

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

Monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência alélica de resistência ao inseticida metaflumizone e à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil

Pedro Henrique Campos Pinho Costa

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

**Piracicaba
2023**

Pedro Henrique Campos Pinho Costa
Bacharel em Agronomia

**Monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência alélica de
resistência ao inseticida metaflumizone e à proteína Cry1Ac expressa em
soja MON87701 × MON89788 em populações de *Helicoverpa armigera*
(Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2023

Dados internacionais de Catalogação da Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Costa, Pedro Henrique Campos Pinho

Monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência alélica de resistência ao inseticida metaflumizone e à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil / Pedro Henrique Campos Pinho Costa. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

74 p.

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

1. *Helicoverpa armigera* 2. Metaflumizone 3. Soja Bt 4. F_2 Screen 5. Monitoramento da suscetibilidade 6. Manejo da resistência de insetos I. Título

A Deus

*Aos meus pais, Flávio e Maria Helena,
pelas orações, apoio e amor. Aos meus irmãos
Flavio Lucas e João Victor, pela amizade.*

A minha companheira de vida Liz Regina.

*E a todos que de forma direta ou indireta
estavam ao meu lado.*

Dedico e Agradeço

AGRADECIMENTOS

À Ele pelo dom da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, paciência, pela confiança, pelas longas conversas motivacionais e sobre a vida, pelo suporte financeiro e por todas as oportunidades concedidas durante a realização desse trabalho. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa processo 88887.483712/2020-00 (PROEX).

A todos os professores do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da ESALQ pelos ensinamentos durante essa caminhada.

Aos funcionários do departamento por todos os auxílios prestados de forma direta e indireta, em especial o Francisco Carlos Prata - “Chico”, José Carlos R. Castilho - “Carlinhos” e Willian B. de Camargo.

À Dra. Eloisa Salmeron – “Elo” pesquisadora assistente do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, por todos os auxílios prestados no início da minha jornada no laboratório durante o período de estágio e nos primeiros meses do curso de mestrado.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Entomologia ESALQ/USP, pelo convívio e companhias nos almoços e jantares.

Ao Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) e a Mariana Durigan (FMC) pelas coletas de populações de *Helicoverpa armigera*.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes Aline S. Guidolin, Antônio Rogério B. do Nascimento, Carolina P. Monteiro, Eduardo M. Perkovski, Emily V. Souza, Everton F. Coutinho, Fernando Semmelroth de A. e Amaral, Gabriel S. Dias, Gabriela A. de Carvalho, Gustavo Z. dos Santos, João Vitor S. da Cruz, Leonardo V. Thiesen, Matheus Sacilotto, Pedro Antônio R. Bazanelli, Pedro Vitor M. Camargo, Rubens H. Kanno e Thalles F. Zambon pela amizade, convívio, cafés, longas e divertidas prosas após o almoço e auxílios na condução deste trabalho.

Aos meus grandes amigos e parceiros da “Equipe Helicoverpa” que percorreram comigo grande parte dessa longa e desafiadora jornada, Anne Caroline S. Küll, Bruno Omoto, Douglas Amado, Fábio M. Führ, Mariana Y. Iuanami, Mateus S. Vitti, Murilo Basso, Ronaldo M. Leal. Muito obrigado!

A todos os colegas e funcionários que passaram pelo laboratório no período em que eu estive por lá, Anderson Bolzan, Dionei S. Muraro, Dyrson de O. Abbade Neto, Fernando E. Oliveira Padovez, Ingrid S. Kaiser, Janice Soares e Juliana G. Rodrigues.

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

Aos meus pais Flávio P. Costa e Maria Helena de Jesus C. P. Costa, e aos meus irmãos Flávio Lucas C. P. Costa e João Victor C. P. Costa por todo apoio, incentivos, pelas orações e todo amor ao longo desses anos.

E a minha companheira de vida Liz Regina S. Silva por todo apoio para realização desse trabalho nos longos feriados e finais de semana contanto com sua ajuda. Muito obrigado!

A todos que me auxiliaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

“O trabalho duro é a soma dos esforços diários e é capaz de vencer o dom natural”

Autor desconhecido.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
Referências.....	17
2. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE E FREQUÊNCIA DE ALELOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO INSETICIDA METAFLOMIZONE EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL.....	21
Resumo.....	21
Abstract	21
2.1. Introdução	22
2.2. Material e Métodos.....	24
2.2.1. Populações de <i>H. armigera</i>	24
2.2.2. Criação de populações de <i>H. armigera</i> em condições de laboratório.....	25
2.2.3. Caracterização das curvas de dose-resposta de <i>H. armigera</i> a metaflumizone.....	25
2.2.4. Monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de <i>H. armigera</i> ...	27
2.2.5. Estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone em <i>H. armigera</i>	29
2.3. Resultados	31
2.3.1. Caracterização das curvas de dose-resposta de <i>H. armigera</i> a metaflumizone.....	31
2.3.2. Monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de <i>H. armigera</i> ...	33
2.3.3. Estimativa da frequência de alelos da resistência a metaflumizone em populações de <i>H. armigera</i>	35
2.4. Discussão	37
2.5. Conclusões	40
Referências.....	41
3. MONITORAMENTO E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA Cry1Ac EXPRESSA EM SOJA MON87701 × MON89788 EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL.....	45
Resumo.....	45

Abstract	46
3.1. Introdução	46
3.2. Material e Métodos	49
3.2.1. Coleta de populações de <i>Helicoverpa</i> spp. em campo	49
3.2.2. Criação de populações de <i>H. armigera</i> em laboratório	51
3.2.3. Monitoramento fenotípico da suscetibilidade à soja MON87701 × MON89788 em populações <i>H. armigera</i>	52
3.2.4. Estimativa da frequência e seleção de alelos da resistência de <i>H. armigera</i> à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788	53
3.2.5. Seleção da linhagem resistente ao evento MON87701 × MON89788	55
3.2.6. Dominância funcional da resistência	56
3.3. Resultados	57
3.3.1. Monitoramento da suscetibilidade de populações de campo de <i>H. armigera</i> ao evento de soja MON87701 × MON89788	57
3.3.2. Estimativa da frequência de alelos da resistência de <i>H. armigera</i> à proteína Cry1Ac ..	58
3.3.3. Seleção da linhagem resistente de <i>H. armigera</i> ao evento de soja MON87701 × MON89788	60
3.3.4. Dominância funcional da resistência	61
3.4. Discussão	63
3.5. Conclusões	66
Referências	68
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

RESUMO

Monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência alélica de resistência ao inseticida metaflumizone e à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil

O controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil tem sido baseado principalmente no uso de inseticidas e plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Casos de resistência de *H. armigera* a diferentes inseticidas já foram documentados no Brasil. Sendo assim, inseticidas com novos modos de ação, tais como metaflumizone (bloqueadores de canais de sódio dependentes da voltagem) podem ser úteis na implementação de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Com o aumento da adoção da soja Bt MON 87701 × MON 89788 que expressa a proteína Cry1Ac, houve uma supressão da densidade populacional de *H. armigera* no Brasil. Contudo, ocorrências esporádicas de lagartas de *Helicoverpa* spp. têm sido reportadas em lavouras de soja Bt nos últimos anos. Sendo assim, para verificar se a evolução da resistência de *H. armigera* à soja Bt era um dos fatores para explicar o aumento destas infestações e possibilitar o uso do inseticida metaflumizone como uma das alternativas para subsidiar um programa de MRI, os objetivos desse estudo foram (i) Caracterizar as curvas de dose-resposta a metaflumizone em populações de *H. armigera*; (ii) Monitorar a suscetibilidade a metaflumizone e soja MON87701 × MON89788 em populações de *H. armigera* coletadas nas safras 2020/21 e 2021/22; (iii) Estimar a frequência de alelos da resistência a metaflumizone e soja MON87701 × MON89788 após 10 anos de cultivo comercial; (iv) Selecionar uma linhagem de *H. armigera* resistente à soja MON87701 × MON89788; e (v) Avaliar a dominância funcional da linhagem resistente de *H. armigera* em folhas de soja MON 87701 × MON 89788. Houve baixa variação (1,84 vezes) na suscetibilidade a metaflumizone em populações de *H. armigera* coletadas na safra 2019/20. Com base na dose diagnóstica (DL_{99}) para metaflumizone, a sobrevivência média variou de \approx 2% (safra 2020/21) a 12% (safra 2021/22). Mediante o uso da técnica de F_2 screen, 179 isofamílias foram avaliadas para estimar a frequência de alelos de resistência a metaflumizone e 55 foram consideradas positivas, resultando em uma frequência estimada de alelos de resistência de 0,0774 (IC 95% = 0,06 - 0,10). De uma safra para outra, houve aumento de \approx 3,2 vezes na frequência de alelos da resistência a metaflumizone. As mortalidades de lagartas de *H. armigera* em folhas de soja Bt foram 100% para todas as populações monitoradas nas safras 2020/21 e 2021/22. Entretanto, em um total de 241 isofamílias F_2 de *H. armigera* testadas quanto à presença de alelos da resistência à soja Bt, 12 isofamílias foram consideradas positivas, resultando em uma frequência alélica estimada de 0,0134 (IC 95% 0,007 - 0,022). Houve um aumento de \approx 12,2 vezes da frequência de alelos da resistência em *H. armigera* à soja Bt em comparação com as estimativas obtidas entre 2013 e 2015. A partir das lagartas sobreviventes de F_2 screen, uma linhagem resistente de *H. armigera* à soja Bt foi selecionada após 8 ciclos de pressão de seleção com lagartas alimentadas em folhas de soja Bt. A dominância funcional da resistência de *H. armigera* em folhas de soja Bt foi recessiva. Os resultados desse trabalho evidenciam a necessidade de implementação de estratégias de MRI para preservar a vida útil do inseticida metaflumizone e da soja MON87701 × MON89788 no manejo de *H. armigera* no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*, Metaflumizone, Soja Bt, F_2 Screen, Monitoramento da suscetibilidade, Manejo da resistência de insetos

ABSTRACT

Susceptibility monitoring and estimation of the frequency of resistance alleles to metaflumizone and Cry1Ac protein expressed in soybean MON87701 × MON89788 in populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil

The control of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil has been relied mainly on the use of insecticides and genetically modified plants expressing proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Cases of resistance of *H. armigera* to different insecticides have already been reported in Brazil. Thus, insecticides with new mode of actions, such as metaflumizone (Voltage-gated sodium channel blockers) are viable options to implementing Insect Resistance Management (IRM) strategies. With the widespread adoption of Bt soybean MON 87701 × MON 89788 expressing Cry1Ac protein, suppression of *H. armigera* population density was observed in Brazil. However, sporadic occurrence of *Helicoverpa* spp. larvae have been reported in Bt soybean in recent years. Thus, to evaluate if resistance evolution of *H. armigera* to Bt soybean was one of the factors to explain the infestations of *Helicoverpa* spp. and provide basic studies with metaflumizone as an alternative to be used in IRM programs, the objectives of this study were: (i) Characterize dose-response curves to metaflumizone in populations of *H. armigera*; (ii) Monitor the susceptibility to metaflumizone and Bt soybean MON87701 × MON89788 in populations of *H. armigera* collected during 2020/21 and 2021/22 crop seasons; (iii) Estimate the frequency of resistance alleles to metaflumizone and Bt soybean MON87701 × MON89788 after 10 years of commercial release; (iv) Select a resistant strain of *H. armigera* to Bt soybean MON87701 × MON89788; and (v) Evaluate the functional dominance of the resistant strain of *H. armigera* feeding on leaves of Bt soybean MON 87701 × MON 89788. Low variation (1.84-fold) in the susceptibility to metaflumizone was detected in populations of *H. armigera* collected during 2019/20 crop season. Based on diagnostic dose (LD₉₉) to metaflumizone, the mean survival varied from ≈ 2% (2020/21 crop season) up to 12% (2021/22 crop season). Based on *F*₂ screen, 179 isofamilies were evaluated to estimate the frequency of resistance alleles to metaflumizone and 55 isofamilies were considered positives, giving an estimate frequency of resistant alleles of 0.0774 (CI 95% = 0.06 - 0.10). There was an increase of ≈ 3.2-fold in the frequency of resistant alleles to metaflumizone from 2020/2021 to 2021/2022 crop seasons. The mortality of *H. armigera* larvae in leaves of Bt soybean were 100% to all populations evaluated during 2020/21 and 2021/22 crop seasons. However, from a total of 241 isofamilies tested in the *F*₂ screen to estimate the frequency of resistance alleles to Bt soybean, 12 isofamilies were considered positive, resulting in the estimated frequency of resistance alleles of 0.0134 (CI 95% 0.007 - 0.022). There was an increase of ≈ 12.2-fold in the frequency of resistant alleles of *H. armigera* to Bt soybean in compare with the frequency estimated in 2013 to 2015. From the larvae surviving in the *F*₂ screen, a resistant strain of *H. armigera* to Bt soybean was selected after 8 cycles of selection pressure of larvae feeding on leaves of Bt soybean. The functional dominance of the resistant strain of *H. armigera* on leaves of Bt soybean was recessive. These results confirmed the need of implementation of strategies of IRM to preserve the lifetime of the insecticide metaflumizone and Bt soybean MON87701 × MON89788 in the management of *H. armigera* in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, Metaflumizone, Bt soybean, *F*₂ Screen, Susceptibility monitoring, Insect resistance management

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Locais de coleta da linhagem suscetível de referência (SUS) e de populações de campo de <i>H. armigera</i> durante a safra 2019/20 utilizadas na caracterização das curvas de dose-resposta a metaflumizone.....	27
Figura 2.2 Locais de coleta de populações de <i>H. armigera</i> durante as safras 2020/21 e 2021/22 para o monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone.....	29
Figura 2.3 Curvas de dose-reposta das populações de campo e da linhagem suscetível de <i>H. armigera</i> a metaflumizone.	32
Figura 2.4 Sobrevivência na dose diagnóstica de metaflumizone de 0,88 μg i.a. cm^{-2} no monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de campo de <i>H. armigera</i> . Barras de erro representam o erro padrão. *Diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).	34
Figura 3.1 Mortalidade (%) de lagartas de <i>H. armigera</i> após sete dias sendo alimentadas com folhas de soja Bt e não-Bt por safra.	58
Figura 3.2 Sobrevivência e peso das lagartas das linhagens de <i>H. armigera</i> testadas em discos de folha de soja MON87701 \times MON89788 e não-Bt. Letras maiúsculas iguais sobre as barras indicam que não existem diferenças quanto a sobrevivência das linhagens alimentadas com folhas de soja não-Bt. Letras minúsculas iguais sobre as barras indicam que não existem diferenças quanto a sobrevivência das linhagens alimentadas com folhas de soja Bt. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Populações de campo utilizadas na caracterização das curvas de dose-resposta de <i>H. armigera</i> a metaflumizone.....	26
Tabela 2.2 Populações utilizadas no monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos que conferem resistência em <i>H. armigera</i> a metaflumizone.	28
Tabela 2.3 Curvas de dose-resposta de <i>H. armigera</i> a metaflumizone pelo método de bioensaio de ingestão.	32
Tabela 2.4 Dose diagnóstica estimada pela análise conjunta dos dados de curvas de dose-resposta em populações de campo de <i>H. armigera</i>	33
Tabela 2.5 Sobrevivência (%) no monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>H. armigera</i> a metaflumizone nas safras 2020/21 e 2021/22.....	35
Tabela 2.6 Estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone em populações de <i>H. armigera</i> coletadas nas safras 2020/2021 e 2021/2022.	36
Tabela 3.1 Locais de coleta de populações de <i>Helicoverpa</i> spp. em condições de campo coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil durante das safras 2019/20 a 2021/22.	51
Tabela 3.2 Populações utilizadas no monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos que conferem resistência em <i>H. armigera</i> à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788.	53
Tabela 3.3 Mortalidade (%) de lagartas de primeiro ínstar de <i>H. armigera</i> quando alimentadas com folhas de soja MON87701 × MON89788 e soja não-Bt após sete dias de infestação.	57
Tabela 3.4 Frequência do alelo da resistência à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em populações de <i>H. armigera</i> nas safras 2020/2021 e 2021/2022.....	59
Tabela 3.5 Seleção de linhagem de <i>H. armigera</i> resistente a proteína Cry1Ac expressa no evento de soja MON87701 × MON89788.	60
Tabela 3.6 Média de sobrevivência (%) e peso médio (mg) de diferentes linhagens de <i>H. armigera</i> em discos de folhas de soja Bt e não-Bt ao sétimo dia após infestação.	61

1. INTRODUÇÃO

A evolução da resistência de insetos-praga a inseticidas tem se tornado um dos grandes desafios em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (PRETTY; BHARUCHA, 2015; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). Na tentativa de manter a densidade populacional de pragas a níveis inferiores ao nível de dano econômico, a exploração de inseticidas e plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido feita, na maioria das vezes, sem a implementação de estratégias de manejo da resistência de insetos (MRI) o que tem proporcionado o aumento de alelos que conferem a resistência (SPARKS; LORSBACH, 2017; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). Uma das pragas que se destaca na agricultura brasileira tem sido a lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) devido ao seu potencial de dano causando elevados prejuízos econômicos em diversas culturas (LOPES-DA-SILVA et al., 2014).

Helicoverpa armigera é oriunda de países do Velho Mundo dos continentes da Ásia, Europa e Oceania (TAY et al., 2017; ZALUCKI et al., 1986). Esta praga foi oficialmente reportada no Brasil em 2013 (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013; TAY et al., 2013) atacando campos de produção de soja e algodão nas principais regiões agrícolas (CZEPAK et al., 2013). O sistema extensivo e complexo da agricultura brasileira favorece ainda mais a evolução da resistência dessa praga, visto que o clima tropical proporciona o cultivo em sucessão de diferentes plantas hospedeiras, chegando até três cultivos em um ano agrícola em regiões com sistemas de irrigação. Aliado a isso, no caso de *H. armigera*, a alta capacidade de dispersão, polifagia e alto potencial reprodutivo (FITT, 1989) proporcionaram condições ideais para a rápida distribuição e adaptação dessa praga no Brasil, permitindo assim que diferentes populações de *H. armigera* se desenvolvam em regiões distintas, ocasionando desenvolvimento contínuo da praga (LEITE et al., 2014; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Assim, a presença desse inseto no campo se torna constante, possibilitando a exploração da sucessão de diferentes plantas hospedeiras cultivadas e não cultivadas, promovendo assim uma maior pressão de seleção e conseqüente evolução da resistência a inseticidas e proteínas Bt. Desta forma, a adoção de programas de MRI é de fundamental relevância para prevenir ou retardar a evolução da resistência a inseticidas e proteínas Bt em populações de *H. armigera* no Brasil.

Atualmente, cerca de 891 casos de resistência de *H. armigera* a diversos ingredientes ativos e proteínas Bt já foram reportados em todo o mundo (APRD, 2023). No Brasil, casos de resistência em *H. armigera* já foram registrados para vários inseticidas de diferentes

grupos químicos, tais como piretroides (Grupo 3A) (DURIGAN et al., 2017), oxadiazinas (Grupo 22A) (DURIGAN, 2018), spinosinas (Grupo 5) (SILVA, 2019) e diamidas (Grupo 28) (ABBADE-NETO et al., 2022; PEREIRA, 2017). Sendo assim, o uso de inseticidas com outros modos de ação como metaflumizone que age bloqueando os canais de sódio dependentes da voltagem (Grupo 22B - semicarbazonas), pode ser utilizado em programas de MRI.

Metaflumizone foi registrado no Brasil em 2017 para o controle de diversos insetos-praga, inclusive *H. armigera*. Este inseticida vem sendo utilizado na China desde 2009, e após três anos de sua liberação comercial, alta razão de resistência a metaflumizone foi reportada em populações de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (SU; SUN, 2014; SUN et al., 2019; TIAN; SUN; SU, 2014). Outros casos de resistência também foram documentados na China, tais como em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (SHEN et al., 2017, 2020; WANG et al., 2016), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (WANG; LOU; SU, 2019) e *H. armigera* (WANG et al., 2021). No Brasil, dois casos de resistência a metaflumizone já foram reportados, sendo um em *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (SILVA et al., 2016) e o outro em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) com presença de resistência cruzada a indoxacarb (KAISER, 2021). Casos de resistência a indoxacarb, que também atua bloqueando os canais de sódio dependentes da voltagem, já foram documentados para *H. armigera* (DURIGAN, 2018) e *S. frugiperda* (KAISER, 2021) no Brasil. Portanto, a evolução da resistência de *H. armigera* a metaflumizone poderá ocorrer, caso estratégias de MRI não sejam implementadas.

Para o manejo de *H. armigera* no Brasil, atualmente a principal estratégia tem sido a exploração do evento de soja Bt MON 87701 × MON 89788 que expressa a proteína inseticida Cry1Ac (Grupo 11A). Esta soja Bt foi aprovada para liberação comercial no Brasil em 2010 (CTNBIO, 2010), mas os primeiros plantios em áreas comerciais iniciaram somente a partir da safra 2013/14 que coincide com o período de relato oficial de *H. armigera* no Brasil (CZEPAK et al., 2013). Trabalhos realizados entre 2013 e 2015 demonstraram que o evento de soja MON 87701 × MON 89788 é altamente eficiente para *H. armigera*, pois diluições de até 100 vezes do tecido liofilizado de soja causaram 100% mortalidade e inibição do desenvolvimento para além do segundo ínstar após sete dias, atendendo aos critérios de “alta dose” para MRI (DOURADO et al., 2016). Essa alta suscetibilidade de *H. armigera* se deve aos altos níveis de expressão da proteína Cry1Ac, variando de ≈ 50 $\mu\text{g/g}$ nos estágios iniciais até 200 μg de proteína por grama de peso fresco (MACRAE et al., 2005). Além disso,

a frequência inicial de alelos que conferem resistência a soja Bt foi baixa ($< 10^{-3}$) em populações de *H. armigera* no Brasil, evidenciando um baixo risco de evolução da resistência (DOURADO et al., 2016).

No Brasil foi verificada uma ampla utilização da soja Bt, sendo que após quase uma década de seu primeiro cultivo comercial em 2013, mais de 40 milhões de hectares (>90% de toda área cultivada com soja no Brasil) são cultivados anualmente com essa biotecnologia, (Comunicação pessoal, Kynetec) e reduções significativas na utilização de inseticidas nos campos de soja foram verificadas, com diminuição do número de pulverizações de inseticidas em até 50% (HORIKOSHI et al., 2021a, 2022). A utilização da soja Bt trouxe inúmeros benefícios à agricultura no Brasil, especialmente ao manejo de lepidópteros-praga na soja devido à eficácia dessa tecnologia no controle dessas pragas. Sendo assim, a evolução da resistência de pragas à soja MON 87701 × MON 89788 pode inviabilizar o uso sustentável dessa tecnologia no Brasil comprometendo programas de MIP, caso estratégias proativas de manejo da resistência não forem adotadas.

Em consequência dessa adoção de soja Bt em larga escala, foram verificadas uma supressão da densidade populacional de *H. armigera* no Brasil com aumento de área plantada com soja Bt, a partir de levantamento realizado no período de 2012 a 2019 (HORIKOSHI et al., 2022). Contudo, relatos de aumento nas infestações de lagartas de *Helicoverpa* spp. na cultura da soja Bt no Brasil têm sido documentados nas últimas safras (BUENO, 2022). Sendo assim, para verificar se a evolução da resistência de *H. armigera* a soja Bt é um dos fatores para explicar o aumento destas infestações e possibilitar o uso do inseticida metaflumizone como uma das alternativas para subsidiar um programa de MRI, os objetivos do presente trabalho foram:

- Caracterizar as curvas de dose-resposta de populações de *H. armigera* a metaflumizone;
- Monitorar a suscetibilidade ao inseticida metaflumizone e à soja MON 87701 × MON 89788 em populações de campo de *H. armigera* coletadas nas safras de 2020/21 e 2021/22;
- Estimar a frequência de alelos da resistência em populações de campo de *H. armigera* a metaflumizone e soja MON 87701 × MON 89788 após uma década de plantio no Brasil;

- Selecionar uma linhagem de *H. armigera* resistente à soja MON 87701 × MON 89788 e avaliar a dominância funcional da resistência de *H. armigera* à soja MON 87701 × MON 89788.

Referências

- ABBADE-NETO, D. et al. First Report of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Resistance to Flubendiamide in Brazil: Genetic Basis and Mechanisms of the Resistance. **Agronomy** **2022**, Vol. **12**, Page **1664**, v. 12, n. 7, p. 1664, 13 jul. 2022.
- AKHURST, R. J. et al. Resistance to the Cry1Ac δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1290–1299, 1 ago. 2003.
- ALVI, A. H. K. et al. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47309, 15 out. 2012.
- APRD. **Arthropod Pesticide Resistance Database | Michigan State University**. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41>>. Acesso em: 18 abr. 2023.
- BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. Fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 4, p. 1311–1319, 1 ago. 2005.
- BUENO, A. DE F. **Ocorrência de lagarta *Helicoverpa* sp. em soja-Bt na safra 2022/23 e principais orientações de manejo**. Disponível em: <<https://blogs.canalrural.com.br/embrapasoja/2022/12/16/ocorrencia-de-lagarta-helicoverpa-sp-em-soja-bt-na-safra-2022-23-e-principais-orientacoes-de-manejo/>>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- CTNBIO. **Parecer Técnico 2542/2010: Liberação Comercial de soja resistente a insetos e tolerante a herbicida**. Disponível em: <<http://ctnbio.mctic.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acesso em: 5 jan. 2023.
- CZEPAK, C. et al. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110–113, mar. 2013.
- DANDAN, Z. et al. Field monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Cry1Ac insecticidal protein resistance in China (2005–2017). **Pest Management Science**, v. 75, n. 3, p. 753–759, 1 mar. 2019.

- DOURADO, P. M. et al. High susceptibility to Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161388, 17 ago. 2016.
- DURIGAN, M. R. et al. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 73–80, 1 nov. 2017.
- DURIGAN, M. R. **Resistance to pyrethroid and oxadiazine insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 7 maio 2018.
- FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, n. 66, p. 17–52, 1989.
- GUAN, F. et al. Population Genomics of Nonrecessive Resistance to Bt Toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* From Northern China. **Journal of Economic Entomology**, 4 jan. 2023.
- GUNNING, R. V. et al. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2558–2563, maio 2005.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Large-scale assessment of lepidopteran soybean pests and efficacy of Cry1Ac soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 5 ago. 2021.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Regional pest suppression associated with adoption of Cry1Ac soybean benefits pest management in tropical agriculture. **Pest Management Science**, v. 78, n. 10, p. 4166–4172, 1 out. 2022.
- ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. **ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY.**, n. 54, 2018.
- ISAAA. Global status of commercialized of biotech/GM crops in 2019: biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier. **ISAAA Brief No. 55 Ithaca, NY.**, n. 55, p. 3–13, 2019.
- KAISER, I. S. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas bloqueadores de canais de sódio**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 7 maio 2021.
- KRANTHI, K. R. et al. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 119–124, 1 fev. 2006.

- KUKANUR, V. S. et al. Cry1Ac resistance allele frequency in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) collected in Telangana and Andhra Pradesh, India. **Crop Protection**, v. 107, p. 34–40, 1 maio 2018.
- LEITE, N. A. et al. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113286, 19 nov. 2014.
- LIU, F. et al. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 155–161, 1 fev. 2009.
- LOPES-DA-SILVA, M. et al. The Role of Natural and Human-Mediated Pathways for Invasive Agricultural Pests: A Historical Analysis of Cases from Brazil. **Agricultural Sciences**, v. 05, n. 07, p. 634–646, 9 jun. 2014.
- MACRAE, T. C. et al. Laboratory and Field Evaluations of Transgenic Soybean Exhibiting High-Dose Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1A Gene for Control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577–587, 1 abr. 2005.
- NETTO, J. C.; ROLIM, G. G.; SCOZ, L. *Helicoverpa armigera*: ameaça a lavouras Bt de algodoeiro. **Circular Técnica: IMAm - Instituto Mato-Grossense do Algodão**, v. N° 35, p. 8, 2018.
- PEREIRA, R. M. **Dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 22 maio 2021.
- PRETTY, J.; BHARUCHA, Z. P. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. **Insects**, v. 6, n. 1, p. 152–182, 5 mar. 2015.
- SHEN, J. et al. Fitness and inheritance of metaflumizone resistance in *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 53–59, 1 jun. 2017.
- SHEN, J. et al. Biochemical mechanisms, cross-resistance and stability of resistance to metaflumizone in *Plutella xylostella*. **Insects**, v. 11, n. 5, p. 311, 15 maio 2020.
- SILVA, S. S. **Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 30 out. 2019.
- SILVA, T. B. M. et al. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. **Crop Protection**, v. 79, p. 80–86, 1 jan. 2016.

- SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 101–104, 1 jan. 2016.
- SPARKS, T. C.; LORSBACH, B. A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 672–677, 1 abr. 2017.
- SU, J.; SUN, X. X. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. **Crop Protection**, v. 61, p. 58–63, 1 jul. 2014.
- SUN, X. X. et al. Resistance Risk Evaluated by Metaflumizone Selection and the Effects on Toxicities over Other Insecticides in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 5, p. 2354–2361, 23 set. 2019.
- TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 10 jun. 2013.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 2017 **35:10**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 11 out. 2017.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y.; GASSMANN, A. Global Patterns of Resistance to Bt Crops Highlighting Pink Bollworm in the United States, China, and India. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 6, p. 2513–2523, 9 dez. 2019.
- TABASHNIK, B. E.; FABRICK, J. A.; CARRIÈRE, Y. Global Patterns of Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: The First 25 Years. **Journal of Economic Entomology**, 4 jan. 2023.
- TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRÍRE, Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: Definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 6, p. 2011–2025, 1 dez. 2009.
- TABASHNIK, B. E.; WU, K.; WU, Y. Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 301–306, 1 jul. 2012.
- TAY, W. T. et al. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80134, 18 nov. 2013.
- TAY, W. T. et al. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 28 mar. 2017.

- TIAN, X.; SUN, X.; SU, J. Biochemical mechanisms for metaflumizone resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, n. 1, p. 8–14, 1 jul. 2014.
- WANG, Q. et al. Field-evolved resistance to 11 insecticides and the mechanisms involved in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 77, n. 11, p. 5086–5095, 1 nov. 2021.
- WANG, X. L. et al. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v. 23, n. 1, p. 50–58, 1 fev. 2016.
- WANG, X.; LOU, L.; SU, J. Prevalence and stability of insecticide resistances in field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Huizhou, Guangdong Province, China. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 3, p. 728–732, 1 set. 2019.
- ZALUCKI, M. P. et al. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? **Australian Journal of Zoology**, v. 34, n. 6, p. 779–814, 1986.

2. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE E FREQUÊNCIA DE ALELOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO INSETICIDA METAFLUMIZONE EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL

Resumo

Casos de resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) a diversos inseticidas convencionais já tem sido reportada no Brasil. Sendo assim, inseticidas com novos modos de ação, tais como metaflumizone que atuam como bloqueadores de canais de sódio dependentes da voltagem, têm sido exploradas para o manejo desta praga no Brasil. Para implementar um programa de manejo da resistência de insetos (MRI) para metaflumizone, estudos para entender a suscetibilidade e estimar a frequência de alelos da resistência a metaflumizone foram conduzidos em populações de campo de *H. armigera* coletadas entre os anos 2019 e 2022. Seis populações de campo coletadas em soja e algodão na safra 2019/20 foram utilizadas para caracterização das curvas de dose-resposta e estimativa da dose diagnóstica (DL_{99}) para o monitoramento da suscetibilidade. Baixa variação (1,84 vezes) na suscetibilidade a metaflumizone foi observada em populações de *H. armigera* coletadas na safra 2019/20. A dose diagnóstica, baseada na DL_{99} , foi de 0,88 μg metaflumizone cm^{-2} . A sobrevivência média em bioensaios de dose diagnóstica variou de $\approx 2\%$ (safra 2020/21) a 12% (safra 2021/22). Pela técnica de F_2 screen, foram testadas 179 isofamílias e 55 foram consideradas positivas, resultando em uma frequência estimada de alelos da resistência a metaflumizone de 0,0774 (IC 95% = 0,06 - 0,10). A isolinha foi considerada positiva somente quando indivíduos sobreviventes e resgatados atingissem a fase adulta na proporção de 1/16. De uma safra para outra, houve aumento de $\approx 3,2$ vezes na frequência de alelos. Portanto, os resultados do presente estudo evidenciam o potencial de evolução da resistência de *H. armigera* a metaflumizone, caso estratégias de manejo da resistência (MRI) não sejam implementadas no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*, Semicarbazonas, F_2 Screen, Monitoramento da suscetibilidade

Abstract

The resistance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to different conventional insecticides has already been reported in Brazil. Thus, insecticides with new mode of actions, such as metaflumizone which act as voltage-gated sodium channel blockers, have been exploited to manage this pest in Brazil. To implement an insect resistance management (IRM) to metaflumizone, studies to understand the susceptibility and to estimate the frequency of resistance alleles to metaflumizone were conducted in populations of *H. armigera* collected between the years 2019 to 2022. Six populations were collected in soybean and cotton during 2019/20 crop season to characterize the dose-response curves and estimate the diagnostic dose (LD_{99}) for susceptibility monitoring. Low variation (1.84-fold) in the susceptibility to

metaflumizone was observed in populations of *H. armigera* collected during 2019/20 crop season. The diagnostic dose, based on LD₉₉, was 0.88 µg metaflumizone cm⁻². The mean survival at diagnostic dose bioassays varied from ≈ 2% (2020/21 crop season) to 12% (2021/22 crop season). By using *F*₂ screen, 179 isofamilies were tested and 55 were considered positive, resulting in the estimated frequency of resistance alleles to metaflumizone of 0.0774 (CI 95% = 0.06 - 0.10). The isoline was considered positive only when surviving and rescued individuals reached adulthood in a proportion of 1/16. There was an increase of ≈ 3.2-fold in the frequency of resistant alleles to metaflumizone from 2020/2021 to 2021/2022 crop seasons. Therefore, the results of this study showed the potential of resistance evolution of *H. armigera* to metaflumizone if IRM strategies were not implemented in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, Semicarbazones, *F*₂ Screen, Susceptibility monitoring

2.1. Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca como uma das pragas-chave responsáveis pela redução da produtividade em cultivos agrícolas no Brasil. Oficialmente relatada no Brasil em 2013 (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013; TAY et al., 2013), essa praga causou grandes prejuízos econômicos em cultivos agrícolas, especialmente nas culturas de soja e de algodão nos anos iniciais de sua detecção, principalmente devido ao desconhecimento de estratégias efetivas de manejo. As características bioecológicas de *H. armigera*, tais como como alto potencial reprodutivo, polifagia e alta capacidade de distribuição e adaptação (FITT, 1989), aliadas ao modelo de produção da agricultura tropical composto por sucessões de culturas hospedeiras em diversas regiões do país, favorecem o desenvolvimento e a permanência da praga em campo durante o ano todo (LEITE et al., 2014; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Desta forma, *H. armigera* tem ocorrido em diversas regiões, permanecendo em condições de campo explorando a sucessão de diferentes plantas hospedeiras cultivados e não cultivados durante todo o ano (FITT, 1989; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Sendo assim, esta praga tem sido exposta a uma alta pressão de seleção com inseticidas e cultivos Bt, favorecendo a evolução da resistência.

Originária de países dos continentes da Ásia, Europa e Oceania (TAY et al., 2017; ZALUCKI et al., 1986), *H. armigera* já apresentou diversos casos de resistência a inseticidas. Atualmente, cerca de 891 casos de resistência a diversos ingredientes ativos e proteínas Bt foram reportados (APRD, 2023) em todo o mundo. No Brasil, casos de resistência já foram registrados para inseticidas piretroides (Grupo 3A) (DURIGAN et al., 2017), oxadiazinas (Grupo 22A) (DURIGAN, 2018), spinosinas (Grupo 5) (SILVA, 2019) e diamidas (Grupo 28) (ABBADE-NETO et al., 2022; PEREIRA, 2017). Desta forma, a adoção de programas de

manejo da resistência (MRI) de *H. armigera* é fundamental para preservar a vida útil de inseticidas e proteínas Bt.

Dentre as medidas de controle adotadas para o manejo de *H. armigera*, o uso de metaflumizone, um dos inseticidas classificados no Grupo 22 (indoxacarb e metaflumizone) de acordo com o IRAC (Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas) que agem bloqueando de canais de sódio dependentes da voltagem levando a uma paralisia flácida e eventualmente a morte dos insetos (SALGADO; HAYASHI, 2007; SILVER et al., 2010), pode ser uma alternativa promissora para o manejo desta praga no Brasil. Metaflumizone é um novo inseticida pertencente ao grupo das semicarbazonas (22B) que foi desenvolvido por Nihon Nohyaku Co. Ltd. (Tóquio, Japão) no início da década de 1990 (TAKAGI et al., 2007). Esse inseticida promove alta eficácia contra alguns dos principais lepidópteros-praga e apresenta baixo risco para organismos não-alvos como insetos benéficos, mamíferos e ao meio ambiente (HEMPEL et al., 2007; WANUMEN et al., 2016).

No Brasil, metaflumizone foi registrado para controle de insetos-praga, inclusive *H. armigera*, em 2017. No entanto, esse inseticida já está sendo utilizado em países como China desde 2009 e uma alta razão de resistência a metaflumizone foi documentada em populações de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (TIAN; SUN; SU, 2014). Nos anos seguintes, vários casos de resistência na China para *S. exigua* (SU; SUN, 2014; SUN et al., 2019), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (SHEN et al., 2017, 2020; WANG et al., 2022, 2016; ZHANG et al., 2017), *S. litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (WANG; LOU; SU, 2019) e *H. armigera* (WANG et al., 2021) foram relatados. Outros casos de resistência a metaflumizone também já foram detectados para *P. xylostella* em Taiwan (PUDASAINI et al., 2022) e *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) na Grécia (RODITAKIS et al., 2017). No Brasil razões moderadas de resistência foram relatadas em *T. absoluta* (SILVA et al., 2016) e alta razão de resistência em *Spodoptera frugiperda* com presença de resistência cruzada para indoxacarb (KAISER, 2021). Diante disso, para preservar a vida útil de metaflumizone para o controle de *H. armigera*, estratégias proativas de MRI devem ser adotadas antes que a frequência de alelos da resistência atinja níveis críticos em condições de campo.

Para que estratégias de manejo da resistência sejam implementadas com sucesso, o fornecimento de informações antecipadas sobre a evolução da resistência em campo é fundamental (DOWNES; WALSH; TAY, 2016). Independente da praga ou estratégia a ser adotada, o manejo da resistência requer um monitoramento efetivo, capaz de detectar de maneira precisa qualquer alteração na suscetibilidade antes que a frequência crítica da

resistência seja atingida. Desta forma, o monitoramento da suscetibilidade de pragas a inseticidas fornece informações que permite orientar a tomada de decisões para retardar a evolução da resistência.

Portanto, para subsidiar a implementação de estratégias de manejo da resistência e preservar a eficácia do inseticida metaflumizone no controle de *H. armigera* nas principais regiões produtoras do Brasil, os objetivos desse estudo foram: (i) Caracterizar as curvas de dose-resposta a metaflumizone em populações de *H. armigera* coletadas nas principais regiões produtoras de soja e algodão do Brasil; (ii) Monitorar a suscetibilidade de populações de *H. armigera* a metaflumizone coletadas nas safras 2020/21 e 2021/22 e (iii) Estimar a frequência inicial de alelos da resistência a metaflumizone em populações de *H. armigera* do Brasil.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Populações de *H. armigera*

Como padrão de suscetibilidade de *H. armigera* foi utilizada a linhagem suscetível de referência (SUS) que foi obtida a partir de uma coleta em áreas produtoras de feijão no município de Luiz Eduardo Magalhães - Bahia em setembro de 2013 e mantida em laboratório na ausência inseticidas e proteínas Bt por mais de 75 gerações. A coleta de populações de *Helicoverpa* spp. em condições de campo foi realizada entre os anos de 2019 e 2022 nas principais regiões produtoras no Brasil central. Ao todo, foram realizadas 19 coletas, sendo seis populações na safra 2019/20 que foram utilizadas para caracterização das curvas de dose-resposta a metaflumizone (Tabela 2.1 e Figura 2.1), cinco populações na safra 2020/21 e oito na safra 2021/22 para o monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos da resistência a metaflumizone (Tabela 3.1). As populações foram coletadas em áreas produtoras de soja, algodão, feijão e nabo forrageiro. Cada população amostrada foi composta por 500 a 800 indivíduos. As lagartas coletadas foram encaminhadas ao laboratório para identificação específica para que somente as populações de *H. armigera* fossem utilizadas na condução dos estudos de monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos que conferem resistência ao inseticida metaflumizone.

2.2.2. Criação de populações de *H. armigera* em condições de laboratório

As lagartas coletadas no campo foram transportadas em copos plásticos de 75 mL contendo dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976; KASTEN JR.; PRECETTI; PARRA, 1978) e encaminhadas ao laboratório para identificação da espécie e posterior criação para condução dos bioensaios. Mediante o uso da técnica de PCR com iniciadores específicos (marcador COI - Cytochrome oxidase I) (BEHERE et al., 2008) foram realizadas a identificação da espécie em uma amostra de 24 lagartas de cada população de lagartas de *Helicoverpa* coletadas no campo. Para as populações identificadas como *H. armigera*, as lagartas permaneceram em copos contendo dieta até atingirem o estágio de pupas. Em seguida todas as pupas foram retiradas e lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65%. A partir desse momento, aproximadamente metade ($\approx 50\%$) das pupas foram utilizadas para manutenção da população em laboratório e a outra metade foi utilizada para estimativa da frequência de alelos da resistência (item 2.2.5) mediante a técnica de *F₂ Screen* (ANDOW; ALSTAD, 1998).

As pupas destinadas à criação e manutenção da população em laboratório foram colocadas em gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm altura \times 25 cm diâmetro) revestidas internamente com papel sulfite e fechadas na parte superior por um tecido tipo *tule* para realização de posturas. Os substratos de oviposição e a solução de mel 10% para alimentação dos adultos foram trocados a cada dois dias. As posturas foram acondicionadas em copos transparentes de 500 mL até a eclosão das lagartas, sendo posteriormente transferidas para copos plásticos de 75 mL contendo dieta até atingirem o terceiro ínstar para serem utilizados nos bioensaios toxicológicos de monitoramento da suscetibilidade (item 2.2.4). Em todos os estágios de crescimento e desenvolvimento os insetos foram mantidos em salas climatizadas ou câmaras B.O.D com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

2.2.3. Caracterização das curvas de dose-resposta de *H. armigera* a metaflumizone

Para caracterização das curvas de dose-resposta de *H. armigera* a metaflumizone, foram utilizadas seis populações do campo e a linhagem suscetível de referência (SUS) (Tabela 2.1). Em média foram testadas sete concentrações espaçadas logaritmicamente que proporcionaram mortalidade entre 5 e 95%. Em cada concentração foram testadas no mínimo 96 lagartas em terceiro ínstar. Os bioensaios toxicológicos foram realizados pelo método de

ingestão de dieta contaminada e conduzidos em placas de acrílico de 24 células (Costar[®]). Cada célula da placa continha 1,5 mL dieta com aplicação superficial de 30 µL de solução inseticida na concentração a ser testada. A calda inseticida foi preparada mediante diluição do inseticida (Verismo[®], Basf S.A.; 240 g a.i. L⁻¹) em água destilada e surfactante Triton X-100 (Synth) (0,1% volume de calda) para uma completa distribuição sobre a superfície da dieta. O tratamento controle consistiu em água destilada mais o surfactante na concentração de 0,1%. Após secagem da calda inseticida, uma lagarta em terceiro ínstar foi inoculada em cada célula e, posteriormente, as placas foram fechadas e acondicionadas em câmaras climatizadas do tipo B.O.D com temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 horas. A avaliação de mortalidade foi realizada 72 horas após infestação. Indivíduos que não apresentavam movimentos rápidos e coordenados quando estimulados com uma pinça foram considerados mortos.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de regressão de Probit (FINNEY, 1971; RUSSELL; ROBERTSON, 1979; RUSSELL; ROBERTSON; SAVIN, 1977) no programa SAS[®] (OnDemand for Academics) para estimativa das doses letais (DL₅₀) com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), coeficientes angulares e valores do qui-quadrado (χ^2). Para estimativa da dose diagnóstica (DL₉₉) a ser utilizada no monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência alélica da resistência, foi realizada a análise conjunta do agrupamento dos dados de mortalidade de todas as populações utilizadas na caracterização das curvas de dose-resposta, conforme proposto por Sims et al (1996). Os dados foram analisados utilizando o modelo binomial com função de ligação complemento *log-log* no programa SAS[®] (Gompertz; PROC PROBIT, SAS Institute (2002)).

Tabela 2.1 Populações de campo utilizadas na caracterização das curvas de dose-resposta de *H. armigera* a metaflumizone.

Safra	Pop. ¹	Data de coleta	Mun./Estado	Latitude	Longitude	Hospedeiro ²
	MT-1	Nov. 2019	Rondonópolis/MT	16° 52' 51" S	54° 45' 58" W	Soja
	MT-2	Jan. 2020	Lucas do Rio Verde/MT	12° 59' 39" S	55° 52' 27" W	Soja
2019/20	BA-1	Jan. 2020	São Desidério/BA	12° 43' 53" S	45° 56' 20" W	Soja
	GO-1	Fev. 2020	Cristalina/GO	16° 47' 26" S	47° 36' 50" W	Soja
	BA-2	Mai. 2020	Barreiras/BA	11° 41' 47" S	46° 00' 17" W	Algodão
	MT-3	Jun. 2020	Primavera do Leste/MT	15° 33' 51" S	54° 26' 25" W	Soja

¹ Código da população; ² cultivares de soja e algodão não-Bt.

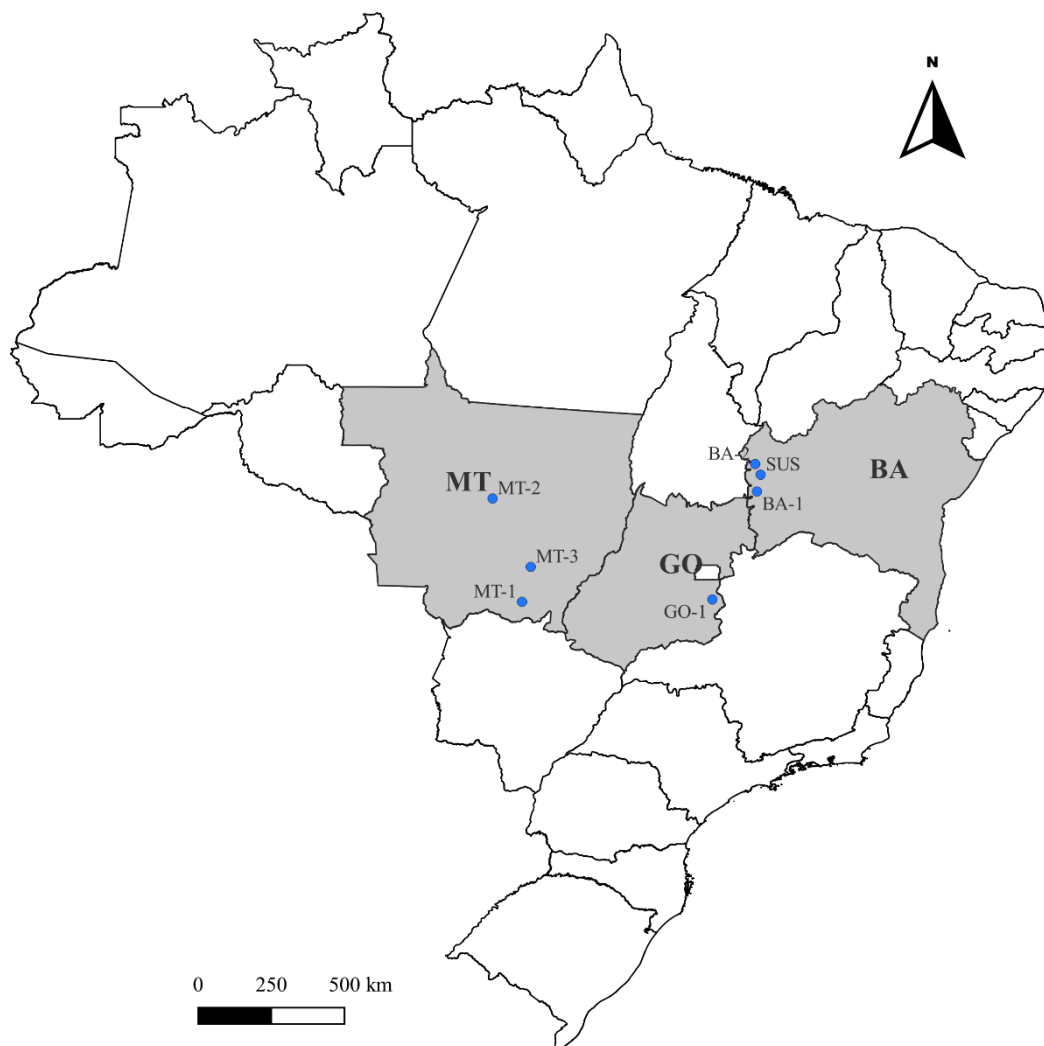


Figura 2.1 Locais de coleta da linhagem suscetível de referência (SUS) e de populações de campo de *H. armigera* durante a safra 2019/20 utilizadas na caracterização das curvas de dose-resposta a metaflumizone.

2.2.4. Monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de *H. armigera*

Para o monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a metaflumizone foram utilizadas 10 populações de campo coletadas nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia nas safras de 2020/21 e 2021/22 (Tabela 2.2 e Figura 2.2). Foram testadas pelo menos 240 lagartas em terceiro ínstar nos bioensaios de ingestão utilizando a dose diagnóstica (DL₉₉) estimada mediante a análise conjunta dos dados de mortalidade das curvas de dose-resposta. O procedimento de bioensaio, tempo de avaliação e critério de

mortalidade foram os mesmos utilizados na caracterização da suscetibilidade pelas curvas de dose-resposta (item 2.2.3).

Para cada população monitorada na DL₉₉ de metaflumizone foi calculado a média de indivíduos sobreviventes e os intervalos de confiança com 95% confiança, por meio da função *Binom.probit* do pacote Binom no programa R (DORAI-RAJ, 2014). Foi utilizado o teste de Dunnett para comparar as médias de sobrevivência das populações de campo com a linhagem suscetível de referência (SUS) por meio da função *ghlt* do pacote Multcomp (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008).

Tabela 2.2 Populações utilizadas no monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos que conferem resistência em *H. armigera* a metaflumizone.

Safra	Pop. ¹	Data de coleta	Mun./Estado	Latitude	Longitude	Hospedeiro ²
2020/21	MT-4	Nov. 2020	Primavera do Leste/MT	15° 25' 23" S	54° 22' 12" W	Soja
	GO-2*	Jan. 2021	Cristalina/GO	16° 26' 58" S	47° 39' 40" W	Soja
	MT-5	Fev. 2021	Itiquira/MT	17° 09' 36" S	54° 45' 21" W	Soja
	MT-6	Abr. 2021	Sorriso/MT	12° 28' 17" S	55° 40' 18" W	Algodão
	MS-1	Mai. 2021	Chapadão do Sul/MS	18° 44' 28" S	52° 33' 27" W	Algodão
2021/22	MS-2	Nov. 2021	Costa Rica/MS	18° 12' 41" S	53° 12' 17" W	Nabo forrageiro
	BA-3	Nov. 2021	Correntina/BA	11° 45' 04" S	45° 46' 34" W	Soja
	GO-4	Nov. 2021	Luziânia/GO	16° 29' 01" S	47° 54' 47" W	Nabo forrageiro
	MT-8	Dez. 2021	Lucas do Rio Verde/MT	13° 41' 16" S	56° 01' 40" W	Algodão
	MS-3	Dez. 2021	Costa Rica/MS	18° 20' 19" S	52° 50' 20" W	Soja

¹ Código da população; ² cultivares de soja e algodão não-Bt; *GO-2: População utilizada somente no monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a metaflumizone (item 2.2.4). Demais populações foram utilizadas tanto no monitoramento da suscetibilidade quanto na estimativa da frequência alélica de resistência a metaflumizone (item 2.2.5).

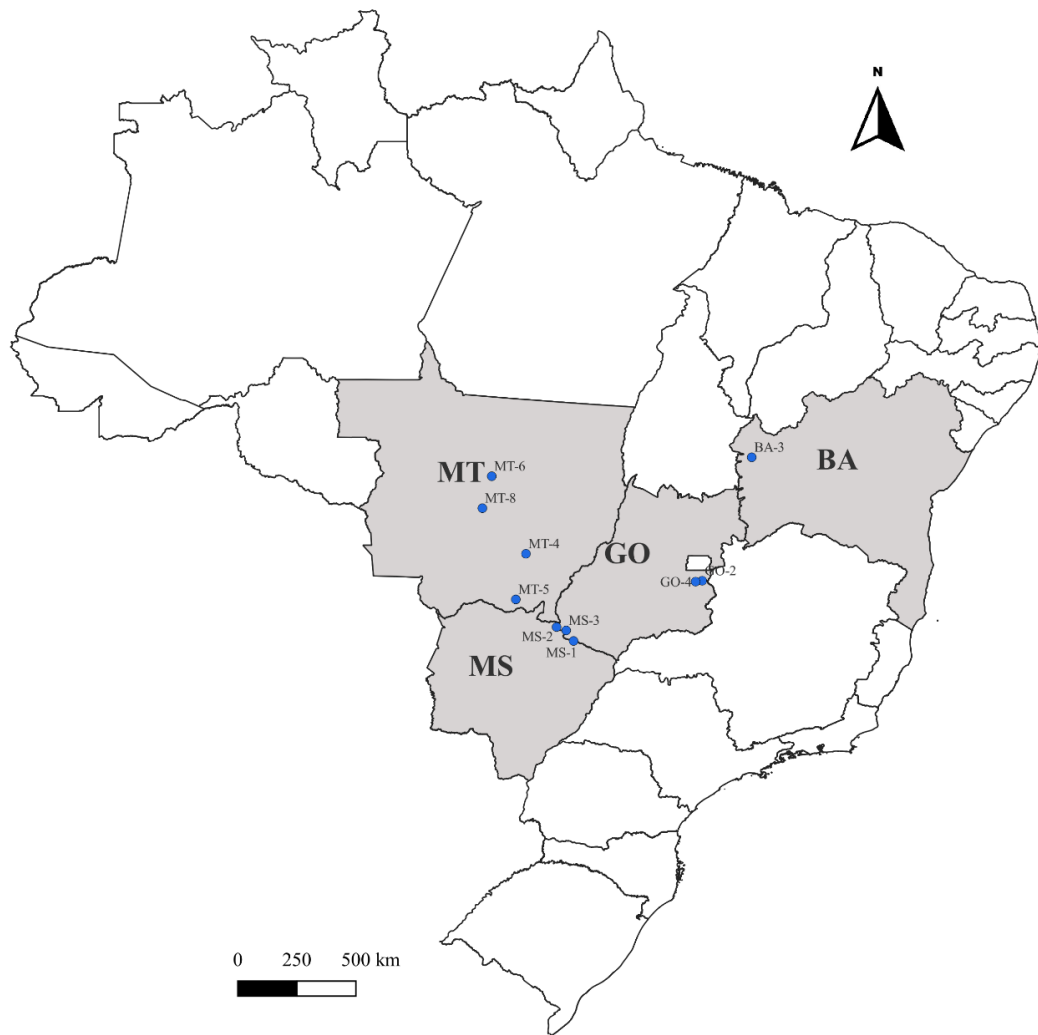


Figura 2.2 Locais de coleta de populações de *H. armigera* durante as safras 2020/21 e 2021/22 para o monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone.

2.2.5. Estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone em *H. armigera*

Para a estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone em populações de *H. armigera* foi utilizada a metodologia de F_2 Screen descrita por Andow e Alstad (1998). As populações usadas nos bioensaios de F_2 foram as mesmas utilizadas no monitoramento da suscetibilidade (Tabela 2.2). Lagartas coletadas em campo foram transportadas para o laboratório e mantidas em dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976; KASTEN JUNIOR; PRECETTI; PARRA, 1978) até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e individualizadas

em uma bandeja com auxílio de um copo plástico transparente (50 mL) invertido sobre papel filtro umedecido. As bandejas com pupas foram acondicionadas em câmara B.O.D climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h) até a emergência dos adultos. Os adultos foram agrupados em casais (Geração parental) para formação de cada isofamília ou isolinha. Os casais foram mantidos em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm altura \times 10 cm diâmetro) revestidas internamente com papel sulfite branco, colocadas sobre um recipiente plástico contendo papel toalha e um copo com algodão umedecido com solução de mel na concentração de 10% para alimentação dos adultos. As gaiolas foram cobertas na parte superior com um tecido tipo *tule* para oviposição e mantidas em sala de criação com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Os substratos (*tule* e papel sulfite) contendo postura e a solução de mel foram trocados a cada dois dias. As posturas correspondentes de cada isolinha foram recolhidas e colocadas em copos plásticos transparentes de 500 mL. Posteriormente, esses copos foram transferidos para câmara B.O.D climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h) até a eclosão das lagartas (Progenie F_1). As lagartas foram inoculadas em dieta artificial em copos plásticos de 75 mL, e ao atingirem o terceiro ínstar pelo menos 192 lagartas foram transferidas para bandejas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta por onde permaneceram até a fase de pupa. As pupas obtidas de cada isofamília foram retiradas, sanitizadas e transferidas para gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm de altura \times 25 cm de diâmetro) e cobertas com tecido tipo *tule* para oviposição. Cada gaiola correspondente a uma isofamília foi composta por aproximadamente 50 casais para a obtenção de lagartas da geração F_2 . As gaiolas foram mantidas em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

A estimativa da frequência alélica da resistência a metaflumizone foi realizada com a progênie F_2 em lagartas de terceiro ínstar mediante bioensaios de ingestão utilizando a dose diagnóstica (DL_{99}). Para cada isofamília foram testadas 120 lagartas (a isofamília foi considerada como testada somente se no mínimo 60 insetos fossem utilizados). Os bioensaios foram realizados conforme o monitoramento da suscetibilidade (item 2.2.4). A avaliação de mortalidade foi feita após 72 horas e todos os indivíduos sobreviventes foram resgatados e colocados em dieta sem aplicação de solução inseticida. Uma isolinha foi considerada positiva somente quando indivíduos sobreviventes e resgatados atingissem a fase adulta na proporção de 1/16. Portanto, para 120 indivíduos (5 placas de 24 células) testados a sobrevivência seria

de 8 indivíduos adultos para uma condição de resistência autossômica, monogênica e recessiva.

A frequência do alelo da resistência a metaflumizone assim como respectivos intervalos de confiança de (IC 95%) foram estimados pela inferência Bayesiana utilizando a equação [1] proposta por Andow e Alstad (1998, 1999) e intervalos de confiança de 95%. Os dados foram analisados usando a função *Binom.bayes* do pacote Binom (DORAI-RAJ, 2014) no programa R 4.2.2 (R CORE, 2022).

[1]

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

Em que:

q = estimativa da frequência do alelo da resistência;

S = número de isofamílias positivas;

N = número de isofamílias testadas

2.3. Resultados

2.3.1. Caracterização das curvas de dose-resposta de *H. armigera* a metaflumizone

Uma baixa variação na suscetibilidade a metaflumizone foi observada em populações de *H. armigera* em condições de campo. Os valores de DL_{50} variaram de 0,049 a 0,090 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ apresentando uma variação de 1,84 vezes entre as populações testadas. A população que apresentou maior suscetibilidade foi MT-1 (coletada no município de Rondonópolis-MT), com DL_{50} 0,049 (IC 95% = 0,033 - 0,066) $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$, em contraste a população GO-1 (coletada em Cristalina-GO) obteve menor suscetibilidade com DL_{50} 0,090 (IC 95% = 0,067 - 0,114) $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ (Tabela 2.3). Os intervalos de confiança de 95% da DL_{50} apresentaram sobreposição indicando uma semelhança na suscetibilidade a metaflumizone entre as populações de campo. Os demais parâmetros das curvas de dose-resposta apresentados, como qui-quadrado e coeficientes angulares indicam o ajuste dos dados ao modelo testado e alta homogeneidade das populações quanto à suscetibilidade a metaflumizone (Tabela 2.3 e Figura 2.3).

Tabela 2.3 Curvas de dose-resposta de *H. armigera* a metaflumizone pelo método de bioensaio de ingestão.

Safra	Pop. ¹	Município	n ²	Coef. ang. (±EPM) ³	DL ₅₀ (IC 95%) ⁴	χ ² (g.l.) ⁵
2013/14	SUS	Luiz Ed. Magalhães/BA	648	1,88 (0,16)	0,018 (0,015 - 0,021)	0,77 (4)
	MT-1	Rondonópolis/MT	588	1,51 (0,21)	0,049 (0,033 - 0,066)	3,45 (5)
2019/20	MT-2	Lucas do Rio Verde/MT	943	1,73 (0,16)	0,061 (0,050 - 0,073)	8,06 (5)
	BA-1	São Desidério/BA	816	1,71 (0,12)	0,061 (0,052 - 0,071)	4,06 (5)
	GO-1	Cristalina/GO	583	1,67 (0,21)	0,090 (0,067 - 0,114)	2,64 (6)
	BA-2	Barreiras/BA	1.271	1,57 (0,11)	0,058 (0,047 - 0,069)	3,10 (6)
	MT-3	Primavera do Leste/MT	936	1,69 (0,13)	0,068 (0,056 - 0,081)	5,68 (5)

¹ código da população; ² Número de insetos testados; ³ Coeficiente angular e erro padrão da média; ⁴ Dose Letal 50% dos indivíduos ($\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$) e Intervalo de Confiança a 95%; ⁵ χ^2 valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

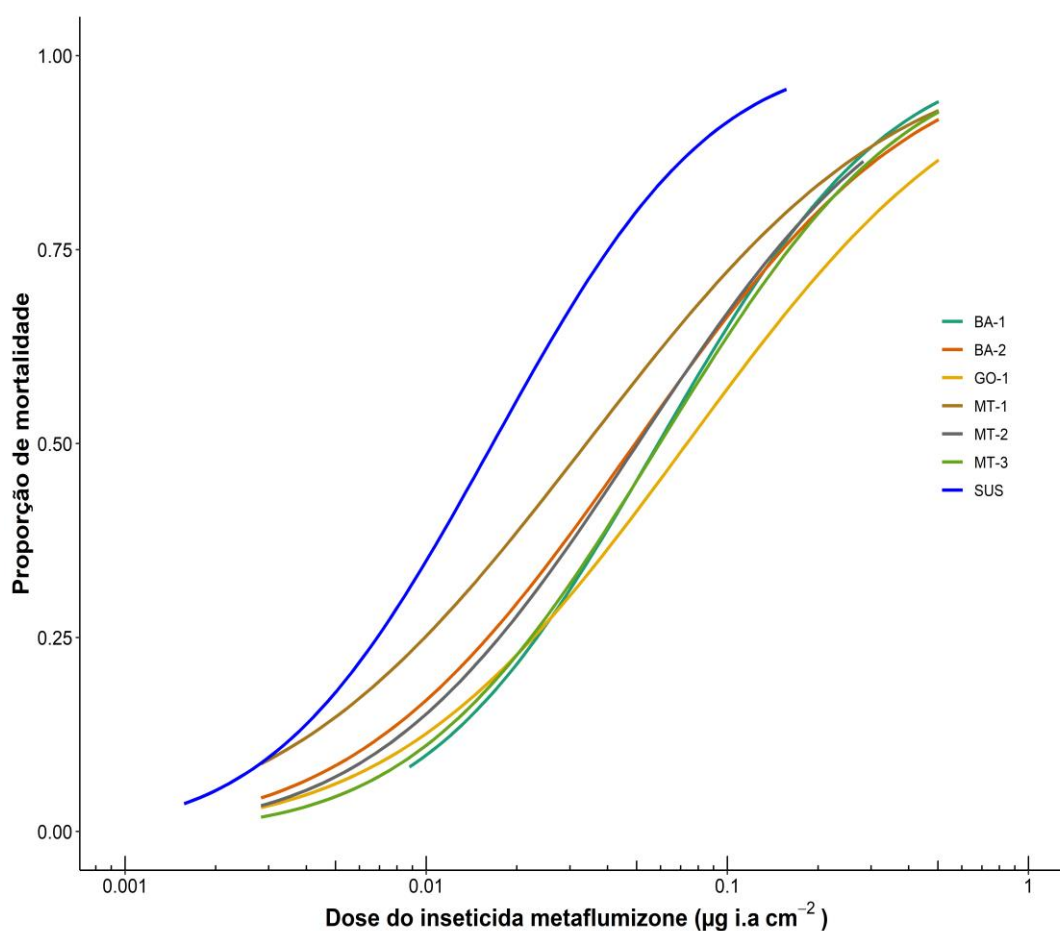


Figura 2.3 Curvas de dose-reposta das populações de campo e da linhagem suscetível de *H. armigera* a metaflumizone.

Mediante a análise conjunta dos dados de mortalidade de caracterização das curvas de dose-resposta de todas as populações de campo, a DL₉₉ estimada para metaflumizone foi de 0,793 (IC 95% = 0,70 - 0,91) µg i.a. cm⁻² (Tabela 2.4). Com base no limite superior do intervalo de confiança, uma dose diagnóstica de 0,88 µg i.a. cm⁻² (equivalente a 56 µg i.a. mL⁻¹) foi estabelecida para monitorar a suscetibilidade de *H. armigera* a metaflumizone. Essa dose foi utilizada nos bioensaios de monitoramento e na estimativa da frequência de alelos da resistência (*F₂ Screen*) para as populações de *H. armigera* coletadas durante as safras de 2020/21 e 2021/22.

Tabela 2.4 Dose diagnóstica estimada pela análise conjunta dos dados de curvas de dose-resposta em populações de campo de *H. armigera*.

Inseticida (i.a)	n ¹	Coef. angular (± EPM) ²	DL ₅₀ (IC 95%) ³	DL ₉₉ (IC 95%) ⁴	χ ² (g.l.) ⁵
metaflumizone	5.137	1,80 (0,05)	0,070 (0,065 - 0,075)	0,793 (0,702 - 0,907)	7,03 (6)

¹ Número de insetos testados; ² Coeficiente angular e erro padrão da média; ³ Dose letal de 50% dos indivíduos (µg i.a. cm⁻²) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Dose letal de 99% dos indivíduos (µg i.a. cm⁻²) e intervalo de confiança a 95%; ⁵ χ² valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

2.3.2. Monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de *H. armigera*

As maiores sobrevivências na dose diagnóstica em populações de *H. armigera* na safra 2020/21 foram observadas nas populações MS-1 (8,3%) e MT-6 (6,9%). Já na safra 2021/22, as populações que tiveram maiores sobrevivência foram GO-4 (12,2%) e MS-3 (11,1%) (Tabela 2.5 e Figura 2.4). Apesar de serem consideradas baixas sobrevivências, observamos que de uma safra para outra a sobrevivência aumentou, indicando um aumento na frequência de alelos que conferem resistência a metaflumizone nas populações de campo.

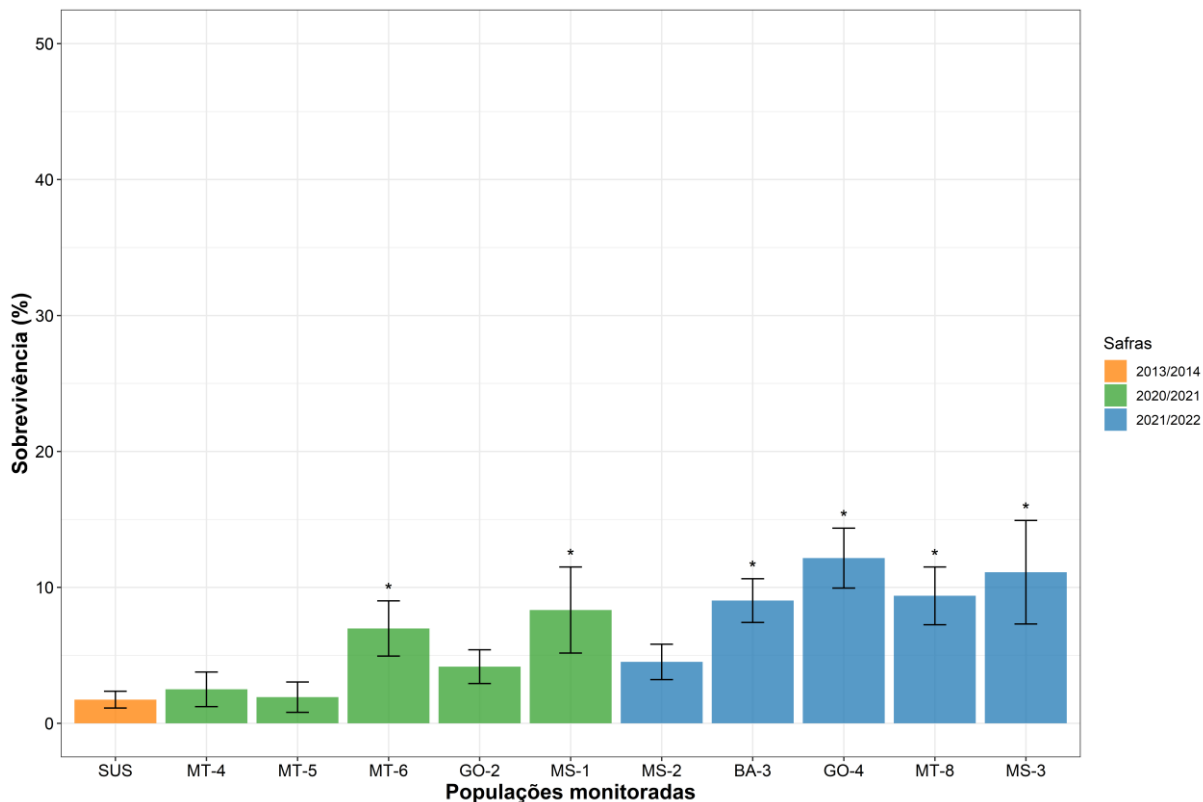


Figura 2.4 Sobrevivência na dose diagnóstica de metaflumizone de $0,88 \mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ no monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em populações de campo de *H. armigera*. Barras de erro representam o erro padrão. *Diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Foi possível verificar que há diferenças significativas entre a linhagem suscetível e as populações de campo dentro da safra e ao longo do tempo (Tabela 2.5). Com base nos intervalos de confiança da probabilidade de sobrevivência (ICs 95%) e no teste de Dunnett, as populações MT-6, MS-1, BA-3, GO-4, MT-8 e MS-3 diferiram significativamente da linhagem suscetível de referência (SUS).

Tabela 2.5 Sobrevivência (%) no monitoramento da suscetibilidade de populações de *H. armigera* a metaflumizone nas safras 2020/21 e 2021/22.

Safra	Pop. ¹	Município	Sobrevivência (\pm EPM) ²	IC 95% ³
2013/14	SUS	Luiz Ed. Magalhães - BA	1,74 (\pm 0,13)	0,007 - 0,039
	MT-4	Primavera do Leste - MT	2,50 (\pm 0,28)	0,012 - 0,059
	MT-5	Itiquira - MT	1,92 (\pm 0,24)	0,009 - 0,043
2020/21	MT-6	Sorriso - MT	6,97 (\pm 0,42)*	0,045 - 0,109
	GO-2	Cristalina - GO	4,17 (\pm 0,25)	0,022 - 0,074
	MS-1	Chapadão do Sul - MS	8,33 (\pm 0,66)*	0,056 - 0,129
	MS-2	Costa Rica - MS	4,51 (\pm 0,27)	0,026 - 0,075
	BA-3	Correntina - BA	9,03 (\pm 0,33)*	0,061 - 0,128
2021/22	GO-4	Luziânia - GO	12,15 (\pm 0,46)*	0,087 - 0,164
	MT-8	Lucas do Rio Verde - MT	9,38 (\pm 0,43)*	0,064 - 0,132
	MS-3	Costa Rica - MS	11,11 (\pm 0,79)*	0,085 - 0,152

¹ código da população; ² Sobrevivência média (%) e erro padrão da média; ³ Intervalo de confiança a 95%;

* Diferença significativa na coluna (teste de Dunnett, $\alpha = 0,05$) com $p < 0,05$. ^{SUS} Linhagem suscetível de referência.

2.3.3. Estimativa da frequência de alelos da resistência a metaflumizone em populações de *H. armigera*

Para a estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone, um total de 631 isofamílias foram estabelecidas e 179 (28,4% de aproveitamento) testadas, totalizando 24.925 lagartas testadas em terceiro ínstar. A sobrevivência média na dose diagnóstica entre as populações testadas variou de 2,3% a 11,0%, resultando em uma frequência de 0,023 (MT-4) a 0,174 (MS-3). Assim como no monitoramento fenotípico da suscetibilidade, em que observamos aumento na sobrevivência de uma safra para outra, houve aumento da frequência de alelos da resistência de $\approx 3,2$ vezes, de 0,0441 na safra 2020/21 para 0,1407 na safra 2021/22 (Tabela 2.6). A frequência estimada para ambas as safras foi de 0,0774 (0,0590 - 0,0979), demonstrando uma frequência inicial alta, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Tabela 2.6 Estimativa da frequência do alelo da resistência a metaflumizone em populações de *H. armigera* coletadas nas safras 2020/2021 e 2021/2022.

Saфра	Pop. ¹	Número de insetos avaliados			Adultos	Iso. Positivas ³	Frequência estimada	IC 95% ⁴
		Iso. Total ²	Isso. Testadas ²	Lagartas				
2020/21	MT-4	132	63	9.627	220	5	0,0231	(0,0086 - 0,0445)
	MT-5	51	11	1.656	62	2	0,0579	(0,0124 - 0,1348)
	MT-6	28	13	2.450	157	3	0,0668	(0,0189 - 0,1417)
	MS-1	76	30	4.099	238	10	0,0860	(0,0441 - 0,1401)
	Subtotal	287	117	17.832	677	20	0,0441	(0,0276 - 0,0643)
2021/22	MS-2	35	2	151	3	0	0,0630	(0,0018 - 0,2189)
	BA-3	32	2	274	9	0	0,0630	(0,0018 - 0,2189)
	GO-4	108	20	2.116	200	12	0,1478	(0,0821 - 0,2286)
	MT-8	91	17	2.024	144	8	0,1185	(0,0564 - 0,1995)
	MS-3	78	21	2.528	288	15	0,1740	(0,1040 - 0,2573)
	Subtotal	344	62	7.093	644	35	0,1407	(0,1009 - 0,1857)
Total		631	179	24.925	1.321	55	0,0774	(0,0590 - 0,0979)

¹ Código da população; ² Número de isofamílias ou isolinhas; ³ Somente isofamílias em que as lagartas (F₂) testadas atingiram o estágio adulto na proporção de 6,25% foram considerados; ⁴ Intervalo de confiança de 95% da estimativa de frequência do alelo.

2.4. Discussão

Uma baixa variação (0,049 a 0,090 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$) na suscetibilidade a metaflumizone em populações de *H. armigera* foi observada (variação menor que ≈ 2 vezes), com base nos valores de DL_{50} (Tabela 2.3). Baixa variação na suscetibilidade ao inseticida metaflumizone também foi relatada em *P. xylostella* = 4,88 vezes (KHAKAME; WANG; WU, 2013) e *S. frugiperda* = 3,18 vezes (KAISER et al., 2021) e 6,24 vezes (OLIVEIRA, 2008). Baixas variações na suscetibilidade são esperadas quando a pressão de seleção exercida sobre a população é baixa, especialmente quando os alelos da resistência estão presentes em baixa frequência (KRANTHI, 2005). Naturalmente alta variação natural na suscetibilidade a inseticidas pode ser verificada entre as populações de campo (ROUSH; MILLER, 1986) e sendo assim, os estudos de linhas-básicas de suscetibilidade têm sido de fundamental importância para o estabelecimento de programas de manejo da resistência. Variações de aproximadamente 20 vezes na DL_{50} foram verificadas, por exemplo, em populações de *T. absoluta* no Brasil (SILVA et al., 2016), e em populações de *H. armigera* na China a metaflumizone (WANG et al., 2021). Porém, devido à baixa utilização de inseticidas bloqueadores de canais de sódio dependentes da voltagem (indoxacarb e metaflumizone) para controle de *H. armigera* no Brasil (< 2% dos inseticidas utilizados no controle de lepidópteros-praga), a pressão de seleção de metaflumizone sobre essa praga ainda é baixa quando comparada com inseticidas do grupo das benzilureias, carbamatos, diamidas, avermectinas e piretroides (Comunicação pessoal, Kynetec).

O monitoramento fenotípico com base na dose diagnóstica (DL_{99}) revelou uma baixa variação geográfica na suscetibilidade de populações de *H. armigera* para os quatro estados em que foram realizadas as coletadas. Ao todo, foram monitoradas dez populações entre as safras 2020/21 e 2021/22. A sobrevivência máxima na safra 2020/21 foi de 8,33% para a população MS-1, na safra seguinte, 2021/22, a máxima sobrevivência encontrada foi de 12,15% para a população GO-4 (Tabela 2.5). Foi verificada uma variação na sobrevivência de *H. armigera* a metaflumizone de uma safra para outra, indicando um pequeno decréscimo na suscetibilidade no decorrer das safras. Na China, estudos com populações de *S. exigua* em condições de campo também demonstram variação na suscetibilidade a metaflumizone de um ano para outro, revelando uma alta razão de resistência (921,4 vezes) em menos de 3 anos da liberação comercial do inseticida (TIAN; SUN; SU, 2014). Estudos adicionais realizados por Su et al. (2014), com as mesmas populações usadas por Tian et al. (2014), revelaram a capacidade de aumento da resistência (CL_{50} de 914 para 5.609 mg i.a. L^{-1}) com pressão de

seleção por dez gerações em condições de laboratório em até 6,1 vezes para outra população de campo que também apresentou aumento da razão de resistência de 60,3 para 370 vezes. A resistência de *S. exigua* a metaflumizone foi associada a esterases e não foi verificada resistência cruzada com indoxacarb (SU; SUN, 2014).

Uma rápida evolução da resistência a metaflumizone também foi verificada em *P. xylostella* na China. A partir do monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone em 29 populações de *P. xylostella* coletadas em campo entre os anos de 2008 e 2011, foi verificada uma variação na suscetibilidade de 4,8 vezes (CL_{50} 1,34 a 6,55 mg i.a. L^{-1}) (KHAKAME; WANG; WU, 2013). Já no monitoramento da suscetibilidade a metaflumizone realizado em 11 populações de *P. xylostella* de campo coletadas entre 2012 e 2014, foi verificada uma variação na suscetibilidade de 79,6 vezes ($CL_{50} = 1,92$ a 152,8 mg i.a. L^{-1}) (WANG et al., 2016). Uma das populações coletada em Baiyun, Província de Guangdong na China teve razão de resistência de 70 vezes a metaflumizone e de 750 vezes a indoxacarb. Mediante comparações das sequências complementares de DNA que codificam os genes do canal de sódio dessa população e da linhagem suscetível, duas mutações (*F1845Y* e *VI848I*) no sexto segmento do domínio IV nos canais de sódio foram encontradas (WANG et al., 2016). Essas mutações conferem diferentes razões de resistência e níveis dominância para indoxacarb e metaflumizone. Linhagens resistentes homozigóticas de cada mutação foram estabelecidas por meio de cruzamentos assistidos por genotipagem. Para ambas as linhagens homozigóticas, as mutações *F1845Y* e *VI848I* herdaram a resistência a indoxacarb e metaflumizone de maneira autossômica, entretanto, o padrão de herança foi distinto. A resistência a ambos os inseticidas foi conferida pela mutação *F1845Y* caracterizada como incompletamente dominante, enquanto a da mutação *VI848I* foi codominante para indoxacarb e incompletamente recessiva para metaflumizone (WANG et al., 2022). Essas mesmas mutações que conferem resistência no local-alvo para os inseticidas bloqueadores dos canais de sódio dependentes das voltagem, foram validadas *in vivo* em *Drosophila melanogaster* mediante CRISPR/Cas9, confirmando uma associação com a resistência (SAMANTSIDIS et al., 2019). Em *T. absoluta*, as mutações *F1845Y* e *VI848I* foram fortemente associadas à resistência a indoxacarb (razão de resistência de 1.794 vezes) e metaflumizone (razão de resistência de 40 vezes) (RODITAKIS et al., 2017).

No Brasil, o primeiro inseticida bloqueador dos canais de sódio dependentes da voltagem (indoxacarb) foi aprovado para comercialização somente em 2015 como medida de controle emergencial de *H. armigera*. Entretanto, em 2016 alta variabilidade (21,2 vezes)

entre populações de campo de *T. absoluta* a metaflumizone foram relatadas (SILVA et al., 2016). Além disso, populações de *P. xylostella* coletadas em 2009 no estado de Pernambuco, antes mesmo da liberação comercial de indoxacarb em 2015, também apresentaram alta variação na suscetibilidade ao indoxacarb (25,3 vezes) (SANTOS et al., 2011). Esses relatos no Brasil, assim como os reportados na China, indicam o alto risco de evolução da resistência de pragas a metaflumizone, uma vez que esses inseticidas não haviam sido liberados para comercialização, ou logo após a liberação comercial estudos registraram uma rápida evolução da resistência.

Casos semelhantes aos relatados na China com populações de *P. xylostella* e *S. exigua* foram verificados no Brasil com *S. frugiperda*. Populações de *S. frugiperda* em condições de campo coletadas entre 2006 e 2007 apresentaram sobrevivência média de 0,63 a 10,37% e variação na suscetibilidade de 6,24 vezes ($CL_{50} = 2,9$ a $18,1 \mu$ i.a mL^{-1}) (OLIVEIRA, 2008). Posteriormente, em trabalho realizado por Kaiser et al. (2021), variação de 2,6 vezes ($CL_{50} = 4,6$ a $15,3 \mu$ g i.a mL^{-1}) foi encontrada em populações coletadas em 2017. A sobrevivência de 87 populações de campo monitorada de 2017 a 2020 variou de 0,0 a 12,7%. Como os primeiros inseticidas bloqueadores de canais de sódio dependentes da voltagem só foram comercializados a partir de 2015, esses valores podem ser resultado da variação natural da suscetibilidade ou da resistência cruzada a outros inseticidas usados anteriormente ou até mesmo de inseticidas convencionais que são utilizados até hoje, como é o caso de piretroides.

A frequência estimada de alelos de resistência a metaflumizone aumentou de 0,0441 (IC 95% = 0,0276 - 0,0643) (safra 2020/21) para 0,1407 (IC 95% = 0,1009 - 0,1857) (safra 2021/22). Nos bioensaios de F_2 *Screen*, a sobrevivência média na dose diagnóstica entre as populações variou de 2,3 a 11% entre as safras (Tabela 2.6), resultando em um aumento de \approx 3,2 vezes na estimativa da frequência de alelos de uma safra para a outra (Tabela 2.6). Portanto, em geral, a suscetibilidade a metaflumizone ainda é alta nas populações de *H. armigera* no Brasil, permitindo o uso desse inseticida em estratégias de rotação no MRI. No entanto, a frequência estimada de alelos que conferem resistência a metaflumizone foi alta, e de uma safra para outra verificamos um pequeno aumento de 3,2 vezes na frequência. Apesar de baixa variação na suscetibilidade e na frequência de alelos da resistência entre as safras 2020/21 e 2021/22, não podemos ignorar o potencial de risco de evolução da resistência de *H. armigera* a metaflumizone. Esse trabalho fornece um alerta antecipado sobre o potencial risco de evolução da resistência a metaflumizone, caso estratégias de manejo da resistência não sejam adotadas.

2.5. Conclusões

- Há baixa variação (< 2 vezes) na suscetibilidade ao inseticida metaflumizone em populações de *H. armigera* do Brasil coletadas na safra 2019/20.
- A frequência inicial do alelo de resistência a metaflumizone em populações de *H. armigera* é alta de 0,0774 (IC 95% = 0,059 - 0,097).
- Houve redução na suscetibilidade ao inseticida metaflumizone em populações de *H. armigera* no Brasil de 2020 a 2022.

Referências

- ABBADÉ-NETO, D. et al. First Report of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Resistance to Flubendiamide in Brazil: Genetic Basis and Mechanisms of the Resistance. **Agronomy** **2022**, Vol. **12**, Page **1664**, v. 12, n. 7, p. 1664, 13 jul. 2022.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1998.
- ANDOW, D.; ALSTAD, D. N. Letter to the Editor. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 4, p. 755–758, 1 ago. 1999.
- APRD. **Arthropod Pesticide Resistance Database | Michigan State University**. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41>>. Acesso em: 18 abr. 2023.
- BEHERE, G. T. et al. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 6, p. 599–603, dez. 2008.
- CZEPAK, C. et al. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110–113, mar. 2013.
- DORAI-RAJ, S. Package ‘binom’ Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. 2014.
- DOWNES, S.; WALSH, T.; TAY, W. T. Bt resistance in Australian insect pest species. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 78–83, 1 jun. 2016.
- DURIGAN, M. R. et al. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 73–80, 1 nov. 2017.

- DURIGAN, M. R. **Resistance to pyrethroid and oxadiazine insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 7 maio 2018.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 1971. v. 8
- FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, n. 66, p. 17–52, 1989.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976.
- HEMPEL, K. et al. Toxicological properties of metaflumizone. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 3, p. 190–195, 15 dez. 2007.
- HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, v. 50, n. 3, p. 346–363, jun. 2008.
- KAISER, I. S. et al. Baseline Response, Monitoring, and Cross-Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Sodium Channel Blocker Insecticides in Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 114, n. 2, p. 903–913, 19 fev. 2021.
- KAISER, I. S. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas bloqueadores de canais de sódio**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 7 maio 2021.
- KASTEN JR., P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. **Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1979) em duas dietas artificiais e substrato natural**Revista de Agricultura, , 1978.
- KASTEN JUNIOR, 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**, v. 53, n. 1, p. 68–78, 7 fev. 1978.
- KHAKAME, S. K.; WANG, X.; WU, Y. Baseline toxicity of metaflumizone and lack of cross resistance between indoxacarb and metaflumizone in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 3, p. 1423–1429, 1 jun. 2013.
- KRANTHI, K. R. **Insecticide resistance monitoring, mechanisms and management manual**. [s.l: s.n.]. v. 153
- LEITE, N. A. et al. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113286, 19 nov. 2014.

- OLIVEIRA, F. E. B. **Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a metaflumizone na cultura do milho: bases para o manejo da resistência.** Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 29 set. 2008.
- PEREIRA, R. M. **Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil.** Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 22 maio 2017.
- PUDASAINI, R. et al. Insecticide Resistance and Control Failure Likelihood Analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) Populations From Taiwan. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 3, p. 835–843, 8 jun. 2022.
- R CORE, T. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.
- RODITAKIS, E. et al. Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 8, p. 1679–1688, 1 ago. 2017.
- ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 2, p. 293–298, 1 abr. 1986.
- RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L. Programming Probit Analysis. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 25, n. 3, p. 191–193, 15 set. 1979.
- RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L.; SAVIN, N. E. POLO: A New Computer Program for Probit Analysis. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 23, n. 3, p. 209–213, 15 set. 1977.
- SALGADO, V. L.; HAYASHI, J. H. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 3, p. 182–189, 15 dez. 2007.
- SAMANTSIDIS, G. R. et al. Functional validation of target-site resistance mutations against sodium channel blocker insecticides (SCBIs) via molecular modeling and genome engineering in *Drosophila*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 104, p. 73–81, 1 jan. 2019.
- SANTOS, V. C. et al. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 264–270, mar. 2011.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics**, 2002.

- SHEN, J. et al. Fitness and inheritance of metaflumizone resistance in *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 53–59, 1 jun. 2017.
- SHEN, J. et al. Biochemical mechanisms, cross-resistance and stability of resistance to metaflumizone in *Plutella xylostella*. **Insects**, v. 11, n. 5, p. 311, 15 maio 2020.
- SILVA, S. S. **Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 30 out. 2019.
- SILVA, T. B. M. et al. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. **Crop Protection**, v. 79, p. 80–86, 1 jan. 2016.
- SILVER, K. S. et al. Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 87–92, 1 jun. 2010.
- SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. In: **Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 229–242.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 101–104, 1 jan. 2016.
- SPECHT, A. et al. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 689–692, 2013.
- SU, J.; SUN, X. X. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. **Crop Protection**, v. 61, p. 58–63, 1 jul. 2014.
- SUN, X. X. et al. Resistance Risk Evaluated by Metaflumizone Selection and the Effects on Toxicities over Other Insecticides in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 5, p. 2354–2361, 23 set. 2019.
- TAKAGI, K. et al. Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 3, p. 177–181, 15 dez. 2007.
- TAY, W. T. et al. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80134, 18 nov. 2013.

- TAY, W. T. et al. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 28 mar. 2017.
- TIAN, X.; SUN, X.; SU, J. Biochemical mechanisms for metaflumizone resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, n. 1, p. 8–14, 1 jul. 2014.
- WANG, Q. et al. Field-evolved resistance to 11 insecticides and the mechanisms involved in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 77, n. 11, p. 5086–5095, 1 nov. 2021.
- WANG, X. et al. Equivalent intensity but differential dominance of sodium channel blocker insecticide resistance conferred by F1845Y and V1848I mutations of the voltage-gated sodium channel in *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v. 0, p. 1–10, 2022.
- WANG, X. L. et al. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v. 23, n. 1, p. 50–58, 1 fev. 2016.
- WANG, X.; LOU, L.; SU, J. Prevalence and stability of insecticide resistances in field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Huizhou, Guangdong Province, China. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 3, p. 728–732, 1 set. 2019.
- WANUMEN, A. C. et al. Residual acute toxicity of some modern insecticides toward two mirid predators of tomato pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 3, p. 1079–1085, 1 jun. 2016.
- ZALUCKI, M. P. et al. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? **Australian Journal of Zoology**, v. 34, n. 6, p. 779–814, 1986.
- ZHANG, S. et al. Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 85–89, 1 ago. 2017.

3. MONITORAMENTO E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA Cry1Ac EXPRESSA EM SOJA MON87701 × MON89788 EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

Resumo

Os plantios comerciais com o evento de soja Bt MON87701 × MON89788 expressando a proteína Cry1Ac iniciaram-se na safra 2013/2014 no Brasil. Essa tecnologia tem sido amplamente adotada com altos níveis de controle de lepidópteros-alvo, incluindo *Helicoverpa armigera* (Hübner). Contudo, casos de resistência à soja Bt evoluída em condições de campo já foram reportadas para as pragas *Rachiplusia nu* (Guenée) e *Crociosema aporema* (Walsingham) na safra 2020/21. Além disso, ocorrências esporádicas de lagartas de *Helicoverpa* spp. têm sido reportadas em lavouras de soja Bt e outras culturas em algumas localidades. Sendo assim, para verificar se a evolução da resistência de *H. armigera* a soja Bt é um dos fatores para explicar o aumento destas infestações, os objetivos desse estudo foram (i) Monitorar a suscetibilidade de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 nas safras 2020/21 e 2021/22; (ii) Estimar a frequência de alelos da resistência à soja MON87701 × MON89788 após 10 anos de cultivo comercial; (iii) Selecionar uma linhagem de *H. armigera* resistente à soja MON87701 × MON89788; e (iv) Avaliar a dominância funcional da resistência de *H. armigera* em folhas de soja MON 87701 × MON 89788. Foram avaliadas 19 populações de *Helicoverpa* spp. coletadas em diferentes plantas hospedeiras (incluindo soja Bt e não-Bt, algodão, feijão e nabo forrageiro) na região Central do Brasil. Inicialmente foi realizada a identificação específica mediante técnica de PCR-RFLP com marcador COI (Cytochrome oxidase I). *Helicoverpa armigera* foi identificada apenas nas amostras de plantas hospedeiras não-Bt e *Helicoverpa zea* (Boddie) em soja Bt e plantas hospedeiras não-Bt. A mortalidade de lagartas de *H. armigera* em folhas de soja Bt foi 100% para todas as populações monitoradas tanto na safra 2020/21 quanto na safra 2021/22. Mediante o uso da técnica de F_2 screen, foram avaliadas um total de 241 isofamílias F_2 de *H. armigera* testadas quanto à presença de alelos da resistência à soja MON87701 × MON89788 e 12 isofamílias foram consideradas positivas, resultando em uma frequência alélica estimada de 0,0134 (IC 95% 0,007 - 0,022). Houve um aumento de $\approx 12,2$ vezes da frequência de alelos da resistência em *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 em comparação com as estimativas obtidas entre 2013 e 2015. A partir das lagartas sobreviventes do F_2 screen, uma linhagem resistente de *H. armigera* à MON87701 × MON89788 foi selecionada após 8 ciclos de pressão de seleção com lagartas alimentadas em folhas de soja Bt. A dominância funcional da resistência de *H. armigera* em folhas de soja MON87701 × MON89788 foi recessiva. Os resultados desse trabalho evidenciam a evolução da resistência de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 e a necessidade de implementação de estratégias de MRI para preservar a vida útil desta tecnologia no manejo desta praga no Brasil.

Palavras-chave: Soja Bt, F_2 Screen, *Helicoverpa* spp, Manejo da Resistência de Insetos

Abstract

The commercial use of Bt soybean MON87701 × MON89788 expressing Cry1Ac protein started during 2013/2014 crop season in Brazil. This technology has been largely adopted providing high levels of control against target lepidopteran pests, including *Helicoverpa armigera* (Hübner). However, field-evolved resistance of the pests *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Crociosema aporema* (Walsingham) was recently reported in 2020/2021 crop season. Additionally, some sporadic occurrence of *Helicoverpa* larvae attacking Bt soybean and other crops has been reported in some locations. Thus, to understand if the evolution of *H. armigera* resistance to Bt soybean was one of the factors to explain the infestation of *Helicoverpa* larvae in Bt soybean, the objectives of this study were (i) Monitor the susceptibility to Bt soybean MON87701 × MON89788 in populations of *H. armigera* collected during 2020/21 and 2021/22 crop seasons; (ii) Estimate the frequency of resistance alleles to Bt soybean MON87701 × MON89788 after 10 years of commercial release; (iii) Select a resistant strain of *H. armigera* to Bt soybean MON87701 × MON89788; e (iv) Evaluate the functional dominance of the resistant strain of *H. armigera* feeding on leaves of Bt soybean MON 87701 × MON 89788 We sampled 19 field populations of *Helicoverpa* from different crops (including Bt and non-Bt soybean, cotton, dry-bean and turnip) from the Central region of Brazil during the 2020/21 and 2021/22 crop seasons. First we identified the species by using PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) with COI (Cytochrome oxidase I). *Helicoverpa armigera* was identified only in the samples from non-Bt host plants and *Helicovera zea* (Boddie) from Bt soybean non-Bt host plants. The mortality of *H. armigera* larvae in leaves of Bt soybean were 100% to all populations evaluated during 2020/21 and 2021/22 crop seasons. However, from a total of 241 isofamilies tested in the F_2 screen to estimate the frequency of resistance alleles to Bt soybean, 12 isofamilies were considered positives, resulting in the estimated frequency of resistance alleles of 0.0134 (CI 95% 0.007 - 0.022). There was an increase of \approx 12.2-fold in the frequency of resistant alleles of *H. armigera* to Bt soybean in compare with the frequency estimated in 2013 to 2015. From the larvae surviving in the F_2 screen, a resistant strain of *H. armigera* to Bt soybean was selected after 8 cycles of selection pressure of larvae feeding on leaves of Bt soybean. The functional dominance of the resistant strain of *H. armigera* on leaves of Bt soybean was recessive. The results of this study showed the potential of resistance evolution of *H. armigera* to Bt soybean MON877701 × MON89788 and the need to implement IRM strategies to preserve the lifetime of this technology to manage this pest in Brazil.

Keywords: Bt soybean, F_2 Screen, *Helicoverpa* spp, Insect resistance management

3.1. Introdução

A utilização de inseticidas e culturas transgênicas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae) têm sido as principais estratégias de manejo adotadas no Brasil e no mundo para o manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e outras espécies de pragas (TABASHNIK; FABRICK;

CARRIÈRE, 2023). Para o manejo de *H. armigera* no Brasil, atualmente a principal estratégia tem sido a exploração do evento de soja Bt MON 87701 × MON 89788 que expressa a proteína inseticida Cry1Ac (Grupo 11A). Esta soja Bt foi aprovada para liberação comercial no Brasil em 2010 (CTNBIO, 2010), no entanto, a soja Bt passou a ser utilizada comercialmente somente a partir da safra 2013/14 que coincide com o ano de relato oficial de *H. armigera* no Brasil (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013).

Trabalhos realizados entre 2013 e 2015 demonstraram que o evento de soja MON 87701 × MON 89788 é altamente eficiente para *H. armigera*, visto que diluições de até 100 vezes do tecido liofilizado de soja causaram mortalidade de 100% nos indivíduos testados e inibição do desenvolvimento larval para além do segundo ínstar após sete dias (DOURADO et al., 2016). Essa alta suscetibilidade de *H. armigera* se deve aos altos níveis de expressão da proteína Cry1Ac, atendendo aos critérios de “alta dose”. Além disso, a frequência inicial de alelos que conferem resistência a soja Bt foi baixa ($< 10^{-3}$) em populações de *H. armigera* no Brasil, comprovando assim um baixo risco de evolução da resistência (DOURADO et al., 2016). Com a ampla adoção dessa tecnologia pelos produtores em diversas regiões de produção, tem sido verificada a supressão da densidade populacional dos principais lepidópteros-pragas da soja devido aos altos níveis de controle conferidos pela soja Bt (HORIKOSHI et al., 2021a, 2022). Reduções significativas na utilização de inseticidas nos campos de soja foram verificadas, com redução do número de pulverizações de inseticidas em até 50% (HORIKOSHI et al., 2021a, 2022). A utilização da soja Bt trouxe inúmeros benefícios à agricultura no Brasil, especialmente ao manejo de pragas na soja devido à eficácia dessa tecnologia no controle de pragas. Sendo assim, a evolução da resistência de pragas à soja MON 87701 × MON 89788 pode inviabilizar o uso sustentável dessa tecnologia no Brasil comprometendo programas de MIP, caso estratégias proativas de manejo da resistência não forem adotadas.

Deste modo, para preservar a vida útil do evento de soja MON87701 × MON89788 em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) no Brasil, é fundamental o estabelecimento proativo de estratégias de manejo da resistência de insetos (MRI). O primeiro passo para implementação de programas de MRI é a caracterização de linhas-básicas da suscetibilidade da praga alvo à proteína inseticida expressa na planta, dessa forma, é possível estimar doses diagnósticas a serem utilizadas no monitoramento fenotípico e na estimativa da frequência de alelos da resistência (FISCHHOFF, 1996; SIMS et al., 1996). Assim é possível identificar pequenas mudanças na suscetibilidade de populações em resposta a pressão de seleção exercida pela cultura Bt (FISCHHOFF, 1996; HUANG et al., 2011). O

monitoramento da resistência às culturas Bt tem como principal objetivo detectar a resistência desenvolvida no campo com antecedência suficiente para permitir o gerenciamento de programas proativos antes que ocorram falhas no campo atingindo a frequência crítica (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009).

O MRI difere para plantas que expressam proteínas Bt em função do nível de expressão da toxina na planta, podendo ser de alta ou baixa dose. Eventos considerados “alta dose” devem matar pelo menos 99,99% dos insetos suscetíveis no campo, enquanto que “baixa dose” é qualquer quantidade que não atenda a definição de “alta dose” (EPA, 1998; GOULD, 1998; TABASHNIK et al., 2008). Essa definição se baseia na dominância da resistência para uma planta que expressa uma proteína Bt. Logo, se a expressão da proteína na planta não for alta o suficiente para matar todos os indivíduos suscetíveis homozigotos, certamente não matará quase todos os indivíduos heterozigotos. Caso esse cenário ocorra, a herança da resistência será considerada não recessiva, o que levará a um rápido processo de evolução da resistência em campo (GOULD, 1998; TABASHNIK; GOULD; CARRIÈRE, 2004). Assim, o grau de dominância da resistência é outro fator a ser considerado no MRI para plantas Bt. Se a expressão da proteína for alta suficiente para matar quase todos os insetos heterozigotos, fazendo com que esses indivíduos heterozigotos tenham fenótipo parecido aos homozigotos suscetíveis, a resistência será funcionalmente recessiva (CAPRIO; SUMERFORD; SIMS, 2000; GOULD, 1998). Outra premissa para a recessividade do alelo da resistência é a utilização de áreas de refúgio. Áreas de refúgio compreendem áreas de cultivos não-Bt, onde a praga não será exposta à pressão de seleção pela proteína presente na área Bt. Desse modo, indivíduos suscetíveis podem sobreviver e acasalar-se com indivíduos sobreviventes oriundos de áreas Bt, gerando uma progênie de indivíduos heterozigotos, que serão controlados pelo evento de “alta dose” (GOULD, 1994; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). A utilização de plantas que expressam as proteínas Bt em “alta dose” associadas ao refúgio, é denominada estratégia de “alta dose/refúgio”.

A resistência prática (desenvolvida em condições de campo) a tecnologias Bt aumentou de três casos em 2005 para pelo menos 26 casos em 2020, afetando 11 espécies em todo o mundo, sendo nove lepidópteros e dois coleópteros (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017; TABASHNIK; CARRIÈRE; GASSMANN, 2019; TABASHNIK; FABRICK; CARRIÈRE, 2023). Diversos casos de resistência de *H. armigera* em várias partes do mundo à proteína Cry1Ac que é expressa no algodão Bt foram registrados em países como Paquistão (ALVI et al., 2012), China (DANDAN et al., 2019; GUAN et al., 2023; LIU et al., 2009;

TABASHNIK; WU; WU, 2012), Índia (KRANTHI et al., 2006; KUKANUR et al., 2018) e Austrália (AKHURST et al., 2003; BIRD; AKHURST, 2005; GUNNING et al., 2005). O algodão Bt foi amplamente cultivado em todo o mundo desde 1996 (ISAAA, 2018, 2019). Essa ampla utilização sem a correta implementação de estratégias de MRI resultou em diversos casos de resistência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac expressa no algodão Bt.

No Brasil foi verificada uma ampla utilização da soja Bt, sendo que após quase uma década de seu primeiro cultivo comercial, mais de 40 milhões de hectares (>90% de toda área cultivada com soja no Brasil) são cultivados anualmente com essa biotecnologia (Comunicação pessoal, Kynetec). A supressão da densidade populacional de *H. armigera* foi relatada no Brasil, a partir de levantamento realizado no período de 2012 a 2019 (HORIKOSHI et al., 2022). No entanto, relatos de ataques de lagartas de *Helicoverpa* spp. atacando áreas de soja Bt foram reportados nas últimas safras (BUENO, 2022), e a possibilidade de híbridos mais adaptados estarem ocorrendo já foi relatada (ANDERSON et al., 2018; CORDEIRO et al., 2020). Além disso, casos de resistência à soja Bt desenvolvida em campo para as pragas *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Crociosema aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) foram reportados na safra 2020/21 (HORIKOSHI et al., 2021b).

Sendo assim, para verificar se a evolução da resistência de *H. armigera* a soja Bt é um dos fatores para explicar o aumento das infestações de *Helicoverpa* spp. na cultura da soja e subsidiar a implementação de estratégias de manejo da resistência e preservar a sustentabilidade da soja Bt nas principais regiões produtoras do Brasil, os objetivos desse trabalho foram: (i) monitorar a suscetibilidade de populações de *H. armigera* em folhas de soja Bt nas safras 2020/21 e 2021/22; (ii) estimar a frequência de alelos da resistência à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera* após uma década de uso dessa biotecnologia em campo; (iii) selecionar uma linhagem de *H. armigera* resistente a soja Bt em laboratório; e (iv) avaliar a dominância funcional baseada na sobrevivência da linhagem resistente, suscetível e heterozigotos em folhas de soja Bt.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleta de populações de *Helicoverpa* spp. em campo

As coletas de populações de *Helicoverpa* spp. em condições de campo foram realizadas entre os anos de 2019 e 2022 nas principais regiões produtoras do Brasil. Ao todo, 19 populações foram coletadas, sendo seis populações na safra 2019/20, cinco populações na

safra 2020/21 e oito na safra 2021/22 em áreas produtoras de soja, algodão, feijão e nabo forrageiro (Tabela 3.1). Cada população amostrada foi composta por 500 a 800 indivíduos. As lagartas coletadas foram encaminhadas ao laboratório para identificação da espécie mediante a técnica de PCR utilizando iniciadores específicos (marcador COI - Cytochrome oxidase I) (BEHERE et al., 2008) para que somente as populações de *H. armigera* fossem utilizadas na condução dos estudos de monitoramento fenotípico e na estimativa da frequência de alelos que conferem resistência à proteína Bt.

Tabela 3.1 Locais de coleta de populações de *Helicoverpa* spp. em condições de campo coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil durante das safras 2019/20 a 2021/22.

Safra	Pop. ¹	Data de coleta	Mun./Estado	Latitude	Longitude	Hospedeiro	Espécie
2019/20	MT-1	11/2019	Rondonópolis/MT	16°52'51"S	54°45'58"W	Soja	<i>H.a.</i>
	MT-2	01/2020	Lucas do Rio Verde/MT	12°59'39"S	55°52'27"W	Soja	<i>H.a.</i>
	BA-1	01/2020	São Desidério/BA	12°43'53"S	45°56'20"W	Soja	<i>H.a.</i>
	GO-1	02/2020	Cristalina/GO	16°47'26"S	47°36'50"W	Soja	<i>H.a.</i>
	BA-2	05/2020	Barreiras/BA	11°41'47"S	46°00'17"W	Algodão	<i>H.a.</i>
	MT-3	06/2020	Primavera do Leste/MT	15°33'51"S	54°26'25"W	Soja	<i>H.a.</i>
2020/2021	MT-4	11/2020	Primavera do Leste/MT	15°25'23"S	54°22'12"W	Soja	<i>H.a.</i>
	GO-2	01/2021	Cristalina/GO	16°26'58"S	47°39'40"W	Soja	<i>H.a.</i>
	MT-5	02/2021	Itiquira/MT	17°09'36"S	54°45'21"W	Soja	<i>H.a.</i>
	MT-6	04/2021	Sorriso/MT	12°28'17"S	55°40'18"W	Algodão	<i>H.a.</i>
	MS-1	05/2021	Chapadão do Sul/MS	18°44'28"S	52°33'27"W	Algodão	<i>H.a.</i>
2021/2022	GO-3	11/2021	Palmeiras de Goiás/GO	16°50'22"S	49°56'57"W	Feijão	<i>H.z.</i>
	MS-2	11/2021	Costa Rica/MS	18°12'41"S	53°12'17"W	Nabo forrageiro	<i>H.a.</i> e <i>H.z.</i>
	BA-3	11/2021	Correntina/BA	11°45'04"S	45°46'34"W	Soja	<i>H.a.</i> e <i>H.z.</i>
	GO-4	11/2021	Luziânia/GO	16°29'01"S	47°54'47"W	Nabo forrageiro	<i>H.a.</i>
	MT-7	11/2021	Campo Verde/MT	15°38'36"S	55°11'03"W	Soja Xtend	<i>H.z.</i>
	MT-8	12/2021	Lucas do Rio Verde/MT	13°41'16"S	56°01'40"W	Algodão	<i>H.a.</i>
	MS-3	12/2021	Costa Rica/MS	18°20'19"S	52°50'20"W	Soja	<i>H.a.</i>
	MT-9	05/2022	Sapezal/MT	13°28'03"S	58°44'48"W	Algodão	<i>H.a.</i>

¹ Código da população; *H.a.* = *Helicoverpa armigera*; *H.z.* = *Helicoverpa zea*.

3.2.2. Criação de populações de *H. armigera* em laboratório

As lagartas coletadas foram transportadas em copos plásticos de 75 mL contendo dieta artificial à base de feijão branco, germe de trigo, levedura de cerveja, proteína de soja e

caseína (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976; KASTEN JUNIOR; PRECETTI; PARRA, 1978) onde permaneceram até a fase de pupa. Em seguida todas as pupas foram retiradas e lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65%. A partir desse momento, metade das pupas foram utilizadas para manutenção da população em laboratório e a outra metade foi utilizada para estimativa da frequência de alelos da resistência (item 3.2.4) por meio da técnica *F₂ Screen* (ANDOW; ALSTAD, 1998).

As pupas destinadas à criação e manutenção da população em laboratório foram colocadas em gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm altura × 25 cm diâmetro) revestidas internamente com papel sulfite e fechadas na parte superior por um tecido tipo *tule* para realização de posturas. Os substratos de oviposição e a solução de mel 10% para alimentação dos adultos foram trocados a cada dois dias. As posturas foram acondicionadas em copos transparentes de 500 mL até eclosão das lagartas, que posteriormente foram utilizadas nos bioensaios de monitoramento da suscetibilidade (item 3.2.3) a proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera*. Em todos os estágios de crescimento e desenvolvimento os insetos foram mantidos em salas climatizadas ou câmaras B.O.D com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

3.2.3. Monitoramento fenotípico da suscetibilidade à soja MON87701 × MON89788 em populações *H. armigera*

A sobrevivência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 foi avaliada em populações sob condições de campo durante as safras 2020/21 e 2021/22 (Tabela 3.2). Os bioensaios foram realizados em bandejas plásticas de 16 células, nas quais continham 3 mL de mistura gelificada ágar-água a 2,5%, e sobre essa mistura papel filtro para impedir o contato direto com a folha, mas mantendo a umidade.

Folhas de soja Bt do terço superior nos estádios vegetativos V4 até V6, provenientes de cultivos em casa de vegetação, foram colocadas em cada célula e com auxílio de um pincel seis lagartas recém eclodidas (< 24 h) foram inoculadas nas folhas em cada célula. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo realizadas 32 repetições, sendo cada repetição constituída de seis lagartas, totalizando duas placas de 16 células e 192 insetos testados para cada população. O tratamento controle foi realizado com folhas de soja não-Bt nas mesmas condições dos tratamentos com folhas Bt. Como padrão de suscetibilidade

foi avaliada a resposta da linhagem suscetível de referência (SUS) a soja MON87701 × MON89788 nas mesmas condições que as populações de campo.

A avaliação foi realizada sete dias após infestação. Foram considerados vivos apenas os indivíduos que realizaram a muda, estando pelo menos em segundo ínstar. Os dados de sobrevivência em folhas de soja Bt e não-Bt das populações de campo foram comparados pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$) para comparação de médias utilizando o programa R 4.2.2 (R CORE, 2022).

Tabela 3.2 Populações utilizadas no monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência de alelos que conferem resistência em *H. armigera* à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788.

Safra	Pop. ¹	Data de coleta	Mun./Estado	Latitude	Longitude	Hospedeiro ²
2020/21	MT-4	Nov. 2020	Primavera do Leste/MT	15° 25' 23" S	54° 22' 12" W	Soja
	MT-5	Fev. 2021	Itiquira/MT	17° 09' 36" S	54° 45' 21" W	Soja
	MT-6	Abr. 2021	Sorriso/MT	12° 28' 17" S	55° 40' 18" W	Algodão
	MS-1	Mai. 2021	Chapadão do Sul/MS	18° 44' 28" S	52° 33' 27" W	Algodão
2021/2022	MS-2	Nov. 2021	Costa Rica/MS	18° 12' 41" S	53° 12' 17" W	Nabo forrageiro
	BA-3	Nov. 2021	Correntina/BA	11° 45' 04" S	45° 46' 34" W	Soja
	GO-4	Nov. 2021	Luziânia/GO	16° 29' 01" S	47° 54' 47" W	Nabo forrageiro
	MT-8	Dez. 2021	Lucas do Rio Verde/MT	13° 41' 16" S	56° 01' 40" W	Algodão
	MS-3	Dez. 2021	Costa Rica/MS	18° 20' 19" S	52° 50' 20" W	Soja

¹ Código da população; ² cultivares de soja e algodão não-Bt. Essas populações também foram utilizadas para a estimativa da frequência alélica de resistência a soja Bt (item 3.2.4).

3.2.4. Estimativa da frequência e seleção de alelos da resistência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788

A estimativa da frequência de alelos que conferem resistência à proteína Cry1Ac expressa em soja Bt em *H. armigera* foi realizada mediante o uso do método *F₂ Screen* proposto por Andow e Alstad (1998). Essa metodologia aumenta a frequência de alelos da resistência na geração *F₂* por meio da endogamia. Esse método *F₂ Screen* consiste basicamente em três processos: 1) estabelecimento de isofamílias (parental) em laboratório; 2)

multiplicação por endogamia de cada isofamília (geração F₁); e 3) lagartas da geração F₂ provenientes do cruzamento da progênie F₁ são utilizadas nos bioensaios de estimativa da frequência dos alelos da resistência e seleção de linhagens resistentes. Para estimativa da frequência de alelos, foram utilizadas nove populações oriundas de cultivos de soja, algodão e nabo forrageiro das safras 2020/21 e 2021/22 (Tabela 3.2).

Lagartas coletadas no campo foram transportadas para o laboratório, e as populações identificadas como *H. armigera* foram mantidas em dieta artificial até o estágio de pupa. As pupas foram retiradas e lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e individualizadas com copo plástico transparente (50 mL) invertido sobre uma bandeja (30 × 40 cm) com papel filtro umedecido, permanecendo em câmara climatizada (25 ± 2°C e fotofase de 14 h) até a emergência dos adultos. Os adultos foram agrupados em casais (Geração parental) para formação de cada isofamília ou isolinha. Os casais foram mantidos em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm altura × 10 cm diâmetro) revestidas internamente com papel sulfite branco, colocadas sobre um recipiente plástico contendo papel toalha e um copo com algodão umedecido com solução de mel na concentração de 10% para alimentação dos adultos. As gaiolas foram cobertas na parte superior com um tecido tipo *tule* para oviposição e mantidas em sala de criação com temperatura controlada de 25 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 14 horas.

Os substratos (*tule* e papel sulfite) para postura e a solução de mel foram trocados a cada dois dias. As posturas correspondentes de cada isolinha contidas nos substratos de oviposição foram recolhidas e colocadas em copos plásticos transparentes de 500 mL. Esses copos foram identificados com a respectiva isofamília e mantidos em câmaras climatizadas (25 ± 1°C e fotofase de 14 h) até a eclosão das lagartas correspondentes à progênie F₁. As lagartas em primeiro ínstar de cada isofamília foram transferidas para copos plásticos de 75 mL contendo dieta artificial, e ao atingirem o terceiro ínstar, no mínimo 128 lagartas foram transferidas para bandejas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta artificial por onde permaneceram até o estágio de pupa. Todas as pupas obtidas de cada isofamília foram sanitizadas e transferidas para gaiolas cilíndricas (tubos PVC 30 cm de altura × 25 cm de diâmetro) e cobertas com tecido tipo *tule* para oviposição. Cada gaiola correspondeu a uma isofamília com aproximadamente 50 casais para obtenção da geração F₂. Todos os insetos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 14 horas.

Os bioensaios de seleção e estimativa da frequência de alelos da resistência à proteína Cry1Ac expressa em soja Bt foram realizados com a progênie F_2 . Para estimar da frequência de alelos a Cry1Ac, foram utilizadas lagartas recém eclodidas de cada isofamília. Os bioensaios foram conduzidos em bandejas plásticas de 16 células, em que cada célula foi preenchida com aproximadamente 3 mL de mistura gelificada ágar-água a 2,5%. Sobre essa mistura colocou-se papel filtro para impedir o contato direto com a folha, mas mantendo a umidade. Folhas de soja Bt do terço superior nos estádios vegetativos V4 até V6 foram colocadas sobre o papel filtro em cada célula. Com auxílio de um pincel 6 lagartas recém eclodidas foram colocadas sobre a folha em cada célula, totalizando 192 insetos testados (2 placas de 16 células). Para verificar a mortalidade natural, 96 lagartas (1 placa de 16 células) de primeiro ínstar foram testadas em folha não-Bt nas mesmas condições que a as folhas Bt. As placas foram fechadas com tampas plásticas e mantidas em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h). O número de lagartas sobreviventes foi registrado no sétimo dia após a infestação. Foram considerados vivos somente os indivíduos que realizaram a muda atingindo pelo menos o segundo ínstar larval (isofamília positiva). As isolinhas que apresentaram indivíduos sobreviventes tiveram os tecidos foliares testados para verificar a expressão da proteína Cry1Ac e as lagartas foram transferidas para dieta artificial para seleção de uma linhagem resistente em laboratório.

A frequência alélica da resistência e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) ao evento expressando proteína Cry1Ac foram estimados pela inferência Bayesiana utilizando a equação proposta por Andow e Alstad (1998, 1999) e intervalos de confiança de 95% (item 2.2.5). Os dados foram analisados usando a função *Binom.bayes* do pacote Binom (DORAI-RAJ, 2014) no programa R 4.2.2 (R CORE, 2022).

3.2.5. Seleção da linhagem resistente ao evento MON87701 × MON89788

Para seleção da linhagem resistente, as isofamílias da população MS-1 que apresentaram indivíduos vivos ao sétimo dia de avaliação nos bioensaios de F_2 *Screen* tiveram todas as lagartas da progênie F_2 testadas para resgatar o maior número de insetos possível. Essas lagartas consideradas vivas foram alimentadas com folhas de soja Bt nas gerações seguintes até que todos ou quase todos os indivíduos completassem o desenvolvimento larval e atingissem o estágio adulto. Os bioensaios de seleção foram conduzidos em placas de 16 células, cada célula contendo um pedaço de papel filtro sobre uma mistura gelificada ágar-água a 2,5% e folha de soja Bt. Sobre as folhas foram inoculadas quatro lagartas de primeiro

ínstar. As placas foram vedadas e armazenadas em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h). Ao sétimo dia após infestação, foi realizada a avaliação dos indivíduos sobreviventes e registrado o peso de uma amostra de 128 lagartas (2 placas de 16 células). Após esse período, as lagartas foram transferidas individualmente para uma nova célula contendo novas folhas de soja Bt e avaliadas diariamente. Como critério de seleção dos indivíduos que constituíram a geração seguinte, foi usado o número de dias em que 80% das lagartas testadas morressem. Esse tempo em que 80% das lagartas testadas morressem foi obtido mediante a contagem diária de todas as lagartas durante os cuidados diários com sua alimentação. Os 20% restantes que sobreviveram foram transferidos para dieta artificial para constituírem a geração seguinte. Esse processo foi realizado em todas as gerações da linhagem prolongando o tempo de alimentação das lagartas com folhas de soja Bt até que um maior número indivíduos completassem o desenvolvimento larval e atingissem o estágio adulto se alimentando exclusivamente de soja Bt.

3.2.6. Dominância funcional da resistência

A resposta de diferentes linhagens de *H. armigera* em discos de folha de soja MON87701 \times MON89788 foi avaliada para compreender as implicações da resistência à proteína Cry1Ac no manejo da resistência de insetos para proteínas Bt no cenário agrícola brasileiro. Foram utilizadas quatro linhagens: suscetível de laboratório (SUS), resistente a soja Bt (Bt-Res - significa resistência a Cry1Ac) e heterozigotos H1 ($\text{♀ SUS} \times \text{♂ Bt-Res}$) e H2 ($\text{♀ Bt-Res} \times \text{♂ SUS}$) obtidos a partir de cruzamentos recíprocos realizados no sexto ciclo de seleção da linhagem resistente. Os bioensaios foram realizados em placas de 16 células contendo uma mistura gelificada ágar-água a 2,5% e sobre essa mistura papel filtro com um disco de folha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×2), sendo testadas 64 lagartas (4 placas de 16 células) em primeiro ínstar de cada linhagem em folhas de soja Bt e não-Bt. Em cada célula da placa foi inoculada sobre o disco de folha uma larva (< 24 h idade). As placas foram vedadas e armazenadas em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h). A avaliação da sobrevivência foi realizada sete dias após a infestação. Foram considerados vivos apenas os insetos que realizaram a muda para o estágio de segundo ínstar. As médias de sobrevivência e peso das diferentes linhagens alimentadas com soja Bt e não-Bt foram analisadas quanto a homogeneidade e

homoscedasticidade. Os valores médios de sobrevivência e peso foram comparados pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3. Resultados

3.3.1. Monitoramento da suscetibilidade de populações de campo de *H. armigera* ao evento de soja MON87701 × MON89788

A mortalidade de lagartas de primeiro ínstar de *H. armigera* alimentadas com soja MON87701 × MON89788 foi de 100% para a linhagem suscetível (SUS) e para todas as populações de campo ao longo das duas safras. Para todas as populações avaliadas em folhas de soja Bt ao sétimo dia após infestação, nenhuma lagarta sobreviveu ou realizou a troca de ínstar. As mesmas populações quando alimentadas com soja não-Bt apresentaram mortalidade máxima de 14% dos indivíduos testados (Figura 3.1). As médias de mortalidade das diferentes populações avaliadas em soja Bt e não-Bt foram comparadas, e verificou-se que houve diferenças na mortalidade das lagartas alimentadas com folhas de soja Bt de não-Bt ($t = 137,71$; $gl = 351$; $p < 0,001$) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Mortalidade (%) de lagartas de primeiro ínstar de *H. armigera* quando alimentadas com folhas de soja MON87701 × MON89788 e soja não-Bt após sete dias de infestação.

Safr	Pop ¹	Soja não-Bt		Soja Bt	
		Mortalidade (\pm EPM) ²	IC 95% ³	Mortalidade (\pm EPM) ²	IC 95% ³
2020/21	SUS	1,6 (0,36)	0,01 - 0,04	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MT-4	7,3 (0,86)	0,04 - 0,12	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MT-5	9,9 (1,05)	0,06 - 0,15	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MT-6	8,3 (0,92)	0,05 - 0,13	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MS-1	7,8 (0,86)	0,05 - 0,12	100 (0,0)	0,98 - 1,00
2021/22	SUS	0,5 (0,21)	0,001 - 0,03	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MS-2	11,5 (1,08)	0,08 - 0,17	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	BA-3	14,1 (0,97)	0,80 - 0,90	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	GO-4	8,9 (1,18)	0,87 - 0,95	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MT-8	7,3 (1,06)	0,88 - 0,96	100 (0,0)	0,98 - 1,00
	MS-3	4,7 (0,55)	0,02 - 0,85	100 (0,0)	0,98 - 1,00

¹ Código da população; ² Porcentagem média de mortalidade e erro padrão da média; ³ Intervalo de confiança a 95%.

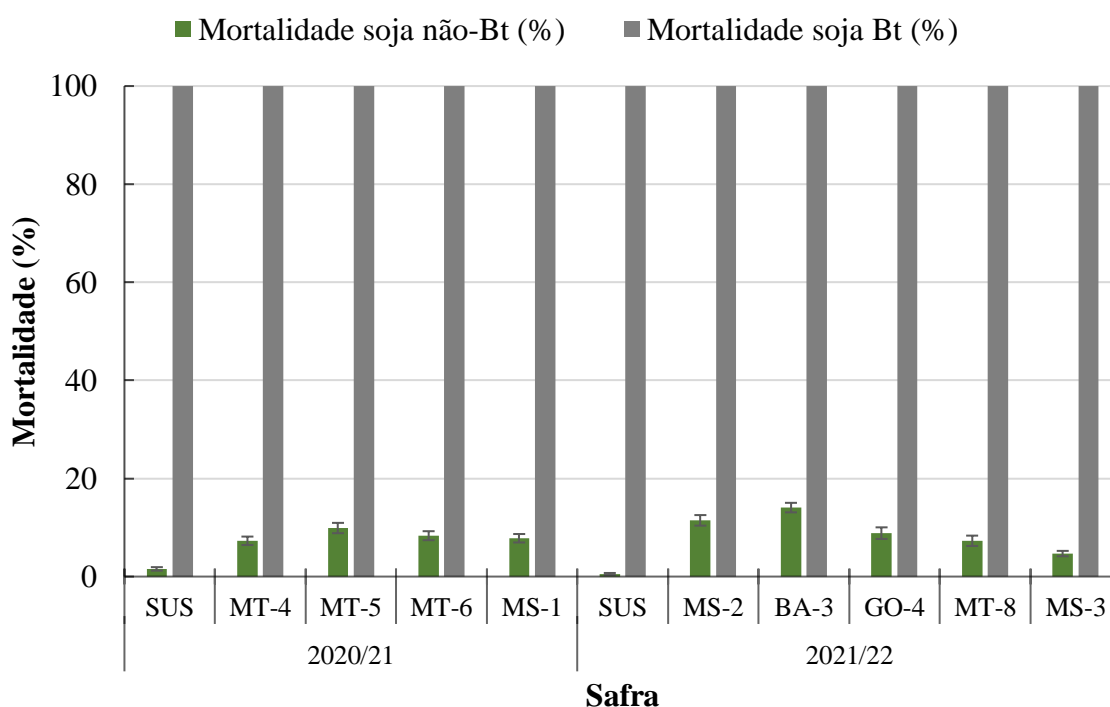


Figura 3.1 Mortalidade (%) de lagartas de *H. armigera* após sete dias sendo alimentadas com folhas de soja Bt e não-Bt por safra.

3.3.2. Estimativa da frequência de alelos da resistência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac

Foram utilizadas nove populações em condições de campo coletadas nas safras 2020/21 e 2021/22 para estimativa da frequência de alelos da resistência à proteína Cry1Ac. Estabeleceu-se cerca de 631 isofamílias a partir de lagartas coletadas em campos de culturas não-Bt, contudo, devido à baixa fecundidade e dificuldade de acasalamentos de *H. armigera* em laboratório, apenas 241 isolinhas (38,2% de aproveitamento) foram avaliadas quanto à presença de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788. Ao todo, 41.003 lagartas em primeiro ínstar foram testadas (Tabela 3.4). Das 41.003 lagartas alimentadas com folhas de soja Bt, cerca de 155 lagartas sobreviveram na segunda avaliação ao sétimo dia, sendo considerados vivos apenas os indivíduos que atingiram pelo menos o 2º ínstar. Das 241 isofamílias testadas, 12 tiveram lagartas sobreviventes, sendo, portanto, consideradas isolinhas positivas. A frequência de alelos da resistência a Cry1Ac estimada para as safras 2020/21 e 2021/22 foi de 0,0134 (IC 95% 0,0072 - 0,0215) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Frequência do alelo da resistência à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788 em populações de *H. armigera* nas safras 2020/2021 e 2021/2022.

Safr	Pop. ¹	Número de insetos avaliados			Sobreviventes		Iso. Positivas	Frequência estimada	IC (95%) ⁵
		Iso. Total ²	Iso. Testadas ³	Lagartas	Lagartas ⁴	Adultos			
2020/21	MT-4	132	73	13.070	16	0	2	0,0100	(0,0021 - 0,0240)
	MT-5	51	16	2.941	65	33	2	0,0418	(0,0087 - 0,0983)
	MT-6	28	13	2.351	0	0	0	0,0168	(0,0004 - 0,0609)
	MS-1	76	29	5.039	54	32	4	0,0404	(0,0134 - 0,0813)
	Subtotal	287	131	23.400	135	65	8	0,0169	(0,0078 - 0,0295)
2021/22	MS-2	35	5	568	0	0	0	0,0360	(0,0010 - 0,1283)
	BA-3	32	5	624	0	0	0	0,0360	(0,0010 - 0,1283)
	GO-4	108	41	6.066	8	0	1	0,0059	(0,0014 - 0,0322)
	MT-8	91	33	5.432	4	0	1	0,0144	(0,0018 - 0,0395)
	MS-3	78	26	4.912	8	0	2	0,0269	(0,0056 - 0,0637)
Subtotal	344	110	17.602	20	0	4	0,0112	(0,0037 - 0,0228)	
Total		631	241	41.003	155	65	12	0,0134	(0,0072 - 0,0215)

¹ Código da população; ² Número de isofamílias ou isolinhas montadas a partir de lagartas de campo; ³ Quantidade de isolinhas testadas com folha de soja MON87701 × MON89788; ⁴ Qualquer sobrevivente na isofamília que tenha atingido pelo menos o segundo ínstar; ⁵ Intervalo de confiança (IC 95%) da estimativa de frequência do alelo.

3.3.3. Seleção da linhagem resistente de *H. armigera* ao evento de soja MON87701 × MON89788

Por meio da técnica de *F₂ Screen*, foi selecionada uma linhagem resistente à soja MON87701 × MON89788 após oito ciclos de seleção a partir da população MS-1 coletada em Chapadão do Sul. Para essa linhagem resistente, denominada Bt-Res, foram testadas 197 lagartas de primeiro ínstar e 36 sobreviveram na avaliação ao sétimo dia, obtendo-se 30 adultos (Tabela 3.4). Nas gerações seguintes, essa linhagem passou por pressão de seleção por prolongamento do tempo de exposição a cada ciclo de seleção até que todos ou quase todos os indivíduos alimentados com folhas de soja Bt completassem o desenvolvimento larval e atingissem o estágio adulto gerando descendentes férteis. Em cada geração da linhagem todas as lagartas foram alimentadas com folhas de soja Bt (Tabela 3.5).

Os primeiros indivíduos capazes de completar o desenvolvimento larval e atingir a fase adulta, se alimentando unicamente de soja Bt, se deram no sétimo ciclo de seleção. Entretanto, nos ciclos anteriores observamos que, mesmo não atingindo o estágio adulto as lagartas conseguiam se alimentar por vários dias, com a grande maioria atingindo avançados estágios larvais ou até mesmo pré-pupa. Apesar de não completar o desenvolvimento e gerar descendentes, essas lagartas podem causar prejuízos econômicos na soja Bt, demandando a pulverização de inseticidas para o seu controle.

Tabela 3.5 Seleção de linhagem de *H. armigera* resistente a proteína Cry1Ac expressa no evento de soja MON87701 × MON89788.

Linhagem (geração)	n ¹	Parâmetros biológicos	
		Sobrevivência (%) ²	Peso médio (mg) ³
Bt-R ₁ (F ₂)	1.127	7,7	0
Bt-R ₂	6.976	5,7	1,37
Bt-R ₃	7.040	5,7	2,65
Bt-R ₄	11.616	5,6	6,72
Bt-R ₅	23.232	3,2	8,89
Bt-R ₆	3.712	41,9	10,9
Bt-R ₇ *	4.486	40,1	13,71
Bt-R ₈	8.832	54,9	14,64

¹ Número de lagartas testadas com soja MON87701 × MON89788 por geração; ² Porcentagem de lagartas sobreviventes (considerados apenas os indivíduos que não tiveram inibição de mudança para além do primeiro ínstar) ao sétimo dia sendo alimentados com folhas de soja Bt; ³ Peso médio (mg) de uma amostra dos indivíduos ao sétimo dia. * ciclo de seleção em que se obteve os primeiros adultos.

3.3.4. Dominância funcional da resistência

Foi observado diferença significativa entre a sobrevivência das linhagens SUS, Bt-Res e heterozigotos (H1 e H2) alimentadas com soja Bt e não-Bt ($F = 9,68$; $gl = 3$; $p < 0,001$). As linhagens SUS, Bt-Res e heterozigotos (H1 e H2) alimentadas com folhas de soja não-Bt não apresentaram diferenças significativas na sobrevivência. Porém, quando os indivíduos dessas linhagens foram testados em folhas de soja Bt foi observado uma diferença significativa entre as sobrevivências (Figura 3.2). A linhagem SUS apresentou 100% de mortalidade, enquanto a linhagem Bt-Res teve 40% de sobrevivência e os heterozigotos H1 e H2 14% e 13%, respectivamente. Apesar dos heterozigotos apresentarem um comportamento fenotipicamente próximo a linhagem Bt-Res, estatisticamente foram consideradas semelhantes à linhagem suscetível (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Média de sobrevivência (%) e peso médio (mg) de diferentes linhagens de *H. armigera* em discos de folhas de soja Bt e não-Bt ao sétimo dia após infestação.

Linhagem	Folha	Sobrevivência (\pm EPM) ¹	Peso (\pm EPM) ²
SUS	Bt	0,00 (0,0) b	0,00 (0,0) b
	não-Bt	95,31 (0,75) A	18,27 (0,52) A
Bt-Res	Bt	39,06 (1,33) a	9,38 (0,43) a
	não-Bt	96,88 (0,45) A	16,27 (0,42) AB
H1	Bt	14,06 (0,86) b	1,37 (0,23) b
	não-Bt	96,88 (0,45) A	12,79 (0,24) B
H2	Bt	13,28 (1,11) b	1,23 (0,25) b
	não-Bt	100,00 (0,00) A	15,18 (0,23) AB

¹ Porcentagem média de sobrevivência (%) e erro padrão da média (EPM); ² Peso médio (mg) e erro padrão da média (EPM). Letras iguais e maiúsculas na coluna indicam que não houve diferenças. Letras iguais e minúsculas na coluna indicam que não há diferenças (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

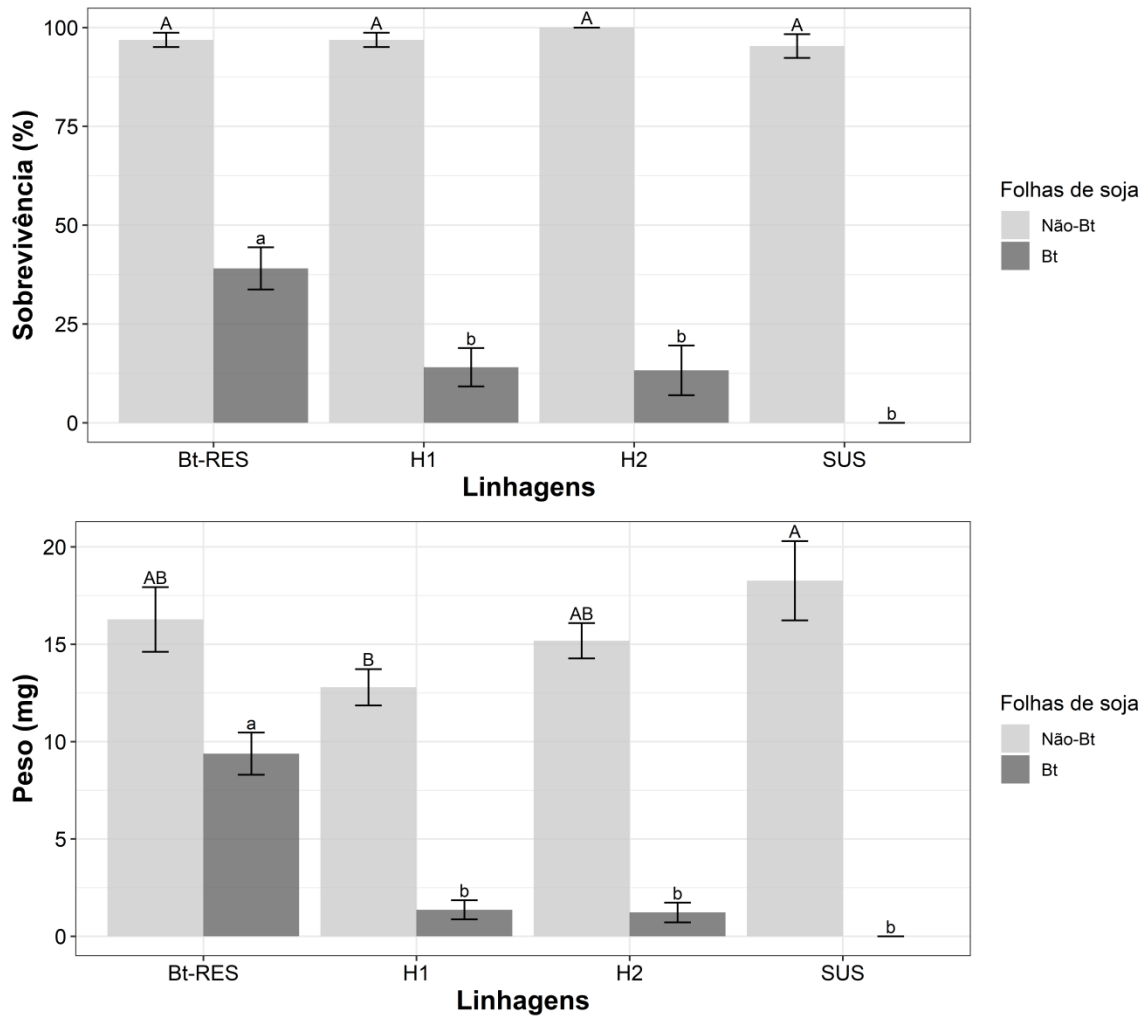


Figura 3.2 Sobrevivência (%) e peso (mg) das lagartas das linhagens de *H. armigera* testadas em discos de folha de soja MON87701 × MON89788 e não-Bt. Letras maiúsculas iguais sobre as barras indicam que não existem diferenças quanto a sobrevivência das linhagens alimentadas com folhas de soja não-Bt. Letras minúsculas iguais sobre as barras indicam que não existem diferenças quanto a sobrevivência das linhagens alimentadas com folhas de soja Bt. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

O peso médio dos indivíduos das linhagens testadas nos tratamentos com folha do evento de soja Bt e soja não-Bt, apresentaram diferença significativa ($F = 8,82$; $gl = 3$; $p < 0,001$). A linhagem Bt-Res apresentou a maior média de peso larval de 9,38 mg quando alimentada com folhas de soja Bt. Por outro lado, os heterozigotos H1 e H2 apresentaram média de peso de 1,37 e 1,23 mg, respectivamente, não diferindo da média de peso linhagem suscetível que foi de 0 mg. Com base no peso médio dos indivíduos alimentados com folhas de soja Bt, os dados sugerem a existência de um custo adaptativo associado a resistência à proteína Cry1Ac. A linhagem resistente Bt-Res quando alimentada em folhas de soja Bt teve redução de quase duas vezes ($\approx 1,7$) no peso larval quando comparado com os indivíduos

testados na soja não-Bt (Tabela 3.6). Já os indivíduos heterozigotos H1 e H2, embora tenham apresentado sobrevivência média de 14% e 13%, respectivamente, o peso médio das lagartas ao se alimentarem de soja Bt, foi 9,33 (H1) e 12,3 (H2) vezes inferior quando comparado com o peso das lagartas em folhas de soja não-Bt. As médias de peso das linhagens testadas em folhas de soja não-Bt não apresentaram diferença significativa, desde modo, não houve uma redução no desenvolvimento larval das linhagens (Tabela 3.6 e Figura 3.2).

3.4. Discussão

As populações de *H. armigera* monitoradas nas safras 2020/21 e 2021/22 apresentaram alta suscetibilidade quando testadas em folhas de plantas de soja Bt que expressam a proteína Cry1Ac. O monitoramento fenotípico da suscetibilidade realizado com folhas de soja Bt resultou em mortalidade de 100% das lagartas avaliadas para todas as populações, nenhuma lagarta sobreviveu ou realizou a muda para além do primeiro ínstar, em ambas as safras. O tratamento controle constituído de folhas de soja não-Bt, realizado para as mesmas populações e nas mesmas condições que o tratamento com folhas de soja Bt, apresentou mortalidade máxima de 14% (Tabela 3.3). Programas de monitoramento fenotípico que consistem na coleta de populações em campo, posteriormente, no estabelecimento da população em laboratório, e por fim, na exposição dos descendentes em concentrações/doses diagnósticas previamente estabelecidas ou diretamente em folhas da planta que expressa a proteína inseticida (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990; ROUSH; MILLER, 1986), não são sensíveis para detectar pequenas mudanças na frequência de alelos da resistência, principalmente no início do processo de evolução da resistência, em que a frequência é baixa (em geral inferior a 10^{-3}) (ANDOW; ALSTAD, 1998). Além disso, esse método não é capaz de identificar alelos que conferem resistência em casos que o indivíduo heterozigoto apresente fenótipo suscetível (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990; SIEGFRIED et al., 2007).

Diante disso, a metodologia de *F₂ Screen* tem sido mais empregada nos casos em que a frequência de alelos da resistência é baixa em populações de campo (ANDOW; ALSTAD, 1998; GOULD et al., 1997; HUANG, 2006). Utilizamos o método de *F₂ Screen* para estimar a frequência de alelos da resistência em populações de *H. armigera* coletadas em campo nas safras 2020/21 e 2021/22 após dez anos de intensa utilização da soja Bt em todo Brasil. 241 isofamílias foram testadas quanto à presença de alelos da resistência (aproveitamento de 38,2 %). Dessas, 12 tiveram indivíduos sobreviventes resultando em uma frequência de alelos

estimada de 0,0134 (IC 95% = 0,0072 – 0,0215) (Tabela 3.4). Esses dados mostram um aumento de $\approx 12,2$ vezes na frequência de alelos da resistência quando comparado com estudos realizados nas safras 2013/14 e 2014/15, em que foi encontrada baixa frequência alélica da resistência (0,0011 IC 95% = 0 – 0,0043) (DOURADO et al., 2016). Para uma condição de resistência autossômica monogênica e recessiva, a frequência estimada nas safras 2013/14 e 2014/15 resultaria em 1,21 indivíduos homocigotos resistentes para cada 1 milhão. Já a frequência estimada entre as safras 2020/21 e 2021/22 seriam encontrados cerca de 180 indivíduos homocigotos resistentes para cada 1 milhão. Esses resultados fornecerem um alerta precoce da resistência, evidenciando uma clara evolução da resistência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac, mostrando que a frequência dos alelos da resistência aumentou em resposta à pressão de seleção da soja Bt.

Estimativas de frequência alélica em *H. armigera* à proteína Cry1Ac também foram amplamente empregadas na China. Estudos realizados com populações de campo coletadas entre 2002 e 2008, relevaram uma baixa frequência inicial de alelos da resistência (freq. estimada = 0 a 0,00233 variação em função do ano de coleta da população) em *H. armigera* a proteína Cry1Ac expressa no algodão Bt (GAO; WU; GOULD, 2009; LI et al., 2007). Assim como relatado neste trabalho, estimativas de frequência alélica da resistência na China revelaram um aumento de 12 vezes na frequência de alelos da resistência, quando comparado com trabalhos realizados anteriormente (0,0058 para 0,075) (HE et al., 2001; LIU et al., 2009). Na Austrália, estimativas de frequência alélica de *H. armigera* a proteína Cry1Ac expressa em algodão Bt, têm sido amplamente utilizadas desde 2002. Estudos realizados entre 2002 e 2007 revelaram uma baixa frequência alélica da resistência (freq. estimada = 0,0003 a 0,0005), e quase nenhuma variação na frequência ao longo dos anos (DOWNES; PARKER; MAHON, 2009; MAHON et al., 2007). Esses resultados obtidos na Austrália, evidenciam que táticas de MRI quando empregadas com antecedência, são capazes de retardar e prevenir a evolução da resistência de pragas às plantas que expressam proteínas Bt (DOWNES; MAHON, 2012). Na Índia, um relato precoce de resistência a Cry1Ac em *H. armigera* foi reportado em 2021 (SINGH; KUKANUR; G.B, 2021). Altas frequências de alelos da resistência foram estimadas para populações de campo coletadas entre 2016 (freq. = 0,050) e 2017 (freq. = 0,056) (SINGH; KUKANUR; G.B, 2021). Kukanur et al. (2018), assim como relatado neste trabalho e na China, também relataram um aumento na frequência alélica de resistência em até 65 vezes maior do que as frequências iniciais estimadas em 2004 por Kranthi (2004) na Índia.

Uma das vantagens do método *F₂ Screen*, é a capacidade de detecção de pequenas alterações na suscetibilidade que não são captadas pelo método convencional de monitoramento realizado testando a progênie da população de campo diretamente nas folhas Bt. O monitoramento fenotípico realizado com a população MS-1 resultou em 100% de mortalidade para todas as lagartas testadas por esse método (Tabela 3.3). No entanto, os bioensaios *F₂ Screen* revelaram indivíduos com capacidade de sobrevivência e desenvolvimento para além do primeiro ínstar em algumas isofamílias da população MS-1 (Tabela 3.4). Além disso, outra vantagem é a possibilidade de seleção de linhagens resistentes (ANDOW; ALSTAD, 1998; BIRD; DRYNAN; WALKER, 2017). Por meio dos indivíduos sobreviventes nos bioensaios realizados em *F₂*, selecionamos uma linhagem resistente a soja Bt. A seleção dessa linhagem foi realizada mediante o prolongamento do tempo de exposição das lagartas em folhas Bt, e resgate dos sobreviventes quando 80% dos indivíduos testados falhavam em completar o desenvolvimento larval se alimentando exclusivamente de soja Bt. Quase 70 mil lagartas em 1º ínstar foram testadas em folhas de soja Bt para selecionar somente os indivíduos com capacidade de completar o desenvolvimento larval e atingir o estágio de adulto. Nosso estudo fornece o primeiro relato de aviso prévio de evolução da resistência de *H. armigera* a soja Bt, após 10 anos desde a introdução comercial em 2013. Esse tempo foi muito próximo ao verificado (média de 8,6 anos) em um estudo compilado dos 25 primeiros anos da implantação de cultivos Bt no mundo (TABASHNIK; FABRICK; CARRIÈRE, 2023). Embora tenhamos relatado um aumento de 12 vezes na frequência de alelos da resistência e selecionado uma linhagem resistente em condições de laboratório, os ataques em campos de soja Bt podem ser explicados devido a presença de lagartas de *H. zea* (Tabela 3.1), ou indivíduos híbridos possivelmente mais adaptados resultantes do cruzamento entre as duas espécies. Também não podemos ignorar o aumento na frequência de alelos, pois essa é uma clara evidencia que está ocorrendo evolução da resistência a proteína Cry1Ac em *H. armigera* no Brasil. Por enquanto, não temos verificado perda de eficácia econômica em campo causada por lagartas de *H. armigera*.

O sistema agrícola brasileiro é caracterizado pelo cultivo intensificado com sucessão de diferentes culturas que expressam a mesma proteína inseticida. Aliado a isso, as características bioecológicas de *H. armigera*, como polifagia e alta capacidade de dispersão (FITT, 1989), favorece a permanência e exploração dessa praga em diferentes plantas Bt cultivadas simultaneamente em áreas adjacentes. Esses fatores promovem uma maior exposição da praga em cultivos Bt e contribuem no aumento da pressão de seleção para a resistência às proteínas Bt. Em condições de campo, a dominância da resistência pode sofrer

algumas alterações dependendo da concentração do inseticida ou proteína Bt em que a praga é exposta, além dos fatores ambientais (BOURGUET; PROUT; RAYMOND, 1996). No Brasil, o cultivo de diferentes culturas que expressam a mesma proteína Bt é comum, como é o caso da soja, algodão e cana-de-açúcar que expressam a proteína Cry1Ac em diferentes concentrações. Em função disso, as populações de *H. armigera* são expostas a diferentes concentrações da proteína Bt, uma vez que a soja expressa a proteína em “alta dose” (DOURADO et al., 2016), e o algodão expressa em “baixa dose”. Além disso, a expressão da proteína Bt varia ao longo do crescimento e desenvolvimento da cultura (DONG; LI, 2007; GREENPLATE et al., 2003; HOLT et al., 2002; MACRAE et al., 2005), influenciando na dominância da resistência. Portanto, estudos de caracterização genética sobre a resistência de *H. armigera* à soja Bt, ajudam a compreender o grau de dominância da resistência. Foram realizados cruzamentos recíprocos entre as linhagens resistente (Bt-Res) e suscetível (SUS) para obtenção dos heterozigotos (H1 e H2). A sobrevivência e peso dessas linhagens foram avaliadas em discos de folha não-Bt e Bt. Ao sétimo dia a linhagem resistente teve sobrevivência de $\approx 40\%$, enquanto os heterozigotos apresentaram sobrevivência de 14% (H1) e 13% (H2) (Tabela 3.6). Apesar de terem sobrevivido, as médias de sobrevivência não diferiram da linhagem suscetível, além disso, a grande redução (até 12 vezes) no peso médio dos indivíduos sobreviventes sugerem que exista um custo adaptativo da resistência (Figura 3.2). Esses resultados revelaram a capacidade de sobrevivência dos heterozigotos em folhas de soja Bt, entretanto esses indivíduos possivelmente não completariam o ciclo na soja Bt, sugerindo que a resistência de *H. armigera* à proteína Cry1Ac seja funcionalmente recessiva. Esses resultados de dominância funcional podem refletir a realidade no campo, provavelmente, esses insetos poderiam causar algum dano, mas devido aos efeitos no desenvolvimento não conseguiriam completar o desenvolvimento larval. Diante disso, programas de MRI precisam ser implementados o mais breve possível para preservar o uso sustentável dessas medidas de controle no manejo integrado de pragas.

3.5. Conclusões

- As populações de *H. armigera* monitoradas nas safras 2020/21 e 2021/22 apresentaram alta suscetibilidade quando testadas em folhas de plantas de soja Bt que expressam a proteína Cry1Ac;

- Houve um aumento de 12 vezes na frequência de alelos da resistência de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 após uma década de uso dessa biotecnologia em campo;
- Mediante a técnica de *F₂ Screen* foi possível selecionar uma linhagem de *H. armigera* resistente ao evento de soja MON87701 × MON89788;
- A dominância da resistência de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 é funcionalmente recessiva.

Referências

- AKHURST, R. J. et al. Resistance to the Cry1Ac δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1290–1299, 1 ago. 2003.
- ALVI, A. H. K. et al. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47309, 15 out. 2012.
- ANDERSON, C. J. et al. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 19, p. 5034–5039, 8 maio 2018.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F₂ Screen for Rare Resistance Alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1998.
- ANDOW, D.; ALSTAD, D. N. Letter to the Editor. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 4, p. 755–758, 1 ago. 1999.
- BEHERE, G. T. et al. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 6, p. 599–603, dez. 2008.
- BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. Fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 4, p. 1311–1319, 1 ago. 2005.
- BIRD, L. J.; DRYNAN, L. J.; WALKER, P. W. The Use of F₂ Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate, Chlorantraniliprole, and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 2, p. 651–659, 1 abr. 2017.
- BOURGUET, D.; PROUT, M.; RAYMOND, M. Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 407–416, 1 maio 1996.

- BUENO, A. DE F. **Ocorrência de lagarta *Helicoverpa* sp. em soja-Bt na safra 2022/23 e principais orientações de manejo.** Disponível em: <<https://blogs.canalrural.com.br/embrapasoja/2022/12/16/ocorrencia-de-lagarta-helicoverpa-sp-em-soja-bt-na-safra-2022-23-e-principais-orientacoes-de-manejo/>>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- CAPRIO, M. A.; SUMERFORD, D. V.; SIMS, S. R. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. [s.l.] Springer, 2000. p. 805.
- CORDEIRO, E. M. G. et al. Hybridization and introgression between *Helicoverpa armigera* and *H. zea*: An adaptational bridge. **BMC Evolutionary Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 25 maio 2020.
- CTNBIO. **Parecer Técnico 2542/2010: Liberação Comercial de soja resistente a insetos e tolerante a herbicida.** Disponível em: <<http://ctnbio.mctic.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acesso em: 5 jan. 2023.
- CZEPAK, C. et al. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110–113, mar. 2013.
- DANDAN, Z. et al. Field monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Cry1Ac insecticidal protein resistance in China (2005–2017). **Pest Management Science**, v. 75, n. 3, p. 753–759, 1 mar. 2019.
- DONG, H. Z.; LI, W. J. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 1, p. 21–29, 1 fev. 2007.
- DORAI-RAJ, S. Package ‘binom’ Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. 2014.
- DOURADO, P. M. et al. High susceptibility to Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161388, 17 ago. 2016.
- DOWNES, S.; MAHON, R. **Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia** *GM crops & food* Taylor & Francis, , 2012. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmcr.20194>>. Acesso em: 22 jan. 2023

- DOWNES, S.; PARKER, T. L.; MAHON, R. Frequency of alleles conferring resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAc and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from 2002 to 2006. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 2, p. 733–742, 1 abr. 2009.
- EPA. **Final report of the subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-pesticides and resistance management, February 1998.** Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/1998/0298_mtg.htm>.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; ROUSH, R. T. Resistance Detection and Documentation: The Relative Roles of Pesticidal and Biochemical Assays. In: **Pesticide Resistance in Arthropods**. [s.l.] Springer US, 1990. p. 4–38.
- FISCHHOFF, D. A. Insect-resistant crop plants. In: PERSLEY, G. J. (Ed.). . **Biotechnology and Integrated Pest Management**. First ed. [s.l.] CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 214–227.
- FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, n. 66, p. 17–52, 1989.
- GAO, Y.; WU, K.; GOULD, F. Frequency of bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006-2008 in Northern China. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 4, p. 1336–1342, 1 ago. 2009.
- GOULD, F. Potential and Problems with High-dose Strategies for Pesticidal Engineered Crops. **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 451–461, 1994.
- GOULD, F. et al. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 3519–3523, 15 abr. 1997.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 701–726, 1998.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976.
- GREENPLATE, J. T. et al. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: Relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, n. 6, p. 340–347, 1 jul. 2003.

- GUAN, F. et al. Population Genomics of Nonrecessive Resistance to Bt Toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* From Northern China. **Journal of Economic Entomology**, 4 jan. 2023.
- GUNNING, R. V. et al. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2558–2563, maio 2005.
- HE, D. J. et al. Using F2 genetic method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Cotton Sci**, v. 13, n. 2, p. 105–108, 2001.
- HOLT, H. E. et al. Determination of the Cry Protein Content of Bt Transgenic Cotton - A Technical Manual for Laboratory Use. n. 92, p. 13, 2002.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Large-scale assessment of lepidopteran soybean pests and efficacy of Cry1Ac soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 5 ago. 2021a.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 29 out. 2021b.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Regional pest suppression associated with adoption of Cry1Ac soybean benefits pest management in tropical agriculture. **Pest Management Science**, v. 78, n. 10, p. 4166–4172, 1 out. 2022.
- HUANG, F. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. **Insect Science**, v. 13, n. 2, p. 73–84, 1 abr. 2006.
- HUANG, F. et al. F2 screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1269–1276, 1 out. 2011.
- ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. **ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY.**, n. 54, 2018.
- ISAAA. Global status of commercialized of biotech/GM crops in 2019: biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier. **ISAAA Brief No. 55 Ithaca, NY.**, n. 55, p. 3–13, 2019.
- KASTEN JUNIOR, 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**, v. 53, n. 1, p. 68–78, 7 fev. 1978.

- KRANTHI, K. R. et al. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 119–124, 1 fev. 2006.
- KRANTHI, K. R.; KRANTHI, N. R. Modelling adaptability of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Bt-cotton in India. **Current Science**, v. 87, n. 8, p. 1096–1107, 22 jan. 2004.
- KUKANUR, V. S. et al. Cry1Ac resistance allele frequency in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) collected in Telangana and Andhra Pradesh, India. **Crop Protection**, v. 107, p. 34–40, 1 maio 2018.
- LI, G. P. et al. Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, was confirmed in Bt cotton farming area of China. **Ecological Entomology**, v. 32, n. 4, p. 366–375, 1 ago. 2007.
- LIU, F. et al. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 155–161, 1 fev. 2009.
- MACRAE, T. C. et al. Laboratory and Field Evaluations of Transgenic Soybean Exhibiting High-Dose Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1A Gene for Control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577–587, 1 abr. 2005.
- MAHON, R. J. et al. Frequency of Alleles Conferring Resistance to the Bt Toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 6, p. 1844–1853, 1 dez. 2007.
- NETTO, J. C.; ROLIM, G. G.; SCOZ, L. *Helicoverpa armigera*: ameaça a lavouras Bt de algodoeiro. **Circular Técnica: IMAmt - Instituto Mato-Grossense do Algodão**, v. N° 35, p. 8, 2018.
- R CORE, T. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.
- ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 2, p. 293–298, 1 abr. 1986.
- SIEGFRIED, B. D. et al. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: What we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, v. 53, n. 4, p. 208–214, 2007.

- SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. In: **Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 229–242.
- SINGH, T. V. K.; KUKANUR, V. S.; G.B, S. Frequency of resistance alleles to Cry1Ac toxin from cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) collected from Bt-cotton growing areas of Telangana state of India. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 183, p. 107559, 1 jul. 2021.
- SPECHT, A. et al. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 689–692, 2013.
- TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Bt crops: Evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199–202, 7 fev. 2008.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 2017 **35:10**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 11 out. 2017.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y.; GASSMANN, A. Global Patterns of Resistance to Bt Crops Highlighting Pink Bollworm in the United States, China, and India. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 6, p. 2513–2523, 9 dez. 2019.
- TABASHNIK, B. E.; FABRICK, J. A.; CARRIÈRE, Y. Global Patterns of Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: The First 25 Years. **Journal of Economic Entomology**, 4 jan. 2023.
- TABASHNIK, B. E.; GOULD, F.; CARRIÈRE, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 4, p. 904–912, 1 jul. 2004.
- TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 6, p. 2011–2025, 1 dez. 2009.
- TABASHNIK, B. E.; WU, K.; WU, Y. Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 301–306, 1 jul. 2012.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o aumento de soluções biológicas no manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil, as duas principais táticas de controle tem sido: I) Controle químico e II) Culturas Bt. Como consequência da alta pressão de seleção exercida por essas táticas de controle ao longo dos anos, sem a implementação de estratégias de MRI, diversos casos de resistência de *H. armigera* a inseticidas já foram reportados no Brasil. Em relação a culturas Bt, relatos recentes de resistência à soja Bt em *Rachiplusia nu* (Guenée) e *Crocidosema aporema* (Walsingham) foram registrados na safra 2020/21, além de surtos de ataques de lagartas de *Helicoverpa* spp. em áreas de soja MON87701 × MON89788 nas últimas safras. Desta forma, para gerar informações que possam ser úteis em programas de MRI a metaflumizone, e buscar entender se os danos causados por lagartas de *Helicoverpa* são resultado da evolução da resistência em *H. armigera*, foram realizados estudos de caracterização das curvas de dose-resposta a metaflumizone, monitoramento fenotípico ao inseticida metaflumizone e a proteína Cry1Ac, e estimativa da frequência de alelos da resistência a metaflumizone e a soja MON87701 × MON89788. Além disso, foi selecionado uma linhagem de *H. armigera* resistente à soja MON87701 × MON89788 para estudos de dominância funcional visando entender os impactos da resistência de *H. armigera* à soja Bt no sistema agrícola brasileiro.

A caracterização das curvas de dose-resposta a metaflumizone revelou baixa variação natural entre as populações de *H. armigera* testadas (< 2 vezes) na safra 2019/20. O monitoramento fenotípico e a estimativa da frequência de alelos da resistência realizados nas safras 2020/21 e 2021/22 demonstraram uma pequena diminuição na suscetibilidade de *H. armigera* a metaflumizone. Em relação à proteína Cry1Ac, os estudos de monitoramento fenotípico não foram sensíveis para captar as variações na suscetibilidade da praga ao longo desses 10 anos de cultivos amplamente adotados. Por outro lado, mediante o método *F₂ Screen*, foi possível estimar a frequência de alelos da resistência e verificar um aumento > 12 vezes na frequência alélica quando comparado aos resultados obtidos com as populações coletadas nas safras de 2013/14 e 2014/15. Além disso, foi possível a seleção de uma linhagem resistente de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 com indivíduos que completam o crescimento e desenvolvimento larval se alimentando exclusivamente de folhas de soja Bt com emergência de adultos gerando descendentes férteis.

Os resultados obtidos nesse trabalho comprovam a resposta à pressão de seleção com o aumento da adoção de plantios de soja Bt no Brasil e, consequentemente, o aumento da

frequência de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788. Com a seleção de uma linhagem de *H. armigera* resistente à soja MON87701 × MON89788 em condições de laboratório, foi possível confirmar que a dominância funcional da resistência é recessiva. Portanto, há possibilidade de retardar a evolução da resistência, caso as áreas de refúgio sejam efetivamente implementadas como estratégia de manejo da resistência de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788.