), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Trocza et al., 2012, Ribeiro et al., 2013), *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera:

Pyralidae) (Gao et al., 2013), *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) (Owen et al., 2013), *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lai et al., 2011), *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae) (Su et al., 2012), *Adoxophyes honmai* (Yasuda) (Lepidoptera: Tortricidae) (Uchiama; Ozawa, 2014), *Cnaphalocrocis medialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) (Zhang et al., 2014), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Roditakis et al., 2015, Silva et al., 2018) e, recentemente, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Bolzan et al., 2019; Gutiérrez-Moreno, 2018).

O principal mecanismo de resistência de pragas a diamidas tem sido relacionado a mutações específicas no RyR, tais como as mutações nas posições G4946E e I4790M, baseado no genoma de *P. xylostella*, que foram inicialmente descritas em populações provenientes de Filipinas, Tailândia e China (Trocza et al., 2012; Guo et al., 2014), e posteriormente, de Índia, Taiwan, Estados Unidos da América, Japão e Coreia do Sul (Steinbach et al., 2015). Mutações similares no RyR nas posições I4790 e G4946 foram descritos para *T. absoluta* (Roditakis et al., 2017), *C. suppressalis* (Sun et al., 2018; Yao et al., 2017), e *S. exigua* (Kim et al., 2021; Zuo et al., 2020). Mutações no RyR nas posições I4790 e G4946 possuem impactos diferentes na ligação das diamidas e a resistência associadas a elas foi funcionalmente validada por ensaios de ligações utilizando radioligantes (Steinbach et al., 2015), expressão receptores mutantes em células recombinantes de insetos (Richardson et al., 2021; Trocza et al., 2015) e por edição gênica, utilizando CRISPR/Cas9 em *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (Douris et al., 2017) e *S. exigua* (Zuo et al., 2017).

A importância de aminoácidos chaves na ligação das moléculas diamidas ao RyR foi recentemente confirmado utilizando genes modificados de RyR de *P. xylostella*, em que a isoleucina na posição 4790 foi trocada por uma cisteína encontrada no RyR1 do tecido esquelético de humanos que não possui afinidade pelas diamidas. Foi observado que o RyR I4790C-mutado de *P. xylostella* funcionalmente expresso em células recombinantes Sf9 apresentou significativa redução de afinidade e eficácia a clorantraniliprole e flubendiamide (Richardson et al., 2021). Há também relatos de casos de resistência a diamidas devido à superexpressão enzimática, no entanto, apresentam baixas razões de resistência relativo à mutação no sítio de ligação (Sial e Brunner, 2012; Campos et al., 2015).

Sendo assim, a evolução da resistência por mutações específicas no RyR é a maior ameaça para a sustentabilidade de todo o grupo químico.

Apesar de os casos de resistência já reportados, os inseticidas diamidas ainda representam uma importante ferramenta no manejo de diversas pragas, principalmente lepidópteros de grande importância agrícola, tais como *S. frugiperda*. Atualmente as diamidas representam 20% de todo o mercado de inseticidas nas culturas da soja, milho e algodão no Brasil para controle de lepidópteros (BIP Spark, 2015 - 2021). *Spodoptera frugiperda* é uma das pragas de maior importância econômica, devido a sua polifagia e elevada capacidade de dano em diversos cultivos agrícolas (Nagoshi et al., 2019). Nativa das Américas e globalmente reconhecida como um dos 20 artrópodes-praga mais importantes nos cultivos agrícolas, foi recentemente reportada na África Ocidental, Central (Goergen et al., 2016), Índia (Ganiger et al., 2018) e China (Jing et al., 2019).

O controle químico e a utilização de plantas geneticamente modificadas têm sido as principais táticas utilizadas para o seu controle. No entanto, a dinâmica de cultivo de grandes culturas no Brasil aliada às condições climáticas e à utilização inadequada desses métodos contribuíram para o estabelecimento de resistência de *S. frugiperda* a diversos inseticidas e proteínas *Bt* atualmente comercializadas. Já foram relatados casos de resistência para mais de 6 diferentes grupos químicos, como piretroides (lambda-cialotrina) e organofosforados (clorpirifós) (Carvalho et al., 2013), inibidores da biosíntese de quitina (lufenurum) (Nascimento et al., 2015), espinosinas (espinosade e espinetoram) (Okuma et al., 2018; Lira et al., 2020), diamidas (clorantraniliprole) (Bolzan et al., 2019), benzoato de emamectina (Muraro et al., 2021) e a 5 proteínas inseticidas expressas em plantas geneticamente modificadas derivadas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), Cry1Ab (Omoto et al., 2016), Cry1F (Farias et al., 2014), Cry1A.105+Cry2Ab2 (Bernardi et al., 2015) e Vip3Aa20 (Bernardi et al., 2016). No entanto, ainda não se tem relato de falhas de controle relacionados a populações resistentes de campo, apesar dos níveis elevados de resistência detectados nas linhagens resistentes à diamidas de *S. frugiperda* coletadas em campo em Porto Rico (Gutiérrez-Moreno et al., 2019).

A evolução da resistência depende de vários fatores, sendo os fatores genéticos determinantes na taxa de aumento da frequência de resistência nas próximas gerações. Dentre os principais fatores genéticos estão a frequência inicial do alelo na população, o número de genes envolvidos e a dominância dessa

característica (Georghiou; Taylor, 1977). Estudos de caracterização e determinação das bases genéticas associadas a resistência a inseticidas são fundamentais para a compreensão da evolução da resistência no campo e para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de insetos (MRI) (Georghiou; Taylor, 1977). Além disso, entender o status atual da frequência de resistência a nível de campo, sua evolução ao longo dos anos e o impacto das mutações presentes nas populações na eficiência dos produtos contribuem para uma melhor implementação de programas de manejo de resistência e para análise de risco de novas moléculas desse grupo.

Considerando o cenário atual de produção agrícola no Brasil com sistemas de produção intensivos e ampla plasticidade biológica de *S. frugiperda*, o objetivo desse trabalho foi gerar subsídios para o desenvolvimento de programas de manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, visando preservar a vida útil das moléculas atualmente comercializadas e a viabilidade de novos quimiotipos. Os objetivos da presente tese foram:

- Monitorar a suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a flubendiamide e mapear a frequência alélica das mutações no receptor de rianodina associadas à resistência a diamidas;
- Selecionar linhagens de *S. frugiperda* resistentes a flubendiamide e caracterizar as bases genéticas envolvidas;
- Caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole e resistência cruzada a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* amostradas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil.

Referências

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided bt maize hybrids in brazil. **PLOS ONE**, Berkeley, v.10, 2015, e0140130. doi:10.1371/journal.pone.0140130.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F. C. L.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the VIP3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, 2016. doi:10.1002/ps.4223.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; NASCIMENTO, A.R.; KAISER, I.S.; LIRA, E.C.; AMARAL, F.S.; KANNO, R.H.; MALAQUIAS, J.B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 75, p. 2682–2689, 2019. doi:10.1002/ps.5376.

CAMPOS, M.R.; SILVA, T.B. M.; SILVA, W.M.; SILVA, J.E.; SIQUEIRA, A.A.S. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. **Pest Management Science**, Sussex, v. 71, p. 537–544, 2015.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PloS ONE**, Berkeley, v. 8 n. 4, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062268.

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

DOURIS, V.; PAPAPOSTOLOU, K.-M.; ILIAS, A.; RODITAKIS, E.; KOUNADI, S.; RIGA, M.; NAUEN, R.; VONTAS, J. Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by crispr/cas9 genome modification in *Drosophila*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 87, p. 127–135, 2017. doi:10.1016/j.ibmb.2017.06.013.

EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; LUMMEN, P.; LOBITZ, N.; SCHULTE, T.; FUNKE, C.; FISCHER R. Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca²⁺ release channels in insects. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 39, p. 21–33, 2006.

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

GANIGER, P. C.; YESHWANTH, H. M.; MURALIMOHAN, K.; VINAY, N.; KUMAR, A. R. V.; CHANDRASHEKARA, K. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. **Current Science**, Bangalore, v. 115 (4), p. 621–623, 2018.

GAO C., YAO R., ZHANG Z. WU, M., ZHANG, S., SU, J. Susceptibility baseline and chlorantraniliprole resistance monitoring in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106(5), p. 2190–2194, 2013.

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

GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMO, M. First report of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS One**, Berkeley, v. 11, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165632.

GUO, L.; LIANG, P.; ZHOU, X.; GAO, X. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 6924, 2014. doi:10.1038/srep06924.

GUTIÉRREZ-MORENO, R.; MOTA-SANCHEZ, D.; BLANCO, C.A.; WHALON, M.E.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; RODRIGUEZ-MACIEL, J.C.; DIFONZO, C. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 112, p. 792–802, 2019. doi:10.1093/jee/toy372.

JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: The Diamides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 7–14, 2013. doi:10.1002/ps.3406.

JING, D.P.; GUO, J.F.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z.; SETHI, A.; HE, K.L.; WANG, Z.Y. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. **Insect Science**, Victoria, v. 00, p. 1-11, 2019.

KIM, J.; NAM, H.Y.; KWON, M.; CHOI, J.H.; CHO, S.R.; KIM, G.-H. Novel diamide resistance-linked mutation in Korean *Spodoptera exigua* and a LAMP assay based on a mutation-associated intronic InDel. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 94, p. 1017–1029, 2021. doi:10.1007/s10340-020-01314-7.

LAI, T.; LI, J.; SU, J. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 101, p. 198–205, 2011.

LIRA, E.C.; BOLZAN, A.; NASCIMENTO, A.R.B.; AMARAL, F.A.S.; KANNO, R.H.; KAISER, I.S.; OMOTO, C. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.5812, 2020.

MURARO, D.S.; NETO, D. de O. A.; KANNO, R. H.; KAISER, I. S.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.6545, 2021.

NAGOSHI, R.N., GOERGEN, G., PLESSIS, H.D. et al. Genetic comparisons of fall armyworm populations from 11 countries spanning sub-Saharan Africa provide insights into strain composition and migratory behaviors. **Scientific Reports**, London, v.9, n. 8311, 2019. doi.org/10.1038/s41598-019-44744-9.

NASCIMENTO, A.R.B.; FARIAS, J.R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. doi:10.1002/ps.4057.

NAUEN, R. Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 690–692, 2006, doi:10.1002/ps.1254.

OKUMA, D.M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; SILVA, A.P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1441–1448, 2018. doi:10.1002/ps.4829.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 1727–1736, 2016. doi:10.1002/ps.4201.

OWEN, L., CATCHOT, A. L., MUSSER, F. R., GORE, J., COOK, D. C., JACKSON, R. Susceptibility of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to reduced-risk insecticides. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 2, p. 554-559, 2013.

RIBEIRO, R. DA S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. Universidade de São Paulo, 2014.

RICHARDSON, E. **Investigation and characterization of diamide insecticide resistance conferred by target-site mutations in the Ryanodine Receptor of lepidopteran pests**. University Wales Institute, Cardiff, 2019. F – Theses, 195p.

RICHARDSON, E.; HOMEM, R. A.; TROCZKA, B. J.; GEORGE, C. H.; EBBINGHAUS-KINTSHER, U.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R.; DAVIES, TG. E. Diamide insecticide resistance in transgenic *Drosophila* and Sf9-cells expressing a full-length diamondback moth ryanodine receptor carrying an I4790M mutation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 78, p. 869-880, 2021. doi: 10.1002/ps.6730.

RICHARDSON, E.; TROCZKA, B.J.; GUTBROD, O.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; WILLIAMSON, M.S.; GEORGE, C.H.; NAUEN, R.; DAVIES, T.G.E. Chimeric Investigations into the Diamide Binding Site on the Lepidopteran Ryanodine Receptor. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, p. 13033, 2021. doi:10.3390/ijms222313033.

RODITAKIS E., VASAKIS E., GRISPOU M., STAVRAKAKI, M., NAUEN, R., GRAVOUIL, M, BASSI, A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal Pesticide Science**, Sussex, v. 88, p. 9–16, 2015.

RODITAKIS, E.; STEIBACH, D.; MORITZ, G.; VASAKIS, E.; STAVRAKAKI, M.; ILIAS, A.; GARCIA-VIDAL, L.; MARTINEZ-AGUIRRE, M. DEL R.; BIELZA, P.; MOROU, E.; SILVA, J. E.; SILVA, W. M.; SIQUEIRA, H. A. A.; IQBAL, S.; TROCZA, B. J.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C.; TSAGKARAKU, A.; VONTAS, J.; NAUEN, R. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 80, p. 11 – 20, 2017.

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

SATTELLE, D.B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T.R. Insect Ryanodine Receptors: Molecular Targets for Novel Pest Control Chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, Sheffield, v. 8, p. 107, 2008. doi:10.1007/s10158-008-0076-4.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J.F.; DOERR, M.D. Susceptibility of *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) to two new reduced-risk insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, p.140–146, 2010.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J. F. Selection for resistance, reversion towards susceptibility and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in oblique banded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, p. 462 – 468, 2012.

SILVA, J.E.; ASSIS, C.P.O.; RIBEIRO, L.M.S.; SIQUEIRA, H.A.A. Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109 (5), p. 2190-2195, 2018.

Spark Smarter Decisions, **BIP Spark soja, milho e algodão**. Valinhos, SP, 2015 - 2021.

SPARKS, T.C.; WESSELS, F.J.; LORSBACH, B.A.; NUGENT, B.M.; WATSON, G.B. The new age of insecticide discovery-the crop protection industry and the impact of natural products. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 161, p. 12–22, 2019. doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.002.

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of Action Classification and Insecticide Resistance Management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 122–128, 2015. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014.

STEINBACH, D.; GUTBROD, O.; LUMMEN, P.; MATTHIESEN, S.; SCHORN, C.; NAUEN, R. Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamides insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 63, p. 14 – 22, 2015.

SU, J.; LAI, T.; LI, J. Susceptibility of field populations of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in China to chlorantraniliprole and the activities of detoxification enzymes. **Crop Protection**, Guildford, v. 42, p. 217–222, 2012.

SUN, Y.; XU, L.; CHEN, Q.; QIN, W.; HUANG, S.; JIANG, Y.; QIN, H. Chlorantraniliprole resistance and its biochemical and new molecular target mechanisms in laboratory and field strains of *Chilo suppressalis* (Walker). **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1416–1423, 2018. doi:10.1002/ps.4824.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; FURUYA, T.; SEO, A.; KODAMA, H.; TSUBATA, K.; FUJIOKA, S.; KODAMA, H.; HIROOKA, T.; NISHIMATSU, T. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, p. 354–360, 2005. doi:10.1584/jpestics.30.354.

TROCZKA B. J., ZIMMER C. T., ELIAS J., SCHORN, C. BASS, C., DAVIES, T. G., FIELD, L. M., WILLIAMSON, M. S., SLATER, R., NAUEN, R. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 873–880, 2012.

TROCZKA, B.J.; WILLIAMS, A.J.; WILLIAMSON, M.S.; FIELD, L.M.; LÜEMMEN, P.; DAVIES, T.G.E. Stable expression and functional characterization of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 14680, 2015. doi:10.1038/srep14680.

YAO, R.; ZHAO, D.-D.; ZHANG, S.; ZHOU, L.-Q.; WANG, X.; GAO, C.-F.; WU, S.-F. Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with special reference to diamides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 73, p. 1169–1178, 2017. doi:10.1002/ps.4439.

ZHANG, S.K.; REN, X.B.; WANG, Y.C.; Resistance in *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to new chemistry insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107(2), p. 815–820, 2014.

ZUO, Y.; WANG, H.; XU, Y.; HUANG, J.; WU, S.; WU, Y.; YANG, Y. CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 89, p. 79 – 85, 2017.

ZUO, Y.-Y.; MA, H.-H.; LU, W.-J.; WANG, X.-L.; WU, S.-W.; NAUEN, R.; WU, Y.-D.; YANG, Y.-H. Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, Beijing, v. 27, p. 791–800, 2020. doi:10.1111/1744-7917.12695.

2. MONITORAMENTO FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DA RESISTÊNCIA A FLUBENDIAMIDE EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

Resumo

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é um importante lepidóptero-praga nas Américas, e recentemente invadiu África, Índia, China e Austrália. No Brasil, *S. frugiperda* é considerada a praga mais destrutiva das culturas do milho e algodão, com diversos casos de resistência a inseticidas e proteínas provenientes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Nesse estudo foi realizado monitoramento fenotípico e genotípico da resistência a flubendiamide em mais de 70 populações de *S. frugiperda* coletadas em milho, sorgo e algodão entre as safras de 2018/19 e 2020/21 para avaliar a suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide. Em geral, a partir do monitoramento fenotípico utilizando dose diagnóstica, não foi detectada uma alteração significativa na suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide no período de 2018/19 a 2020/21, exceto para as populações do Estado da Bahia amostradas na entressafra que apresentaram sobrevivências superiores a 50% na dose diagnóstica. Resultados de F₂ screen de 31 populações amostradas em todas as regiões representativas produtoras de milho e algodão, confirmaram a estabilidade da frequência alélica associada a resistência a flubendiamide apresentando frequência média de 0,0423 (0,0364 – 0,0486) em 2018/19, 0,0275 (0,0206 – 0,0355) em 2019/20 e de 0,0375 (0,0272 – 0,0435) em 2020/21. Posteriormente, análises de genotipagem de populações do campo utilizando o ensaio de discriminação alélica TaqMan™, revelaram baixa frequência das mutações RyR I4790M/K, confirmando os resultados do monitoramento fenotípico. A mutação I4790M foi predominante nas populações de *S. frugiperda* do Brasil, sendo possível identificar a presença da mutação I4790K apenas nas populações da Bahia, Mato Grosso e São Paulo. Os resultados obtidos nesse trabalho servirão para o aprimoramento de programas de monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide.

Palavras-chave: Monitoramento fenotípico, Frequência alélica, Flubendiamide, Discriminação alélica.

Abstract

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is an important lepidopteran pest in the Americas, and recently invaded Africa, India, China and Australia. In Brazil, *S. frugiperda* is considered the most destructive pest of maize and cotton crops, with many reported cases of resistance to insecticides and *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) proteins. In this study, a phenotypic and genotypic monitoring the susceptibility to flubendiamide was performed in more than 70 field populations of *S. frugiperda* sampled in corn and cotton crops between 2018/19 and 2020/21 seasons. In general, there was no significant shift in susceptibility of *S. frugiperda* to flubendiamide, except for populations sampled in the state of Bahia during fallow seasons showing survival of >50% at diagnostic dose. Results of F₂ screen of 31 populations of *S. frugiperda* collected from major maize and cotton production confirmed that the frequency of diamide resistance alleles remained rather stable showing an average of 0.0423 in 2018/19, 0.0275 in 2019/20 and 0.0375 in 2020/21. Genotyping of field-collected samples employing a TaqMan™-based allelic

discrimination assay, revealed a low frequency of RyR I4790M/K mutations significantly, confirming the results of phenotypic monitoring of resistance. The I4790M mutation was predominant in populations of *S. frugiperda* in Brazil, and the mutation I4790K was identified only in populations of Bahia, Mato Grosso and São Paulo. The results obtained in this work can contribute for an effective implementation of resistance management strategies of *S. frugiperda* to flubendiamide

Keywords: Phenotypic monitoring, Allele frequency, Flubendiamide, Allelic discrimination.

2.1 Introdução

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das pragas de maior importância econômica, devido a sua polifagia e elevada capacidade de dano em diversos cultivos agrícolas (Nagoshi et al., 2019). Nativa das Américas e globalmente reconhecida como um dos 20 artrópodes-praga mais importantes nos cultivos agrícolas, foi recentemente reportada pela primeira vez na África Ocidental, Central (Goergen et al., 2016), Índia (Ganiger et al., 2018) e China (Jing et al., 2019). O controle químico e a utilização de plantas geneticamente modificadas têm sido as principais táticas utilizadas para o seu controle. A dinâmica de cultivo de grandes culturas no Brasil, aliada às condições climáticas e a utilização inadequada desses métodos, contribuíram para a evolução da resistência de *S. frugiperda* a diversos inseticidas e proteínas *Bt* atualmente comercializadas.

A resistência de *S. frugiperda* a inseticidas de diversos grupos de inseticidas já foram reportadas no Brasil, tais como piretroides (Diez-Rodriguez; Omoto, 2001), organofosforados (Carvalho et al., 2013), inibidores da biosíntese de quitina (Nascimento et al., 2015), espinosinas (Okuma et al., 2018; Lira et al., 2020), diamidas (Bolzan et al., 2019; Boaventura et al., 2020), benzoato de emamectina (Muraro et al., 2021) e também a proteínas *Bt*, como Cry1Ab (Omoto et al., 2016), Cry1F (Farias et al., 2014), Cry1A.105+Cry2Ab2 (Bernardi et al., 2015) e Vip3Aa20 (Bernardi et al., 2016).

Os inseticidas do grupo das diamidas, lançadas globalmente em 2006, se tornaram uma importante ferramenta no manejo integrado de pragas (MIP) devido a sua elevada eficácia de controle, ausência de resistência cruzada com outros grupos de inseticidas, baixa toxicidade e seletividade a mamíferos e insetos benéficos (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006). Atualmente as diamidas ainda se encontram

como um dos mais importantes inseticidas utilizados o controle de lepidópteros-praga no mundo (Sparks; Nauen, 2015), especialmente nas culturas da soja, milho e algodão correspondendo a mais de 20% do mercado do Brasil em 2021/22 (BIP Spark, 2015 - 2021). Atualmente são comercializadas diamidas do ácido ftálico (Tohnishi M. et al., 2005) e diamidas antranílicas (Cordova et al., 2006). Ambos os tipos de diamidas se ligam diretamente no receptor de rianodina (RyR), presente nos tecidos neuromusculares dos insetos ativando a liberação de cálcio, o qual leva a uma contração descontrolada dos músculos e conseqüentemente morte do inseto (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2007).

Devido ao seu intenso uso, já foram relatados na literatura casos de resistência a inseticidas diamidas em diversos lepidópteros pragas, que são de importância agrícola no Brasil, tais como *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Troczka et al., 2012, Ribeiro et al., 2014), *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) (Owen et al., 2013), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Roditakis et al., 2015, Silva et al., 2018) e *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019; Gutiérrez-Moreno, 2019). O principal mecanismo de resistência de pragas a inseticidas diamidas tem sido devido a mutações específicas no RyR, tais como as mutações na posição G4946E, I4790M e I4790K encontrado em *P. xylostella* (Troczka et al., 2012, Steinbach et al., 2015, Jouraku et al., 2020), G4903V e I4746T em *T. absoluta* (Roditakis et al.; 2017) e I4794M em *S. frugiperda* (Boaventura et al., 2020).

No Brasil, geralmente se praticam duas ou mais safras por ano, permitindo múltiplas gerações de pragas agrícolas e levando ao aumento da pressão de seleção com inseticidas. Dessa maneira, entender a situação atual da frequência de resistência a nível de campo, sua evolução ao longo dos anos e o impacto na eficiência dos produtos contribuem para uma melhor implementação de programas de manejo de resistência e para análise de risco de novas moléculas desse grupo. Nesse estudo foi realizado o monitoramento fenotípico e genotípico da resistência a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* coletadas em lavouras comerciais de milho e algodão entre as safras de 2018/19 e 2020/21, com o objetivo de avaliar a evolução da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide ao longo dos anos e mapear a frequência alélica e genotipagem das possíveis mutações presentes nas populações de *S. frugiperda* no Brasil.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coletas das populações de campo e criação no laboratório

As populações de *S. frugiperda* utilizadas no estudo foram coletadas nos principais Estados produtores agrícolas de soja, milho e algodão: Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul nas safras agrícolas de 2018/19 a 2020/21. Foram coletadas aproximadamente 1000 lagartas de cada localidade em diferentes culturas hospedeiras como milho, algodão não-Bt, e sorgo (Figura 2.1).



Figura 2.1. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade ao inseticida flubendiamide nas safras de 2018/19-2020/21.

2.2.2 Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide

Foram utilizadas cerca de 70 populações de campo coletadas nas safras de 2018/19 a 2020/21 (1ª e 2ª safra de 2018/19, entressafra 2018-2019, 1ª e 2ª safra de 2019/2020, entressafra de 2019-2020, 1ª e 2ª safra de 2020/21, entressafra 2020-2021 (Tabela 2.1) no monitoramento fenotípico.

As lagartas provenientes das coletas de campo foram acondicionadas em bandejas e/ou copos plásticos contendo dieta artificial (Kasten et al., 1978) e enviadas aos Laboratórios de Resistência de Artrópodes - USP/ESALQ e Manejo de Resistência FHI – Bayer S.A./Paulínia, permanecendo até o estágio de pupa. As pupas obtidas foram retiradas e acondicionadas em gaiolas PVC (policloreto de vinila, 20 cm de diâmetro x 20 cm altura) revestidos internamente com papel jornal e

com “voil” na parte superior (substratos para oviposição). As gaiolas foram colocadas sobre um prato acrílico (40 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) e para a alimentação dos adultos foi oferecida uma solução de mel em água a 10% embebida em algodão hidrófilo. A cada 2 dias as posturas foram retiradas e as gaiolas substituídas. Os ovos obtidos foram acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido (1 x 1 cm) para a manutenção da umidade e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e 12h de fotofase. As lagartas recém-eclodidas na geração F₁ foram transferidas para copos plásticos transparentes (100 mL) contendo dieta artificial, onde permaneceram até atingirem o 3º instar, estágio no qual foram utilizadas nos bioensaios.

Para o monitoramento fenotípico foram utilizados bioensaios de ingestão, mediante tratamento superficial da dieta com inseticida em placas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) contendo aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial por célula (área de 2,27 cm²). Foi utilizado o inseticida flubendiamide (Belt®, Bayer S.A.) (480 g a.i./l) na dose diagnóstica 2,38 µg i.a./cm² (CL₉₉) (Ribeiro, 2014) diluído em água destilada, e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Como tratamento testemunha foi utilizado água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%.

Nas células contendo os tratamentos foram individualizadas lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* que permaneceram se alimentando do substrato tratado por um período de 96 horas, em câmara climatizada “BOD”, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e 12h de fotofase. Após quatro dias de exposição aos produtos, foi avaliada a mortalidade de *S. frugiperda*, sendo consideradas mortas as lagartas que não apresentaram movimentos coordenados quando tocadas com uma pinça após 4 dias. A unidade experimental dos bioensaios de ingestão foi constituída de placas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ), totalizando 448 a 480 lagartas por população, sendo consideradas 16 lagartas por repetição.

Com base nos resultados obtidos no monitoramento fenotípico foram estimados a probabilidade de mortalidade e os intervalos de confiança 95% (IC 95%) para cada população testada utilizando a função *binom.probit* do pacote *binom* do programa R 3.4.1. (R Core Team, 2020). As mortalidades das populações de uma mesma safra foram agrupadas e submetidas a análise de ANOVA unilateral, sendo as médias comparadas entre si por teste de Tukey post-hoc.

Tabela 2.1. Populações utilizadas para o monitoramento fenotípico e discriminação alélica (Taqman™) da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21.

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
1ª Safra 2018/2019				
Santo Ângelo, RS	28° 06' 15,59" S	54° 25' 33,20" O	Milho	25/10/2018
Selbach, SC	28° 36' 46,93" S	52° 56' 36,06" O	Milho	25/10/2018
Toledo, PR	24° 52' 51,70" S	53° 35' 46,07" O	Milho	01/11/2018
Ponta Grossa, PR	24° 35' 05,87" S	49° 41' 47,96" O	Milho	12/11/2018
Cristalina, GO	16° 58' 49,76" S	47° 38' 28,33" O	Milho	23/11/2018
Santa Helena de Goiás, GO	17° 40' 21,56" S	50° 39' 20,32" O	Milho	18/12/2018
Chapecó, SC	27° 11' 39,01" S	52° 39' 32,00" O	Milho	01/12/2018
Luis Eduardo Magalhães, BA	11° 38' 55,13" S	45° 31' 01,10" O	Milho	04/12/2018
Araguari, MG	18° 33' 47,52" S	47° 25' 12,90" O	Milho	21/12/2018
Casa Branca, SP	21° 32' 5,49" S	47° 04' 28,92" O	Milho	21/12/2018
2ª Safra 2018/2019				
Toledo, PR	24° 38' 52,27" S	53° 42' 39,65" O	Milho	08/03/2019
Campo Mourão, PR	24° 01' 41,67" S	52° 19' 05,56" O	Milho	28/03/2019
Casa Branca, SP	21° 45' 00,69" S	47° 08' 09,39" O	Milho	02/04/2019
Araguari, MG	18° 33' 47,52" S	47° 25' 12,90" O	Milho	02/04/2019
Chapadão do Sul, MS	18° 44' 13,96" S	52° 32' 08,74" O	Milho	01/04/2019
Lucas do Rio Verde, MT	12° 55' 36,64" S	56° 03' 13,73" O	Milho	15/03/2019
Campo Verde, MT	15° 23' 14,16" S	55° 05' 46,11" O	Milho	26/04/2019
Cristalina, GO	17° 48' 24,11" S	50° 48' 12,13" O	Milho	26/04/2019
Rio Verde, GO	17° 48' 24,11" S	50° 48' 12,13" O	Milho	24/04/2019
Entressafra 2018/2019				
Casa Branca, SP	21° 54' 43,75" S	47° 08' 29,39" O	Milho	12/06/2019
Lucas do Rio Verde, MT	12° 58' 44,45" S	55° 52' 24,91" O	Milho	26/06/2019
Rio Verde, GO	17° 45' 05,85" S	50° 32' 52,03" O	Milho	26/06/2019
Correntina, BA	13° 23' 57,23" S	45° 52' 50,09" O	Milho	18/06/2019
1ª Safra 2019/2020				
Coronel Barros, RS	28°22'54,59" S	54°00'52,56" O	Milho	24/10/2019
Selbach, RS	28°38'45,28" S	53°00'17,50" O	Milho	24/10/2019
Chapecó, SC	27°11'38,11" S	52°37'31,86" O	Milho	04/12/2019
Corbélia, PR	24°50'46,36" S	53°19'10,86" O	Milho	13/11/2019
Tibagi, PR	24°27'09,86" S	50°11'24,90" O	Milho	29/10/2019
Pirassununga, SP	21°53'56,01" S	47°21'10,87" O	Sorgo	25/10/2019
Uberlândia, MG	19°10'49,32" S	48°09'16,56" O	Sorgo	07/11/2019
Santa Helena de Goiás, GO	17°45'13,68" S	50°35'12,19" O	Sorgo	20/11/2019

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
Cristalina, GO	16°27'07,21" S	47°37'48,60" O	Milho	28/11/2019
2ª Safra 2019/2020				
Casa Branca, SP	21°54'45,20" S	47°10'52,52" O	Milho	21/02/2020
Londrina, PR	23°20'26,90" S	51°14'04,60" O	Milho	10/03/2020
Cascavel, PR	24°36'26,20" S	53°17'40,60" O	Milho	06/03/2020
Mamborê, PR	24°19'04,80" S	52°35'23,70" O	Milho	06/03/2020
Dourados, MS	22°03'43,00" S	54°54'37,00" O	Milho	24/03/2020
Chapadão do Sul, MS	18°42'57',00" S	52°45'32,00" O	Milho	24/03/2020
Lucas do Rio Verde, MT	12°59'36,27" S	55°50'06,40" O	Milho	13/03/2020
Sapezal, MT	12°26'54,42" S	59°15'06,33" O	Milho	12/03/2020
Campo Verde, MT	15°32'40,28" S	55°12'09,48" O	Milho	17/03/2020
Rio Verde, GO	17°48'03,43" S	50°24'59,66" O	Milho	26/04/2020
Entressafra 2019/2020				
Campo Novo do Parecis, MT	11°42'56,16" S	55°18'44,74" O	Algodão	30/04/2020
Campo Verde, MT	15°33'53,90" S	55°11'27,20" O	Algodão	26/05/2020
Roda Velha, BA	12°40'33,56" S	45°58'00,90" O	Algodão	12/05/2020
Luis Eduardo Magalhães, BA	11°41'47,28" S	46°00'17,46" O	Algodão	15/05/2020
Jaborandi, BA	14°14'33,36" S	45°26'32,52" O	Algodão	30/05/2020
1ª Safra 2020/2021				
Santo Ângelo, RS	28°28'50,40" S	54°20'16,90" O	Milho	21/10/2020
Chapecó, SC	27°05'19,00" S	52°38'13,00" O	Milho	22/12/2020
Selbach, SC	28°38'33,70" S	52°57'05,20" O	Milho	21/10/2020
Cascavel, PR	25°02'12,48" S	53°04'12,61" O	Milho	06/11/2020
Piraí do Sul, PR	24°27'40,84" S	50°10'38,84" O	Milho	06/11/2020
Casa Branca, SP	21°48'05,46" S	46°55'54,99" O	Milho	27/10/2020
Araguari, MG	18°43'54,43" S	47°58'41,06" O	Milho	31/12/2020
Santa Helena de Goiás, GO	17°41'21,17" S	50°39'09,68" O	Milho	11/11/2020
Cristalina, GO	16°28'08,58" S	47°39'11,72" O	Milho	02/12/2020
Luis Eduardo Magalhães, BA	12°05'40,82" S	45°42'41,54" O	Milho	21/02/2021
2ª Safra 2020/2021				
Campo Mourão, PR	24°02'11,52" S	52°18'37,14" O	Milho	11/05/2021
Londrina, PR	23°19'46,21" S	51°18'19,93" O	Milho	11/05/2021
Cascavel, PR	24°21'51,21" S	53°33'38,10" O	Milho	04/05/2021
Dourados, MS	22°11'49,02" S	54°42'42,98" O	Milho	04/05/2021
Chapadão do Sul, MS	18°43'55,58" S	52°30'48,33" O	Milho	08/04/2021
Lucas do Rio Verde, MT	13°01'51,74" S	55°53'52,28" O	Milho	14/04/2021
Sapezal, MT	13°28'52,18" S	59°16'16,98" O	Milho	23/03/2021
Campo Verde, MT	15°15'13,70" S	55°02'23,27" O	Milho	23/03/2021
Rio Verde, GO	17°48'03,43" S	50°24'59,66" O	Milho	08/04/2021

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
Entressafra 2020/2021				
São Desidério, BA	12° 40'33,56" S	45°58'00,90" O	Algodão	23/06/2021

2.2.3 Frequência de alelos associados à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

A frequência alélica associada a resistência de *S. frugiperda* ao inseticida flubendiamide foi estimada e monitorada utilizando a metodologia de F₂ screen (Andow; Alstad, 1998). Foram monitoradas populações coletadas nas segunda safras de milho nos Estados de importância agrícola para a cultura. Para isso, foram coletadas aproximadamente 1000 lagartas de cada localidade e enviadas ao laboratório da Bayer S.A./Paulínia. As lagartas coletadas no campo foram mantidas em dieta artificial até a fase de pupa. Posteriormente, as pupas foram separadas por sexo e individualizadas em copos plásticos (25 mL) invertidos sobre um papel filtro umedecido permanecendo até a emergência dos adultos.

Após a emergência, os adultos virgens foram separados em casais e acondicionados em gaiolas confeccionadas com copos plásticos transparentes (500 mL) (um casal por gaiola). Foi oferecida uma solução de mel em água a 10% embebida em algodão hidrófilo para a alimentação dos adultos. A cada 2 dias as posturas foram retiradas e as gaiolas substituídas. Cada casal representou uma isofamília e sua descendência foi criada separadamente das demais. Os ovos obtidos de cada isofamília foram acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido (1 × 1 cm) para a manutenção da umidade e mantidos em sala climatizada a 25 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 12 h.

Após a eclosão das lagartas, aproximadamente 100 indivíduos de cada isofamília foram criadas em bandejas plásticas de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brazil) contendo dieta artificial (1 lagarta/célula). Após a obtenção das pupas, elas foram retiradas e acondicionadas separadamente por isofamília em gaiolas cilíndricas de PVC (21 cm de altura × 14 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel do tipo sulfite e fechadas na parte superior com placas de petri para acasalamento entre indivíduos da geração F₁. Cento e vinte e oito lagartas de 3^o instar de cada isolinha proveniente dos cruzamentos de F₂ screen (geração F₂) foram submetidas a ensaios de tratamento superficial em dieta utilizando a dose

discriminatória definidos nos estudos de herança para flubendiamide de 74 µg i.a./cm². Foram consideradas isolinhas positivas, as isolinhas que obtiveram indivíduos F₂ sobreviventes após 96h, chegando até a fase de pupa. Foram utilizadas um total de 31 populações amostradas nas safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21 (Tabela 2.2).

Os dados oriundos do monitoramento em F₂ screen foram analisados pela inferência Bayesiana (Brunk, 1975) para estimar a frequência do alelo resistente, com um intervalo de confiança de 95%:

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

Sendo p frequência de alelos resistentes testadas, N o número de isolinhas testadas e S o número de isolinhas positivas. Nessa análise foi considerado o modelo para fêmeas e machos coletados antes do acasalamento (Andow; Alstad, 1998). Foi considerado para o modelo a hipótese de distribuição uniforme do alelo de resistência na população, acasalamento ao acaso e resistência monogênica. Os IC 95% foram estimados utilizando a função *binom.bayes* do pacote *binom* no programa R 3.4.1 (R Core Team, 2020). As frequências agrupadas do alelo de resistências nas populações de *S. frugiperda* entre as safras foram comparadas por ANOVA unilateral e as médias comparadas por teste de Tukey's post-hoc.

Tabela 2.2. Populações utilizadas para estimativa da frequência alélica (F₂ Screen) do alelo que confere resistência a flubendiamide em populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21.

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
2ª Safra 2018/2019				
Tasso Fragoso, MA	07°49'33,8" S	46°00'22,6" O	Milho	25/04/2019
Luis Eduardo Magalhães, BA	13°19'31,6" S	46°05'57,3" O	Milho	15/02/2019
Campo Verde, MT	15°30'53,0" S	55°12'25,0" O	Milho	22/03/2019
Lucas do Rio Verde, MT	12°48'15,0" S	56°25'40,0" O	Milho	29/03/2019
Chapadão do Sul, MS	18°42'52,6" S	52°36'23,5" O	Milho	09/05/2019
Ponta Porã, MS	22°24'50,9" S	55°19'18,4" O	Milho	09/05/2019
Rio Brilhante, MS	21°42'37,4" S	54°39'09,8" O	Milho	15/05/2019
Rio Verde, GO	17°48'49,8" S	50°39'30,2" O	Milho	19/03/2019
Araguari, MG	18°40'23,9" S	48°09'27,1" O	Milho	05/04/2019
Casa Branca, SP	21°50'03,8" S	46°58'50,7" O	Milho	14/05/2019
Campo Mourão, PR	23°45'24,9" S	52°13'10,9" O	Milho	04/04/2019

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
Londrina, PR	22°55'35,5" S	50°54' 3,6" O	Milho	04/04/2019
2ª Safra 2019/2020				
Serra do Coceiral, BA	10°37'53,5" S	45°45' 59,7" O	Milho	10/06/2020
Campo Verde, MT	15°38'25,7" S	55°14'44,9" O	Milho	30/04/2020
Lucas do Rio Verde, MT	13°17'24,5" S	55°38'50,9" O	Milho	27/04/2020
Maracaju, MS	22°09'32,5" S	54°38'42,5" O	Milho	15/05/2020
Ponta Porã, MS	22°27'08,0" S	55°20'33,0" O	Milho	20/05/2020
Formosa, GO	14°55'46,2" S	47°35'54,9" O	Milho	16/01/2020
Araguari, MG	23°45'24,9" S	48°09'27,1" O	Milho	05/05/2020
Casa Branca, SP	21°48'18,1" S	47°10'57,0" O	Milho	03/06/2020
Campo Mourão, PR	24°19'04,8" S	52°35'23,7" O	Milho	06/03/2020
Londrina, PR	22°59'31,7" S	51°00'34,0" O	Milho	04/04/2020
2ª Safra 2020/21				
Balsas, MA	07°49'33,8" S	46°00'22,6" O	Milho	14/05/2021
Campo Verde, MT	15°30'53,0" S	55°12'25,0" O	Milho	25/05/2021
Lucas do Rio Verde, MT	12°48'15,0" S	56°25'40,0" O	Milho	14/05/2021
Maracaju, MS	22°55'35,5" S	54°39'09,8" O	Milho	14/05/2021
Ponta Porã, MS	22°24'50,9" S	55°19'18,4" O	Milho	15/05/2021
Rio Verde, GO	17°48'49,8" S	50°39'30,2" O	Milho	28/05/2021
Araguari, MG	23°45'24,9" S	48°09'27,1" O	Milho	12/11/2020
Campo Mourão, PR	18°40'23,9" S	52°13'10,9" O	Milho	14/06/2021
Londrina, PR	21°42'37,0" S	50°54'03,6" O	Milho	24/05/2021

2.2.4 Discriminação alélica e mapeamento da frequência dos genótipos I4790, M4790, K4790 associadas à resistência *S. frugiperda* a diâmidas no Brasil

Para os ensaios de discriminação alélica dos genótipos I4790, M4790, K4790 associadas à resistência de *S. frugiperda* a diâmidas foram analisadas amostras de DNA de 10 a 20 indivíduos provenientes de populações de campo utilizadas no monitoramento fenotípico (Tabela 2.3) das safras 2018/19 a 2020/21, totalizando em 64 locais e 1182 indivíduos.

As mariposas provenientes das lagartas coletadas em campo (F_0) ainda vivas, foram acondicionadas em ultrafreezer -80°C até extração de DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando a metodologia CTAB adaptada por Doyle & Doyle (1987) e armazenados a -20°C até sua utilização. A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando Taqman™ PCR Master Mix em um sistema Applied Biosystems ViiA™7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, cidade de Foster, CA). As

reações foram realizadas usando 1 µl de DNA 50 ng/µl, 5 µl Taqman™ PCR Master Mix, 20 µM de cada primer (direto e reverso), 0,25 µl de sonda 10 ng/µl e água livre de nuclease até completar o volume final de 10 µL da reação. As reações de amplificação foram conduzidas a 95°C por 10 min (1x), seguidas por 50 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 90s.

Os iniciadores e sonda visando identificação dos genótipos I4790 e M4790 utilizados nos ensaios de fluorescência por Taqman™ foram obtidos no trabalho de Boaventura et al. (2019), e a sonda utilizada para identificação do genótipo K4790 foi desenvolvida nesse trabalho.

Tabela 2.3. Iniciadores e sondas utilizados nos ensaios de fluorescência por Taqman™ para discriminação alélica da resistência de *Spodoptera frugiperda* a diamidas.

Iniciador	Sequência
Sf.taq_4790_F	5'-ACGACGATGCACTAGAAG-3'
Sf.taq_4790_R	5'-CACCTTGAGATGATAGTACC-3'
Sf.I4790_sus_FAM	5'-[FAM]TGTCGCTCGCTATACTCATCG[BHQ1]-3'
Sf. M4790_mut_VIC	5'-[6VIC]CTCGCTATGCTCATCGGGT[BHQ1]-3'
Sf. K4790_mut_VIC	5'-[6VIC]TGCTCGCTAACTCATCGGGT[BHQ1]-3'

A frequência alélica dos genótipos I4790, M4790 e K4790 foram calculadas considerando o princípio de Hardy-Weinberg (Phillip, 2010-2011) e analisadas segundo o teste de qui-quadrado.

$$F = \frac{(2n.RR + n.RS)}{2(n.RR + n.RS + n.SS)}$$

Onde *n* corresponde ao número de indivíduos testados e *RR*, *RS* e *SS* a frequência de indivíduos com determinado genótipo em cada população.

As médias da frequência alélica do genótipo suscetível I4790 de *S. frugiperda* entre as safras foram comparadas por ANOVA unilateral e as médias comparadas por teste de Tukey's post-hoc.

2.3 Resultados

2.3.1 Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a flubendiamide

O monitoramento da suscetibilidade realizado com o inseticida flubendiamide na 1ª safra de 2018/19 apresentou mortalidade variando entre 100,00% (99,23 –

100,00%) para a população de Santo Ângelo (RS) a 59,38% (54,93 – 63,70%) para a população de Luis Eduardo Magalhães (BA) (Tabela 2.4). Na primeira safra de milho do ano agrícola de 2018/19, as populações de *S. frugiperda* coletadas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo apresentaram menores sobrevivência, indicando uma elevada suscetibilidade a flubendiamide. Em contrapartida, regiões produtoras de sementes de milho como Araguari (MG) com 78,75% (74,91 – 82,22%) de mortalidade e regiões produtoras de algodão como Cristalina, Santa Helena de Goiás e Luis Eduardo Magalhães apresentaram menores controles. Durante a segunda safra a mortalidade das populações diminuiu para a região de Casa Branca (SP) apresentando 86,88% (83,61 – 89,66%) e Toledo (PR) 75,79% (71,90 – 79,37%), mas se manteve-se estável nas demais regiões (Tabela 2.4). As menores sobrevivências na segunda safra foram observadas para as regiões de Rio Verde (GO), Lucas do Rio Verde (MT) e Toledo (PR) chegando a 75,79% de mortalidade. Na entressafra de 2018/19 ainda foi observado uma menor mortalidade nas populações coletadas em Correntina (BA) com 75,00% (70,97 – 78,71%), seguida das populações de Lucas do Rio Verde (MT) com 84,79% (81,35 – 87,78%), Rio Verde (GO) com 86,46% (83,16 – 89,29%) e Casa Branca (SP) apresentando elevada suscetibilidade com 97,71% (96,00 – 98,76%) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Mortalidade de lagartas de 3º instar de populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante as safras de 2018/19, 2019/20, 2020/21 submetidas a ensaios de ingestão por aplicação superficial na dieta de flubendiamide utilizando dose diagnóstica (2,38 µg i.a./cm²).

Cidade, UF	Número de lagartas		Mortalidade (%) 2,38 µg i.a./cm ² (IC 95%)
	Testadas	Mortalidade	
1ª Safra 2018/19			
Araguari, MG	480	378	78,75 (74,91 - 82,22)
Casa Branca, SP	480	470	97,92 (96,26 - 98,90)
Chapecó, SC	480	457	95,21 (92,97 - 96,83)
Cristalina, GO	480	406	84,58 (81,13 - 87,59)
Luis Eduardo Magalhães, BA	480	285	59,38 (54,93 - 63,70)
Ponta Grossa, PR	504	492	97,62 (95,94 - 98,67)
Santa Helena de Goiás, GO	480	380	79,17 (75,35 - 82,61)
Santo Ângelo, RS	480	480	100,0 (99,23 - 100,0)
Selbach, RS	480	476	99,17 (97,91 - 99,70)
Toledo, PR	480	460	95,83 (93,71 - 97,33)
2ª Safra 2018/19			

Cidade, UF	Número de lagartas		Mortalidade (%) 2,38 µg i.a./cm ² (IC 95%)
	Testadas	Mortalidade	
Araguari, MG	480	460	95,83 (97,33 - 93,71)
Campo Mourão, PR	480	462	96,25 (94,21 - 97,66)
Campo Verde, MT	480	436	90,83 (87,98 - 93,15)
Casa Branca, SP	480	417	86,88 (83,61 - 89,66)
Chapadão do Sul, MS	552	526	95,29 (93,24 - 96,81)
Cristalina, GO	480	460	95,83 (93,71 - 97,33)
Dourados, MS	480	453	94,38 (92,00 - 96,16)
Lucas do Rio Verde, MT	480	365	76,04 (72,06 - 79,69)
Rio Verde, GO	480	367	76,46 (72,50 - 80,08)
Sapezal, MT	480	386	80,42 (76,67 - 83,77)
Toledo, PR	504	382	75,79 (71,90 - 79,37)
Entressafra 2018/2019			
Casa Branca, SP	480	469	97,71 (96,00 - 98,76)
Correntina, BA	480	360	75,00 (70,97 - 78,71)
Lucas do Rio Verde, MT	480	407	84,79 (81,35 - 87,78)
Rio Verde, GO	480	415	86,46 (83,16 - 89,29)
1ª Safra 2019/20			
Chapecó, SC	480	474	98,75 (97,35 - 99,46)
Corbélia, PR	480	470	97,92 (96,26 - 98,90)
Coronel Barros, RS	96	95	98,96 (94,24 - 99,88)
Cristalina, GO	528	410	77,65 (73,94 - 81,04)
Pirassununga, SP	480	448	93,33 (90,80 - 95,29)
Santa Helena de Goiás, GO	480	406	84,58 (81,13 - 87,59)
Selbach, RS	480	449	93,54 (91,04 - 95,46)
Tibagi, PR	456	416	91,23 (88,34 - 93,55)
Uberlândia, MG	480	471	98,13 (96,53 - 99,05)
2ª Safra 2019/20			
Campo Verde, MT	456	402	88,16 (84,93 - 90,87)
Casa Branca, SP	456	414	90,79 (87,84 - 93,17)
Cascavel, PR	480	475	98,96 (97,63 - 99,59)
Chapadão do Sul, MS	480	465	96,88 (94,97 - 98,14)
Dourados, MS	480	472	98,33 (96,80 - 99,19)
Londrina, PR	480	475	98,96 (97,63 - 99,59)
Lucas do Rio Verde, MT	480	463	96,46 (94,46 - 97,82)
Mamborê, PR	480	480	100,0 (99,23 - 100,0)
Rio Verde, GO	456	447	98,03 (96,35 - 99,00)
Sapezal, MT	552	429	77,72 (74,10 - 81,03)
Entressafra 2019/20			

Cidade, UF	Número de lagartas		Mortalidade (%) 2,38 µg i.a./cm ² (IC 95%)
	Testadas	Mortalidade	
Campo Novo do Parecis, MT	480	451	93,96 (91,52 - 95,81)
Campo Verde, MT	480	447	93,13 (90,56 - 95,12)
Jaborandi, BA	480	345	71,88 (67,72 - 75,75)
Luis Eduardo Magalhães, BA	480	368	76,67 (72,72 - 80,28)
Roda Velha, BA	480	213	44,38 (39,97 - 48,85)
1ª Safra 2020/21			
Araguari, MG	480	428	89,17 (86,12 - 91,70)
Casa Branca, SP	480	466	97,08 (95,22 - 98,30)
Cascavel, PR	480	479	99,79 (98,76 - 99,98)
Chapecó, SC	480	471	98,13 (96,53 - 99,05)
Cristalina, GO	480	410	85,42 (82,03 - 88,35)
Luis Eduardo Magalhães, BA	480	224	46,67 (42,23 - 51,14)
Piraí do Sul, PR	480	480	100,0 (99,23 - 100,0)
Santa Helena de Goiás, GO	432	415	96,06 (93,85 - 97,58)
Santo Ângelo, RS	480	471	98,13 (96,53 - 99,05)
Selbach, SC	480	478	99,58 (98,50 - 99,91)
2ª Safra 2020/21			
Campo Mourão, PR	480	449	93,54 (91,04 - 95,46)
Campo Verde, MT	480	319	66,46 (62,14 - 70,57)
Casa Branca, SP	480	460	95,83 (93,71 - 97,33)
Cascavel, PR	480	472	98,33 (96,80 - 99,19)
Chapadão do Sul, MS	480	403	83,96 (80,46 - 87,02)
Dourados, MS	480	468	97,50 (95,74 - 98,61)
Londrina, PR	480	469	97,71 (96,00 - 98,76)
Lucas do Rio Verde, MT	480	431	89,79 (86,82 - 92,25)
Rio Verde, GO	480	374	77,92 (74,03 - 81,45)
Sapezal, MT	480	456	95,00 (92,73 - 96,67)
Entressafra 2020/21			
São Desidério, BA	452	392	13,20 (10,30 - 16,55)

Na primeira safra de 2019/20, as populações amostradas apresentaram elevada suscetibilidade ao inseticida flubendiamide na maioria das localidades amostradas (Tabela 2.4). As menores mortalidades foram observadas no Estado de Goiás, Cristalina (GO) com 77,65% (73,94 – 81,04%) e Santa Helena do Goiás com 84,58% (81,13 – 87,59%), no entanto não diferiram quanto aos resultados observados em 2018/19 (Tabela 2.4, Figura 2.2). Para as demais localidades amostradas a suscetibilidade observada foi alta, variando entre 98,96% (94,24 –

99,88%) para Coronel Barros (RS) a 91,23% (88,34 – 93,55%) para Tibagi (PR). Nas populações amostradas durante a segunda safra, a suscetibilidade manteve-se elevada, com baixa sobrevivência para a maioria das populações. As maiores sobrevivências foram observadas para as populações coletadas no Estado do Mato Grosso, com mortalidade de 77,72% (74,10 – 81,03%) em Sapezal e 88,16% (84,93 – 90,87%) em Campo Verde. No entanto, ao realizar amostragem de populações na entressafra de 2019/20, coletando populações de *S. frugiperda* na cultura do algodão, observamos uma baixa mortalidade nas populações coletadas na Bahia com 44,38% (39,97 – 48,85%) de sobrevivência em Roda Velha, 71,88% (67,72 – 75,75%) em Jaborandi e 76,67% (72,72 – 80,28%) em Luis Eduardo Magalhães (Tabela 2.4).

Na primeira safra de 2020/21, as populações coletadas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo continuaram apresentando elevada suscetibilidade ao inseticida flubendiamide, com sobrevivência de até 2,92% em Casa Branca (SP) (Tabela 2.4). As menores mortalidades foram relatadas para as regiões de Araguari (MG) com 89,17% (86,12 – 91,70%), Cristalina (GO) com 85,42% (82,03 – 88,35%) e Luis Eduardo Magalhães (BA) com 46,67% (42,23 – 51,14%). Na segunda safra, todas as populações amostradas no Estado do Paraná continuaram apresentando elevada suscetibilidade, com valores de mortalidade de no mínimo 93,54% (91,04 – 95,46%) para a população de Campo Mourão. As menores mortalidades foram observadas para os Estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás com sobrevivência variando entre 89,79% (86,82% - 92,25%) em Lucas do Rio Verde, a 66,46% (62,14 – 70,57%) para Campo Verde (MT). Já na entressafra, a sobrevivência observada para a população coletada em São Desidério (BA) na cultura do algodão apresentou baixa suscetibilidade, com 13,20% (10,30 – 16,55%) de mortalidade (Tabela 2.4).

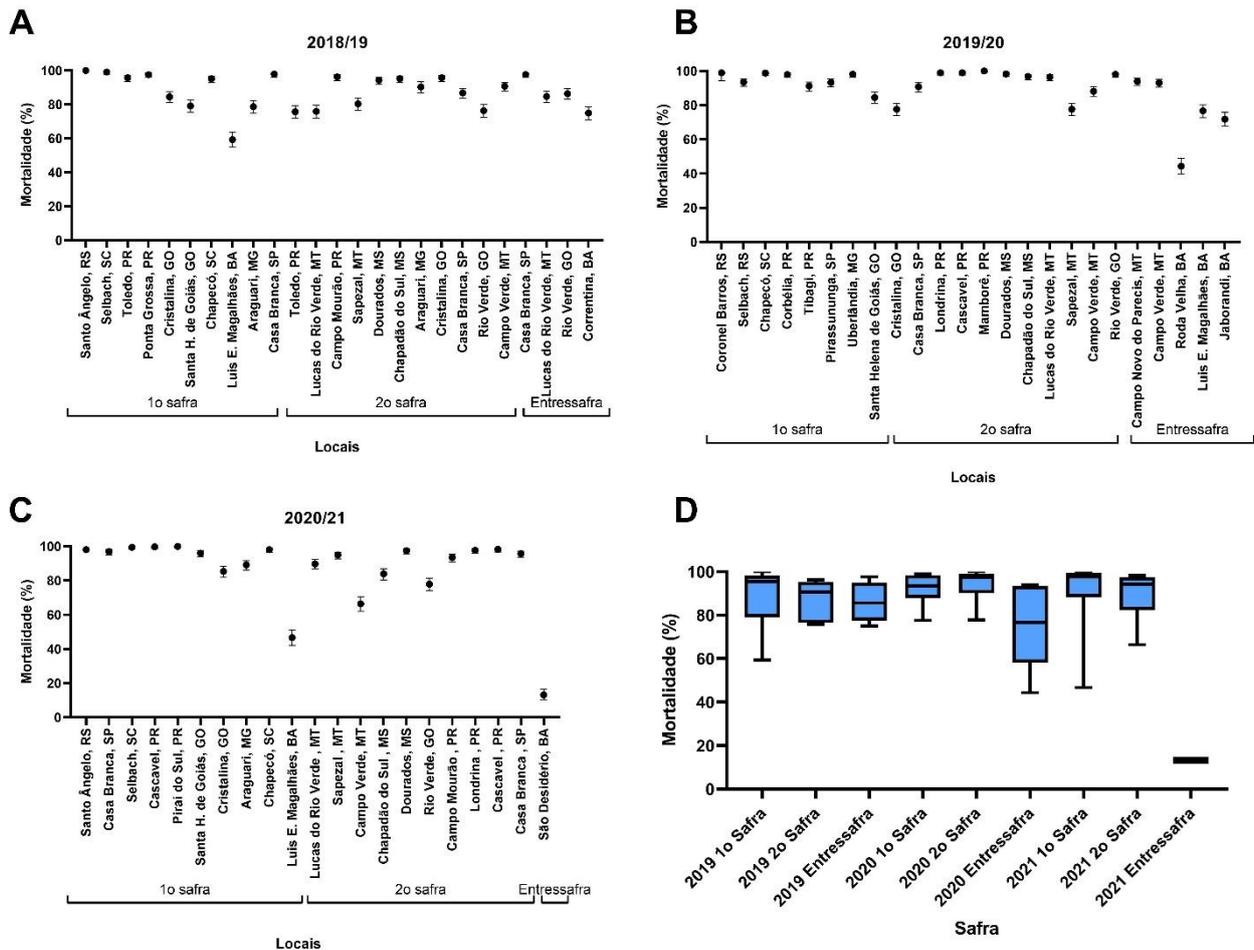


Figura 2.2. Monitoramento fenotípico de populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante as safras de 2018/19 (A), 2019/20 (B), 2020/21 (C) e um resumo da suscetibilidade de cada safra (D) utilizando a dose diagnóstica de flubendiamide ($2,38 \mu\text{g i.a./cm}^2$) em ensaios de aplicação superficial em dieta.

Ao agruparmos as populações de acordo com a safra agrícola em que foram amostradas, verificamos que não há diferença significativa entre elas ($F = 0,18$, $gl = 63$, $P = 0,8279$), e que a suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide vem se mantendo estável ao longo dos anos (Figura 2.3).

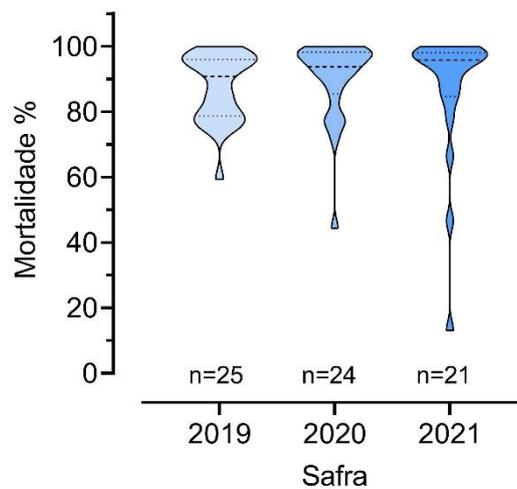


Figura 2.3. Mortalidade das populações de *Spodoptera frugiperda* na dose diagnóstica de flubendiamide (bioensaios de aplicação superficial na dieta 2,38 μg i.a. flubendiamide/ cm^2) em 70 populações, amostradas nas safras 2019 (2018/19), 2020 (2019/2020) e 2021 (2020/21).

2.3.2 Frequência de alelos associados à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

Um total de 1972 isolinhas provenientes de 31 populações brasileiras de *S. frugiperda* durante as safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21 foram coletadas nos Estados da Bahia, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná.

Na safra de 2018/19 foram testadas um total de 1044 isolinhas, sendo observado 176 isolinhas positivas. Dentre as populações testadas, foi verificada uma variação de 0,0119 (0,0015 – 0,0330) para Ponta Porã (MS) a 0,1023 (0,0729 – 0,1359) para Luis Eduardo Magalhães (BA). A maior frequência de alelo de resistência na população foi observada para Luis Eduardo Magalhães (BA), seguido das populações de Rio Verde (GO), Campo Verde (MT), Rio Brilhante (MS), Araguari (MG) e Londrina (PR), apresentando frequências variando entre 0,0482 (0,0279 – 0,0734) a 0,0577 (0,0328 – 0,0891). Em geral, a frequência do alelo que confere referência a flubendiamide no Brasil foi de 0,0423 (0,0364 – 0,0486%) na safra de 2018/19 (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Frequência estimada de alelos associados à resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2018/19.

Safra 2018/19 Locais	No. Testados		F ₂ isolinhas positivas	Frequência alelo R	IC 95%
	F ₂ isolinhas	Lagartas			
Casa Branca, SP	122	9985	5	0,0121	0,0045 - 0,0234
Luis Eduardo Magalhães, BA	86	8801	35	0,1023	0,0729 - 0,1359
Rio Verde, GO	141	12758	27	0,0489	0,0328 - 0,0681
Campo Verde, MT	127	11713	24	0,0485	0,0317 - 0,0685
Lucas do Rio Verde, MT	102	8455	9	0,0240	0,0116 - 0,0408
Araguari, MG	64	6188	15	0,0606	0,0352 - 0,0924
Rio Brilhantes, MS	81	9074	15	0,0482	0,0279 - 0,0734
Campo Mourão, PR	99	10307	15	0,0396	0,0228 - 0,0606
Londrina, PR	63	6514	14	0,0577	0,0328 - 0,0891
Tasso Fragoso, MA	91	9765	15	0,0430	0,0248 - 0,0658
Ponta Porã, MS	40	4138	1	0,0119	0,0015 - 0,0330
Chapadão do Sul, MS	28	3562	1	0,0167	0,0021 - 0,0460
Brasil	1044	101260	176	0,0423	0,0364 - 0,0486

Em 2019/20 foram testadas um total de 459 isolinhas, sendo observado 60 isolinhas positivas. A população que apresentou maior frequência do alelo que confere resistência foi a população coletada no Estado de São Paulo, no município de Casa Branca (SP), com 0,1112 (0,0560 – 0,1766) de frequência e a população com menor frequência foi observada no Estado do Mato Grosso no município de Lucas do Rio Verde (MT) com 0,0068 (0,0002 – 0,0249). Foi observada uma diminuição significativa na frequência do alelo de resistência para a região de Londrina apresentando 0,0070 (0,0002 - 0,0256) e Campo Mourão (PR) 0,0098 (0,0027 – 0,0214) em comparação com a safra anterior (Tabela 2.6). Para as demais localidades amostradas, não houve diferença significativa na frequência do alelo de resistência na população. Pela análise conjunta, a frequência do alelo resistente no Brasil foi estatisticamente semelhante ao observado na safra passada, apresentando uma frequência de 0,0275 (0,0206 - 0,0355) (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Frequência estimada do alelo associado à resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2019/20.

Safra 2019/20 Locais	No. Testados		F ₂ isolinhas positivas	Frequência alelo R	IC 95%
	F ₂ isolinhas	Lagartas			
Serra do Coceiral, BA	65	3884	17	0,0635	0,0376 - 0,0955
Campo Verde, MT	10	613	1	0,0210	0,0006 - 0,0759
Lucas do Rio Verde, MT	35	972	1	0,0068	0,0002 - 0,02492
Maracaju, MS	29	2034	6	0,0485	0,0182 - 0,0924
Ponta Porã, MS	105	5403	9	0,0211	0,0097 - 0,0366
Formosa, GO	56	3260	8	0,0345	0,0151 - 0,0615
Araguari, MG	2	144	1	0,0630	0,0018 - 0,0892
Casa Branca, SP	25	2485	12	0,1112	0,0599 - 0,1766
Campo Mourão, PR	100	6763	4	0,0098	0,0027 - 0,0214
Londrina, PR	34	1663	1	0,0070	0,0002 - 0,0256
Brasil	461	27221	60	0,0275	0,0206 - 0,0355

O mesmo padrão foi observado no monitoramento genotípico da safra 2020/21, a qual apresentou uma frequência de 0,0375 (0,0272 – 0,0435) na análise conjunta das populações (Tabela 2.7). As maiores frequências foram observadas para Balsas (MA) com 0,0904 (0,0538 - 0,1352), seguido de Rio Verde com 0,0671 (0,0342 - 0,1099) e Lucas do Rio Verde com 0,0560 (0,0318 - 0,0864). Em contrapartida, as menores frequências foram observadas para Ponta Porã (MS) com 0,0046 (0,0001 - 0,0171), Londrina com 0,00103 (0,0028 - 0,0225) e Araguari (MG) com 0,0179 (0,0037 - 0,0427) (Tabela 2.7). Apenas a população de Lucas do Rio Verde apresentou aumento significativo na frequência do alelo na população amostrada em comparação à safra anterior.

Tabela 2.7. Frequência estimada de alelos associados à resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em populações coletadas no Brasil na safra 2020/21.

Safra 2020/21 Locais	No. Testados		F ₂ isolinhas positivas	Frequência alelo R	IC 95%
	F ₂ isolinhas	Lagartas			
Balsas, MA	45	3153	16	0,0904	0,0538 - 0,1352
Campo Verde, MT	43	3547	4	0,0278	0,0092 - 0,0562
Lucas do Rio Verde, MT	65	3066	14	0,0560	0,0318 - 0,0864
Maracaju, MS	50	3229	6	0,0337	0,0137 - 0,0620
Ponta Porã, MS	52	2315	0	0,0046	0,0001 - 0,0171
Rio Verde, GO	39	6971	10	0,0671	0,0342 - 0,1099
Araguari, MG	40	3187	2	0,0179	0,0037 - 0,0427
Campo Mourão, PR	40	4885	4	0,0298	0,0098 - 0,0603
Londrina, PR	95	4574	3	0,0103	0,0028 - 0,0225
Brasil	469	34927	59	0,0375	0,0272 - 0,0435

Com base na análise dos resultados de cada safra, não foram observadas alterações significativas na frequência do alelo associado à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide nas populações amostradas ($F = 0,10$, $gl = 30$, $P = 0,9056$) (Figura 2.4).

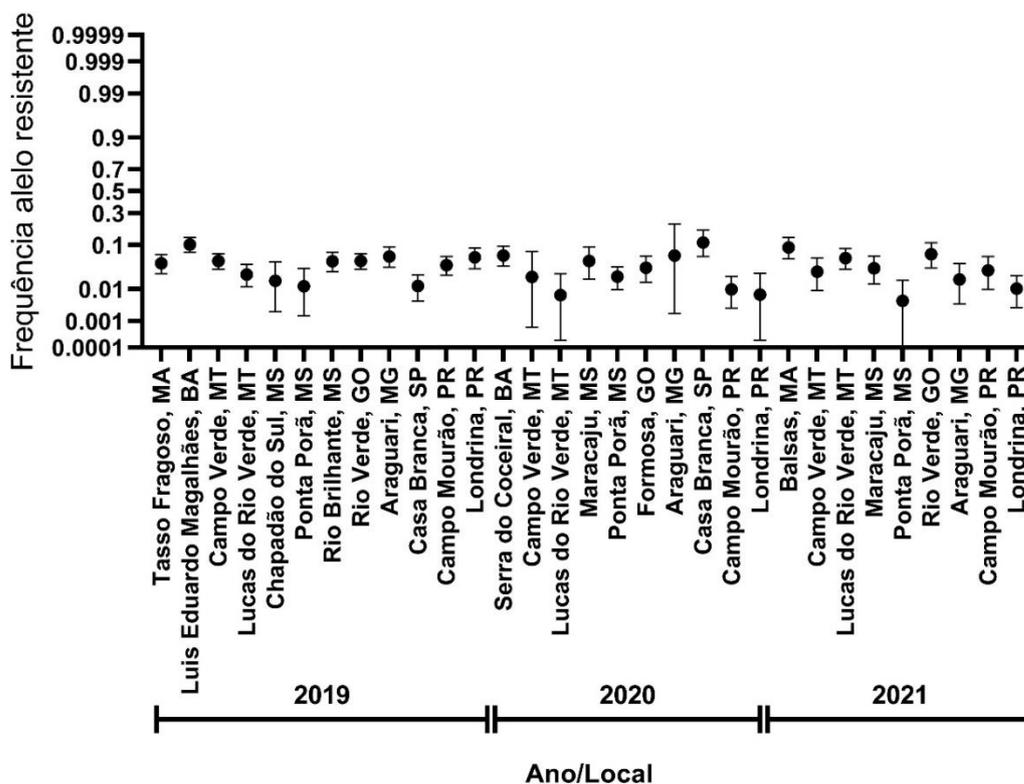


Figura 2.4. Frequência estimada dos alelos associados à resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide utilizando a metodologia de F₂ screen. No total, 1044, 461 e 469 isolinhas foram testadas nas safras de 2018/19, 2019/20 e 2020/21, respectivamente.

2.3.3 Discriminação alélica e mapeamento da frequência dos genótipos I4790, M4790, K4790 associadas a resistência *S. frugiperda* a diamidas no Brasil

Na primeira safra de 2018/19 o genótipo heterozigoto 4790 I/M foi predominante nas populações amostradas e apresentou uma frequência de 24% na população de Luis Eduardo Magalhães (BA), 17% em Santa Helena de Goiás (GO), 10% em Araguari e 5% em Casa Branca. Apenas a população de Luis Eduardo Magalhães apresentou indivíduos homozigotos 4790 M/M na frequência de 5% de ocorrência. Na segunda safra foram observadas frequências de indivíduos heterozigotos para a mutação 4790 I/M nas localidades de Rio Verde (GO), Lucas do Rio Verde, Campo Verde e Sapezal (MT), Chapadão do Sul e Dourados (MS) e Casa Branca (SP) com frequência variando entre 5% e 25% (Tabela 2.8). Já na entressafra, foi observado uma redução na frequência do alelo resistente nas populações amostradas no Mato Grosso, apresentando apenas 5% de indivíduos heterozigotos e uma estabilidade para a população de Santa Helena de Goiás (GO), com uma frequência semelhante a observada para a população amostrada na primeira safra. No entanto, para a população amostrada em Correntina (BA), foi observado a presença dos genótipos 4790 I/K com 5% de frequência, 4790 I/M com 16% e 4790 M/M com 10% de frequência, apresentando um total de 31% de frequência do alelo de resistência nos indivíduos amostrados (Tabela 2.8).

Em 2019/20, foi observado uma menor frequência do alelo resistente nas populações amostradas durante a primeira safra, sendo observado a presença de heterozigotos em Uberlândia com 5% de frequência, Pirassununga (SP), Tibagi (PR) com 10% cada e Luis Eduardo Magalhães com 5% de indivíduos heterozigotos no genótipo 4790 I/K e 5% de indivíduos homozigotos para o genótipo 4790 K/K (Tabela 2.8). Na segunda safra, foi observado a presença de 10% de heterozigotos 4790 I/M nas populações de Lucas do Rio Verde, 13% em Cascavel (PR) e 27% em Casa Branca (SP). Ainda, em Casa Branca, foi observado a presença de 7% de indivíduos homozigotos 4790 M/M e 7% de indivíduos heterozigotos 4790 I/K. Nas populações amostradas na entressafra, foi observado a mutação I4790M em todas as populações amostradas, variando entre 10% e 15% para indivíduos heterozigotos e 5% a 10% de indivíduos homozigotos (Tabela 2.8).

A mesma tendência observada nas safras anteriores foi observada na frequência alélica dos indivíduos amostrados durante a primeira safra de 2020/21,

com três populações apresentando o alelo de resistência, sendo observada a presença de heterozigotos 4790 I/M em Santa Helena de Goiás (GO) e Araguari (MG) com 5% de frequência, Luis Eduardo Magalhães (BA) com 10% de indivíduos heterozigotos e 10% de indivíduos homozigotos. A mutação I4790K foi observada em heterozigose na população de Casa Branca (5%) e Luis Eduardo Magalhães (10%). Na segunda safra foi observada a presença da mutação I4790M nas populações de Chapadão do Sul (MS), Rio Verde (GO), Lucas do Rio Verde (MT), Sapezal (MT), Campo Verde (MT), Cascavel (PR) e Luis Eduardo Magalhães (BA) (Tabela 2.8). Já a mutação I4790K foi observada apenas na população de Casa Branca. Na população de São Desidério amostrada na entressafra de 2020/21, foi observada uma elevada frequência das mutações associadas à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide com 26% de frequência do genótipo 4790 I/M, 20% 4790 M/M e 11% 4790 I/K (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Frequência alélica dos genótipos 4790 I/I, 4790 I/M, 4790 I/K, 4790 M/M, 4790 K/K e 4790 M/K em populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas na safra de 2020/2021 por meio de ensaios de discriminação alélica Taqman™.

Ano	Local	Safra	N	4790 I/I	4790 I/M	4790 M/M	4790 M/K	F	χ^2 final	p	4790 I/I	4790 I/K	4790 K/K	4790 M/K	F	χ^2 final	p
2018/19	Selbach, RS	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Santo Ângelo, RS	1 ^a	18	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Toledo, PR	1 ^a	19	90%	10%	0%	0%	0,05	0,05	0,82	90%	0%	0%	0%	0,00	0,19	0,66
2018/19	Ponta Grossa, PR	1 ^a	18	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Cristalina, GO	1 ^a	8	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Luis Eduardo Magalhães, BA	1 ^a	17	71%	24%	6%	0%	0,18	0,62	0,43	71%	0%	0%	0%	0,00	1,47	0,23
2018/19	Chapecó, SC	1 ^a	16	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Santa Helena de Goiás, GO	1 ^a	18	83%	17%	0%	0%	0,08	0,15	0,70	83%	0%	0%	0%	0,00	0,50	0,48
2018/19	Araguari, MG	1 ^a	10	90%	10%	0%	0%	0,05	0,03	0,87	90%	0%	0%	0%	0,00	0,10	0,75
2018/19	Casa Branca, SP	1 ^a	19	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,83
2018/19	Toledo, PR	2 ^a	19	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Lucas do Rio Verde, MT	2 ^a	19	85%	15%	0%	0%	0,08	0,12	0,72	85%	0%	0%	0%	0,00	0,43	0,51
2018/19	Sapezal, MT	2 ^a	20	85%	15%	0%	0%	0,08	0,13	0,72	85%	0%	0%	0%	0,00	0,45	0,50
2018/19	Campo Mourão, PR	2 ^a	19	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Londrina, PR	2 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2018/19	Chapadão do Sul, MS	2 ^a	20	80%	20%	0%	0%	0,10	0,25	0,62	80%	0%	0%	0%	0,00	0,80	0,37
2018/19	Dourados, MS	2 ^a	20	75%	20%	5%	0%	0,15	0,93	0,33	75%	0%	0%	0%	0,00	1,25	0,26
2018/19	Casa Branca, SP	2 ^a	20	75%	25%	0%	0%	0,13	0,41	0,52	75%	0%	0%	0%	0,00	1,25	0,26
2018/19	Campo Verde, MT	2 ^a	18	94%	6%	0%	0%	0,03	0,01	0,90	94%	0%	0%	0%	0,00	0,06	0,81
2018/19	Rio Verde, GO	2 ^a	20	80%	20%	0%	0%	0,10	0,25	0,62	80%	0%	0%	0%	0,00	0,80	0,37
2018/19	Correntina, BA	Entressafra	19	68%	16%	10%	0%	0,19	3,53	0,06	68%	5%	0%	0%	0,04	1,38	0,24
2018/19	Santa Helena de Goiás, GO	Entressafra	17	82%	18%	0%	0%	0,09	0,16	0,69	82%	0%	0%	0%	0,00	0,53	0,47
2018/19	Lucas do Rio Verde, MT	Entressafra	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2018/19	Chapadão do Sul, MS	Entressafra	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2019/20	Santo Ângelo, RS	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Selbach, RS	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Pirassununga, SP	1 ^a	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2019/20	Tibagi, PR	1 ^a	20	90%	10%	0%	0%	0,05	0,06	0,81	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65

Ano	Local	Safra	N	4790 I/I	4790 I/M	4790 M/M	4790 M/K	F	χ^2 final	p	4790 I/I	4790 I/K	4790 K/K	4790 M/K	F	χ^2 final	p
2019/20	Cascavel, PR	1 ^a	21	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Chapecó, SC	1 ^a	6	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Cristalina, GO	1 ^a	10	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Uberlândia, MG	1 ^a	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2019/20	Luis Eduardo Magalhães, BA	1 ^a	21	90%	0%	0%	0%	0,00	0,21	0,65	90%	5%	5%	0%	0,08	8,59	0,00
2019/20	Lucas do Rio Verde, MT	2 ^a	20	90%	10%	0%	0%	0,05	0,06	0,81	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65
2019/20	Campo Verde, MT	2 ^a	19	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Casa Branca, SP	2 ^a	15	60%	27%	7%	0%	0,21	0,37	0,54	60%	7%	0%	0%	0,05	1,69	0,19
2019/20	Sapezal, MT	2 ^a	17	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Londrina, PR	2 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Cascavel, PR	2 ^a	8	75%	13%	13%	0%	0,19	2,78	0,10	75%	0%	0%	0%	0,00	0,50	0,48
2019/20	Chapadão do Sul, MS	2 ^a	21	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2019/20	Campo Novo do Parecis, MT	Entressafra	20	75%	15%	10%	0%	0,18	4,62	0,03	75%	0%	0%	0%	0,00	1,25	0,26
2019/20	Barreiras, BA	Entressafra	19	84%	11%	5%	0%	0,11	3,70	0,05	84%	0%	0%	0%	0,00	0,47	0,49
2019/20	Campo Verde, MT	Entressafra	21	90%	10%	0%	0%	0,05	0,05	0,82	90%	0%	0%	0%	0,00	0,19	0,66
2019/20	Jaborandi, BA	Entressafra	14	86%	14%	0%	0%	0,07	0,08	0,77	86%	0%	0%	0%	0,00	0,29	0,59
2020/21	Selbach, RS	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Santo Ângelo, RS	1 ^a	18	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Casa Branca, SP	1 ^a	20	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91
2020/21	Santa Helena de Goiás, GO	1 ^a	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2020/21	Ponta Grossa, PR	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Cascavel, PR	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Chapecó, SC	1 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Araguari, MG	1 ^a	20	90%	5%	5%	0%	0,08	8,18	0,00	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65
2020/21	Luis Eduardo Magalhães, BA	1 ^a	20	70%	10%	10%	0%	0,17	6,03	0,01	70%	10%	0%	0%	0,06	0,86	0,35
2020/21	Chapadão do Sul, MS	2 ^a	20	90%	0%	10%	0%	0,10	20,00	0,00	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65
2020/21	Dourados, MS	2 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Campo Mourão, PR	2 ^a	20	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	Rio Verde, GO	2 ^a	20	85%	10%	5%	0%	0,10	3,95	0,05	85%	0%	0%	0%	0,00	0,45	0,50
2020/21	Casa Branca, SP	2 ^a	20	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65	90%	10%	0%	0%	0,05	0,06	0,81

Ano	Local	Safra	N	4790 I/I	4790 I/M	4790 M/M	4790 M/K	F	χ^2 final	p	4790 I/I	4790 I/K	4790 K/K	4790 M/K	F	χ^2 final	p
2020/21	Lucas do Rio Verde, MT	2ª	20	80%	15%	5%	0%	0,13	1,98	0,16	80%	0%	0%	0%	0,00	0,80	0,37
2020/21	Sapezal, MT	2ª	20	90%	5%	5%	0%	0,08	8,18	0,00	90%	0%	0%	0%	0,00	0,20	0,65
2020/21	Campo Verde, MT	2ª	20	80%	5%	10%	0%	0,13	10,74	0,00	80%	0%	5%	0%	0,06	2,45	0,12
2020/21	Cascavel, PR	2ª	20	95%	5%	0%	0%	0,03	0,01	0,91	95%	0%	0%	0%	0,00	0,05	0,82
2020/21	Londrina, PR	2ª	19	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00	100%	0%	0%	0%	0,00	0,00	1,00
2020/21	São Desidério, BA	Entressafra	19	42%	26%	20%	0%	0,38	2,23	0,13	42%	11%	0%	0%	0,10	4,33	0,04

Em geral, a mutação I490M apresentou maior ocorrência nas populações amostradas, sendo identificada em 16 das 24 populações amostradas da safra de 2018/19, em 10 das 20 populações da safra 2019/20 e 9 das 20 populações da safra 2020/21 (Figura 2.5).

Já a mutação I4790K foi observada somente em populações coletadas no Estado da Bahia e São Paulo (Figura 2.5), sendo observada com maior estabilidade nas regiões de Casa Branca, Correntina, São Desidério e Luis Eduardo Magalhães, com ocorrência tanto nas populações da primeira, quanto da segunda safra dos anos agrícolas 2019/20 e 2020/21.

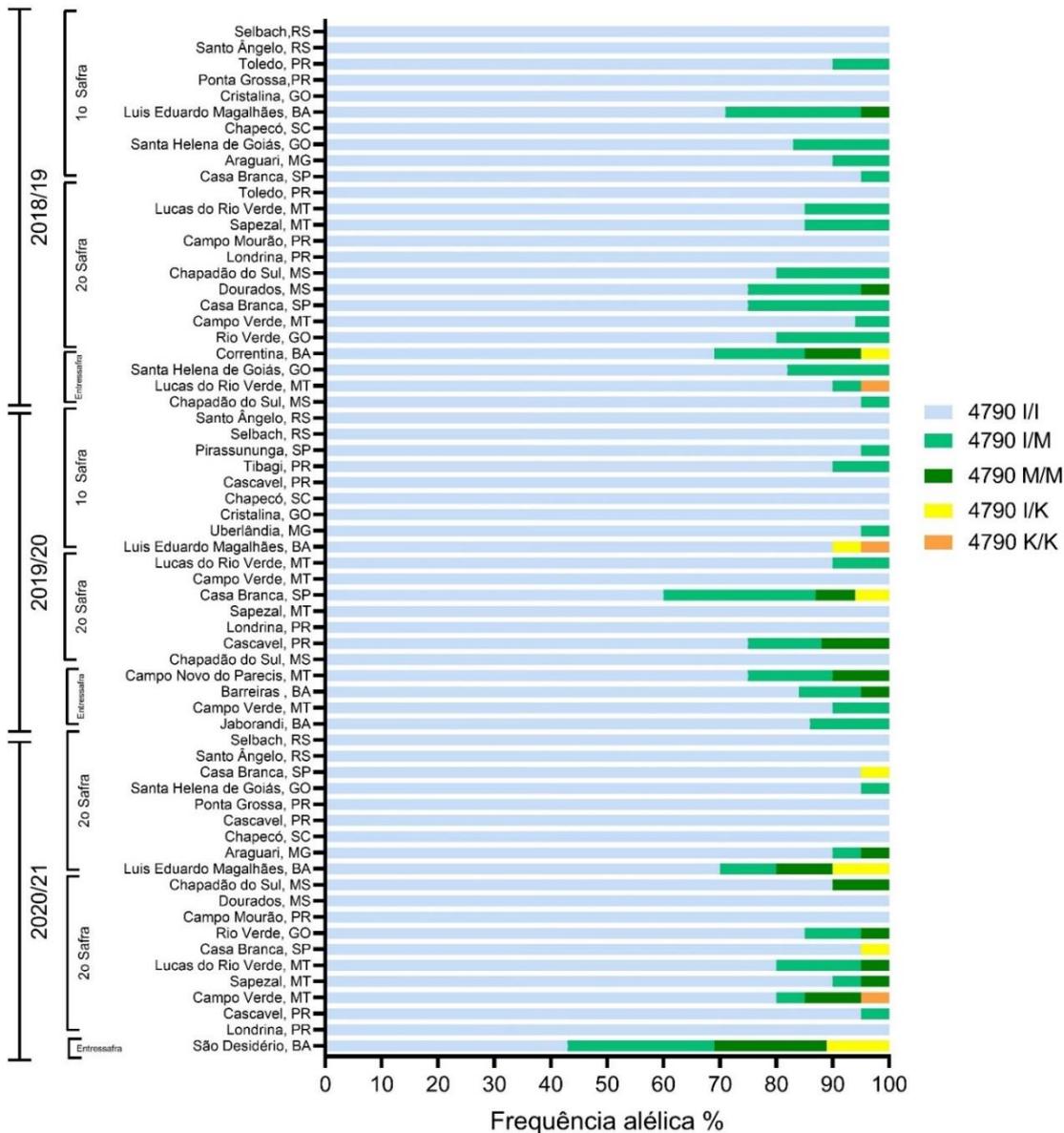


Figura 2.5. Frequência alélica dos genótipos 4790 I/I, 4790 I/M, 4790 I/K, 4790 M/M, 4790 K/K e 4790 M/K identificadas por Taqman™ em populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras 2018/19 (2019) e 2019/20 (2020) e 2020/21 (2021).

A análise conjunta da frequência do alelo suscetível nas populações amostradas não apresentaram diferenças significativas entre as safras ($F = 0,08$, $gl = 63$, $P = 0,9262$) (Figura 2.6).

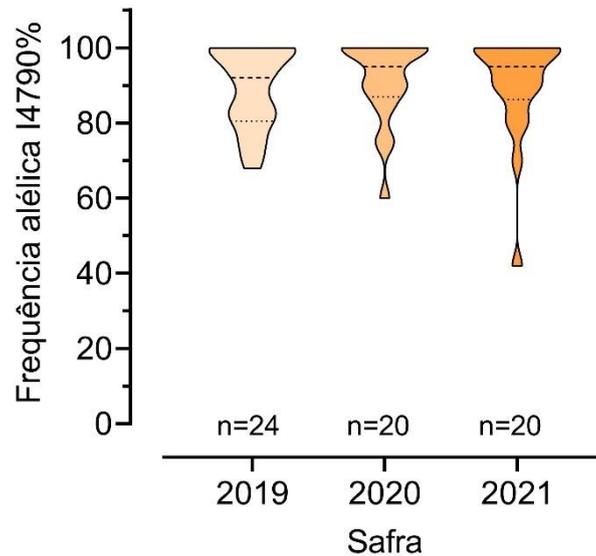


Figura 2.6. Frequência do alelo I4790 (suscetível) no receptor de rianodina em 64 populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas nas safras 2019 (2018/19), 2020 (2019/2020) e 2021 (2020/21).

Os dados obtidos nos monitoramentos fenotípicos e frequência alélica apresentaram uma correlação significativa ($R = 0,870$, $P < 0,0001$), indicando a genotipagem por Taqman™ como uma ferramenta prática e rápida na estimativa da frequência de resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide (Figura 2.7).

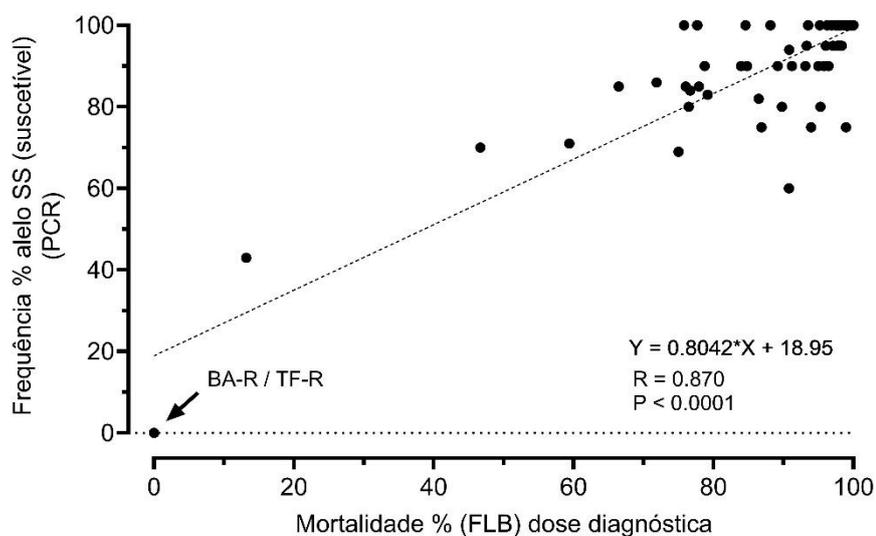


Figura 2.7. Regressão linear entre os resultados de mortalidade dos bioensaios de monitoramento fenotípico (aplicação superficial na dieta, 2,38 $\mu\text{g a.i./cm}^2$) e frequência do alelo suscetível (SS) identificado por Taqman™ apresentaram correlação significativa ($F = 188$, $gl = 1, 60$, $P < 0.0001$).

2.4 Discussão

No presente estudo não foram observadas mudanças significativas na suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide nas populações amostradas durante as safras agrícolas de 2018/19 a 2020/21. Foi constatada uma alteração inicial da frequência do alelo em relação aos monitoramentos fenotípicos realizados no Brasil nas safras de 2011/12 a 2013/14 (Ribeiro, 2014) e 2015/16 a 2017/18 (Bolzan, 2019), principalmente em regiões produtoras de algodão (BA, MT) e regiões com histórico de produção de sementes de milho (Casa Branca, SP). Entretanto, o monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide realizado nesse estudo, indica uma estabilidade da frequência de resistência, a qual não apresentou aumento significativo durante as safras de 2018/19 a 2020/21. A frequência média do alelo associado à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide observada nos ensaios de F₂ screen corrobora com essa afirmativa apresentando frequência variando entre 0,0275 (0,0206 – 0,0355) a 0,0423 (0,0364 – 0,0486) não apresentando diferença significativa entre as safras amostradas.

O principal mecanismo de resistência de pragas a diamidas foi devido a mutações na região terminal-C de II a VI do domínio intramembranar do RyR (Richardson et al., 2020). Nesse estudo foi detectado a presença de duas substituições de aminoácidos em linhagens de *S. frugiperda*, BA-R e TF-R (vide capítulo 3), no RyR posição I4790 (baseado no genoma de *P. xylostella*) e associado

a resistência à diamidas. A primeira, I4790M, previamente descrito em *P. xylostella* (Guo et al., 2014; Jouraku et al., 2020), *T. absoluta* (Roditakis et al. 2017), *S. exigua* (Zuo et al., 2020) e *S. frugiperda* (Boaventura et al., 2020). A segunda, I4790K, descrita mais recentemente em *P. xylostella* (Jouraku et al., 2020; Jiang et al., 2021). A identificação da mutação I4790K é de extrema importância, uma vez que apresentou elevados níveis de resistência em *P. xylostella* e elevada resistência cruzada para diamidas do ácido ftálico e antranílicas, superior ao observado em linhagens contendo a mutação I4790M (Jiang et al., 2021). Por meio de ensaios de genotipagem utilizando discriminação alélica por TAQMAN™, foi detectada pela primeira vez a ocorrência das mutações I4790M e I4790K em várias populações de *S. frugiperda* no Brasil. Ensaios similares baseados em genotipagem por TAQMAN™ foram conduzidos em populações de *S. frugiperda* amostradas em diferentes continentes, mas não conseguiram identificar tais mutações (Boaventura et al., 2020). Outros dois estudos utilizando sequenciamento do genoma completo de populações de *S. frugiperda* de diferentes países também não conseguiram detectar a presença de mutações no RyR nas regiões I4790 e G4946 (Guan et al., 2021; Yainna et al., 2021).

Os ensaios de genotipagem desenvolvidos nesse estudo revelaram que a mutação I4790M está presente em populações de *S. frugiperda* de diversos Estados Brasileiros, com exceção do Estado do Rio Grande do Sul, local em que as condições climáticas permitem apenas o plantio de uma safra de milho. Em contraste, a mutação I4790K está presente em poucas localidades e está associada a locais de elevada pressão de seleção como os Estados da Bahia, Mato Grosso, e São Paulo, especificamente em regiões produtoras de soja/algodão e produtoras de sementes de milho, possuindo pelo menos duas safras agrícolas por ano (Conab, 2021).

A baixa frequência da mutação I4790K e o elevado custo adaptativo associado a resistência de *S. frugiperda* a diamidas associado à mutação I4790M (Padovez et al., 2022) sugerem risco moderado da evolução de resistência de *S. frugiperda* a diamidas. Além disso, a redução significativa no número de aplicações de inseticidas para manejo de lepidópteros pragas nas culturas da soja e algodão, além da maior adoção de inseticidas de diferentes modos de ação nas culturas do milho, soja e algodão (BIP Spark 2015 - 2021, Farmtrack Distribution 2018 - 2021) contribuem para a manutenção de indivíduos suscetíveis a diamidas na população. A área total

tratada com inseticidas do grupo das diamidas para lepidópteros diminuiu de 26,16% em 2016 para 19,83% em 2021, em contraste, inseticidas do grupo das espinosinas, avermectinas e desacopladores da fosforilação oxidativa aumentaram em 32,27% (BIP Spark 2015 - 2021, Farmtrack Distribution 2018 - 2021).

Os resultados observados nos monitoramentos fenotípicos e genotípicos refletem variações geográficas e temporais na suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide. Todos os métodos utilizados reforçam a necessidade de implementação de estratégias de manejo integrado de pragas a nível regional, a fim de se retardar a evolução de resistência a inseticidas do grupo das diamidas, especialmente nos Estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso. As diamidas continuarão sendo uma importante ferramenta para o manejo de lepidópteros pragas globalmente, sendo assim, a implementação de estratégias de manejo de resistência eficientes é essencial para garantir a sustentabilidade dos produtos atuais e futuros (Teixeira et al., 2013). Ainda, a continuidade do monitoramento da suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* a diamidas é essencial para suportar e avaliar a eficiência das estratégias de manejo atualmente adotadas.

2.5 Conclusões

- A frequência de resistência a flubendiamide varia de acordo com a safra e a região de amostragem das populações de *S. frugiperda*;
- As frequências fenotípicas e genotípicas de resistência a flubendiamide são maiores em populações de *S. frugiperda* amostradas na Bahia, Goiás e Mato Grosso;
- Há uma predominância da mutação I4790M nas populações de *S. frugiperda* do Brasil, sendo possível identificar a presença da mutação I4790K apenas nas populações da Bahia, Mato Grosso e São Paulo.

Referências

ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. F₂ screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in brazil. **PLOS ONE**, Berkeley, v.10, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0140130.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F. C. L.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the VIP3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, 2016. doi:10.1002/ps.4223.

BOAVENTURA, D.; BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; OKUMA, D.M.; OMOTO, C.; Nauen, R. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, v.76, p.47–54, 2020. doi:10.1002/ps.5505.

BOAVENTURA, D.; MARTIN, M.; POZZEBON, A.; MOTA-SANCHEZ, D.; Nauen, R. Monitoring of target-site mutations conferring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Insects**, Basel, v. 11, p. 545, 2020. doi:10.3390/insects11080545.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; NASCIMENTO, A.R.; KAISER, I.S.; LIRA, E.C.; AMARAL, F.S.; KANNO, R.H.; MALAQUIAS, J.B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 75, p. 2682–2689, 2019. doi:10.1002/ps.5376.

BRUNK, H D. **An introduction to mathematical statistics**. 3rd ed. Lexington, p. 513, 1975.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n. 4, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062268.

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

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

EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; LUMMEN, P.; LOBITZ, N.; SCHULTE, T.; FUNKE, C.; FISCHER R. Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca²⁺ release channels in insects. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 39, p. 21–33, 2006.

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

GANIGER, P. C.; YESHWANTH, H. M.; MURALIMOCHAN, K.; VINAY, N.; KUMAR, A. R. V.; CHANDRASHEKARA, K. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. **Current Science**, Bangalore, v. 115 (4), p. 621-623, 2018.

GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMO, M. First report of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS One**, Berkeley, v. 11, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165632.

GUAN, F.; ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; PADOVAN, A.; WALSH, T.K.; TAY, W.T.; GORDON, K.H.J.; JAMES, W.; CZEPAK, C.; ET AL. Whole-genome sequencing to detect mutations associated with resistance to insecticides and Bt proteins in *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science**, Victoria, v. 28, p. 627–638, 2021. doi:10.1111/1744-7917.12838.

GUO, L.; LIANG, P.; ZHOU, X.; GAO, X. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 6924, 2014. doi:10.1038/srep06924.

GUTIÉRREZ-MORENO, R.; MOTA-SANCHEZ, D.; BLANCO, C.A.; WHALON, M.E.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; RODRIGUEZ-MACIEL, J.C.; DIFONZO, C. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 112, p. 792–802, 2019. doi:10.1093/jee/toy372.

JIANG, D.; QIAN, C.; WANG, D.; WANG, F.; ZHAO, S.; YANG, Y.; BAXTER, S.W.; WANG, X.; WU, Y. VARYING Contributions of three ryanodine receptor point mutations to diamide insecticide resistance in *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 77, p. 4874–4883, 2021. doi:10.1002/ps.6534.

JING, D. P.; GUO, J. F.; JIANG, Y. Y.; ZHAO, J. Z.; SETHI, A.; HE, K. L.; WANG, Z. Y. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. **Insect Science**, Victoria, v. 00, p. 1-11, 2019.

JOURAKU, A.; KUWAZAKI, S.; MIYAMOTO, K.; UCHIYAMA, M.; KUROKAWA, T.; MORI, E.; MORI, M. X.; MORI, Y.; SONODA, S. Ryanodine receptor mutations (G4946E and I4790K) differentially responsible for diamide insecticide resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, 2020. doi:10.1016/j.ibmb.2019.103308.

KASTEN, Jr. P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, p. 69-78, 1978.

LAI T., LI J., SU J. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 101, p. 198–205, 2011.

LIRA, E. C., BOLZAN, A., NASCIMENTO, A. RB., AMARAL, F. AS., KANNO, R. H., KAISER, I. S., OMOTO, C. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.5812, 2020.

MURARO, D.S.; NETO, D. de O. A.; KANNO, R. H.; KAISER, I. S.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.6545, 2021.

NAGOSHI, R.N., GOERGEN, G., PLESSIS, H.D. et al. Genetic comparisons of fall armyworm populations from 11 countries spanning sub-Saharan Africa provide insights into strain composition and migratory behaviors. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 8311, 2019. doi.org/10.1038/s41598-019-44744-9.

NASCIMENTO, A. R.; FRESIA, P.; CONSOLI, F. L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), **BMC Genomics**, London, 2015. doi: 10.1186/s12864-015-2183-z.

OKUMA, D.M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; SILVA, A.P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1441–1448, 2018. doi:10.1002/ps.4829.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 1727–1736, 2016. doi:10.1002/ps.4201.

OWEN, L., CATCHOT, A. L., MUSSER, F. R., GORE, J., COOK, D. C., JACKSON, R. Susceptibility of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to reduced-risk insecticides. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 2, p. 554-559, 2013.

R CORE TEAM (2020). — European Environment Agency Available online: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>>.

RIBEIRO, R. DA S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. Universidade de São Paulo, 2014.

RICHARDSON, E.B.; TROCZKA, B.J.; GUTBROD, O.; DAVIES, T.G.E.; NAUEN, R. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 93, p. 911–928, 2020. doi:10.1007/s10340-020-01220-y.

RODITAKIS E., VASAKIS E., GRISPOU M., STAVRAKAKI, M., NAUEN, R., GRAVOUIL, M, BASSI, A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal Pesticide Science**, Sussex, v. 88, p. 9–16, 2015.

RODITAKIS, E.; STEIBACH, D.; MORITZ, G.; VASAKIS, E.; STAVRAKAKI, M.; ILIAS, A.; GARCIA-VIDAL, L.; MARTINEZ-AGUIRRE, M. DEL R.; BIELZA, P.; MOROU, E.; SILVA, J. E.; SILVA, W. M.; SIQUEIRA, H. A. A.; IQBAL, S.; TROCZA, B. J.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C.; TSAGKARAKU, A.; VONTAS, J.; NAUEN, R. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 80, p. 11 – 20, 2017.

SILVA, J. E.; ASSIS, C. P. O.; RIBEIRO, L. M. S.; SIQUEIRA, H. A. A. Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109 (5), p. 2190-2195, 2018.

Spark Smarter Decisions, **BIP Spark soja, milho e algodão**. Valinhos, SP, 2015 - 2021.

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 122–128, 2015. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014.

STEINBACH, D.; GUTBROD, O.; LUMMEN, P.; MATTHIESEN, S.; SCHORN, C.; NAUEN, R. Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamides insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 63, p. 14 – 22, 2015.

TEIXEIRA, L.A.; ANDALORO, J.T. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 106, p. 76–78, 2013. doi:10.1016/j.pestbp.2013.01.010.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; FURUYA, T.; SEO, A.; KODAMA, H.; TSUBATA, K.; FUJIOKA, S.; KODAMA, H.; HIROOKA, T.; NISHIMATSU, T. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, p. 354–360, 2005. doi:10.1584/jpestics.30.354.

TROCZKA B. J., ZIMMER C. T., ELIAS J., SCHORN, C. BASS, C., DAVIES, T. G., FIELD, L. M., WILLIAMSON, M. S., SLATER, R., NAUEN, R. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 873–880, 2012.

YAINNA, S.; NÈGRE, N.; SILVIE, P.J.; BRÉVAULT, T.; TAY, W.T.; GORDON, K.; DALENÇON, E.; WALSH, T.; NAM, K. Geographic monitoring of insecticide resistance mutations in native and invasive populations of the fall armyworm. **Insects**, Basel, v. 12, p. 468, 2021. doi:10.3390/insects12050468

ZUO, Y.; WANG, H.; XU, Y.; HUANG, J.; WU, S.; WU, Y.; YANG, Y. CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 89, p. 79 – 85, 2017.

3 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE: PADRÃO DE HERANÇA E RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTRAS DIAMIDAS

Resumo

O entendimento das bases genéticas associadas à resistência é de fundamental importância para a implementação de estratégias efetivas de manejo da resistência a inseticidas (MRI). Nesse estudo, foram realizadas a caracterização das bases genéticas da resistência a flubendiamide em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e resistência cruzada a outras diamidas. A partir da seleção de duas linhagens resistentes, sendo uma população proveniente de São Desidério-BA (BA-R) e outra de Tasso Fragoso-MA (TR-R). As razões de resistência das linhagens BA-R e TR-R foram >4500 vezes para ambas as linhagens. A partir dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens suscetível e resistentes, verificou-se que a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide é autossômica e incompletamente recessiva para ambas as linhagens. Os retrocruzamentos da progênie F₁ dos cruzamentos recíprocos com o parental resistente demonstraram caráter monogênico para as duas linhagens. O sequenciamento da região II a VI da região C-terminal do receptor de rianodina identificou a presença das mutações I4790M/K nas duas linhagens resistentes. Para entender a avaliação da dominância funcional, plantas de milho foram tratadas com flubendiamide na dose recomendada e expostas a lagartas resistentes, heterozigotas e suscetíveis. Houve mortalidade de < 30% para as lagartas das linhagens resistentes, > 80% para as linhagens heterozigotas e 100% de mortalidade para a linhagem suscetível, confirmando a resistência incompletamente recessiva. Foi verificada elevada resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole, ciantraniliprole). Esses resultados fornecem subsídios importantes para compreender a evolução da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide e auxiliar na implementação de programas de manejo de resistência visando preservar a vida útil de diamidas no controle de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, Flubendiamide, Herança da resistência, Resistência cruzada, Mutação no sítio de ação, Receptor de rianodina.

Abstract

The understanding of insecticide resistance genetic basis it is extremely important for an effective implementation of insecticide resistance management (IRM) strategies. In this study, we characterize the inheritance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistance to flubendiamide and cross-resistance to other diamides. Two flubendiamide-resistant strains were selected, being one from a population collected in São Desidério, Bahia State (BA-R) and another from Tasso Fragoso, Maranhão State (TF-R). The resistance ratios of BA-R and TF-R were >4,500-fold for both

strains. The estimated CL_{50} values from reciprocal crosses between susceptible and resistant strains indicated that resistance is autosomal and (incompletely) recessive in both strains. F_1 progeny backcrosses with the resistant parental presented a monogenic resistance for both strains. The sequencing of region II to VI of ryanodine receptor C-terminal identified the presence of I4790M/K target-site mutation in both resistant strains. To understand the functional dominance, maize plants were treated with flubendiamide at field rates and exposed to resistant, heterozygous and susceptible larvae. There was a high survivorship for the resistant strains with more than >70% survivorship, 20% survivorship for heterozygous and a 100% mortality for susceptible strains, confirming the incomplete recessive trait. We also verify a high cross-resistance among flubendiamide and anthranilic diamides (chlorantraniliprole and cyantraniliprole). These results provide important information to understand flubendiamide resistance evolution in *S. frugiperda* and support the implementation of effective insecticide resistance management programs to preserve the efficacy of diamides for *S. frugiperda* control.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Flubendiamide, Inheritance, Cross-resistance, Target-site mutation, Ryanodine receptor.

3.1 Introdução

A agricultura tropical do Brasil permite produção de diversas culturas ao longo do ano, as quais muitas são hospedeiras de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), permitindo várias gerações no ciclo e, conseqüentemente, expondo essas populações a uma elevada pressão de seleção a inseticidas. Fatores como a pressão de seleção, resistência cruzada e fatores genéticos associados à resistência são os principais determinantes na taxa de aumento da frequência de resistência nas próximas gerações, sendo essenciais para a melhor compreensão da evolução da resistência e, posterior elaboração e refinamento de estratégias de manejo da resistência (Roush; Daly 1990; Tabashnik, 1991). Essas informações podem ser exploradas a partir da caracterização do padrão de herança, estudos de resistência cruzada, frequência inicial de alelos da resistência em populações de campo e modelos de simulação de evolução da resistência (Roush; McKenzie, 1987; Roush; Daly 1990, Tabashnik, 1991). Estudos de padrão de herança permitem verificar se a característica de resistência está associada a cromossomos autossômicos, sexuais ou de origem mitocondrial. A maioria dos casos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas relatam o caráter autossômico, como demonstrado nos estudos de herança da resistência a lambda-cialotrina (Diez-Rodriguez; Omoto, 2001), lufenurom (Nascimento et al., 2016), espinosinas (Okuma et al., 2018; Lira et al., 2020) e clorantraniliprole (Bolzan et al., 2019). Além disso, o grau de dominância da resistência fornece uma importante informação para a

elaboração de estratégias de manejo de resistência, pois se refere à resposta fenotípica em função da dose aplicada, em que altas doses de inseticida podem fazer com que a resistência seja funcionalmente recessiva e uma baixa dose pode torná-la funcionalmente dominante (Ford, 1975). Linhagens de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *S. frugiperda* resistentes a diamidas apresentaram herança autossômica, além da característica de dominância incompletamente recessiva (Steinbach et al., 2015; Silva et al., 2018; Bolzan et al., 2019). Estudos envolvendo uma linhagem de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) geneticamente modificada apresentando a mutação G4946E, comprovaram que, uma vez associada a essa mutação, a herança da resistência a flubendiamide foi completamente recessiva (Zuo et al., 2017).

Os inseticidas do grupo das diamidas agem seletivamente nos receptores de rianodina (RyR), localizados na membrana do retículo sarcoplasmático de tecidos musculares dos insetos. Estes canais têm como função a regulação homeostática de cálcio presente nos estoques intracelulares, levando a uma rápida paralização das contrações musculares, cessação da alimentação e conseqüentemente morte do inseto (Nauen, 2006; Sattelle; Cordova & Cheek, 2008). Até o momento, existem dois quimiotipos no mercado, as diamidas do ácido ftálico (flubendiamide) (Tonishi et al., 2005) e as diamidas antranílicas (clorantraniliprole e ciantraniliprole) (Cordova et al., 2006; Lahm et al. 2005; Lahm et al., 2007), os quais ativam os RyRs dos insetos pela ligação em um sítio comum no terminal-C do domínio intramembranar, levando a uma liberação desordenada de cálcio no citosol (Kato et al, 2009; Ma et al., 2020; Qi et al., 2014).

O primeiro caso de resistência à diamidas foi reportado para *P. xylostella* (Troczka et al., 2012; Ribeiro et al., 2014) seguida por pelo menos nove casos de resistência reportados a lepidópteros pragas (Richardson et al., 2020), incluindo *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Bolzan et al., 2019), sendo o principal mecanismo de resistência de pragas a diamidas associado a mutações específicas no RyR. As mutações nas posições G4946E e I4790M (baseado no genoma de *P. xylostella*) foram primeiramente descritas em populações de *P. xylostella* amostradas em Filipinas, Tailândia e China (Troczka et al., 2012; Guo et al., 2014), posteriormente foram relatados casos na Índia, Taiwan, Estados Unidos da América, Japão e Coreia (Steinbach et al., 2015).

Em um segundo momento, mutações similares no RyR nas posições I4790 e G4946 foram descritos para *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Roditakis et al., 2017), *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) (Sun et al., 2018; Yao et al., 2017), e *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Kim et al., 2021; Zuo et al., 2020). Mutações no RyR nas posições I4790 e G4946 possuem impactos diferentes na ligação das diamidas, consequentemente apresentando diferentes razões de resistência (RR) cruzada. O impacto da mutação G4946E/V foi funcionalmente validado por ensaios de ligações utilizando radioligantes (Steinbach et al., 2015), apresentando uma RR >450-vezes para flubendiamide e >159-vezes para clorantraniliprole e por edição gênica utilizando CRISPR/Cas9 em *S. exigua* (Zuo et al., 2017) apresentando RR de 223-vezes, 336-vezes e >1000-vezes para clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamide. Maiores RR cruzada foram associadas a mutação I4790M em linhagens resistentes de *S. frugiperda* apresentando RR >22-vezes para clorantraniliprole e >5400-vezes para flubendiamide (Boaventura et al., 2020) e seu impacto também validado por edição gênica utilizando CRISPR/Cas9 em *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (Douris et al., 2017) e por expressão de receptores mutantes em células recombinantes de insetos (Richardson et al., 2021). O desenvolvimento de resistência por mutações específicas no RyR devido a sua elevada resistência cruzada é a maior ameaça para a sustentabilidade de todo o grupo químico.

O melhor entendimento das bases genéticas da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide pode auxiliar na implementação efetiva de programas de manejo da resistência. Sendo assim, no presente estudo foi realizada a seleção de duas linhagens distintas de *S. frugiperda* resistente a flubendiamide em condições de laboratório para caracterizar o padrão de herança, verificar as mutações envolvidas e avaliar resistência cruzada a diamidas antranílicas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Seleção das linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes a flubendiamide

A linhagem resistente de *S. frugiperda* a flubendiamide (Belt®) (480 g a.i./l) BA-R foi obtida a partir de uma população de campo coletada em cultivos de milho em São Desidério - BA (13° 15' 51,70" S, 46° 08' 45,82" L), durante a safra

2017/2018. A linhagem TF-R foi obtida em Tasso Fragoso - MA (7° 49' 33.8" S, 46° 00' 22.6" L), durante a safra 2018/2019 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Linhagens resistentes de *Spodoptera frugiperda* à diamidas selecionadas pela metodologia de F₂ screen.

Código da população	Município	Cultura	Latitude	Longitude	Data de coleta
BA-R	São Desidério - BA	Milho	13° 15' 51,70" S	46° 08' 45,82" L	Dez/17
TF-R	Tasso Fragoso - MA	Milho	7°49' 33.8" S	46° 00' 22.6" L	Abr/19

Foram coletadas aproximadamente 1000 lagartas de cada localidade e enviadas ao laboratório de Manejo de Resistência FHI – Bayer S.A./Paulínia onde foram selecionadas pela técnica de F₂ screen (Andow; Alstad,1998). As lagartas coletadas no campo foram mantidas em dieta artificial até a fase de pupa. Posteriormente, as pupas foram separadas por sexo e individualizadas em copos plásticos (25 mL) invertidos sobre um papel filtro umedecido permanecendo até a emergência dos adultos.

Após a emergência, os adultos virgens foram separados em casais e acondicionados em gaiolas confeccionadas com copos plásticos transparentes (500 mL) (um casal por gaiola). Foi oferecida como alimentação dos adultos uma solução de mel em água a 10% embebida em algodão hidrófilo. A cada 2 dias as posturas foram retiradas e as gaiolas substituídas. Cada casal representou uma isofamília e sua descendência foi criada separadamente das demais. Os ovos obtidos de cada isofamília foram acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido (1 × 1 cm) para a manutenção da umidade e mantidos em sala climatizada a 25 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 12 h. Após a eclosão das lagartas, aproximadamente 100 indivíduos de cada isofamília foram criadas em bandejas plásticas de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brazil) contendo dieta artificial (1 lagarta/célula). Após a obtenção das pupas, as mesmas foram retiradas e acondicionadas separadamente por isofamília em gaiolas cilíndricas de PVC (21 cm de altura × 14 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel do tipo sulfite e fechadas na parte superior com placas de petri para acasalamento entre indivíduos da geração F₁.

Cento e vinte e oito lagartas de terceiro ínstar provenientes do cruzamento dos adultos em F₁ (geração F₂) de cada família foram individualizadas e expostas a

74 µg i.a./cm² de flubendiamide (Belt[®], 480 g flubendiamide/L, Bayer S.A.) aplicado na superfície da dieta artificial. Aos quatro dias, as lagartas sobreviventes foram transferidas para recipientes plásticos contendo apenas dieta artificial, onde permaneceram até a fase de pupa.

A avaliação foi realizada após 4 dias e a frequência do alelo de resistência foi estimada pela equação de Andow & Alstad (1998):

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

Em que: E [q] = frequência esperada do alelo de resistência; S = número de isolinhas positivas; n = número de isolinhas testadas.

As linhagens selecionadas foram mantidas sob pressão de seleção utilizando flubendiamide na dose de 132,16 µg i.a./cm².

Como linhagem suscetível de referência foi utilizada a linhagem “Sus”, obtida junto a Embrapa Milho e Sorgo (Sete lagoas, MG, Brasil) no ano de 1996, sendo mantida sem pressão de seleção por inseticidas ou proteínas *Bt*.

3.2.2 Caracterização da herança da resistência de diferentes linhagens associada à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

A caracterização da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide foi realizada pela obtenção da curva de concentração-resposta para as linhagens suscetível (Sus) e resistentes a flubendiamide (BA-R; TF-R) por meio de bioensaios de tratamento superficial da dieta. Foram utilizadas de oito a doze concentrações espaçadas logaritmicamente de flubendiamide (Belt[®]) (480 g a.i./L) diluídas em água destilada e surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%. Como tratamento testemunha foi utilizado água destilada e o surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%.

Nas células contendo os tratamentos foram individualizadas lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* que permaneceram se alimentando do substrato tratado por um período de 96 horas, em câmara climatizada “BOD”, a 25 ± 2°C de temperatura e 12h de fotofase. Após quatro dias de exposição aos produtos, foi avaliada a mortalidade de *S. frugiperda*, sendo consideradas mortas as lagartas que não apresentaram movimentos coordenados quando tocadas com uma pinça após 4

dias. Os dados de mortalidade das linhagens foram submetidos à análise de Probit por meio do software POLO PLUS (Leora Software). A partir das curvas, foi estimada a concentração letal 50 (CL₅₀), os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular. A razão de resistência foi calculada mediante a divisão da CL₅₀ linhagem resistente pela CL₅₀ da suscetível.

Para a determinação do padrão da herança associado à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide, as pupas da linhagem suscetível e resistentes foram mantidas em placas individualizadas e separadas por sexo. Após a emergência dos adultos, foram formados casais heterozigotos (♂ BA-R/TF-R x ♀ Sus e ♂ Sus x ♀ BA-R/TF-R) e mantidas em gaiolas de PVC (14 cm diâmetro por 21 cm de altura). As progênes dos cruzamentos (geração F₁) foram submetidas às diferentes concentrações de flubendiamide espaçadas logaritmicamente, com a finalidade de caracterizar curvas de concentração-resposta, semelhantes à metodologia descrita anteriormente.

O grau de dominância (D) foi estimado com base nas curvas concentração-resposta da geração F₁ e linhagens parentais. O grau de dominância (D) foi estimado com base nas metodologias propostas por Bourguet et al. (2000) e Stone (1968). O grau médio de dominância foi obtido a partir da equação proposta por Bourguet et al. (2000):

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

Sendo: M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} as mortalidades da linhagem resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente. Para valores de D próximos a 0 ($D = 0$) considera-se como herança completamente recessiva e para valores próximos a 1 ($D = 1$) considera-se como resistência completamente dominante (Bourguet et al., 2000).

Os dados foram também analisados pelo método proposto 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 CL₅₀ estimadas a partir das linhagens heterozigotas H₁ (Sus ♀ x Resistente ♂) e H₂ (Sus ♂ x Resistente ♀) e F₁ (resistente e suscetível). 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.

Para estimar o número de genes relacionados a resistência, foram realizados retrocruzamentos da progênie F_1 com a linhagem resistente (BA-R; TF-R), parental que apresentou fenótipo mais distinto de F_1 (Tsukamoto 1983; Roush; Daly, 1990). A herança foi avaliada a partir do teste qui-quadrado [1] (Sokal; Rohlf, 1995):

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

A variável Ni representa a mortalidade observada 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 e b = porcentagem de mortalidade da linhagem resistente 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 contribuem para uma característica quantitativa, como a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide, utilizou-se o método proposto por Lande (1981):

$$n_E = \frac{(X_{RR} - X_{SS})^2}{8\sigma_s^2}$$

Em que X_{RR} e X_{SS} correspondem ao \log_{10} da CL_{50} das linhagens BA-R, TF-R e Sus respectivamente, $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - [\sigma_{F1}^2 + 0,5\sigma_{RR}^2 + 0,5\sigma_{SS}^2]$ e σ_{B1}^2 , σ_{B2}^2 , σ_{F1}^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 BA-R, TF-R e Sus, estimadas de acordo com Lande (1981) pelo inverso do coeficiente angular ao quadrado.

3.2.3 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole e ciantraniliprole)

A caracterização da resistência cruzada de *S. frugiperda* foi realizada a partir das curvas de concentração-resposta para as linhagens Sus, BA-R e TF-R para os inseticidas flubendiamide (Belt®) (480 g i.a./L), clorantraniliprole (Premio®) (200 g i.a./L) e ciantraniliprole (Benevia®) (200 g i.a./L) seguindo a mesma metodologia do item 2.2.1. Os dados de mortalidade das linhagens foram submetidos à análise de Probit por meio do software POLO PLUS (Leora Software). A partir das curvas foram estimadas as concentrações letais média (CL₅₀), os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular. A razão de resistência foi estimada mediante a divisão da CL₅₀ das curvas de suscetibilidade da população resistente pela CL₅₀ da população suscetível.

3.2.4 Dominância funcional da resistência das linhagens de *S. frugiperda* resistentes a flubendiamide

Sementes de milho convencional (P30F53 RR) foram semeadas em vasos plásticos de 5 L (2 sementes/vaso). Após a germinação, uma única planta foi mantida em cada vaso. No estágio fenológico V₃-V₄, folhas totalmente desenvolvidas foram cortadas em áreas de 4,5 cm² de área e imersas por 3 segundos em soluções inseticidas com a dose de campo de 150 mL/ha de Belt® (Flubendiamide 480 g/L), 150 mL/ha de Premio® (Clorantraniliprole 200 g/L), 500 mL/ha de Benevia® (Ciantraniliprole 100 g/L) e água destilada diluídos em um volume de calda de 150 L/ha. As folhas foram alocadas em placas de petri de 90 mm (CRAL®), contendo solução de ágar a 1% e papel filtro para evitar contato direto da folha com o ágar. Após secagem do produto, foram infestadas com uma única lagarta de 3º instar de *S. frugiperda* da linhagem Sus, BA-R, TF-R e heterozigotos provenientes dos cruzamentos recíprocos. Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições, sendo que cada repetição foi constituída de 4 placas de petri. Após sete dias, as lagartas sobreviventes foram recuperadas e, em laboratório, criadas em dieta artificial até a emergência de adultos. Foram estimados a probabilidade de mortalidade e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para tratamento utilizando a função *binom.probit* do pacote *binom* do programa R 3.4.1. (R Core Team, 2020).

3.2.5 Sequenciamento da região II a VI do receptor de rianodina das linhagens resistentes a flubendiamide

O sequenciamento da região de II a VI do domínio intramembranar receptor de rianodina (RyR) de *S. frugiperda*, foi realizado por meio da extração do RNA total de 10 lagartas de terceiro instar da linhagem BA-R e TF-R utilizando o kit de extração RNeasy Mini Kit® (Qiagen®), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA foram verificadas em Nanodrop-One/One^c (Thermo Scientific®). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 µg de RNA total tratado com DNase. Para a reação de transcriptase reversa foi utilizado o sistema comercial GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega®), de acordo com especificações do fabricante. Os primers utilizados no sequenciamento foram obtidos no trabalho de Boaventura et al. (2019) (

Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Iniciadores utilizados no sequenciamento parcial do receptor de rianodina de *Spodoptera frugiperda* (região II a VI do domínio intramembranar).

Iniciador	Sentido 5' – 3'	Sequência
Sf. 1-F	Senso	5'-TCAAGGTGGCTGCAGTACTG-3'
Sf. 2-F	Senso	5'-GCCATCGAAGCTGAGAGCAA-3'
Sf. 3-F	Senso	5'-AGGCAGCAAGGGACTGATTC-3'
Sf. 1-R	Antissenso	5'-GTTCCCTGTTGACCTCGTCGT-3'
Sf. 2-R	Antissenso	5'-GAAGAAGTCCCAGCATCGCT-3'

As reações de amplificação foram conduzidas a 95°C por 5 min (1 ciclo), 95°C por 30s, 60°C por 30s e 70°C por 40s (45 ciclos), seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos, sendo a eficiência da reação de amplificação verificada via eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido 6 µL brometo de etídio, em solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) em voltagem constante de 100 V e posterior visualização em transiluminador. Após confirmação de amplificação, as amostras foram purificadas e encaminhadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, onde foi

realizado o sequenciamento com os primers senso e antissenso de todas as amostras na plataforma ABI 3730XL® (Applied Biosystems®).

A sequência parcial de aminoácidos do receptor de rianodina de *S. frugiperda* das linhagens suscetível (MK805909.1), BA-R (ON653045), TF-R 4790M (ON653048), TF-R 4790K (ON653047) e TF-R 4790K/M (ON653046) foram alinhadas a sequências já relatadas na literatura como *P. xylostella* (GenBank AET09964), *T. absoluta* (GenBank APC65631), *S. exigua* (GenBank AFC36359), *S. frugiperda* (GenBank MK226188) utilizando o software Geneious v. 10.2.3 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand).

3.3 Resultados

3.3.1 Seleção das linhagens de BA-R e TF-R *Spodoptera frugiperda* resistente a diamidas

A partir das 63 isofamílias testadas de São Desidério – BA utilizando a metodologia de F₂ screen, 13 isofamílias sobreviveram (BA-R) resultando em uma frequência alélica do gene de resistência de 0,0556 (0,0308 – 0,0870) na população. Para a linhagem TF-R, foram testadas 91 isofamílias coletadas em Tasso Fragoso – MA, sendo 16 isofamílias positivas (TF-R) correspondendo a 0,0020 (0,0010 – 0,0086) de indivíduos contendo o alelo de resistência na população de Tasso Fragoso.

3.3.2 Caracterização da resistência das linhagens BA-R e TF-R de *S. frugiperda* a flubendiamide

3.3.2.1 Herança da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

A partir da razão da CL₅₀ das linhagens resistentes pela CL₅₀ da linhagem suscetível, foi observada uma razão resistência superior a 4557-vezes para flubendiamide.

As curvas de concentração-mortalidade das progênes F₁ dos cruzamentos recíprocos apresentaram uma resposta bastante similar para ambos os cruzamentos, com sobreposição dos intervalos de confiança dos valores de CL₅₀. A razão de resistência dos cruzamentos recíprocos foram de 2,21 a 3,00 para a linhagem BA-R e 1,41 a 1,62 para TF-R. Dessa maneira, os resultados indicam que a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide é autossômica (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Concentração-mortalidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e resistentes (BA-R; TF-R) a flubendiamide e heterozigotos provenientes de cruzamentos recíprocos.

Linhagem	<i>n</i>	Coef. Angular ± EP	CL ₅₀ (95% CI) (µg i.a./cm ²)	χ ²	gl ^a	RR ^b
Sus	768	1,53 ± 0,11	0,29 (0,21 – 0,39)	16,2	9	-
BA-R	784	0,70 ± 0,26	>1321,59	2,8	10	> 4557
Sus ♀ x BA-R ♂	832	1,39 ± 0,12	0,64 (0,41 – 0,87)	18,1	9	2,21
Sus ♂ x BA-R ♀	832	1,38 ± 0,13	0,87 (0,58 – 1,28)	26,3	10	3,00
TF-R	512	0,80 ± 0,13	>1321,59	3,4	5	> 4557
Sus ♀ x TF-R ♂	512	1,53 ± 0,13	0,41 (0,29 – 0,58)	9,73	7	1,41
Sus ♂ x TF-R ♀	496	1,29 ± 0,11	0,47 (0,29 – 0,64)	8,67	7	1,62

^a gl, graus de liberdade

^b Razão de resistência (RR), CL₅₀ linhagem resistente/CL₅₀ linhagem suscetível

3.3.2.2 Dominância da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

A dominância da resistência de *S. frugiperda* pode variar de conforme a concentração de flubendiamide utilizada. Segundo a metodologia de Bourguet et al. (2000), a dominância diminuiu com o aumento da concentração de flubendiamide, apresentando uma herança dominante nas concentrações mais baixas, tendendo a uma herança incompletamente recessiva a totalmente recessiva nas concentrações mais altas (Tabela 3.4). Nas concentrações próximas às utilizadas em campo (~ 3,17 µg i.a./cm²) a dominância foi menor que 0,18 para BA-R e menor que 0,01 para TF-R (Figura 3.1), indicando uma dominância incompletamente recessiva.

Tabela 3.4. Efeito da dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em função da concentração do inseticida das linhagens suscetível, resistentes BA-R e TF-R e heterozigotas.

Concentração ($\mu\text{g i.a./cm}^2$)	Sus	BA-R ♂ x Sus ♀		TF-R ♂ x Sus ♀		BA-R	TF-R
	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Dominância (D)	Mortalidade (%)	Dominância (D)	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)
0,00	2,08	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00
0,07	14,58	3,13	0,79	21,87	0,50	0,00	0,00
0,13	36,46	4,69	0,87	25,00	0,31	0,00	0,00
0,74	64,58	46,88	0,27	59,38	0,08	0,00	0,00
2,38	87,50	71,35	0,18	78,15	0,01	0,00	0,00
7,40	100,00	86,98	0,13	97,92	0,02	0,00	0,00
13,22	100,00	92,19	0,08	100,00	0,00	0,00	0,00
132,16	100,00	98,44	0,02	100,00	0,00	2,08	4,69
1321,59	100,00	100,00	0,00	100,00	0,00	6,25	29,69

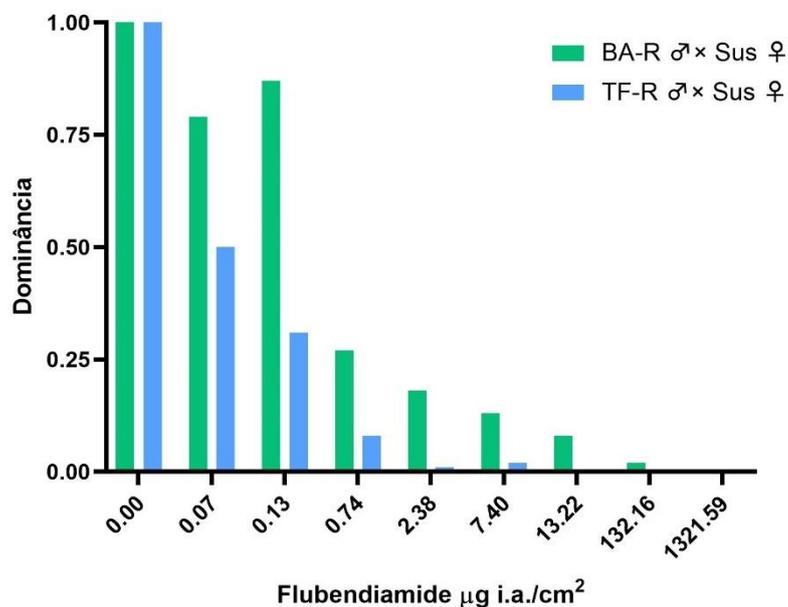


Figura 3.1. Efeito da dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide em função da concentração do inseticida das linhagens suscetível, resistentes BAR-R e TF-R e heterozigotas.

O grau de dominância estimado pelo método proposto por Stone (1968) variou entre - 0,82 e - 0,74 para BA-R e -0,89 a -0,92 para TF-R para os cruzamentos recíprocos H₁ e H₂, respectivamente. Ambas as análises corroboram com a hipótese de que a resistência de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide é incompletamente recessiva.

3.3.2.3 Número de genes associados à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide

A partir da mortalidade observada e esperada de indivíduos provenientes de retrocruzamentos das linhagens heterozigotas com os parentais resistentes, aceitou-se a hipótese de herança da resistência possuir caráter monogênico (Tabela 3.5). Os valores de mortalidade foram significativos pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,001$), apenas na menor dose testada para a linhagem BA-R. No entanto, não foi observada diferença significativa nas demais concentrações o que permite caracterizar a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide como monogênica.

Tabela 3.5. Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre as linhagens resistentes e a progênie F₁ (cruzamentos recíprocos entre as linhagens BA-R, TF-R e Sus) de *Spodoptera frugiperda* para diferentes concentrações de flubendiamide.

Concentração ($\mu\text{g i.a./cm}^2$)	BA-R						TF-R					
	BA-R ♀ x F1 ♂			BA-R ♂ x F1 ♀			TF-R ♀ x F1 ♂			TF-R ♂ x F1 ♀		
	^a Obs.	^b Exp.	χ^2	Obs.	Exp.	χ^2	^a Obs.	^b Exp.	χ^2	Obs.	Exp.	χ^2
0,13	12,5	2,34	28,84*	10,42	2,34	18,22*	0	19,53	0,04	0	19,53	0,04
1,32	29,69	28,9	0,02	36,88	28,9	1,98	17,97	37,5	0,30	6,25	37,5	0,10
13,22	31,25	39,06	1,64	43,75	39,06	0,59	45,32	50	0,45	40,18	50	0,40
74,00	39,58	47,92	1,78	46,88	47,92	0,03	51,04	50	0,51	43,75	50	0,44
132,16	45,83	49,71	0,38	43,75	49,71	0,91	48,22	52,1	0,44	48,44	52,1	0,44
1321,59	59,38	50,5	2,02	53,13	50,5	0,18	70	64,58	0,38	69,79	64,58	0,38

^a Mortalidade observada ^b Mortalidade esperada baseada em herança mendeliana

*Diferença significativa ($P = 0,001$, graus de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada

A estimativa do número mínimo de segregações independentes estimada foi entre 1,42 a 2,84 para BA-R e 1,3 a 1,77 para TF-R, sugerindo que a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide está relacionada a um número de *loci* baixo.

3.3.2.4 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e diamidas antranílicas (clorantraniliprole, ciantraniliprole e tetraniliprole)

O inseticida flubendiamide apresentou valores de CL₅₀ igual a 0,29 (0,21 – 0,39) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para linhagem suscetível de referência e >1321,59 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para as linhagens resistentes a flubendiamide, apresentando uma razão de resistência >4557 vezes (Tabela 3.6). Para as moléculas clorantraniliprole e ciantraniliprole a linhagem Sus apresentou valores de CL₅₀ de 0,06 (0,04 – 0,08) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ e 0,01 (0,005 – 0,0014) $\mu\text{g i.a./cm}^2$, respectivamente. Para clorantraniliprole, as linhagens

resistentes apresentaram uma razão de resistência de 692 para a BA-R e 3917 vezes para TF-R e para ciantraniliprole de 1799 vezes para a linhagem BA-R e de 7475 vezes para a TF-R. Os dados obtidos indicam a presença de resistência cruzada entre os inseticidas flubendiamide e as demais diamidas antranílicas. Dessa maneira, os inseticidas do grupo das diamidas, ambas ftálicas e antranílicas, precisam ser utilizadas com moderação e rotacionadas para o manejo de resistência. Além disso, a linhagem TF-R apresentou maiores razões de resistência em comparação à resposta da linhagem BA-R, o que indica diferenças de suscetibilidade da linhagem em virtude das mutações encontradas na população.

Tabela 3.6. Dose-mortalidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e resistente a flubendiamide (BA-R e TF-R) em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial às moléculas inseticidas flubendiamide, clorantraniliprole e ciantraniliprole.

Linhagem	n	Ingrediente ativo	Coef. Angular ± EP	CL ₅₀ (IC 95%) (µg i.a./cm ²)	χ ²	gl ^a	RR ^b
Sus	768	Flubendiamide	1,53 ± 0,11	0,29 (0,21 – 0,39)	16,2	9	-
BA-R	784		0,70 ± 0,26	>1321,59	2,81	13	> 4557
TF-R	512		0,80 ± 0,13	>1321,59	3,4	5	> 4557
Sus	464	Clorantraniliprole	1,33 ± 0,10	0,06 (0,04 – 0,08)	5,25	10	-
BA-R	496		1,73 ± 0,08	41,51 (25,21 – 75,80)	18,20	8	692
TF-R	448		1,02 ± 0,08	235,03 (157,01 – 321,78)	10,61	7	3917
Sus	224	Ciantraniliprole	3,64 ± 0,66	0,01 (0,005 – 0,014)	0,74	6	-
BA-R	384		1,62 ± 0,16	17,99 (3,44 – 36,62)	21,33	6	1799
TF-R	800		1,13 ± 0,07	74,75 (39,10 – 123,54)	12,75	7	7475

^a gl, graus de liberdade

^b Razão de resistência (RR), CL₅₀ linhagem resistente/CL₅₀ linhagem suscetível

3.3.2.5 Dominância funcional da resistência das linhagens de *S. frugiperda* resistentes a flubendiamide

Com base no experimento foi possível observar 100% (91,19 – 100%) de mortalidade da linhagem Suscetível e Sus ♀ x BA-R/TF-R ♂ para todos os produtos e sobrevivência em torno de 10% para os produtos flubendiamide e clorantraniliprole

para a linhagem Sus ♂ x BA-R/TF-R ♀ (Figura 3.2). No entanto, não foi observada diferença significativa entre elas pela sobreposição dos intervalos de confiança.

Para a linhagem resistente TF-R, foi observado baixa eficiência dos produtos, apresentando mortalidade de 5% (1,07 – 16,11%) para flubendiamide, 2,5% (0,26 - 12,87%) para clorantraniliprole e 17,5% (8,21 – 31,64%) para ciantraniliprole (

Tabela 3.7). Esses resultados indicam que apesar das moléculas diamidas possuírem o mesmo mecanismo de ação, existem pequenas divergências na afinidade da ligação da molécula ao receptor.

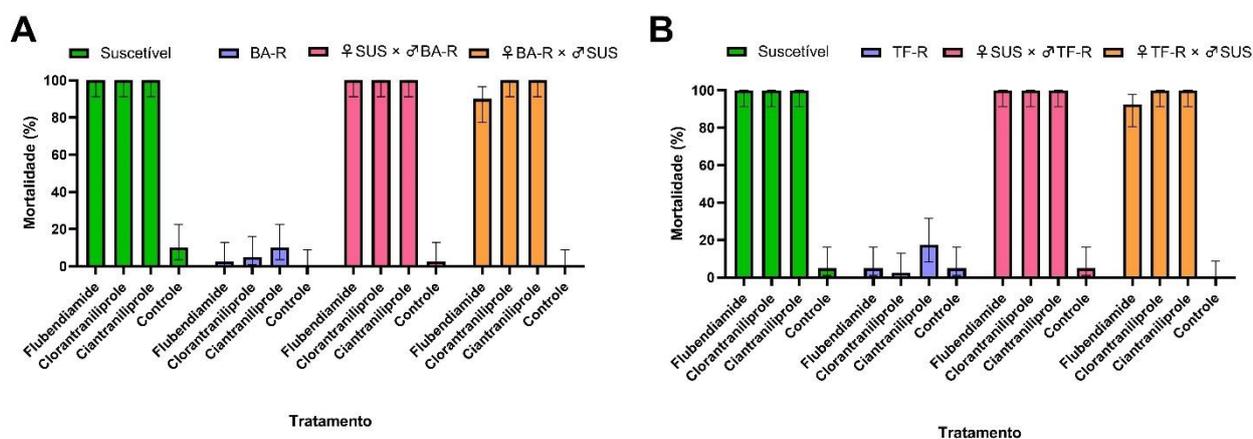


Figura 3.2. Mortalidade e intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens BA-R (A), TF-R (B), Suscetível e heterozigotos em folhas de milho imersas em soluções inseticidas na dose recomendada em bula dos produtos Belt® (Flubendiamide), Prêmio® (Clorantraniliprole), Benevia® (Ciantraniliprole).

Tabela 3.7. Mortalidade e intervalo de confiança 95% (IC 95%) das linhagens BA-R, TF-R, suscetível e heterozigotos em folhas de milho imersas em soluções inseticidas na dose recomendada em bula dos produtos Belt® (Flubendiamide), Prêmio® (Clorantraniliprole) e Benevia® (Ciantraniliprole).

Linhagem	Controle	Flubendiamide	Clorantraniliprole	Ciantraniliprole
	Mortalidade % (IC95)	Mortalidade % (IC95)	Mortalidade % (IC95)	Mortalidade % (IC95)
Suscetível	5,0 (1,07 - 16,11)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)
BA-R	0,0 (0,00 - 8,81)	2,5 (0,27 - 12,87)	5,0 (1,07 - 16,11)	10,0 (3,50 - 22,61)
♀ SUS x ♂ BA-R	2,5 (0,27 - 12,87)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)
♀ BA-R x ♂ SUS	0,0 (0,00 - 8,81)	90,0 (77,39 - 96,50)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)
TF-R	5 (1,07 - 16,11)	5,0 (1,07 - 16,11)	2,5 (0,26 - 12,87)	17,5 (8,21 - 31,64)
♀ SUS x ♂ TF-R	5 (1,07 - 16,11)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)	100,0 (91,19 – 100,00)
♀ TF-R x ♂ SUS	0	92,5	100,0	100

	(0,00 - 8,81)	(80,59 - 97,81)	(91,19 - 100,00)	(91,19 - 100,00)
--	---------------	-----------------	------------------	------------------

3.3.2.6 Sequenciamento da região II a VI do receptor de rianodina das linhagens resistentes a flubendiamide

Os pares de primers utilizados proporcionaram o sequenciamento de uma região contendo 1433 pares de base (pb) para as linhagens resistentes e 1410 pb para a linhagem Suscetível. As fitas consenso de cada linhagem foram alinhadas com as sequências já reportadas na literatura e a tradução foi baseada na sequência de referência de *P. xylostella* (AET09964).

Não foi observada a presença da mutação G4903E reportada para *P. xylostella* (Rodistakis et al., 2017) (Figura 3.3) em nenhuma das linhagens selecionadas para flubendiamide. No entanto, foi observado a presença de duas mutações na posição I4790M/K reportada para *T. absoluta* (Steinbach et al., 2015) e *S. frugiperda* (Boaventura et al., 2019). A mutação I4790M foi observada em ambas as populações BA-R e TF-R, apresentando a sequência nucleotídeos “ATG” traduzindo o aminoácido metionina (M) ao invés de isoleucina (I) (Figura 3.4, Figura 3.5). Já a linhagem TF-R apresentou 3 genótipos distintos, com indivíduos apresentando a mutação I4790M, I4790K apresentando s sequência de nucleotídeos “AAA” traduzindo o aminoácido lisina (K) e indivíduos heterozigotos apresentando as duas mutações I4790M/K.

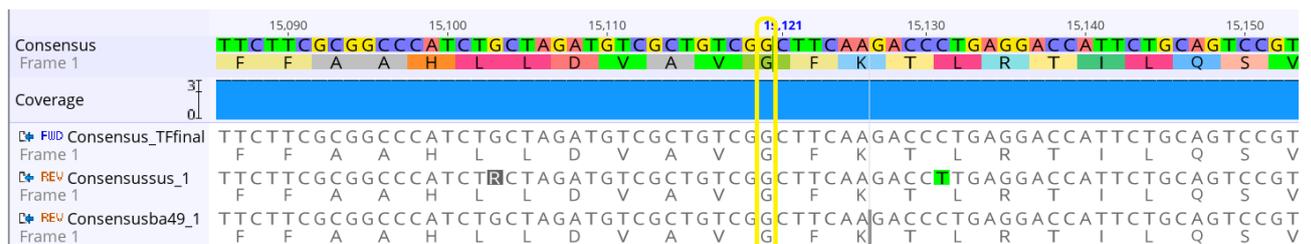


Figura 3.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos das linhagens Suscetível, BA-R e TF-R da região parcial do receptor de rianodina compreendendo a região G4946E.



Figura 3.4. Alinhamento da sequência de aminoácidos de três indivíduos utilizando primers senso e antissenso, da região parcial do receptor de rianodina compreendendo a região I4790M/K, alinhados com a tradução do receptor de *Plutella xylostella* (GenBank AET09964).

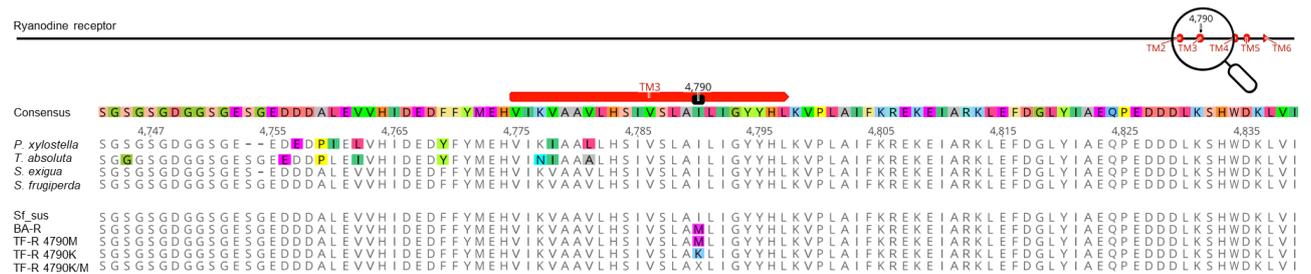


Figura 3.5. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da região parcial do receptor de rianodina de espécies de lepidópteros pragas compreendendo a região I4790M/K associada a resistência à diamidas e linhagens suscetível, resistentes (BA-R; TF-R) de *Spodoptera frugiperda* a flubendiamide. O número de acesso da sequências referenciadas são: *Plutella xylostella* (AET09964), *Tuta absoluta* (APC65631), *Spodoptera exigua* (AFC36359), *S. frugiperda* (MK226188), Sf_sus (MK805909.1), BA-R (ON653045), TF-R 4790M (ON653048), TF-R 4790K (ON653047) and TF-R 4790K/M (ON653046).

3.4 Discussão

Com o objetivo de caracterizar os alelos resistentes e a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide foram selecionadas duas linhagens por F₂ screen apresentando elevadas razões de resistência (RR >4557 vezes), apresentando resistência autossômica, incompletamente recessiva e monogênica. Ao serem expostas a diferentes concentrações de flubendiamide, os heterozigotos provenientes de cruzamentos recíprocos não apresentaram diferenças significativas pela sobreposição do intervalo de confiança, indicando que os loci relacionados a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide estão localizados em cromossomos

autossômicos, não possuindo origem mitocondrial ou ligado ao sexo para ambas as linhagens, BA-R e TF-R.

A dominância associada a resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide possui característica incompletamente recessiva em doses próximas a recomendada em bula na cultura do milho apresentando pequena sobrevivência de indivíduos heterozigotos. Essa informação foi confirmada nos ensaios de dominância funcional utilizando plantas de milho tratadas com Belt® (Flubendiamide 480 SC) na dose recomendada em bula, em que os heterozigotos apresentaram sobrevivência variando de 7,5% a 10%. Por fim, a resistência de *S. frugiperda* à diamidas por meio de retrocruzamentos e por testes de segregação gênica demonstrou estar relacionada a um pequeno número de genes, se comportando como uma característica fenotípica associada a herança monogênica. Os resultados obtidos nesse estudo, corroboram com os dados observados no monitoramento da frequência alélica utilizando a metodologia de F₂ screen (vide capítulo 2) e seguem o mesmo padrão de herança observado para *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019) e outras espécies lepidópteros como *P. xylostella* (Steinbach et al., 2015; Ward et al., 2021) e *T. absoluta* (Roditakis et al., 2017).

As linhagens BA-R e TF-R selecionadas para flubendiamide, apresentaram elevados níveis de resistência cruzada as diamidas antranílicas clorantraniliprole e ciantraniliprole. Resultados similares foram reportados para outras espécies como *P. xylostella* e *S. exigua* (Steinbach et al., 2015; Kim et al., 2021; Jouraku et al., 2020), uma vez que flubendiamide e diamidas antranílicas representam a mesma classe química (Jeanguenat, 2013), compartilhando o mesmo modo de ação de acordo com a classificação do Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC) (Sparks; Nauen, 2015).

Nesse estudo, foi detectada a presença de duas substituições de aminoácidos nas linhagens de *S. frugiperda* BA-R e TF-R no RyR na posição I4790 (numeração baseada no genoma de *P. xylostella*) e associadas a resistência à diamidas. A mutação I4790M, já descrita em *P. xylostella* (Guo et al., 2014; Jouraku et al., 2020), *T. absoluta* (Roditakis et al. 2017), *S. exigua* (Zuo et al., 2020), e *S. frugiperda* (Boaventura et al., 2020), e a mutação I4790K, descrita mais recentemente em *P. xylostella* (Jouraku et al., 2020; Jiang et al., 2021). A presença da mutação I4790K apresentou elevados níveis de resistência em *P. xylostella*, e elevada resistência cruzada para diamidas do ácido ftálico e antranílicas, superior ao observado em

linhagens contendo a mutação I4790M (Jiang et al., 2021). Ambas as mutações foram validadas em relação ao seu impacto na ligação de diamidas no RyR. O impacto da mutação I4790K foi funcionalmente comprovada eletrofisiologicamente utilizando células HEK293 recombinantes expressando RyR de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) RyR carregando a mutação I4790K (Jouraku et al., 2020). A importância da mutação I4790M na resistência a diamidas foi funcionalmente comprovada por várias estratégias, sendo uma delas a introgressão *in vivo* da mutação I4790M em linhagem suscetível de *S. exigua* resultando em uma razão de resistência de 20-vezes para clorantraniliprole e flubendiamide (Zuo et al., 2020). Outro estudo inserindo a sequência completa do RyR de uma população mutante de *P. xylostella* em *D. melanogaster*, obteve uma razão de resistência de 22-vezes para flubendiamide e 4-vezes para clorantraniliprole, confirmando o menor impacto sobre a resistência à diamidas (Richardson et al., 2021). Padrões similares foram descritos para linhagem de *S. frugiperda* selecionada para clorantraniliprole apresentando homozigose da mutação I4790M, a qual apresentou elevada razão de resistência para flubendiamide com RR >5400-vezes comparado a clorantraniliprole com 225-vezes (Bolzan et al., 2019). Estudos funcionais utilizando linhagens de *S. frugiperda* mutantes expressando a mutação I4790M/K ainda precisam ser realizados para suportar resultados obtidos *in vivo* para as linhagens BA-R e TF-R.

No presente estudo foi possível realizar a caracterização das bases genéticas da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide, além da presença de resistência cruzada a diamidas antranílicas, e evidenciando pela primeira vez a co-ocorrência das mutações I4790M/K em *S. frugiperda*, demonstrando assim o alto risco de resistência a todas as moléculas desse grupo químico. Esses resultados fornecem informações essenciais para a implementação de programas de manejo de resistência buscando preservar a vida útil de inseticidas do grupo das diamidas.

3.5 Conclusões

- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide é caracterizado como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica;
- A linhagem de *S. frugiperda* resistente a flubendiamide apresenta elevada resistência cruzada para as diamidas antranílicas;

- O genótipo I4790M/K de *S. frugiperda* apresenta maior resistência cruzada para as diamidas antranílicas em comparação ao genótipo I4790M;

Referências

ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. F₂ screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.

BOAVENTURA, D.; BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; OKUMA, D.M.; OMOTO, C.; NAUEN, R. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 76, p. 47–54, 2020. doi:10.1002/ps.5505.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; NASCIMENTO, A.R.; KAISER, I.S.; LIRA, E.C.; AMARAL, F.S.; KANNO, R.H.; MALAQUIAS, J.B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 75, p. 2682–2689, 2019. doi:10.1002/ps.5376.

BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1588-1595, 2000.

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

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

DOURIS, V.; PAPAPOSTOULOU, K.-M.; ILIAS, A.; RODITAKIS, E.; KOUNADI, S.; RIGA, M.; NAUEN, R.; VONTAS, J. Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by CRISPR/Cas9 genome modification in *Drosophila*. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 87, p. 127–135, 2017. doi:10.1016/j.ibmb.2017.06.013.

FORD, E.B. (Ed.). **Ecological genetics**. 4th ed. London: Chapman and Hall, 1975. 442 p.

GEORGHIOU, G. P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Parasitological Review**, San Diego, v. 26, n. 2, p. 224-255, 1969.

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

GUO, L.; LIANG, P.; ZHOU, X.; GAO, X. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 6924, 2014. doi:10.1038/srep06924.

GUTIÉRREZ-MORENO, R.; MOTA-SANCHEZ, D.; BLANCO, C.A.; WHALON, M.E.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; RODRIGUEZ-MACIEL, J.C.; DIFONZO, C. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 112, p. 792–802, 2019. doi:10.1093/jee/toy372.

JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: The Diamides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 7–14, 2013. doi:10.1002/ps.3406.

JIANG, D.; QIAN, C.; WANG, D.; WANG, F.; ZHAO, S.; YANG, Y.; BAXTER, S.W.; WANG, X.; WU, Y. VARYING Contributions of three ryanodine receptor point mutations to diamide insecticide resistance in *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 77, p. 4874–4883, 2021. doi:10.1002/ps.6534.

JOURAKU, A.; KUWAZAKI, S.; MIYAMOTO, K.; UCHIYAMA, M.; KUROKAWA, T.; MORI, E.; MORI, M. X.; MORI, Y.; SONODA, S. Ryanodine receptor mutations (G4946E and I4790K) differentially responsible for diamide insecticide resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, 2020. doi:10.1016/j.ibmb.2019.103308.

KATO, K.; KIYONAKA, S.; SAWAGUCHI, Y.; TOHNISHI, M.; MASAKI, T.; YASOKAWA, N.; MIZUNO, Y.; MORI, E.; INOUE, K.; HAMACHI, I.; ET AL. Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in the lepidopterous ryanodine receptor Ca^{2+} release channel. **Biochemistry**, Washington, v. 48, p. 10342–10352, 2009. doi:10.1021/bi900866s.

KIM, J.; NAM, H.Y.; KWON, M.; CHOI, J.H.; CHO, S.R.; KIM, G.-H. Novel diamide resistance-linked mutation in Korean *Spodoptera exigua* and a LAMP assay based on a mutation-associated intronic InDel. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 94, p. 1017–1029, 2021. doi:10.1007/s10340-020-01314-7.

LAHM, G.P.; SELBY, T.P.; STEVENSON, T.M. et al. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, p. 4898-906, 2005.

LAHM, G.P.; STEVENSON, T. M.; SELBY, T. P.; FREUDENBERGER, D. C.; FLEXBER, L.; BELLIN, C. A.; DUBAS, C. M.; SMITH, K. A. H.; HOLLINGSHAUS, J. G.; CLARK, C. E.; BENNER, E.A. Rynaxypyrtm: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 17, p. 6274-6279, 2007.

LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within population. **Genetics**, Bethesda, v. 99, p. 541-553, 1981.

LIRA, E. C., BOLZAN, A., NASCIMENTO, A. RB., AMARAL, F. AS., KANNO, R. H., KAISER, I. S., OMOTO, C. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.5812, 2020.

MA, R.; HAJI-GHASSEMI, O.; MA, D.; JIANG, H.; LIN, L.; YAO, L.; SAMURKAS, A.; LI, Y.; WANG, Y.; CAO, P.; ET AL. Structural basis for diamide modulation of ryanodine receptor. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 16, p. 1246–1254, 2020. doi:10.1038/s41589-020-0627-5.

NASCIMENTO, A.R.B.; FARIAS, J.R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. doi:10.1002/ps.4057.

NAUEN, R. Insecticide mode of action: Return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 690–692, 2006. doi:10.1002/ps.1254.

OKUMA, D.M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; SILVA, A.P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1441–1448, 2018. doi:10.1002/ps.4829.

QI, S.; LÜMMEN, P.; NAUEN, R.; CASIDA, J.E. Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, p. 4077–4082, 2014. doi:10.1021/jf501236h.

R CORE TEAM (2020). — European Environment Agency Available online: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>.

RIBEIRO, R. DA S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. Universidade de São Paulo, 2014.

RICHARDSON, E.; HOMEM, R. A.; TROCZKA, B. J.; GEORGE, C. H.; EBBINGHAUS-KINTSHER, U.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R.; DAVIES, TG. E. Diamide insecticide resistance in transgenic *Drosophila* and Sf9-cells expressing a full-length diamondback moth ryanodine receptor carrying an I4790M mutation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 78, p. 869-880, 2021. doi: 10.1002/ps.6730.

RICHARDSON, E.B.; TROCZKA, B.J.; GUTBROD, O.; DAVIES, T.G.E.; NAUEN, R. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.93, p.911–928, 2020. doi:10.1007/s10340-020-01220-y.

RODITAKIS, E.; STEIBACH, D.; MORITZ, G.; VASAKIS, E.; STAVRAKAKI, M.; ILIAS, A.; GARCIA-VIDAL, L.; MARTINEZ-AGUIRRE, M. DEL R.; BIELZA, P.; MOROU, E.; SILVA, J. E.; SILVA, W. M.; SIQUEIRA, H. A. A.; IQBAL, S.; TROCZA, B. J.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C.; TSAGKARAKU, A.; VONTAS, J.; NAUEN, R. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 80, p. 11 – 20, 2017.

ROUSH R. T.; MILLER, G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79 (2), p. 293-298, 1986.

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

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

SATTELLE, D.B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T.R. Insect ryanodine receptors: Molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, Sheffield, v. 8, p. 107, 2008. doi:10.1007/s10158-008-0076-4.

SILVA, J. E.; ASSIS, C. P. O.; RIBEIRO, L. M. S.; SIQUEIRA, H. A. A. Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109 (5), p. 2190-2195, 2018.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practices of statistics in biological research. New York: W.H. Freeman, 1995. 880p.

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 122–128, 2015. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014.

STEINBACH, D.; GUTBROD, O.; LUMMEN, P.; MATTHIESEN, S.; SCHORN, C.; NAUEN, R. Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamides insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 63, p. 14 – 22, 2015.

STONE, B.F. A formula for determining the degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 38, p. 325-326, 1968.

SUN, Y.; XU, L.; CHEN, Q.; QIN, W.; HUANG, S.; JIANG, Y.; QIN, H. Chlorantraniliprole resistance and its biochemical and new molecular target mechanisms in laboratory and field strains of *Chilo suppressalis* (Walker). **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1416–1423, 2018. doi:10.1002/ps.4824.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, p. 703–712, 1991.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; FURUYA, T.; SEO, A.; KODAMA, H.; TSUBATA, K.; FUJIOKA, S.; KODAMA, H.; HIROOKA, T.; NISHIMATSU, T. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, p. 354–360, 2005. doi:10.1584/jpestics.30.354.

TROCZKA B. J., ZIMMER C. T., ELIAS J., SCHORN, C. BASS, C., DAVIES, T. G., FIELD, L. M., WILLIAMSON, M. S., SLATER, R., NAUEN, R. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 873–880, 2012.

TROCZKA, B.J.; WILLIAMS, A.J.; WILLIAMSON, M.S.; FIELD, L.M.; LÜEMMEN, P.; DAVIES, T.G.E. Stable expression and functional characterization of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 14680, 2015. doi:10.1038/srep14680.

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

WARD, C.M.; PERRY, K.D.; BAKER, G.; POWIS, K.; HECKEL, D.G.; BAXTER, S.W. A Haploid Diamondback Moth (*Plutella xylostella* L.) Genome assembly resolves 31 chromosomes and identifies a diamide resistance mutation. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 138, n. 103622, 2021. doi:10.1016/j.ibmb.2021.103622.

YAO, R.; ZHAO, D.-D.; ZHANG, S.; ZHOU, L.-Q.; WANG, X.; GAO, C.-F.; WU, S.-F. Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with special reference to diamides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 73, p. 1169–1178, 2017. doi:10.1002/ps.4439.

ZUO, Y.; WANG, H.; XU, Y.; HUANG, J.; WU, S.; WU, Y.; YANG, Y. CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 89, p. 79 – 85, 2017.

ZUO, Y.-Y.; MA, H.-H.; LU, W.-J.; WANG, X.-L.; WU, S.-W.; NAUEN, R.; WU, Y.-D.; YANG, Y.-H. Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, Beijing, v. 27, p. 791–800, 2020. doi:10.1111/1744-7917.12695.

4 LINHAS-BÁSICAS DE SUSCETIBILIDADE A TETRANILIPROLE EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

Os inseticidas do grupo das diamidas têm sido amplamente utilizados para controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) desde sua introdução no Brasil em 2009. As diamidas são importantes ferramentas para o manejo dessa praga principalmente nas culturas do milho, soja e algodão, no entanto, já foram relatados casos de resistência de *S. frugiperda* a diamidas do ácido ftálico e antranílicas. Novas moléculas antranílicas vêm sendo desenvolvidas para o controle de lepidópteros-praga, tais como tetraniliprole. Sendo assim, com o objetivo de implementar estratégias proativas de manejo da resistência foram realizados estudos de caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em 10 populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil em 2018/19 e 2020/21 e avaliação de resistência cruzada a flubendiamide. A variação na suscetibilidade a tetraniliprole foi de 1,43 vezes a 5,71 vezes nas populações de *S. frugiperda* avaliadas. A mortalidade média variou de 73,44% a 99,78% na dose diagnóstica de 0,44 µg i.a./cm² (CL₉₉ da linhagem suscetível) e de 77,68% a 99,33% na dose de 0,74 µg i.a./cm² (CL₉₉ da linhas-básica de suscetibilidade) em populações de *S. frugiperda* amostradas na safra de 2021/22. Foi detectada elevada resistência cruzada para duas linhagens de *S. frugiperda* resistentes previamente selecionadas para flubendiamide, apresentando uma razão de resistência cruzada (RR) de 79-vezes para a linhagem BA-R e de 832-vezes para a linhagem TF-R em relação a testemunha. Estudos utilizando plantas de milho tratadas com a dose recomendada de tetraniliprole foram expostas a lagartas de terceiro ínstar das linhagens suscetível, heterozigotas e resistentes. Foi observado 100% de mortalidade para as linhagens suscetível e heterozigotas, e mortalidade variando entre 10% a 20% para as duas linhagens resistentes. A exposição prévia de populações de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas podem impactar a eficiência de novas moléculas do mesmo grupo devido a resistência cruzada. Dessa maneira, estratégias de manejo da resistência devem ser implementadas urgentemente, a fim de se preservar a vida útil e a eficiência de controle de inseticidas diamidas para o controle de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, Linha-básica suscetibilidade, Tetraniliprole, Manejo de resistência à inseticidas.

Abstract

Diamides insecticides have been widely used in Brazil for *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) control since its introduction in 2009. Diamides are still an important tool for this specie management in row crops such as maize, soybean and cotton, however, cases of resistance of *S. frugiperda* have already been reported to phthalic acid and anthranilic diamides. Novel anthranilic molecules are being developed for lepidoptera species control such as tetraniliprole. To implement a proactive resistance management strategies, we conducted baseline studies in 10 populations of *S. frugiperda* sampled in the major maize-growing regions from Brazil in 2018/19 and 2020/21 and assessed the cross-resistance to flubendiamide. The variability in the

susceptibility of *S. frugiperda* populations to tetraniliprole was 1.43-fold to 5.71-fold. In average, the mortality varied from 73.44% to 99.78% at 0,44 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ (LC_{99} of the susceptible strain) and 77.68% to 99.33% at 0.74 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ (LC_{99} of baseline susceptibility data) for populations sampled in 2021/22 crop-season. It was detected high cross-resistance for two *S. frugiperda* resistant strains previously selected to flubendiamide, with a resistant ratio (RR) of 79-fold for BA-R strain and of 832-fold for TF-R strain. Treated-maize plants with tetraniliprole at the recommended field rate were exposed to larvae of 3rd instar of susceptible, heterozygous and resistant strains. It was observed 100% mortality for susceptible and heterozygous strains with 100% control, and mortality varying from 10% to 20% for both resistant strains. The pre-exposure of *S. frugiperda* to diamide insecticides can impact the efficacy of new diamides molecules due to cross-resistance. Therefore, insecticide resistance management strategies must be adopted immediately in order to preserve the lifetime and efficiency of diamide insecticides for *S. frugiperda* control.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Susceptibility baseline, Tetraniliprole, Insecticide resistance management.

4.1 Introdução

Nos últimos anos houve significativo avanço na implementação de estratégias manejo de integrado de pragas na agricultura com a utilização de plantas geneticamente modificadas e maior adoção de produtos biológicos. No entanto, o uso de inseticidas químicos ainda permanece como principal método utilizado no controle de pragas em diversas culturas. Já foram reportados aproximadamente 600 casos de resistência para ácaros e insetos, afetando a produção agrícola a nível mundial (Sparks; Nauen, 2015; Sparks et al., 2019). A resistência a inseticidas é um problema de longa data que afeta a eficiência e sustentabilidade dos produtos voltados para proteção de cultivos, prejudicando não somente produtores rurais, mas também afetando a capacidade de empresas de todo o mundo em investir em novos compostos. Atualmente o registro de novas moléculas para o controle de pragas está cada vez mais escasso devido à dificuldade em se desenvolver novos modos de ação, ao aumento dos custos de pesquisa e produção e devido às exigências regulatórias mais rigorosas (Sparks, 2013; Sparks; Lorsbach et al., 2017).

Os inseticidas do grupo das diamidas apresentam características desejáveis para serem incorporados ao programa de manejo integrado de pragas, uma vez que apresentam baixa toxicidade a mamíferos e alta seletividade a inimigos naturais, além da ausência de resistência múltipla com inseticidas de outros grupos químicos (Tohnishi et al., 2005; Lahm et al., 2005; Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012). No entanto, devido ao seu intenso uso, já foram

relatados na literatura mais de nove casos de resistência a diversos lepidópteros-praga (Richardson et al., 2020), incluindo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Bolzan et al., 2019) principal praga agrícola das Américas, causando prejuízos na cultura do milho, além de outras culturas de importância agrícola como algodão e soja (Pogue, 2002; Montezano et al., 2018)

O tetraniliprole é a mais recente molécula do grupo das diamidas a ser desenvolvida pela Bayer CropScience, apresentando amplo-espectro de ação e elevada eficiência no controle de lepidópteros, coleópteros e dípteros em baixas dosagens (Li et al., 2019). Derivada da molécula ciantraniliprole, a molécula também possui um grupo cianeto e apresenta translocação sistêmica na planta, sendo recomendado para tratamento de semente (Alam et al., 2020), aplicações no solo e foliar (Li et al., 2019a, 2019b). Até o momento, não foram relatados casos de tolerância ou resistência de *S. frugiperda* a tetraniliprole. No Brasil, inseticidas do grupo das diamidas estão presentes desde 2009 e já foram reportados casos de resistência de *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019) e *T. absoluta* (Silva et al., 2018) a diamidas do ácido ftálico e antranílicas. Além disso, foi relatada existência de elevada resistência cruzada para todas as moléculas do grupo químico das diamidas para linhagens de *S. frugiperda* selecionada para clorantraniliprole (Bolzan et al., 2019) e flubendiamide (vide capítulo 2).

A fim de se desenvolver estratégias de manejo de resistência proativas buscando a sustentabilidade e preservação da molécula tetraniliprole, foram realizados estudos de caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade e monitoramento da resistência nas principais regiões produtoras de milho no Brasil, na safra de 2020/21. Além disso, foram conduzidos estudos para entender a possibilidade de resistência cruzada entre tetraniliprole e flubendiamide.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Populações de campo e linhagens

As populações de *S. frugiperda* utilizadas no estudo foram coletadas nos principais Estados produtores de soja, milho e algodão: Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná nas safras agrícolas de 2018/19 e 2020/21 (Figura 4.1). Foram coletadas aproximadamente 1000 lagartas de cada localidade em diferentes culturas hospedeiras como milho e milheto.

As lagartas provenientes das coletas de campo foram acondicionadas em bandejas e/ou copos plásticos contendo dieta artificial (Kasten Jr. et al, 1978) e enviadas ao Laboratório de Manejo de Resistência FHI – Bayer S.A./Paulínia, permanecendo até o estágio de pupa. As pupas obtidas foram retiradas e acondicionadas em gaiolas PVC (policloreto de vinila, 20 cm de diâmetro × 20 cm altura) revestidos internamente com papel jornal e com “voil” na parte superior (substratos para oviposição). As gaiolas foram colocadas sobre um prato acrílico (40 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) e para a alimentação dos adultos foi oferecida uma solução de mel em água a 10% embebida em algodão hidrófilo. A cada 2 dias as posturas foram retiradas e as gaiolas substituídas. Os ovos obtidos foram acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido (1 × 1 cm) para a manutenção da umidade e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e 12h de fotofase. As lagartas recém-eclodidas na geração F1 foram transferidas para copos plásticos transparentes (100 mL) contendo dieta artificial, onde permaneceram até atingirem o 3º instar, estágio no qual foram utilizadas nos bioensaios.

As linhagens suscetível (Sus) e resistentes (BA-R e TF-R) utilizadas para os estudos de resistência cruzada e eficácia de tetraniliprole foram obtidas conforme descrito no capítulo 3. As linhagens BA-R e TF-R foram mantidas sob pressão de seleção utilizando a concentração de flubendiamide na dose de $132,16 \mu\text{g i.a./cm}^2$ durante quatro dias em todas as gerações. Já a linhagem Sus foi mantida sem pressão de inseticidas ou proteínas *Bt*.

4.2.2 Linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de *S. frugiperda*

Para caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *S. frugiperda* foram realizadas curvas de concentração-resposta para 10 populações coletadas em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil por meio de bioensaios de tratamento superficial da dieta (Tabela 4.1, Figura 4.1). Foram utilizados de oito a 10 concentrações espaçadas logaritmicamente de tetraniliprole (Vayego®) (200 g a.i./L) diluídas em água destilada e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Como tratamento testemunha foi utilizado água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Nas células contendo os tratamentos foram individualizadas lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda*, que permanecerão se alimentando por

um período de 96 horas, em câmara climatizada “BOD”, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $50 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase. Após quatro dias de exposição ao produto, foi avaliada a mortalidade de *S. frugiperda*, sendo consideradas mortas as lagartas que não mudaram de ínstar e aquelas que não apresentaram movimentos coordenados quando tocadas com um pincel.

Tabela 4.1. Populações utilizadas para caracterização da linha-básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole durante as safras 2018/19 e 2020/21.

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
2ª Safra 2018/19				
Campo Novo do Parecis, MT	11°42'56,16" S	55°18'44,74" O	Milho	11/02/2019
Sapezal, MT	13°30'44,00" S	58°47'47,00" O	Milho	30/04/2019
Lucas do Rio Verde, MT	12°48'15,00" S	56°25'40,00" O	Milho	29/03/2019
Rio Brilhante, MS	21°42'37,40" S	54°39'09,80" O	Milho	08/04/2019
Araguari, MG	18°40'23,90" S	48°09'27,10" O	Milho	05/04/2019
Campo Mourão, PR	24°03'40,00" S	52°21'29,00" O	Milho	04/04/2019
Palotina, PR	24°19'38,30" S	54°07'45,20" O	Milho	04/04/2019
Ponta Grossa, PR	25°07'21,90" S	50°01'17,90" O	Milho	18/04/2019
2ª Safra 2021/22				
Deciolândia, MT	14°11'00,00" S	57°33'11,00" O	Milho	10/01/2021
Campo Mourão, PR	24°03'40,00" S	52°21'29,00" O	Milho	16/02/2022



Figura 4.1. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para a caracterização da linha-básica de suscetibilidade a tetraniliprole durante as safras 2018/19 e 2020/21.

Os dados de mortalidade das populações foram submetidos à análise de Probit por meio do software POLO PLUS (Leora Software). A partir das curvas, foi estimada a concentração letal 50 (CL₅₀), os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular. As doses diagnósticas e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) estimados a partir da obtenção da concentração letal 99% (CL₉₉) foram calculados através da análise conjunta dos dados de mortalidade das linhas-básicas de suscetibilidade utilizando o modelo linear generalizado com a função *glm* e suas funções de ligação probit e cloglog do pacote *binom* e *ecotox* no programa R 3.4.1. (R Development Core Team, 2017).

4.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a tetraniliprole

O monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a tetraniliprole foi realizado para doze populações coletadas na primeira e segunda safra de 2020/21 (Tabela 4.2; Figura 4.2). Foi utilizado o inseticida tetraniliprole (Vayego®) (200 g a.i./L) nas concentrações diagnósticas de 0,0726 µg i.a./cm², CL₉₉ da população suscetível de referência e 0,1271 µg i.a./cm², CL₉₉ proveniente da análise conjunta das linhas-básicas de suscetibilidade das populações de campo diluído em água destilada e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Como tratamento testemunha foi utilizada água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. A unidade experimental dos bioensaios de ingestão foi constituída de placas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ), totalizando 448 lagartas por população, sendo consideradas 16 lagartas por repetição. Os ensaios foram realizados utilizando a mesma metodologia do item 4.2.2.

Com base nos resultados obtidos no monitoramento fenotípico, foram estimados a probabilidade de mortalidade e os intervalos de confiança 95% (IC 95%) para cada população testada, utilizando a função *binom.exact* do pacote *binom* do programa R 3.4.1. (R Development Core Team, 2017).

Tabela 4.2. Populações utilizadas para o monitoramento fenotípico da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole amostradas durante as safras de 2020/21.

Cidade, UF	Latitude	Longitude	Cultura	Data de Coleta
1ª Safra 2021/22				
Sorriso, MT	12° 25' 59" S	55° 38' 15" O	Milheto	19/11/2021
Dourados, MS	22° 16' 46" S	54° 38' 56" O	Milho	23/11/2021
Lucas do Rio Verde, MT (I)	13° 00' 19" S	55° 58' 05" O	Milho	24/11/2021
2ª Safra 2021/22				
Deciolândia, MT	14° 11' 00" S	57° 33' 11" O	Milho	10/01/2021
Correntina, BA (I)	13° 21' 16" S	44° 40' 22" O	Milho	13/01/2022
Primavera do Leste, MT	15° 18' 39" S	54° 14' 32" O	Milho	07/02/2022
Correntina, BA (II)	13° 21' 16" S	44° 40' 22" O	Milho	10/02/2022
Campo Mourão, PR	24° 03' 40" S	52° 21' 29" O	Milho	16/02/2022
Rio Verde, GO	17° 46' 41" S	50° 58' 14" O	Milho	08/03/2022
Lucas do Rio Verde, MT (II)	12° 15' 17" S	55° 22' 59" O	Milho	11/03/2022
Araguari, MG	18° 37' 22" S	48° 14' 03" O	Milho	22/03/2022
Uberlândia, MG	18° 53' 58" S	48° 09' 36" O	Milho	25/04/2022

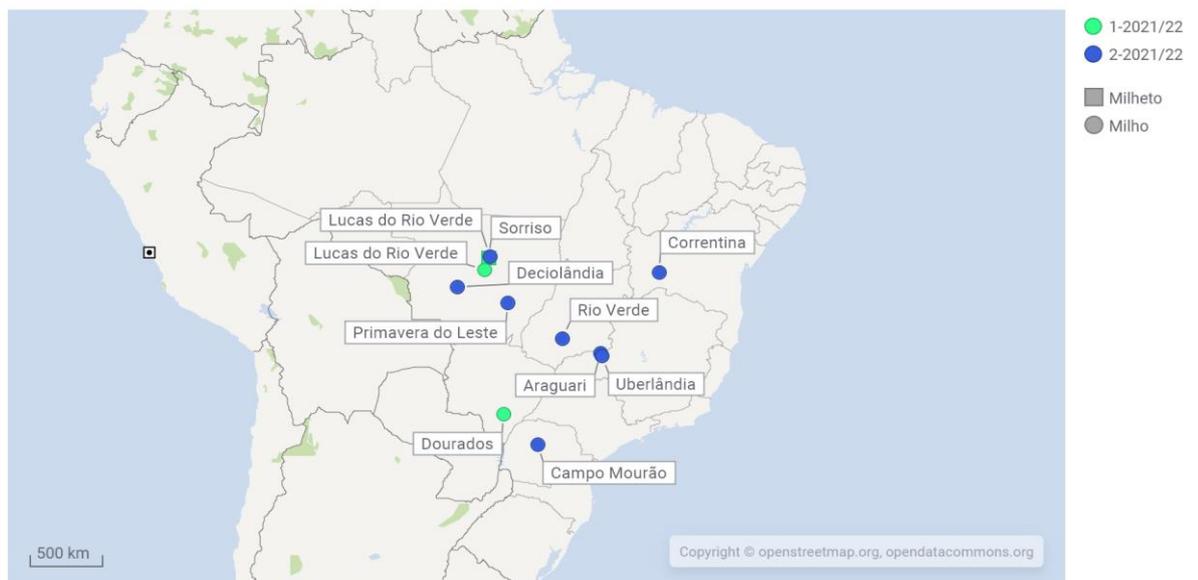


Figura 4.2. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Spodoptera frugiperda*, utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade ao inseticida tetraniliprole nas safras de 2021/22.

4.2.4 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e tetraniliprole

A caracterização da resistência cruzada de *S. frugiperda* foi realizada a partir das curvas de concentração-resposta para as linhagens Sus, BA-R e TF-R para o inseticida tetraniliprole (Vayego®) (200 g i.a./L) seguindo a mesma metodologia do

item 4.2.2. Os dados de mortalidade das linhagens foram submetidos à análise de Probit por meio do software POLO PLUS (Leora Software). A partir das curvas, foram estimadas as concentrações letais média (CL_{50}), os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular. A razão de resistência foi estimada mediante a divisão da CL_{50} das curvas de suscetibilidade da população resistente pela CL_{50} da população suscetível.

4.2.5 Dominância funcional e eficiência agrônômica de tetraniliprole em linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistentes a flubendiamide em condições de laboratório

Sementes de milho convencional (P30F53 RR) foram semeadas em vasos plásticos de 5 L (2 sementes/vaso). Após a germinação, uma única planta foi mantida em cada vaso. No estágio fenológico V_3-V_4 , folhas totalmente desenvolvidas foram cortadas em áreas de 4 cm² de área e imersas por 3 segundos em soluções inseticidas contendo Vayego® (Tetraniliprole 200 g/L) e água destilada diluídos em um volume de calda de 150 L/ha. As folhas foram alocadas em placas de petri de 90 mm (CRAL®), contendo solução de ágar a 1% e papel filtro para evitar contato direto da folha com o ágar. Após secagem do produto, foram infestadas com uma única lagarta de 3º instar de *S. frugiperda* das respectivas linhagens de interesse.

Para o ensaio de dominância funcional, foram utilizadas lagartas de terceiro instar das linhagens suscetível, resistente (BA-R e TF-R) e heterozigotas (♀Sus x ♂BA-R, ♀BA-R x ♂Sus, ♀Sus x ♂TF-R, ♀TF-R x ♂Sus), utilizando a dose 150 mL/ha de Vayego® (Tetraniliprole 200 g/L). Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência de tetraniliprole no controle da linhagem resistente TF-R utilizando diferentes doses de Vayego® (Tetraniliprole 200 g/L) variando de 150 a 300 mL/ha.

Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições, sendo que cada repetição foi constituída de 10 placas de Petri. Após sete dias, as lagartas sobreviventes foram recuperadas e, em laboratório, criadas em dieta artificial até a emergência de adultos. Foram estimados a probabilidade de mortalidade e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para cada tratamento, utilizando a função *binom.exact* do pacote *binom* do programa R 3.4.1. (R Development Core Team, 2017).

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de *S. frugiperda* do Brasil

A partir da caracterização das linhas básicas de suscetibilidade a tetraniliprole em populações de *S. frugiperda*, foram observadas algumas variações na suscetibilidade das populações avaliadas, as quais variaram sua CL_{50} entre 0,020 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Ponta Grossa, PR) e 0,080 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Sapezal, MT) de tetraniliprole (Tabela 4.3). As populações que apresentaram maior suscetibilidade foram amostradas em Ponta Grossa (PR), Araguari (MG) e Rio Brilhante (MS) com CL_{50} variando entre 0,020 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 0,030 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em comparação a linhagem suscetível de referência. As menores suscetibilidades foram observadas para as populações amostradas no Estado do Mato Grosso (Sapezal e Campo Novo do Parecis). Em geral, as populações amostradas para estimativa da concentração diagnóstica (CL_{99}) apresentaram variações de suscetibilidade variando 1,43 a 5,71-vezes em relação a linhagem suscetível de referência. Houve diferença significativa na resposta da maioria das populações amostradas em relação a CL_{50} da população suscetível de referência devido à não sobreposição dos intervalos de confiança, com exceção da população de Ponta Grossa (PR), apresentando elevada suscetibilidade a tetraniliprole.

Tabela 4.3. Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a tetraniliprole para populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas na cultura do milho na safra 2018/19 e 2020/21.

Cidade, DF	N	Coeficiente angular \pm EP	CL ₅₀ (95% CI)	CL ₉₉ (95% CI)	χ^2	gl ^a	Variação*
			($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
Suscetível	928	2,33 \pm 0,16	0,014 (0,011 - 0,018)	0,14 (0,087 - 0,307)	20,01	10	-
2ª Safra 2018/19							
Campo Novo do Parecis, MT	576	2,53 \pm 0,47	0,066 (0,047 - 0,091)	0,695 (0,583 - 1,112)	0,88	8	4,71
Sapezal, MT	864	1,73 \pm 0,19	0,080 (0,06 - 0,15)	0,795 (0,535 - 1,139)	3,83	8	5,71
Lucas do Rio Verde, MT	640	2,04 \pm 0,22	0,054 (0,042 - 0,069)	0,442 (0,307 - 0,638)	6,22	8	3,86
Rio Brilhante, MS	576	2,00 \pm 0,41	0,030 (0,017 - 0,045)	0,439 (0,272 - 0,709)	1,98	8	2,14
Araguari, MG	640	2,79 \pm 0,48	0,025 (0,019 - 0,034)	0,601 (0,183 - 0,794)	7,47	8	1,79
Campo Mourão, PR	576	2,42 \pm 0,44	0,057 (0,039 - 0,079)	0,291 (0,206 - 0,41)	2,53	8	4,07
Ponta Grossa, PR	640	1,88 \pm 0,34	0,020 (0,013 - 0,030)	0,461 (0,201 - 0,792)	1,41	8	1,43
Palotina, PR	640	1,97 \pm 0,21	0,052 (0,040 - 0,066)	0,516 (0,352 - 0,757)	6,48	8	3,71
2ª Safra 2021/22							
Deciolândia, MT	896	1,66 \pm 0,14	0,047 (0,036 - 0,059)	0,756 (0,584 - 1,219)	4,2	9	3,36
Campo Mourão, PR	896	1,46 \pm 0,09	0,049 (0,040 - 0,058)	0,764 (0,536 - 1,07)	6,78	9	3,50

^a g.l., graus de liberdade

^b Variação da suscetibilidade, CL₅₀ linhagem resistente/CL₅₀ linhagem suscetível

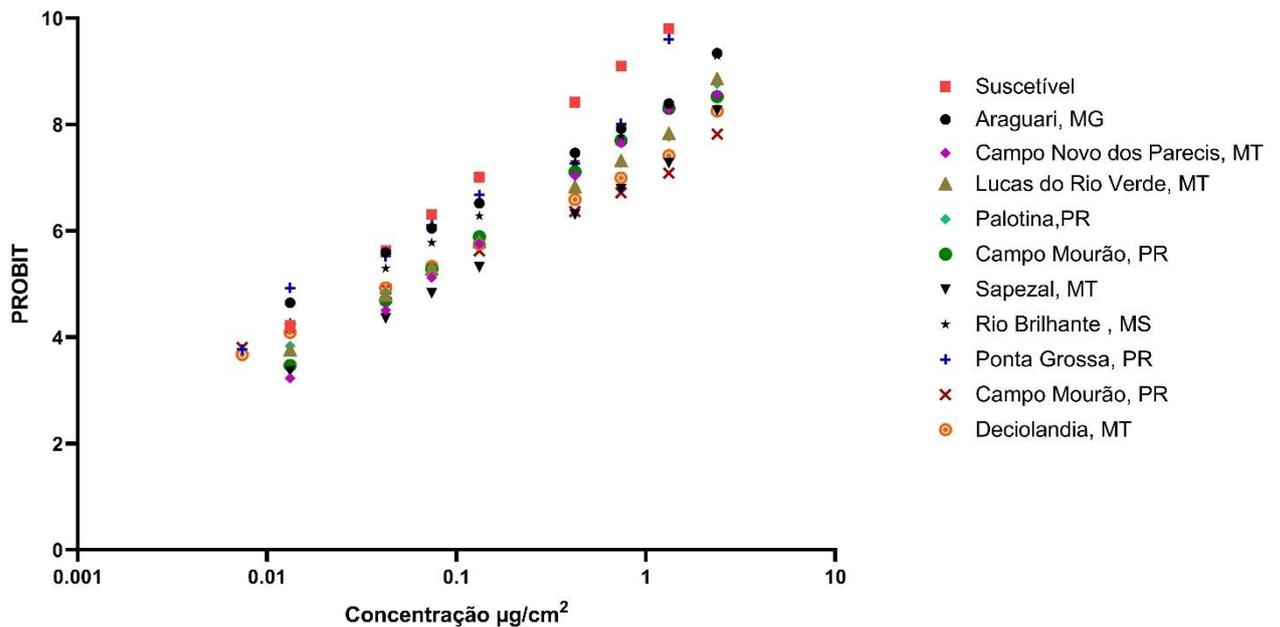


Figura 4.3. Curvas de concentração-resposta de tetraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas nas safras 2018/19, 2021/22 e linhagem suscetível de referência.

Pela análise conjunta dos dados de mortalidade das curvas de concentração-resposta foi estimada a concentração diagnóstica baseada na CL_{99} da população suscetível e da análise conjunta para ser utilizada nos ensaios de monitoramento de suscetibilidade de *S. frugiperda* à tetraniliprole. A CL_{50} da população suscetível de referência (Sus) foi de 0,014 (0,011 – 0,018) e a CL_{99} de 0,140 (0,087 – 0,307) $\mu\text{g i.a./cm}^2$. Já a análise conjunta das dez populações de campo de *S. frugiperda* coletadas na safra 2018/19 e 2021/22 apresentou uma CL_{50} de 0,070 (0,057 – 0,084) e CL_{99} de 0,774 (0,717 – 0,836) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ de tetraniliprole (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Concentração-mortalidade de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e análise das curvas de concentração-resposta conjunta de treze populações coletadas na safra 2018/2019 e 2020/21 (linha-básica de suscetibilidade).

Linhagem	n	Coeficiente angular \pm EP	CL_{50} (IC 95%)	CL_{99} (IC 95%)	χ^2	g.l. ^a	Variação ^b
			($\mu\text{g/cm}^2$)	($\mu\text{g/cm}^2$)			
Suscetível	928	2,33 \pm 0,16	0,014 (0,011 - 0,018)	0,140 (0,087 - 0,305)	20,01	10	-
Baseline	6784	1,69 \pm 0,04	0,070 (0,057 - 0,084)	0,774 (0,717 - 0,836)	37,89	8	5,00

^a gl, graus de liberdade

^b Variação, CL_{50} linhagem resistente/ CL_{50} linhagem suscetível

Baseado na média e nos limites superiores dos intervalos de confiança (IC 95%), foram estabelecidas duas concentrações diagnósticas de 0,44 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ e 0,74 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para monitorar a suscetibilidade de *S. frugiperda* para tetraniliprole.

4.3.2 Monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a tetraniliprole

Na safra agrícola de 2021/22 foram amostradas 12 populações coletadas nos Estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná. As lagartas na geração F₁, quando expostas a concentração diagnóstica de tetraniliprole na CL₉₉ da população suscetível de referência (0,44 $\mu\text{g i.a./cm}^2$), apresentaram uma maior sobrevivência, diferindo da população suscetível de referência (Sus), com exceção da população amostrada em Campo Mourão (SP) com 99,78% (98,06 – 99,86%) de mortalidade. Foi observada uma variação na mortalidade larval das populações de *S. frugiperda*, variando de 73,44% (69,09 – 77,47%) em Sorriso (MT) a 99,78% (98,76 – 100%) em Campo Mourão (PR) (Figura 4.4). As populações que apresentaram menor suscetibilidade foram amostradas no Estado do Mato Grosso (MT) e Bahia (BA).

Tabela 4.5. Mortalidade larval (%) e intervalo de confiança (IC 95%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas as concentrações diagnósticas de tetraniliprole.

Cidade, UF	Tetraniliprole 0,44 mg i.a./cm ²				Tetraniliprole 0,74 mg i.a./cm ²			
	Total Testados	Total Mortos	Mortalidade %	IC 95%	Total Testados	Total Mortos	Mortalidade %	IC 95%
Suscetível	448	444	99,11	(97,73 - 99,76)	448	0	100	(99,18 - 100,0)
1ª Safra de 2021/22								
Sorriso, MT	448	329	73,44*	(69,09 - 77,47)	448	348	77,68*	(73,53 - 81,45)
Dourados, MS	448	98	87,50*	(79,92 - 92,99)	448	432	96,43*	(94,26 - 97,95)
Lucas do Rio Verde, MT (I)	656	529	80,64*	(77,40 - 83,60)	560	528	94,29*	(92,03 - 96,06)
2ª Safra de 2021/22								
Decirolândia, MT	448	404	90,18*	(87,04 - 92,77)	448	405	90,4*	(87,29 - 92,97)
Correntina, BA (I)	448	347	77,46*	(73,30 - 81,24)	448	397	88,62*	(85,30 - 91,41)
Primavera do Leste, MT	448	389	86,83*	(83,34 - 89,82)	448	413	92,19*	(89,30 - 94,49)
Correntina, BA (II)	448	426	88,84*	(85,55 - 91,60)	448	398	95,09*	(92,66 - 96,90)
Campo Mourão, PR	448	447	99,78	(98,76 - 100,0)	448	445	99,33	(98,06 - 99,86)
Rio Verde, GO	448	387	86,38*	(82,86 - 89,42)	448	409	91,29*	(88,29 - 93,74)
Lucas do Rio Verde, MT (II)	448	363	81,03*	(77,08 - 84,55)	448	407	90,85*	(87,79 - 93,35)

*Houve diferença estatística entre a mortalidade da população amostrada no campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

Quando expostas a concentração diagnóstica de tetraniliprole na concentração diagnóstica estabelecida por meio das curvas de concentração-resposta de suscetibilidade de 0,74 µg i.a./cm², as lagartas provenientes das populações amostradas apresentaram maior mortalidade (Figura 4.5). No entanto, ainda diferiram da população suscetível de referência (Sus), com exceção das populações amostradas em Campo Mourão (PR) com 99,33% (98,06 – 99,86%), Araguari e Uberlândia (MG) com 98,51% (96,97 – 99,44%) e 98,66% (97,11 – 99,51%) de mortalidade, respectivamente. As amostradas no Estado do Mato Grosso (Sorriso) e Bahia (Correntina I) continuaram apresentando menores mortalidades com mais de 11% a 26% de sobrevivência no monitoramento fenotípico, respectivamente.

Em geral, foi observada elevada mortalidade para as populações amostradas, com uma variação de 77,68% a 99,33% (Figura 4.4) apresentando elevada suscetibilidade da maioria das populações para tetraniliprole.

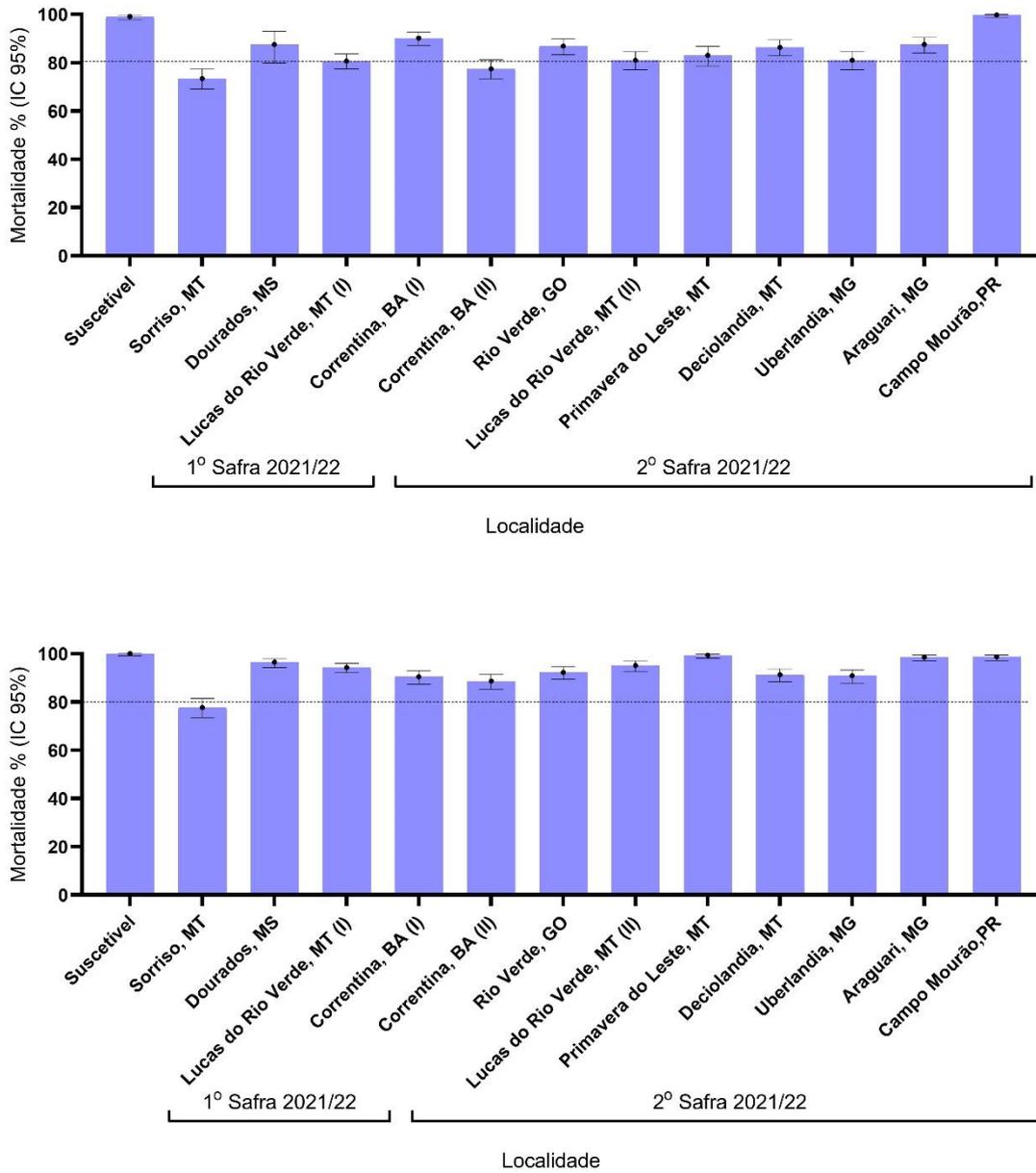


Figura 4.4. Monitoramento fenotípico da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a tetraniliprole em populações amostradas em diferentes localidades brasileiras durante a primeira e segunda safra de 2021/22 na concentração diagnóstica da população suscetível de referência de 0,44 µg i.a/cm² (A) e baseline de suscetibilidade de 0,74 µg i.a/cm² (B).

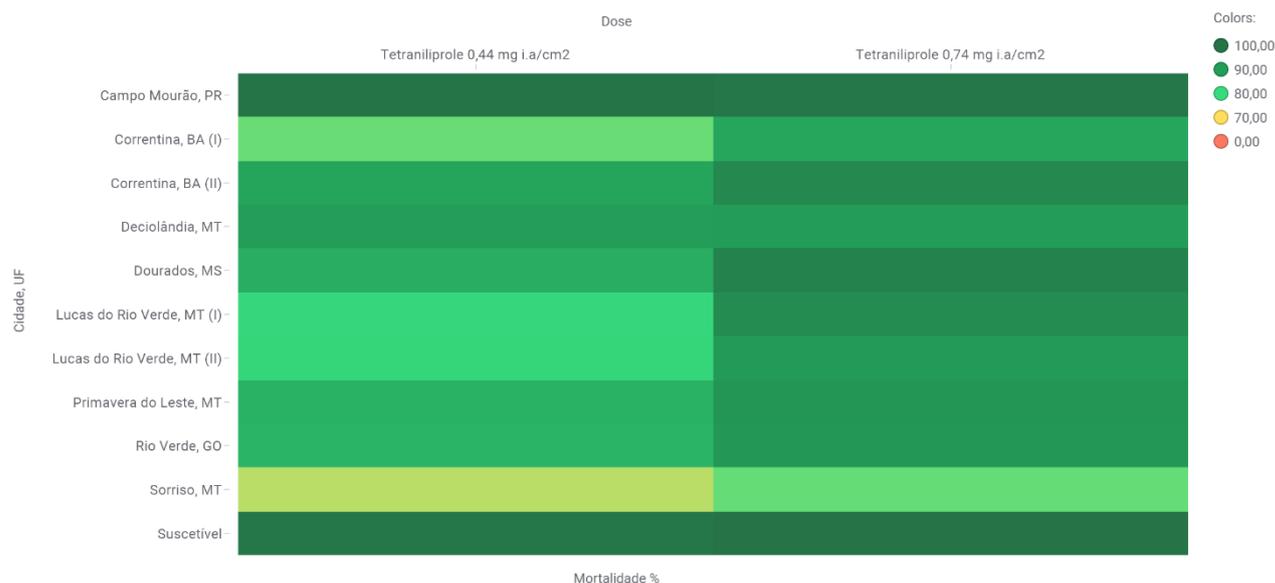


Figura 4.5. Mapa de calor comparativo da mortalidade larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* amostradas durante a primeira e segunda safra 2021/22 expostas a concentrações diagnósticas de tetraniliprole de 0,44 e 0,74 $\mu\text{g i.a./cm}^2$.

4.3.3 Avaliação de resistência cruzada entre flubendiamide e tetraniliprole

Os resultados das curvas de concentração-resposta para tetraniliprole nas linhagens suscetível e resistentes (BA-R, TF-R) estão apresentados na Tabela 4.6. Foi observado uma CL₅₀ de 0,349 (0,023 – 0,008), 2,765 (2,111 – 3,790) e 29,052 (11,295 – 61,887) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para as linhagens Sus, BA-R e TF-R, respectivamente, apresentando diferenças significativas entre as três linhagens. A linhagem resistente TF-R apresentou maior resistência cruzada com uma razão de resistência de 832,44-vezes em comparação a linhagem BA-R com 79,23-vezes. Os dados obtidos indicam uma elevada resistência cruzada das linhagens selecionadas para flubendiamide e tetraniliprole, principalmente da linhagem que possui a mutação I4790K (TF-R).

Tabela 4.6. Dose-mortalidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (Sus) e resistente a flubendiamide (BA-R e TF-R) em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial à molécula inseticida tetraniliprole.

Linhagem	n	Ingrediente ativo	Coef. Angular ± EP	CL ₅₀ (IC 95%) (µg i.a./cm ²)	χ ²	g.l. ^a	RR ^b
Sus	816	Tetraniliprole	1,47 ± 0,11	0,0349 (0,023 – 0,008)	12,53	11	-
BA-R	448		1,41 ± 0,14	2,765 (2,111 – 3,790)	7,06	9	79,23
TF-R	736		0,73 ± 0,06	29,052 (11,295 – 61,887)	20,05	7	832,44

^a gl, graus de liberdade

^b Razão de resistência (RR), CL₅₀ linhagem resistente/CL₅₀ linhagem suscetível

4.3.4 Dominância funcional e eficácia de tetraniliprole em linhagens de *S. frugiperda* resistentes a flubendiamide em condições de laboratório

Com base no experimento foi possível observar 100% (91,19 – 100%) de mortalidade da linhagem suscetível e heterozigotas (♀Sus x ♂BA-R/TF-R; ♂Sus x ♀BA-R/TF-R) para tetraniliprole (Figura 4.6). Para as linhagens resistentes BA-R e TF-R, foi observado baixa eficiência dos produtos, apresentando mortalidade de 10% (3,50 – 22,61%) e 22,5% (11,8 – 37,3%), respectivamente, não apresentando diferenças significativas devido a sobreposição dos intervalos de confiança (Figura 4.6).

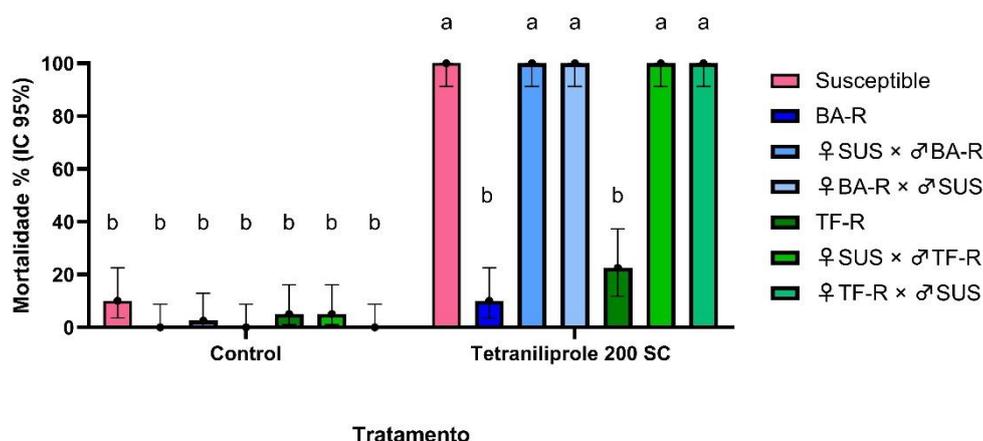


Figura 4.6. Mortalidade ± intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens Suscetível, BA-R, TF-R e heterozigotos (Sus ♀ x ♂ BA-R/TF-R; ♂ Sus x ♀ BA-R/TF-R) em folhas de milho imersas em solução inseticida de Vayego® (Tetraniliprole 200 SC) na concentração de 150 mL/ha.

Com base nos resultados obtidos na avaliação de eficácia de tetraniliprole na linhagem resistente TF-R, foi possível observar 100% (91,19 – 100%) de mortalidade da linhagem Suscetível em todas as doses testadas de tetraniliprole (Figura 4.7). Para a linhagem resistente TF-R, foi observado maior eficiência na dose de 300 mL/ha com mortalidade de 80% (64,35 – 90,94%), seguida da dose de 250 e 200 mL/ha com 65,00% (48,3 – 79,4%) e 62,5% (45,8 – 77,3%), e por fim a dose de 150 mL/ha com 32,5% (25,8 – 57,3%) (Figura 4.7).

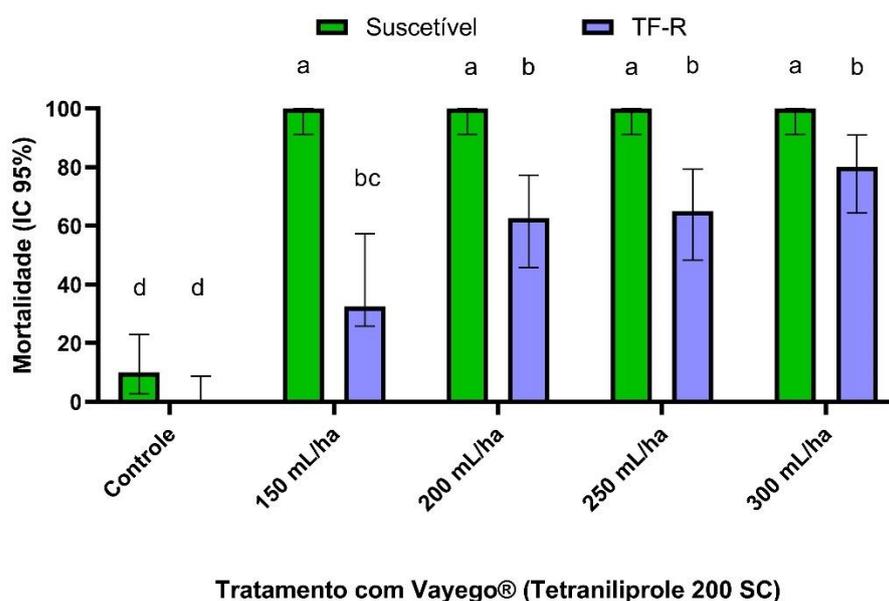


Figura 4.7. Mortalidade e intervalo de confiança (IC 95%) das linhagens TF-R e suscetível em folhas de milho imersas em soluções inseticidas com diferentes concentrações do produto Vayego® (Tetraniliprole 200 SC).

4.4 Discussão

Com o objetivo de se investigar a suscetibilidade das populações brasileiras a tetraniliprole, foram estabelecidas das linhas-básicas de suscetibilidade para 10 populações de *S. frugiperda*, amostradas nas principais regiões produtoras de milho nas safras agrícolas de 2018/19 e 2020/21. A definição de linhas-básicas de suscetibilidade baseada em curvas de concentração-resposta é um dos primeiros passos em programas de monitoramento da resistência, pois indicam a suscetibilidade e a variação natural de diferentes populações. Foi possível observar uma variação de 1,43-vezes a 5,71-vezes entre as populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil, sendo as maiores variações encontradas em populações amostradas no Estado do Mato Grosso indicando uma menor

suscetibilidade dessas populações em comparação às demais (Ffrench-constant; Roush, 1990). Linhas básicas de suscetibilidade a tetraniliprole também foram estabelecidas para populações *S. frugiperda* da Índia que apresentou variações de 2,30-vezes (Kulye et al., 2021).

O monitoramento da suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* foi realizado utilizando duas concentrações diagnósticas de 0,44 µg i.a./cm² e 0,74 µg i.a./cm², apresentando diferenças estatísticas na resposta de populações que tiveram menores mortalidades como Bahia e Mato Grosso. Em geral, a suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* a tetraniliprole variou geograficamente nos cinco Estados do Brasil, na safra 2021/22, com maior suscetibilidade no Estado do Paraná. As populações de *S. frugiperda* provenientes dos Estados da Bahia e Mato Grosso tiveram as menores médias de mortalidade na concentração diagnóstica. Esse fato é esperado uma vez que as regiões agrícolas do Cerrado brasileiro apresentam grandes áreas de expansão agrícola, plantios sucessivos de hospedeiros da praga-alvo e cultivo de duas ou três safras por ano em áreas irrigadas (Pereira et al. 2012, Rada 2013). Assim, o sistema de produção intensivo no Cerrado brasileiro e a ampla plasticidade biológica de *S. frugiperda* favorecem o estabelecimento de uma alta densidade populacional e submetem as populações de pragas a elevada pressão de seleção durante todo o ano. Como previamente relatado, vários casos de resistência de *S. frugiperda* a diversos grupos de inseticidas no Brasil, como piretroides (Diez-Rodriguez; Omoto, 2001), organofosforados (Carvalho et al., 2013), inibidores da biosíntese de quitina (Nascimento et al., 2015), espinosinas (Okuma et al., 2018; Lira et al., 2020), diamidas (Bolzan et al., 2019; Boaventura et al., 2020), benzoato de emamectina (Muraro et al., 2021) e também a proteínas *Bt* (Omoto et al., 2016; Farias et al., 2014; Bernardi et al., 2015; Bernardi et al., 2016) foram inicialmente descobertas nessas mesmas regiões. A adoção de estratégias efetivas de manejo da resistência é extremamente necessária nessas regiões, buscando a sustentabilidade de todas as moléculas utilizadas para controle de *S. frugiperda*.

Foi observada uma elevada resistência cruzada entre tetraniliprole e as linhagens resistentes BA-R, com uma razão de resistência de 79-vezes e TF-R com 831-vezes, suportando os dados obtidos no Capítulo 3, em que ambas as mutações presentes nas linhagens (I4790M e I4790K) mostraram impacto na ligação de diamidas no receptor de rianodina (RyR). Destaque para a população TF-R, a qual

apresentou maiores razões de resistência cruzada para todas as moléculas diamidas (Okuma et al., 2022; Richardson et al., 2021). Os estudos de dominância funcional utilizando folhas de milho indicam elevada mortalidade dos heterozigotos em doses recomendadas em bula (Vayego®, Bayer CropScience) e maior mortalidade de indivíduos resistentes em reposta à dose, indicando uma maior interação de tetraniliprole ao sítio de ligação das diamidas no RyR. Até o momento, não houve relatos de resistência de nenhuma espécie a tetraniliprole (Zhang et al., 2022), incluindo *S. frugiperda* (Kulye et al., 2021). No entanto, a implementação de estratégias de manejo de resistência adequadas e efetivas são cruciais para manutenção da eficiência de todas as moléculas desse grupo químico. Estudos de monitoramento de resistência a tetraniliprole devem ser conduzidos no Brasil, buscando identificar precocemente decréscimos na suscetibilidade de populações ao longo do tempo e de diferentes geografias em resposta à pressão de seleção exercida em cada região, buscando assim, avaliar a efetividade dos programas de manejo da resistência e atualizar as medidas a serem implementadas.

4.5 Conclusões

- Há elevada suscetibilidade a tetraniliprole na maioria das populações de *S. frugiperda* amostradas na safra de 2020/21;
- Há resistência cruzada entre tetraniliprole e flubendiamide em *S. frugiperda*.

Referências

ALAM, T.; PRASAD, R.; KUMAR, R.; SAHOO, S. Studies on efficacy of tetraniliprole 480 FS on maize crop against maize stem borer, *Chilo partellus* (Swinhoe) as seed treatment. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 23, p. 649–652, 2020.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PLOS ONE**, Berkeley, v.10, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0140130.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OKUMA, D.M.; MIRALDO, L.L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 1794–1802, 2016. doi:10.1002/ps.4223.

BOAVENTURA, D.; BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; OKUMA, D.M.; OMOTO, C.; NAUEN, R. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, v.76, p.47–54, 2020. doi:10.1002/ps.5505.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.; NASCIMENTO, A.R.; KAISER, I.S.; LIRA, E.C.; AMARAL, F.S.; KANNO, R.H.; MALAQUIAS, J.B.; OMOTO, C. Selection and Characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 75, p. 2682–2689, 2019. doi:10.1002/ps.5376.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PloS ONE**, Berkeley, v. 8 n. 4, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062268.

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

EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; LUMMEN, P.; LOBITZ, N.; SCHULTE, T.; FUNKE, C.; FISCHER R. Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca^{+2} release channels in insects. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 39, p. 21–33, 2006.

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

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

GUTIÉRREZ-MORENO, R.; MOTA-SANCHEZ, D.; BLANCO, C.A.; WHALON, M.E.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; RODRIGUEZ-MACIEL, J.C.; DIFONZO, C. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 112, p. 792–802, 2019. doi:10.1093/jee/toy372.

KASTEN, Jr. P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, p. 69-78, 1978.

KULYE, M.; MEHLHORN, S.; BOAVENTURA, D.; GODLEY, N.; K.V., S.; RUDRAPPA, T.; CHARAN, T.; RATHI, D.; NAUEN, R. Baseline susceptibility of *Spodoptera frugiperda* populations collected in India towards different chemical classes of insecticides. **Insects**, Basel, v. 12, n. 758, 2021. doi.org/10.3390/insects12080758.

LAHM, G.P.; CORDOVA, D.; BARRY, J.D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 17, p. 4127-4133, 2009.

LAHM, G.P.; SELBY, T.P.; STEVENSON, T.M.; MYERS, B.J.; SEBURYAMO, G.; SMITH, B.K.; FLEXNER, L.; CLARK, C.E.; CORDOVA, D. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, p. 4898-4906, 2005.

LAI T., LI J., SU J. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 101, p. 198–205, 2011.

LARSON, J. L., REDMONT, C. T., POTTER, D. A., Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, p. 740-748, 2012.

LI, W., ZHANG, Y., JIA, H. R., ZHOU, W. W., LI, B. T., & HUANG, H. J. Residue analysis of tetraniliprole in rice and related environmental samples by HPLC/MS. **Microchemical Journal**, New York, v. 150, n. 104168, 2019. doi.org/10.1016/j.microc.2019.104168.

LI, W., ZHANG, Y., JIA, H.R., LI, B.T. Field control effect of 18% tetraniliprole suspension on rice stem borer. **Pesticide** 58, 221–222, 2019a.

Li, W., ZHANG, Y., JIA, H.R., ZHOU, W.W., LI, B.T., HUANG, H.J, Residue analysis of tetraniliprole in rice and related environmental samples by HPLC/MS. **Microchemical Journal**, New York, v. 150, n. 104168, 2019b.

LIRA, E. C., BOLZAN, A., NASCIMENTO, A. RB., AMARAL, F. AS., KANNO, R. H., KAISER, I. S., OMOTO, C. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.5812, 2020.

MONTEZANO, D.G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; ROQUE-SPECHT, V.F.; SOUSA-SILVA, J.C.; PAULA-MORAES, S.V.; PETERSON, J.A.; HUNT, T.E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, Pretoria, v. 26, p. 286–300, 2018. doi:10.4001/003.026.0286.

MURARO, D.S.; NETO, D. de O. A.; KANNO, R. H.; KAISER, I. S.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, Sussex. doi: 10.1002/ps.6545, 2021.

NASCIMENTO, A.R.B.; FARIAS, J.R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. doi:10.1002/ps.4057.

OKUMA, D.M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; SILVA, A.P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 74, p. 1441–1448, 2018. doi:10.1002/ps.4829.

OKUMA, D.M.; CUENCA, A.; NAUEN, R.; OMOTO, C. Large-scale monitoring of the frequency of ryanodine receptor target-site mutations conferring diamide resistance in brazilian field populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, Basel, v. 13, n. 626, 2022. doi.org/10.3390/insects13070626.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 1727–1736, 2016. doi:10.1002/ps.4201.

OWEN, L.; CATCHOT, A. L.; MUSSER, F. R.; GORE, J.; COOK, D. C.; JACKSON, R. Susceptibility of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to reduced-risk insecticides. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 2, p. 554-559, 2013.

PEREIRA, P.A.A.; MARTHA, G.B.; SANTANA, C.A.; ET AL. The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. **Agriculture and Food Security**, Oxford, v. 1, p. 4, 2012. doi.org/10.1186/2048-7010-1-4.

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

R CORE TEAM (2020). — European Environment Agency. Available online: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>>.

RADA, N. Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle. **Food Policy**, Guilford, v. 38, p. 146–155, 2013.

RIBEIRO, R. DA S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. Universidade de São Paulo, 2014.

RICHARDSON, E. Investigation and characterization of diamide insecticide resistance conferred by target-site mutations in the Ryanodine Receptor of lepidopteran pests. **University Wales Institute**, Cardiff, 2019. F – Theses, 195p.

RICHARDSON, E.; HOMEM, R. A.; TROCZKA, B. J.; GEORGE, C. H.; EBBINGHAUS-KINTSHER, U.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R.; DAVIES, T.G. E. Diamide insecticide resistance in transgenic *Drosophila* and Sf9-cells expressing a full-length diamondback moth ryanodine receptor carrying an I4790M mutation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 78, p. 869-880, 2021. doi: 10.1002/ps.6730.

RICHARDSON, E.B.; TROCZKA, B.J.; GUTBROD, O.; DAVIES, T.G.E.; NAUEN, R. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 93, p. 911–928, 2020. doi:10.1007/s10340-020-01220-y.

RODITAKIS E., VASAKIS E., GRISPOU M., STAVRAKAKI, M., NAUEN, R., GRAVOUIL, M, BASSI, A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal Pesticide Science**, Sussex, v. 88, p. 9–16, 2015.

SILVA, J. E.; ASSIS, C. P. O.; RIBEIRO, L. M. S.; SIQUEIRA, H. A. A. Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109 (5), p. 2190-2195, 2018.

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

SPARKS, T.C.; LORSBACH, B.A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. **Pest Management Science**, Sussex, v. 73, p. 672-677, 2017.

SPARKS, T. C.; WESSELS, F. J.; LORSBACH, B. A.; NUGENT, B. M.; WATSON, G. B. The new age of insecticide discovery-the crop protection industry and the impact of natural products. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 161, p. 12–22. 2019. doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.002.

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 122–128, 2015. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; FURUYA, T.; SEO, A.; KODAMA, H.; TSUBATA, K.; FUJIOKA, S.; KODAMA, H.; HIROOKA, T.; NISHIMATSU, T. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, p. 354–360, 2005. doi:10.1584/jpestics.30.354.

TROCZKA B. J., ZIMMER C. T., ELIAS J., SCHORN, C. BASS, C., DAVIES, T. G., FIELD, L. M., WILLIAMSON, M. S., SLATER, R., NAUEN, R. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 873–880, 2012.

ZHANG, Z.; GAO, B.; QU, C.; GONG, J.; LI, W.; LUO, C.; WANG, R. Resistance monitoring for six insecticides in vegetable field-collected populations of *Spodoptera litura* from China. **Horticulture**, Basel, v. 8, n. 255, 2022. doi.org/10.3390/horticulturae8030255.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência de insetos a inseticidas e proteínas *Bt* será um dos problemas da produção agrícola mundial, uma vez que o desenvolvimento de novos modos de ação, não acompanham os números de relatos de pragas com resistência a novos grupos químicos. Dessa maneira, preservar as ferramentas atualmente disponíveis é essencial para manter a eficiência e sustentabilidade de moléculas com bom perfil toxicológico e que possam ser associadas a programas de manejo integrado de pragas, como as diamidas. Estudos de monitoramento, caracterização das bases genéticas e moleculares e o mecanismo associados à resistência são fundamentais para a estruturação de programa de manejo da resistência eficiente. Neste estudo foram utilizados diferentes métodos para monitorar a resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil. Foi realizada a caracterização das bases genéticas associadas à resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide em duas linhagens apresentando diferentes genótipos e seus respectivos mecanismos de resistência. Além disso, foram estabelecidas linhas-básicas de suscetibilidade para monitoramento de populações de *S. frugiperda* a tetraniliprole, a mais recente inovação desse grupo químico.

Os resultados obtidos no monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas sugerem uma estabilidade na frequência de resistência dentro de cada localidade nos últimos 3 anos. Esse fator pode estar relacionado a utilização de ferramentas integradas para o manejo de *S. frugiperda*, como tratamento de semente, utilização de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas *Bt* e a maior adoção de inseticidas com diferentes modos de ação. No entanto, como a frequência do alelo de resistência se encontra alto nas populações, também demonstram que outras estratégias de manejo da resistência devem ser implementadas, a fim de se evitar falhas no controle em razão da evolução da resistência. A frequência da mutação I4790K presente nas populações de campo apresenta maior risco para a sustentabilidade de todo o grupo químico e reforça a adoção de estratégias de manejo de resistência, principalmente em áreas produtoras de algodão e sementes de milho. A identificação e desenvolvimento de metodologias rápidas e precisas para identificação dessas mutações podem ser utilizadas em larga escala para monitoramento de sua evolução nas diferentes populações e assim contribuir para estudos de modelagem e prever possíveis impactos na eficiência de controle.

O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a flubendiamide nas duas linhagens foi caracterizada como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica. Características confirmadas nos estudos de dominância funcional utilizando plantas de milho e pela elevada relação entre os resultados de F₂ e resultados de monitoramento fenotípico. Dessa maneira, a utilização das doses recomendadas em bula aliadas a uma boa tecnologia de aplicação garante quase a totalidade da mortalidade dos indivíduos heterozigotos, estratégia fundamental para diminuir o processo de evolução de resistência no campo.

A partir das linhas básicas de suscetibilidade a tetraniliprole foi possível determinar as concentrações diagnósticas a serem utilizadas nos programas de monitoramento de suscetibilidade de *S. frugiperda*. Resultados do monitoramento da safra de 2021/22 apresentaram elevada suscetibilidade para a maioria das populações testadas, apresentando menores mortalidade para as populações amostradas e Sorriso (MT) e Correntina (BA). Em doses recomendadas do produto, foi possível observar 100% de mortalidade dos heterozigotos e até 80% de controle de indivíduos resistentes, demonstrando uma maior efetividade da molécula em populações resistentes.

As diamidas representam uma excelente opção para o manejo de *S. frugiperda*, no entanto, medidas de manejo de resistência como o contínuo monitoramento da suscetibilidade e frequência alélica nas populações, monitoramento e pulverização de acordo com os níveis de ação, utilização de produtos seletivos a inimigos naturais, plantas transgênicas expressando proteínas *Bt* eficientes, utilização de doses recomendadas em bula e rotação de ativos com diferentes modos de ação deve ser implementadas com urgência para manutenção da efetividade desse grupo químico. Este estudo fornece informações para que táticas de manejo integrado de pragas e manejo de resistência sejam implementadas com o objetivo de diminuir a frequência de resistência no campo e prolongar a vida útil dos inseticidas diamidas no controle de *S. frugiperda*.