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

| Resistência de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| bloqueadores de canais de sódio |

Ingrid Schimidt Kaiser

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

Ingrid Schimidt Kaiser Engenheira Agrônoma

Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas bloqueadores de canais de sódio

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

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

Kaiser, Ingrid Schimidt

Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas bloqueadores de canais de sódio / Ingrid Schimidt Kaiser. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

88 p.

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

1. Lagarta-do-cartucho do milho 2. Manejo da resistência de insetos 3. Indoxacarb 4. Metaflumizone I. Título

A Deus pela vida, Agradeço

Aos meu pais ADENAUER e EMÍLIA, e
meu irmão ATOS HENRIQUE e
meu namorado JOSÉ HENRIQUE
pelo amor, incentivo, apoio e por torceram pelo meu sucesso
Dedico e agradeço

Aos meus sobrinhos HENRIQUE e JOÃO PEDRO para que sirva de estímulo para os estudos

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia USP/ESALQ pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao meu orientador Dr. Celso Omoto pela oportunidade e confiança depositada em mim, orientação e ensinamentos transmitidos durante a realização do curso.

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

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

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

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Entomologia USP/ESALQ pelo convívio e companheirismo durante o curso.

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

Às funcionárias do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, Dra. Eloisa e Janice, pelo apoio e suporte durante todo o projeto.

Aos atuais colegas e amigos de Pós-graduação do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ Aline, Douglas, Dyrson, Fernando Amaral, Fernando Padovez, Juliana, Pedro, Rogério e Rubens. E aos atuais estagiários e que já se foram pela disponibilidade em ajudar.

Em especial a todos que fizeram parte da equipe "F2 screen" *Spodoptera* principalmente para Aline, Anderson, Ewerton, Fernando Amaral, Fernando Padovez e Rubens, que incansavelmente ajudavam uns aos outros.

Às minhas amigas com quem morei em Piracicaba Amanda Túler, Juliana Bezerra e Inana Xavier pela amizade e por tornarem meus momentos mais alegres.

Aos meus pais, Adenauer e Emília, meu irmão, Atos Henrique, pelo amor incondicional, suporte, incentivo e por sempre quererem meu bem estar e felicidade.

Ao meu namorado José Henrique, por todo amor, compreensão e apoio incondicional.

A minha família, em especial meus sobrinhos Henrique e João Pedro, minha cunhada Paula, e também à família do meu namorado que me apoiam e torcem pelo meu sucesso.

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram, meu muito obrigada!

Até aqui nos ajudou o Senhor, e, por isso estamos alegres.

Salmos 126.3

SUMÁRIO

| RESUMO | 8 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| REFERÊNCIAS | 15 |
| 2. LINHAS-BÁSICAS DE SUSCETIBILIDADE, MONITORAMENTO E RESISTÊNCIA CRUZADA | A DE |
| Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDAS BLOQUEADORES DE CANA | IS DE |
| SÓDIO NO BRASIL | 22 |
| RESUMO | 22 |
| ABSTRACT | 22 |
| 2.1. Introdução | 23 |
| 2.2. Material e métodos | 25 |
| 2.2.1. Insetos | 25 |
| 2.2.2. Inseticidas e bioensaios | 25 |
| 2.2.3. Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de S. frugiperda a indoxacarb e metaflun | nizone |
| | 26 |
| 2.2.4. Monitoramento de suscetibilidade de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone | 27 |
| 2.2.5. Estimativa da frequência de alelos da resistência de S. frugiperda a indoxacarb | 29 |
| 2.2.6. Resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone e alguns outros inseticidas e proteínas B | t . 30 |
| 2.2.7. Análise de dados | 30 |
| 2.3. Resultados | 31 |
| 2.4. Discussão | 39 |
| Referências | 41 |
| 3. PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA CRUZADA A INSETIC | CIDAS |
| BLOQUEADORES DE CANAIS DE SÓDIO EM Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). | 48 |
| RESUMO | 48 |
| ABSTRACT | 48 |
| 3.1. Introdução | 49 |
| 3.2. Material e métodos | |
| 3.2.1. Insetos | |
| 3.2.2. Bioensaios | |
| 3.2.3. Padrão de herança da resistência de <i>S. frugiperda</i> a indoxacarb e metaflumizone | |
| | |

| 3.2.3.1. Dominância da resistência | 53 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2.3.2. Número de genes | 53 |
| 3.2.4. Resistência cruzada de <i>S. frugiperda</i> a inseticidas que atuam nos canais de sódio | 54 |
| 3.3. Resultados | 55 |
| 3.3.1. Padrão de herança da resistência de <i>S. frugiperda</i> a indoxacarb e metaflumizone | 55 |
| 3.3.1.1. Dominância da resistência | 57 |
| 3.3.1.2. Número de genes associados a resistência | 59 |
| 3.3.2. Resistência cruzada de <i>S. frugiperda</i> entre inseticidas que atuam nos canais de sódio | 61 |
| 3.4. Discussão | 61 |
| Referências | 64 |
| 4. CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTE | ERA: |
| NOCTUIDAE) A INSETICIDAS BLOQUEADORES DE CANAIS DE SÓDIO | 70 |
| RESUMO | 70 |
| ABSTRACT | 70 |
| 4.1. Introdução | 71 |
| 4.2. Material e métodos | 72 |
| 4.2.1. Insetos | 72 |
| 4.2.2. Respostas das linhagens suscetível e resistente de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone | 72 |
| 4.2.3. Custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a inseticidas bloqueadores de cana | is de |
| sódio | 73 |
| 4.3. Resultados | 74 |
| 4.3.1. Respostas das linhagens suscetível e resistente de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone | 74 |
| 4.3.2. Custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone | 75 |
| 4.4. Discussão | 80 |
| Referências | 82 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 87 |

RESUMO

Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas bloqueadores de canais de sódio

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga do milho no Brasil, e seu controle tem sido baseado principalmente no uso de inseticidas químicos e plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas de Bacillus thuringiensis Berliner (Bt). Vários casos de resistência de S. frugiperda a estas táticas de controle já foram documentados e a resistência tem sido uma das grandes ameaças em programas no manejo integrado de pragas (MIP). Portanto, o uso de inseticidas com mecanism de ação único como os bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) poderiam auxiliar em programas de manejo de resistência de insetos (MRI). Para subsidiar um programa de MRI, os objetivos da presente pesquisa foram (i) Caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de S. frugiperda coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil; (ii) Monitorar a resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone em populações coletadas nas safras agrícolas de 2017 a 2020; (iii) Avaliar a resposta a indoxacarb e metaflumizone em linhagens suscetíveis e resistentes de S. frugiperda a inseticidas e proteinas Bt selecionadas em laboratório; (iv) Selecionar linhagens de S. frugiperda resistente a indoxacarb e metaflumizone para caracterizar as bases genéticas da resistência e a resistência cruzada entre inseticidas que atuam nos canais de sódio; e (v) Avaliar os custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone. A variação na suscetibilidade foi baixa a indoxacarb (4,6 vezes) e a metaflumizone (2,6 vezes) entre as populações de S. frugiperda coletadas em 2017. A frequência estimada dos alelos que confere resistência a indoxacarb foi de 0,0452 (0,0382 - 0,0527 CI 95%), usando o método F₂ screen, em populações de S. frugiperda coletadas em 2017 e 2018. A sobrevivência média na concentração diagnóstica baseada na CL₉₉ variou de 0,2 a 12,2% para indoxacarb e de 0,0 a 12,7% para metaflumizone em populações de S. frugiperda coletadas em diferentes regiões do Brasil de 2017 a 2020. A razão de resistência de *S. frugiperda* para indoxacarb foi de ≈ 30 vezes e para metaflumizone foi > 600 vezes. Não foi detectada resistência cruzada entre os inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) e outros inseticidas (chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, lufenuron, teflubenzuron, spinetoram e chlorantraniliprole) e proteínas Bt (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F e Vip3Aa20). Por outro lado, foi verificada a presença de resistência cruzada entre os inseticidas indoxacarb e metaflumizone. O padrão de herança da resistência de S. frugiperda para indoxacarb e metaflumizone foi autossômica, incompletamente recessiva e com efeito poligênico. Além disso, foi verificada a presença de custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone, baseado nos parâmetros biológicos avaliados em condições de laboratório na ausência de pressão de seleção. Portanto, baseado nas informações obtidas no presente estudo, indoxacarb e metaflumizone são importantes ferramentas a serem explorados em programas de MRI em S. frugiperda no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho do milho, Manejo da resistência de insetos, Indoxacarb, Metaflumizone

ABSTRACT

Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to sodium channel blocker insecticides

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) is the major maize pest in Brazil, and its control have been based on the use insecticides and transgenic plants expressing proteins of Bacillus thuringiensis Berliner (Bt). Several cases of S. frugiperda resistance to these control tactics have already been documented and resistance has been one of the major threats to integrated pest management (IPM) programs. Therefore, the use of insecticides with new modes of action such as sodium channel blockers (indoxacarb and metaflumizone) could help in insect resistance management programs (IRM). To develop an IRM program, the goals of this research were (i) To characterize the baseline susceptibility to indoxacarb and metaflumizone in S. frugiperda populations colletected from major maize-growing regions in Brazil; (ii) To monitor the S. frugiperda resistance to indoxacarb and metaflimizone in populations collected from 2017 to 2020 growing seasons; (iii) To evaluate the response to indoxacarb and metaflumizone in strains of S. frugiperda susceptible and resistant to some selected insecticides and Bt proteins; (iv) To select a resitant strain of S. frugiperda resistant to sodium channel blockers insecticides under laboratory coditions to characterize the genetic basis of resistance and cross-resistance between insecticides that act on sodium channels; and (v) To evaluate fitness costs associated with resistance of S. frugiperda to indoxacarb and metaflumizone. Low variation in susceptibility to indoxacarb (4.6-fold) and metaflumizone (2.6-fold) was detected in populations of S. frugiperda collected in 2017. The frequency of the resistance allele to indoxacarb was 0.0452 (0.0382 - 0.0527 CI 95%), by using F₂ screen method. The mean survival at diagnostic concentration, based on LC₉₉, varied from 0.2 to 12.2% for indoxacarb and from 0.0 to 12.7% for metaflumizone in populations of S. frugiperda collected in Brazil from 2017 to 2020. The resistance ratio of S. frugiperda to indoxacarb was \approx 30-fold and to metaflumizone was > 600-fold. No cross-resistance was detected between sodium channel blocker insecticides (indoxacarb and metaflumizone) and other insecticides (chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, lufenuron, teflubenzuron, spinetoram and chlorantraniliprole) and Bt proteins (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F and Vip3Aa20). On the other hand, cross-resistance between indoxacarb and metaflumizone was detected. The inheritance of resistance of S. frugiperda to indoxacarb and metaflumizone was autosomal, incompletely recessive and with polygenic effect. In addition, significant fitness costs associated with S. frugiperda resistance to indoxacarb and metaflumizone were observed in life history traits evaluated under laboratory conditions in the absence of selection pressure. Thus, based on information obtained in this study, indoxacarb and metaflumizone are important tools to be exploited in IRM programs in Brazil.

Keywords: Fall armyworm, Insect resistance management, Indoxacarb, Metaflumizone

LISTA DE FIGURAS

| Figura 2.1 Locais de coleta das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> utilizadas na caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 2.3 Boxplot ilustrando a porcentagem de sobrevivência de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas na concentração diagnóstica no monitoramento da suscetibilidade dos inseticidas (a) indoxacarb e (b) metaflumizone ao longo das safras (2017 a 2020) no Brasil |
| Figura 3.1 Grau de dominância da resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> em função da concentração de indoxacarb (método de Bourguet et al. 2000) |
| FIgura 3.2 Grau de dominância da resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> em função da concentração de metaflumizone (método de Bourguet et al. 2000) |
| Figura 4.1 Duração (A) e viabilidade (B) das fases das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e heterozigoto (HZI) de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial. as colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05, teste de Tukey) |
| Figura 4.2 Duração do período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, peso de pupa e lagarta das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e heterozigoto (HZi) de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial. as colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05, teste de Tukey)77 |
| Figura 4.3 Duração (a) e viabilidade (b) das fases das linhagens sus-ba, metaflumizone-r e heterozigoto (hzm) de <i>spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05, teste de tukey) |
| Figura 4.4 Duração do período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, peso de pupa e lagarta das linhagens SUS-BA Metaflumizone-R e heterozigoto (HZm) de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial. as colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05, teste de Tukey)79 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 2.1 Populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> utilizadas na caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabela 2.2 Populações de Spodoptera frugiperda utilizadas para estimar a frequência dos alelos de resistência a indoxacarb. 29 |
| Tabela 2.3 Linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível e resistentes a diferentes inseticidas/proteínas Bt utilizadas na avaliação da resistência cruzada |
| Tabela 2.4 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de Spodoptera frugiperda a indoxacarb e metaflumizone. 32 |
| Tabela 2.5 Monitoramento da suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> coletadas em cultivos de milho no período de 2017 a 2020 |
| Tabela 2.6 Frequência do alelo que confere resistência a indoxacarb em populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> coletadas nas safras de milho 2017/2018 no Brasil |
| Tabela 2.7 Respostas a indoxacarb e metaflumizone em diferentes linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível e resistente a inseticidas/proteínas Bt |
| Tabela 3.1 Concentração-resposta das linhagens suscetível (SUS), resistente a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) e progênies F_1 dos cruzamentos recíprocos de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone |
| Tabela 3.2 Análise do qui-quadrado (χ^2) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem resistente Indoxacarb-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (Hi1 = \Im SUS x \Im Indoxacarb-R) expostas a diferentes concentrações de indoxacarb |
| Tabela 3.3 Análise do qui-quadrado (χ 2) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem da resistente Metaflumizone-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (Hm2 = \Im SUS x \Im Metaflumizone-R) expostas a diferentes concentrações de metaflumizone |
| Tabela 3.4 Concentração-resposta das linhagens suscetível (SUS), resistente a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos inseticidas lambda cyhalothrin, indoxacarb e metaflumizone |
| Tabela 4.1 Concentração-resposta da população BA 48 e das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e Metaflumizone-R de <i>Spodoptera frugiperda</i> a inseticidas bloqueadores de canais de sódio |
| Tabela 4.2 Parâmetros da tabela vida de fertilidade de linhagens suscetível SUS-BA, resistente IndoxacarB-R e heterozigotos HZi de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial77 |
| Tabela 4.3 Parâmetros da tabela vida de fertilidade de linhagens suscetível SUS-BA, resistente Metaflumizone-R e heterozigotos HZm de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta artificial |

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a principal praga do milho nas Américas, além de atacar outras culturas de importância econômica. No Brasil, o problema com *S. frugiperda* tem se agravado em regiões como o Cerrado, devido às condições climáticas que permitem o cultivo durante todo o ano (Pereira et al. 2012, Rada 2013, Strassburg et al. 2017), favorecendo assim um maior número de gerações de *S. frugiperda* por ano e o estabelecimento de uma alta densidade populacional da praga (Pogue 2002, Barros et al. 2010, Casmuz et al. 2010, Montezano et al. 2018). Recentemente, *S. frugiperda* ganhou notoriedade no cenário agrícola mundial, pois foi relatado surtos desta praga na África, Ásia e Austrália, demonstrando a alta capacidade de migração da espécie e o grande potencial de prejuízo em diversas culturas (Goergen et al. 2016, Stokstad 2017, Ganiger et al. 2018, Toepfer et al. 2019, Jing et al. 2020, Queensland Government Department of Agriculture and Fisheries 2020).

De acordo com Arthropod Pesticide Resistance Database, há registros de 144 casos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas (APRD 2021). No Brasil, casos de resistência de *S. frugiperda* para diferentes grupos de inseticidas, tais como piretroides, organofosforados, inibidores de biossíntese de quitina, espinosinas e diamidas já foram documentados (Diez-Rodríguez & Omoto 2001, Carvalho et al. 2013, Nascimento et al. 2016, Okuma et al. 2018, Bolzan et al. 2019, Nascimento 2019, Lira et al. 2020), assim como para as proteínas Cry1F (Farias et al. 2014) e Cry1Ab (Omoto et al. 2016) expressas em híbridos de milho geneticamente modificado que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), comprometendo outras tecnologias Bt devido à resistência cruzada entre proteínas do grupo Cry1 (Bernardi et al. 2015, Horikoshi et al. 2016). Sendo assim, o uso de inseticidas para o manejo de *S. frugiperda* ainda tem sido necessário no Brasil.

Dentre os inseticidas recomendados para o controle de *S. frugiperda* estão os bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone), classificado no Grupo 22 de acordo com o IRAC (Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas). Esses inseticidas apresentam modo de ação único pois se ligam ao poro dos canais de sódio abertos quando a membrana ainda está despolarizada e bloqueia os canais de sódio. Nestas condições, a transmissão do impulso nervoso não ocorre, o que resulta em paralisia e morte do inseto (Wing et al. 2000, McCann et al. 2001). Ambos os inseticidas oferecem excelente controle de algumas pragas da ordem Lepidoptera, além de Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Diptera e Blattaria (Salgado & Hayashi 2007, Silver et al. 2010). Esses inseticidas apresentam grande importância e são

ideais em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) por possuir baixa toxicidade para inimigos naturais e perfis toxicológicos e ecotoxicológicos favoráveis (Hewa-Kapuge et al. 2009, Wanumen et al. 2016, Demirci et al. 2018).

Indoxacarb, descrito primeiramente por McCann et al. (2001), pertence ao grupo das oxadiazinas (Subgrupo 22A). Considerado um pró-inseticida, há necessidade de ativação metabólica pela ação hidrolisante de enzimas (esterases ou amidases) presentes no inseto que resultam na formação do metabólito JT333 (N-decarbomethoxyllated) causando bloqueio dos canais de sódio (von Stein et al. 2013). Após a metabolização do indoxacarb surge sintomas de neuro intoxicação o que ocasiona pequenas convulsões e até a paralisia do inseto seguida de morte. A atuação é mais por ingestão, como observado em lagartas de *S. frugiperda* que são 2,5 vezes mais sensíveis por meio oral que por meio tópico (Wing et al. 1998, 2000). Já o metaflumizone pertence ao grupo das semicarbazonas (Subgrupo 22B) e, ao contrário de indoxacarb, não requer metabolização para produzir o composto ativo, mas apresenta sintomas neurotóxicos idênticos nos insetos (Salgado & Hayashi 2007, Silver et al. 2010).

Apesar de os inseticidas bloqueadores de canais de sódio terem sido lançados recentemente no mercado já foram relatados diversos casos de resistência no mundo, tais como em Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivos de algodão na Austrália e China (Bird 2017, Bird et al. 2017, Cui et al. 2018), Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae) no Paquistão (Ahmad et al. 2008, Sayyed et al. 2008), Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) (Su e Sun 2014, Ahmad et al. 2018), Plutella xylostella (Lepdoptera: Plutellidae) na China (Khakame et al. 2013, Wang et al. 2016, Shen et al. 2017, Zhang et al. 2017) e Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) na Grécia (Roditakis et al. 2017). No Brasil, o inseticida indoxacarb tem sido comercializado há mais de 10 anos e já foram confirmados casos de resistência em P. xylostella (Santos et al. 2011), T. absoluta (Silva et al. 2011) e Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) (Haddi et al. 2015). Já metaflumizone está no mercado há menos de cinco anos, contudo já foi relatado um caso de resistência para T. absoluta (Silva, et al. 2016b). Assim, os inseticidas bloqueadores de canais de sódio também apresentam um alto risco de evolução da resistência em diferentes insetos pragas, caso estratégia de manejo da resistência não sejam implementadas. Contudo, a presença de resistência cruzada pode influenciar a evolução da resistência devido à pressão de seleção por outros inseticidas, e estudos sobre a possibilidade de resistência cruzada fornecem subsídios para adoção de estratégias proativas de manejo da resistência (Roush & Mckenzie 1987).

A maioria dos trabalhos de resistência a inseticidas bloqueadores de canais de sódio evidencia que a desintoxicação metabólica está envolvida como principal mecanismo de

resistência (Shono et al. 2004, Nehare et al. 2010, Pang et al. 2012, Tian et al. 2014, Haddi et al. 2015, Silva, et al. 2016 a, Bird 2017). Entretanto, a resistência tanto ao indoxacarb quanto à metaflumizone foram atribuídas a duas mutações *F1845Y* e *V1848I*, identificadas no segmento S6 do domínio IV dos canais de sódio em duas populações de *P. xylostella* (Wang et al. 2016) e as mesmas mutações foram identificadas em uma população resistente a estes inseticidas em *T. absoluta* na Grécia e Itália (Roditakis et al. 2017). Quando as mutações foram expressas em oócitos de *Xenopus*, verificou-se que as mutações reduziram quase igualmente a inibição da corrente de sódio pelo indoxacarb e metaflumizone (Jiang et al. 2015). Posteriormente, essas mutações foram testadas *in vitro* empregando a estratégia CRISPR / Cas9 para gerar cepas de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophiladae) portadoras destas mutações. Os resultados indicaram que ambas as mutações conferem resistência a indoxacarb e a metaflumizone, sendo que a mutação *F1845Y* conferiu uma maior razão de resistência a metaflumizone (Samantsidis et al. 2019).

Para a implementação de estratégias de manejo da resistência, uma das principais etapas está no monitoramento da resistência, pois permite detectar alterações na suscetibilidade antes que a frequência crítica da resistência seja atingida e auxilia na tomada de decisões e retardar a evolução da resistência (Roush & Miller 1986, Downes et al. 2007). O monitoramento pode ser caracterizado como fenotípico ou genotípico, em que no monitoramento fenotípico é possível mediante a comparação entre as estimativas das concentrações letais das populações de campo com populações suscetíveis de referência ou ainda com o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, sendo este último o mais recomendado (Roush & Miller 1986, ffrench-Constant & Roush 1990). O método genotípico baseia-se em técnicas de F₁ *screen* ou F₂ *screen* em que ambos os métodos permitem estimar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo. O método F₁ *screen* é menos custoso e trabalhoso, comparado ao F₂ *screen*, entretanto há a necessidade de se ter a linhagem resistente já selecionada (Andow & Alstad 1998, Andow & Ives 2002).

Um dos pontos a serem considerados para a implementação de estratégias de manejo da resistência está relacionado à compreensão dos fatores genéticos que afetam a sua evolução (Georghiou & Taylor 1977, Roush & McKenzie 1987). O padrão de herança genética da resistência e o conhecimento a respeito do número de genes envolvidos na resistência de insetos possuem grande influência na evolução da resistência pois interfere na velocidade da evolução da resistência mediante as pressões de seleção com inseticidas em condições de campo (Georghiou & Taylor 1977). A seleção de alelos de resistência pode estar associada a custos adaptativos (Gassmann et al. 2009, Kliot & Ghanim 2012, Freeman et al., 2021). Os insetos

resistentes exibem menor aptidão (por ex. paramêtros de tabelas de vida e fertilidade) na ausência de pressão de seleção do que os insetos suscetíveis (Gassmann et al. 2009, Kliot & Ghanim 2012, Freeman et al., 2021).

Para subsidiar a implantação de estratégias de manejo da resistência e preservar a eficácia dos inseticidas bloqueadores de canais de sódio para o manejo de *S. frugiperda* no Brasil, os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de S. frugiperda coletadas nas princiapis regiões produtoras de milho no Brasil;
- Monitorar a resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone no Brasil em populações coletadas nas safras agrícolas de 2017 a 2020;
- Avaliar a resposta a indoxacarb e metaflumizone em linhagens suscetíveis e resistentes de S. frugiperda a inseticidas e proteinas Bt;
- Selecionar linhagens de S. frugiperda resistente a indoxacarb e metaflumizone e caracterizar as bases genéticas da resistência e a resistência cruzada entre inseticidas que atuam nos canais de sódio; e
- Avaliar os custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone.

Referências

- **Ahmad, M., A. Farid, and M. Saeed**. **2018**. Resistance to new insecticides and their synergism in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Crop Prot. 107: 79–86.
- **Ahmad, M., A. H. Sayyed, M. A. Saleem, and M. Ahmad**. **2008**. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Crop Prot. 27: 1367–1372.
- **Andow, D. A., and D. N. Alstad. 1998.** F₂ Screen for Rare Resistance Alleles. J. Econ. Entomol. 91: 572–578.
- **Andow, D. A., and A. R. Ives. 2002.** Monitoring and adaptive resistance management. 12: 1378–1390.
- **APRD**. **2021**. Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. http://www.pesticideresistance.org/ . Accesso 23 de janeiro de 2021.

- **Barros, E. M., J. B. Torres, J. R. Ruberson, and M. D. Oliveira**. **2010**. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. Entomol. Exp. Appl. 137: 237–245.
- Bernardi, D., E. Salmeron, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, P. M. Dourado, R. A. Carvalho, S. Martinelli, G. P. Head, and C. Omoto. 2015. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. PLoS One. 10: e0140130.
- **Bird, L. J. 2017**. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag. Sci. 73: 575–581.
- **Bird, L. J., L. J. Drynan, and P. W. Walker**. **2017**. The Use of F₂ Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate, Chlorantraniliprole, and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 110: 651–659.
- Bolzan, A., F. E. Padovez, A. R. Nascimento, I. S. Kaiser, E. C. Lira, F. S. Amaral, R. H. Kanno, J. B. Malaquias, and C. Omoto. 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. Pest Manag. Sci. 75: 2682–2689.
- Carvalho, R. A., C. Omoto, L. M. Field, M. S. Williamson, and C. Bass. 2013. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. PLoS One. 8: e62268.
- Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socias, M. G. Murua, S. Prieto, and S. Medina. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. la Soc. Entomológica Argentina. 69: 209–231.
- Cui, L., Q. Wang, H. Qi, Q. Wang, H. Yuan, and C. Rui. 2018. Resistance selection of indoxacarb in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): cross-resistance, biochemical mechanisms and associated fitness costs. Pest Manag. Sci. 74: 2636–2644.
- **Demirci, Ö., K. Güven, D. Asma, S. Öğüt, and P. Uğurlu. 2018**. Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 147: 749–758.
- **Diez-Rodríguez, G. I., and C. Omoto. 2001**. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. Neotrop. Entomol. 30: 311–316.

- **Downes, S., R. Mahon, and K. Olsen**. **2007**. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for Bt-cotton: Current status and future challenges. J. Invertebr. Pathol. 95: 208–213.
- Farias, J. R., R. J. Horikoshi, A. C. Santos, and C. Omoto. 2014. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin From *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. J. Econ. Entomol. 107: 2182–2189.
- **ffrench-Constant, R. H., and R. T. Roush**. **1990**. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, pp. 4–38. *In* Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (eds.), Pestic. Resist. Arthropods. Springer, Boston, MA.
- Freeman, J. C., L. B. Smith, H. Sun, J. G. Scott, J. J. Silva, and Y. Fan. 2021. Fitness studies of insecticide resistant strains: lessons learned and future directions. Pest Manag. Sci. Ganiger, P. C., H. M. Yeshwanth, K. Muralimohan, N. Vinay, A. R. V. Kumar, and K. Chandrashekara. 2018. Occurrence of the New Invasive Pest, Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the Maize Fields of Karnataka, India. Curr. Sci. 115: 621.
- **Gassmann, A. J., Y. Carrière, and B. E. Tabashnik**. **2009**. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 54: 147–163.
- **Georghiou, G. P., and C. E. Taylor**. **1977**. Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319–323.
- Goergen, G., P. L. Kumar, S. B. Sankung, A. Togola, and M. Tamò. 2016. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. PLoS One. 11: e0165632.
- Haddi, K., L. P. Mendonca, M. F. Dos Santos, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira. 2015.
 Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 108: 362–369.
- Hewa-Kapuge, S., S. McDougall, and A. A. Hoffmann. 2009. Effects of Methoxyfenozide, Indoxacarb, and Other Insecticides on the Beneficial Egg Parasitoid *Trichogramma* nr. brassicae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Under Laboratory and Field Conditions. J. Econ. Entomol. 96: 1083–1090.
- Horikoshi, R. J., D. Bernardi, O. Bernardi, J. B. Malaquias, D. M. Okuma, L. L. Miraldo, F. S. A. E. De Amaral, and C. Omoto. 2016. Effective dominance of resistance of

- Spodoptera frugiperda to Bt maize and cotton varieties: Implications for resistance management. Sci. Rep. 6: 1–8.
- Jiang, D., Y. Du, Y. Nomura, X. Wang, Y. Wu, B. S. Zhorov, and K. Dong. 2015. Mutations in the transmembrane helix S6 of domain IV confer cockroach sodium channel resistance to sodium channel blocker insecticides and local anesthetics. Insect Biochem. Mol. Biol. 66: 88–95.
- Jing, D., J. Guo, Y. Jiang, J. Zhao, A. Sethi, K. He, and Z. Wang. 2020. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. Insect Sci. 1744-7917.12700.
- **Khakame, S. K., X. Wang, and Y. Wu**. **2013**. Baseline Toxicity of Metaflumizone and Lack of Cross Resistance Between Indoxacarb and Metaflumizone in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 106: 1423–1429.
- **Kliot, A., and M. Ghanim**. **2012**. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Manag. Sci. 68: 1431–1437.
- Lira, E. C., A. Bolzan, A. R. B. Nascimento, F. S. A. Amaral, R. H. Kanno, I. S. Kaiser, and C. Omoto. 2020. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) to spinetoram: Inheritance and cross-resistance to spinosad. Pest Manag. Sci. 76: 2674–2680.
- McCann, S. F., G. D. Annis, R. Shapiro, D. W. Piotrowski, G. P. Lahm, J. K. Long, K. C. Lee, M. M. Hughes, B. J. Myers, S. M. Griswold, B. M. Reeves, R. W. March, P. L. Sharpe, P. Lowder, W. E. Barnette, and K. D. Wing. 2001. The discovery of indoxacarb: Oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. Pest Manag. Sci. 57: 153–164.
- Montezano, A. D. G., A. Specht, D. G. Montezano, and A. Specht. 2018. Host Plants of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. African Entomol. 26: 286–300.
- **Nascimento, A. 2019**. Exploiting next generation sequencing techniques (NGS) to identify molecular markers for monitoring the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides and Bt proteins.
- Nascimento, A. R. B. do, J. R. Farias, D. Bernardi, R. J. Horikoshi, and C. Omoto. 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. Pest Manag. Sci. 72: 810–815.
- Nehare, S., B. S. Ghodki, G. K. Lande, V. Pawade, and A. S. Thakare. 2010. Inheritance of resistance and cross resistance pattern in indoxacarb-Resistant diamondback moth *Plutella xylostella* L. Entomol. Res. 40: 18–25.

- Okuma, D. M., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, A. P. Silva, and C. Omoto. 2018. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. Pest Manag. Sci. 74: 1441–1448.
- Omoto, C., O. Bernardi, E. Salmeron, R. J. Sorgatto, P. M. Dourado, A. Crivellari, R. A. Carvalho, A. Willse, S. Martinelli, and G. P. Head. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. Pest Manag. Sci. 72: 1727–1736.
- Pang, S., W. You, L. Duan, X. Song, X. Li, and C. Wang. 2012. Resistance selection and mechanisms of oriental tobacco budworm (*Helicoverpa assulta* Guenee) to indoxacarb. Pestic. Biochem. Physiol. 103: 219–223.
- Pereira, P. A. A., G. B. M. Jr, C. A. Santana, and E. Alves. 2012. The development of Brazilian agriculture and future challenges. Agric. Food Secur. 1:4.
- **Pogue, M. 2002**. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae). Mem. Am. Entomol. Soc. 43: 1–202.
- Queensland Government Department of Agriculture and Fisheries. 2020. First mainland detection of fall armyworm. https://www.daf.qld.gov.au/news-media/media-centre/biosecurity/news/first-mainland-detection-of-fall-armyworm. Acesso em 20 de janeiro de 2021.
- Rada, N. 2013. Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle. Food Policy. 38: 146–155.
- Roditakis, E., K. Mavridis, M. Riga, E. Vasakis, E. Morou, J. L. Rison, and J. Vontas. **2017**. Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 73: 1679–1688.
- Roush, R. T., and J. A. McKenzie. 1987. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. Annu. Rev. Entomol. 32: 361–380.
- Roush, R. T., and G. L. Miller. 1986. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. J. Econ. Entomol. 79: 293–298.
- **Salgado, V. L., and J. H. Hayashi**. **2007**. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. 150: 182–189.
- **Samantsidis, G. R., A. O. O'Reilly, V. Douris, and J. Vontas. 2019**. Functional validation of target-site resistance mutations against sodium channel blocker insecticides (SCBIs) via molecular modeling and genome engineering in *Drosophila*. Insect Biochem. Mol. Biol. 104: 73–81.
- Santos, V., H. de Siqueira, J. da Silva, and M. de Farias. 2011. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 40: 264–270.

- **Sayyed, A. L. I. H., M. Ahmad, and M. A. Saleem**. **2008**. Cross-Resistance and Genetics of Resistance to Indoxacarb in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). 472–479.
- Shen, J., D. Li, S. Zhang, X. Zhu, H. Wan, and J. Li. 2017. Fitness and inheritance of metaflumizone resistance in *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 139: 53–59.
- **Shono, T., L. Zhang, and J. G. Scott. 2004**. Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. Pestic. Biochem. Physiol. 80: 106–112.
- Silva, G. A., M. C. Picanço, L. Bacci, A. L. B. Crespo, J. F. Rosado, and R. N. C. Guedes. **2011**. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 67: 913–920.
- Silva, J. E., C. P. O. Assis, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Field-Evolved Resistance and Cross-Resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations to Diamide Insecticides. J. Econ. Entomol. 109: 2190–2195. a
- Silva, T. B. M., W. M. Silva, M. R. Campos, J. E. Silva, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. Crop Prot. 79: 80–86. b
- Silver, K. S., W. Song, Y. Nomura, V. L. Salgado, and K. Dong. 2010. Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pestic. Biochem. Physiol. 97: 87–92.
- von Stein, R. T., K. S. Silver, and D. M. Soderlund. 2013. Indoxacarb, metaflumizone, and other sodium channel inhibitor insecticides: Mechanism and site of action on mammalian voltage-gated sodium channels. Pestic. Biochem. Physiol. 106: 101–112.
- **Stokstad, E. 2017**. New crop pest takes Africa at lightning speed. Science. 356: 473–474.
- Strassburg, B. B. N., T. Brooks, R. Feltran-Barbieri, A. Iribarrem, R. Crouzeilles, R. Loyola, A. E. Latawiec, F. J. B. Oliveira Filho, C. A. de M. Scaramuzza, F. R. Scarano, B. Soares-Filho, and A. Balmford. 2017. Moment of truth for the Cerrado hotspot. Nat. Ecol. Evol. 1: 0099.
- **Su, J., and X. Sun**. **2014**. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. Crop Prot. 61: e353–e361.
- **Tian, X., X. Sun, and J. Su. 2014**. Biochemical mechanisms for metaflumizone resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Pestic. Biochem. Physiol. 113: 8–14.
- Toepfer, S., U. Kuhlmann, M. Kansiime, D. O. Onyango, T. Davis, K. Cameron, and R. Day. 2019. Communication, information sharing, and advisory services to raise awareness

- for fall armyworm detection and area-wide management by farmers. J. Plant Dis. Prot. 126: 103–106.
- Wang, X.-L., W. Su, J.-H. Zhang, Y.-H. Yang, K. Dong, and Y.-D. Wu. 2016. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Sci. 23: 50–58.
- Wanumen, A. C., G. A. Carvalho, P. Medina, E. Viñuela, and Á. Adán. 2016. Residual Acute Toxicity of Some Modern Insecticides Toward Two Mirid Predators of Tomato Pests. J. Econ. Entomol. 109: 1079–1085.
- Wing, K. D., M. Sacher, Y. Kagaya, Y. Tsurubuchi, L. Mulderig, M. Connair, and M. Schnee. 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Prot. 19: 537–545.
- Wing, K. D., M. E. Schnee, M. Sacher, and M. Connair. 1998. A Novel Oxadiazine Insecticide Is Bioactivated in Lepidopteran Larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 37: 91–103.
- **Zhang, S., X. Zhang, J. Shen, D. Li, H. Wan, H. You, and J. Li. 2017**. Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 140: 85–89.

2. LINHAS-BÁSICAS DE SUSCETIBILIDADE, MONITORAMENTO E RESISTÊNCIA CRUZADA DE Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDAS BLOQUEADORES DE CANAIS DE SÓDIO NO BRASIL

RESUMO

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas de culturas agrícolas nos agroecossistemas brasileiros. A resistência de S. frugiperda já foi relatada a alguns inseticidas convencionais e proteínas Bt. Portanto, o uso de inseticidas com modo de ação único tais como os bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) pode ser uma ferramenta importante nos programas de Manejo de Resistência a Inseticidas (MRI). Para implementar um programa de MRI proativo, foram realizados estudos de (i) caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade e monitoramento da resistência a indoxacarb e metaflumizone em 87 populações de campo de S. frugiperda coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil de 2017 a 2020, (ii) estimativa da frequência dos alelos de resistência ao indoxacarb, e (iii) avaliação da resistência cruzada de indoxacarb e metaflumizone para alguns inseticidas e proteínas Bt. Foi detectada baixa variação na suscetibilidade a indoxacarb (4,6 vezes) e a metaflumizone (2,6 vezes) em populações de S. frugiperda coletadas em 2017. A frequência estimada dos alelos que conferem resistência a indoxacarb foi de 0,0452 (0,0382 - 0,0527 CI 95%), usando o método F₂ screen. A sobrevivência média na concentração diagnóstica, baseada na CL₉₉, variou de 0,2 a 12,2% para indoxacarb e de 0,0 a 12,7% para metaflumizone, confirmando a alta suscetibilidade da S. frugiperda a estes inseticidas no Brasil. Não foi detectada resistência cruzada entre inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) e outros inseticidas (chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, lufenuron, chlorantraniliprole) teflubenzuron, spinetoram proteínas (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F e Vip3Aa20). Tais resultados demonstram que os inseticidas bloqueadores de canais de sódio são importantes ferramentas a serem explorados nas estratégias de MRI de S. frugiperda no Brasil.

Palavras-chave: 1. Lagarta-do-cartucho do milho 2. Bloqueadores dos canais de sódio 3. Indoxacarb 4. Metaflumizone 5. Manejo de resistência de insetos

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the key cross-crop pests in Brazilian agroecosystems. Field-evolved resistance of *S. frugiperda* to some conventional insecticides and Bt proteins has already been reported. Thus, the use of insecticides with new mode of action such as sodium channel blockers (indoxacarb and metaflumizone) could be an important tool in insecticide resistance management (IRM) programs. To implement a proactive IRM, we conducted

baseline response and monitoring to indoxacarb and metaflumizone in 87 field populations of S. frugiperda collected from major maize-growing regions of Brazil from 2017 to 2020, estimated the frequency of resistance alleles to indoxacarb, and evaluated cross-resistance of indoxacarb and metaflumizone to some selected insecticides and Bt proteins. Low variation in susceptibility to indoxacarb (4,6-fold) and metaflumizone (2,6-fold) was detected in populations of S. frugiperda in 2017. The frequency of the resistance allele to indoxacarb was 0.0452 (0.0382 - 0.0527)CI 95%), by using F₂ screen method. The mean survival at diagnostic concentration, based on CL₉₉, varied from 0,2 to 12,2% for indoxacarb and from 0,0 to 12,7% for metaflumizone, confirming high susceptibility of S. frugiperda to these insecticides in Brazil. No cross-resistance was detected between sodium channel blocker insecticides (indoxacarb and metaflumizone and other insecticides (chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, lufenuron, teflubenzuron, spinetoram and chlorantraniliprole) and Bt proteins (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F and Vip3Aa20). These findings showed that sodium channel blocker insecticides are important candidates to be exploited in IRM strategies of S. frugiperda in Brazil.

Key words: 1. Fall armyworm 2. Sodium channel blockers 3. Indoxacarb, 4. Metaflumizone 5. Insect resistance management

*Este capítulo foi aceito na revista Journal of Economic Entomology. Referência: **Ingrid S. Kaiser**, Rubens H. Kanno, Anderson Bolzan, Fernando S. A. Amaral, Ewerton C. Lira, Aline S. Guidolin, Celso Omoto. Baseline response, monitoring and cross-resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to sodium channel blocker insecticides in Brazil. Journal of Economic Entomology, 2021, toab011, https://doi.org/10.1093/jee/toab011

2.1. Introdução

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas agrícolas das Américas, causando prejuízos na cultura do milho, além de outras culturas de importância agrícola como algodão e soja (Pogue 2002; Montezano et al. 2018). Recentemente, esta praga invadiu a África, Ásia e Austrália, e está rapidamente se espalhando pelos continentes causando perdas econômicas (Goergen et al. 2016, Stokstad 2017, Ganiger et al. 2018, Jing et al. 2020, Queensland Government Department of Agriculture and Fisheries 2020).

O uso de inseticidas e plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) são as principais táticas para o controle de *S. frugiperda* no Brasil e no mundo. A resistência de *S. frugiperda* no Brasil já foi relatada para alguns inseticidas convencionais como os pertencentes ao grupo de piretroides (Diez-Rodríguez & Omoto 2001,

Carvalho et al. 2013), organofosforados (Carvalho et al. 2013), benzoilureias (Nascimento et al. 2016), espinosinosinas (Okuma et al. 2018), diamidas (Bolzan et al. 2019) e proteínas Bt (Farias et al. 2014, Omoto et al. 2016). Para o controle de lepidópteros praga no Brasil, o número de pulverizações com inseticidas varia de acordo com a utilização das tecnologias Bt nas diferentes culturas e a região agrícola, mas em média é necessário 7 a 9 pulverizações em algodão, 2 a 5 em milho e 2 a 3 em soja. Assim, o uso de inseticidas com modo de ação diferente pode ser uma ferramenta importante nos programas de manejo de resistência a inseticidas.

Os inseticidas bloqueadores de canais de sódio, tais como indoxacarb e metaflumizone, destacam-se por seu modo de ação único ao bloquear os canais de sódio (Wing et al. 2000, McCann et al. 2001), pela baixa toxicidade para inimigos naturais e perfis toxicológicos e ecotoxicológico favoráveis. Estas características são ideais para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Hewa-Kapuge et al. 2009, Wanumen et al. 2016, Demirci et al. 2018). Desta forma, os inseticidas bloqueadores de canais de sódio são uma alternativa ao manejo da resistência aos inseticidas *S. frugiperda* e ainda não foram relatadas falhas de controle desta praga com o uso destes inseticidas.

No Brasil, indoxacarb está no mercado há mais de 10 anos e já foram confirmados casos de resistência em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Santos et al. 2011), *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Silva et al. 2011) e *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (Haddi et al. 2015). Metaflumizone está no mercado há menos de cinco anos, mas já foi relatado um caso de resistência para *T. absoluta*. (Silva et al. 2016). Assim, os inseticidas bloqueadores de canais de sódio mostram risco potencial de evolução da resistência em diferentes insetos pragas.

As estratégias no manejo de resistência para *S. frugiperda* incluem a rotação de inseticidas com diferentes modos de ação que não apresentem resistência cruzada. Há poucos relatos de resistência cruzada entre os inseticidas bloqueadores de canais de sódio e outros grupos de inseticidas e proteínas Bt (Sayyed et al. 2005, Khakame et al. 2013, Bird & Downes 2014). Entretanto, o número de casos de resistência cruzada pode aumentar, especialmente com inseticidas do grupo dos piretroides que atuam no mesmo sítio de ação (Zhorov e Dong 2017). Além disso, já foi relatado resistência cruzada moderada ao indoxacarb para uma população de *P. xylostella* resistente a cipermetrina (Nehare et al. 2010). Portanto, estudos de resistência cruzada entre os inseticidas devem ser levado em consideração para elaborar estratégias de MRI.

No presente estudo, foram realizados estudos de (i) caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade e monitoramento da resistência a indoxacarb e metaflumizone em populações

de campo de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil de 2017 a 2020, (ii) estimativa da frequência dos alelos de resistência ao indoxacarb, e (iii) avaliação da resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone e alguns outros inseticidas e proteínas Bt.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Insetos

As populações de *S. frugiperda* foram coletadas nas principais regiões de cultivo de milho no Brasil de 2017 a 2020 nos campos de milho não-Bt (Tabela 2.1, Figura 2.1). Para cada população de campo, foram coletadas aproximadamente 1000 lagartas, transportadas em copos plásticos individuais contendo dieta artificial à base de germe de trigo, levedura de cerveja, proteína de soja e caseína (Kasten et al. 1978) onde permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram transferidas para gaiolas de policloreto de vinila (PVC) (10 cm diâmetro × 20 cm altura), revestidas internamente com papel para servir como substrato para oviposição. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10% e a cada dois dias, o papel em oviposição e a solução de mel foram substituídos. As massas de ovos eram mantidas em copos de plástico (100 mL) com papel umedecido até a eclosão das lagartas, e então transferidos para copos de plástico contendo dieta artificial e mantidos até atingirem o terceiro ínstar, no qual foram utilizadas nos bioensaios.

A linhagem de referência suscetível (SUS) foi proveniente da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil). Esta linhagem vem sendo mantida em laboratório nas mesmas condições descritas anteriormente na ausência de pressão de seleção de inseticidas e proteínas Bt por mais de 20 anos. Os insetos e bioensaios foram mantidos em condições de controladas de 25±2 °C, 70±10% de umidade relativa, e fotoperíodo de 14:10 h de luz/escuro.

2.2.2. Inseticidas e bioensaios

O bioensaio de ingestão foi realizado em placas de 24 células (Corning[®] Costar[®], São Paulo, Brasil), com aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial por célula (área de 1,9 cm²). Diferentes concentrações dos os inseticidas indoxacarb (Avatar[®], 150 g de i.a. L⁻¹, FMC Química do Brasil LTDA) e metaflumizone (Verismo[®], 240 g de i.a. L⁻¹, Basf S. A.) foram diluídos em água destilada com adição de 0,1 % (v/v) do surfactante Triton[®]. Em cada célula

foi aplicado 30 µL da solução inseticida, e após a secagem foi inoculado uma lagarta de terceiro ínstar por célula. A mortalidade das lagartas foi avaliada após 48 horas, sendo consideradas mortas quando não apresentava movimento coordenado após um leve toque de um pincel. Foi utilizada a mesma metodologia para ambos inseticidas.

2.2.3. Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone

Sete populações de campo coletadas durante as safras de milho dos anos agrícolas 2017 e 2018 e a linhagem SUS foram utilizadas para caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone (Figura 2.1, Tabela 2.1). Para ambos os inseticidas, seis a oito concentrações dos inseticidas variando de 1 a 100 µg mL⁻¹ foram avaliadas para fornecer 5 e 95% de mortalidade. O tratamento controle consistiu de água destilada mais o surfactante. Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em cada concentração foram testadas pelo menos 72 lagartas de terceiro ínstar.

Tabela 2.1 Populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas na caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone.

| Código da população | Local | Latitude | Longitude | Data da coleta |
|---------------------|-------------------------|---------------|-------------|----------------|
| SUS | Laboratório | - | - | - |
| BA 48 | São Desidério – BA | 12°51'12,096" | 45°28'12,7" | Jul. 2017 |
| GO 40 | Rio Verde – GO | 17° 47' 53" | 50° 55' 41" | Dez. 2016 |
| MG 26 | Divisa Nova – MG | 21°30'35" | 46°16'42" | Dez. 2016 |
| MT 43 | Lucas do Rio Verde – MT | 13° 03' 01" | 55° 54' 40" | Mar. 2017 |
| PR 74 | Cascavel – PR | 24° 57' 21" | 53° 27' 19" | Mar. 2017 |
| SC 6 | Guatambu - SC | 27°07'52,79" | 52°45'33,1" | Nov. 2016 |
| SP 24 | Casa Branca – SP | 21°34'49,87" | 47°05'20,5" | Dez. 2016 |



Figura 2.1 Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas na caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone.

2.2.4. Monitoramento de suscetibilidade de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone

O monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone foi realizado em 87 populações de campo coletadas durante as safras de 2017 a 2020 (Figura 2.2), utilizando concentração diagnóstica de cada inseticida, baseada na CL₉₉ estimada por meio da análise conjunta das linhas-básicas de suscetibilidade. Foram testadas 20 repetições de 24 lagartas de terceiro instar por repetição totalizando 480 lagartas por população. O procedimento de bioensaio foi a mesma descrita anteriormente (item 2.2.2).

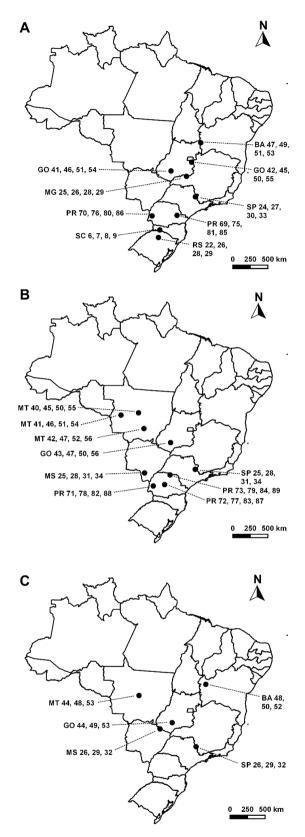


Figura 2.2 Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* utilizados no monitoramento da suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone. (A) Primeira safra da cultura do milho 2017, 2018, 2019 e 2020; (B) segunda safra da cultura do milho 2017, 2018, 2019 e 2020; (C) entressafra da cultura do milho 2017/2018, 2018/2019 e 2019/2020.

2.2.5. Estimativa da frequência de alelos da resistência de S. frugiperda a indoxacarb

Para estimar a frequência de alelos de resistência do *S. frugiperda* a indoxacarb foi utilizado o método de F₂ *screen* proposto por Andow &Alstad (1998). As populações de campo foram coletadas em cultivos de milho nas safras de 2017 e 2018 provenientes dos principais estados produtores (Tabela 2.2). As lagartas coletadas foram transportadas para o laboratório e mantidas em dieta artificial até a fase de pupa. As pupas foram sexadas e individualizadas em copos plásticos (50 mL) em papel filtro umedecido para manter a umidade. Após a emergência dos adultos, os casais foram formados em copos plásticos (500 mL) e cada casal (P₀) foi considerado uma isolinha. Para cada isolinha, 96 larvas da geração F₁ foram criadas até a fase adulta e colocadas juntas em gaiolas para acasalamento. Os bioensaios foram realizados com lagartas de terceiro ínstar da geração de F₂.

Tabela 2.2 Populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas para estimar a frequência dos alelos de resistência a indoxacarb.

| Código da população | Local | Latitude | Longitude | Data |
|------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|-----------|
| - | 2017 | | | |
| BA 47 | Luís Eduardo Magalhães - BA | 11°57'34,60" | 46°05'54,06" | Dez 2016 |
| BA 48 | São Desidério - BA | 12°51'12,096" | 45°28'12,72" | Jul. 2017 |
| GO 41 | Rio Verde - GO | 17°42'58" | 51°10'46" | Dez. 2016 |
| MT 40 | Lucas do Rio Verde MT | 12°33'41,04" | 56°09'41,65" | Mar. 2017 |
| SP 24 | Casa Branca - SP | 21°34'49,87" | 47°05'20,51" | Dez.2016 |
| - | 2018 | | | |
| BA 49 | São Desidério - BA | 13° 15' 51,70" | 46° 08' 45,82" | Dez. 2017 |
| GO 46 | Rio Verde - GO | 17° 44′ 38,87" | 50° 51' 13,82" | Dez. 2017 |
| MT 45 | Lucas do Rio Verde - MT | 13° 09' 49,25" | 56° 00' 24,88" | Mar. 2018 |
| PR 78 | Cascavel - PR | 24° 45' 36,08" | 53° 40' 10,16" | Mar. 2018 |
| SP 28 | Casa Branca - SP | 22° 05' 57,08" | 47° 01' 39,58" | Abr. 2018 |

Para cada isolinha foram testadas 5 repetições de 24 lagartas de terceiro ínstar totalizando 120 lagartas. Foi utilizado a concentração diagnóstica de 100 µg mL⁻¹ para indoxacarb, de acordo com o método de bioensaio descrito anteriormente (item 2.2.2). A

isolinha foi considerada positiva quando pelo menos oito lagartas sobreviventes dos bioensaios atingiram a fase adulta, de acordo com o critério reportado por Andow & Alstad (1998).

2.2.6. Resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone e alguns outros inseticidas e proteínas Bt

Para avaliar os padrões de resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone e alguns outros inseticidas e proteínas Bt (Tabela 2.3), utilizou-se o mesmo método de bioensaio mencionado no item 2.2.3. Foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar provenientes das linhagens suscetível de referência e resistentes a cada inseticida/proteína Bt em bioensaios concentração-resposta para os inseticidas indoxacarb e metaflumizone. As lagartas foram expostas de seis a oito concentrações para ambos os inseticidas espaçadas logaritmicamente. O tratamento controle consistiu de água destilada mais o surfactante. Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que em cada concentração foram testadas pelo menos 72 lagartas de terceiro ínstar.

Tabela 2.3 Linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível e resistentes a diferentes inseticidas/proteínas Bt utilizadas na avaliação da resistência cruzada.

| Código da linhagem | Ingrediente ativo/ Proteína Bt | Local | Referência |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------|
| SUS | - | Laboratório | - |
| Diam - R | Chlorantraniliprole | Correntina, BA | (Bolzan et al. 2019) |
| Spin- R | Spinetoram | Barreiras, BA | (Lira et al. 2020) |
| Chlor - R | Chlorpyrifos | Luís Eduardo Magalhães, BA | (Nascimento 2019) |
| Lam - R | Lambda-Cyhalothrin | Palotina, PR | (Nascimento 2019) |
| Luf - R | Lufenuron | São Desidério, BA | (Nascimento 2019) |
| Teflu - R | Teflubenzuron | Sapezal, MT | (Nascimento 2019) |
| PW-R | Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F | São Desidério, MT | (Bernardi et al. 2015) |
| VIP - R | Vip3Aa20 | Lucas do Rio Verde, MT | (Bernardi et al. 2016) |

2.2.7. Análise de dados

Os dados de concentração-resposta de indoxacarb e metaflumizone foram submetidos à análise Probit mediante o uso do programa PoloPlus (LeOra software 2002) para

caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade e avaliação da resistência cruzada. Foram estimadas as CL_{50} s e CL_{99} s com seus correspondentes intervalos de confiança de 95% (CIs), coeficiente angular e o valor do qui-quadrado (χ^2). Para o padrão de resistência cruzada, a razão de resistência (RR) foi calculada dividindo-se o valor LC_{50} de cada linhagem resistente pelo valor LC_{50} correspondente da linhagem SUS.

Para estimar a concentração diagnóstica a ser utilizada no monitoramento da suscetibilidade, foi realizada a análise conjunta dos dados das linhas-básicas de suscetibilidade, de acordo com o método proposto por Sims et al. (1996). Na análise conjunta, os dados de mortalidade foram ajustados com um modelo binomial usando a função de conexão log-log complementar (gompit; PROC PROBIT). As populações avaliadas no monitoramento da resistência foram agrupadas por safra e ano para comparação de médias usando o teste bootstrap pareado do pacote ExpDes.pt do Software R (R Development Core Team 2020). A distribuição percentual de mortalidade dentro de cada combinação (safra e ano) foi analisada graficamente por boxplot, usando o pacote ggplot2 no R Software (R Development Core Team 2020).

Após a obtenção do número de isolinhas positivos e negativos, a frequência esperada do alelo de resistência a indoxacarb foi calculada de acordo com a seguinte fórmula, proposta por Andow e Alstad (1998).

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

onde q é a frequência estimada do alelo de resistência, S é o número de isolinas positivas, e N é o número de isolinhas testadas. Os intervalos de confiança foram obtidos usando a função binom.bayes do pacote binom em R Software (R Development Core Team 2020).

2.3. Resultados

A partir da caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de *S. frugiperda*, foi observada uma baixa variação na suscetibilidade entre as populações avaliadas para indoxacarb (4,6 vezes) e também para metaflumizone (2,6 vezes) (Tabela 2.4). As CL₅₀s variavam de 3,7 a 17,1μg mL⁻¹ e 4,6 a 15,3 μg mL⁻¹ para o indoxacarb e metaflumizone respectivamente. As populações provenientes da Bahia (BA 48), Goiás (GO 40) e Mato Grosso (MT 43) apresentaram a menor suscetibilidade para ambos os inseticidas.

Tabela 2.4 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone.

| Geração | n^1 | Coef. Ang. ± EP | CL ₅₀ (95% IC) ² | CL ₉₉ (95% IC) ³ | $\chi^2(\mathbf{gl})^4$ |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| | | | Indoxacarb | | |
| - | 1152 | $2,8 \pm 0,2$ | 3,7 (3,3 - 4,1) | 25,4 (20,5 - 33,5) | 6,7 (7) |
| F_2 | 696 | $2,0\pm0,1$ | 17,1 (13,4 - 22,0) | 244,0 (142,7 - 543,1) | 13,3 (7) |
| \mathbf{F}_1 | 929 | $1,\!8\pm0,\!1$ | 12,4 (10,8 - 14,2) | 258,7 (185,0 - 390,8) | 4,0 (7) |
| \mathbf{F}_4 | 1200 | $2,0\pm0,1$ | 6,7 (6,0 - 7,5) | 99,6 (77,1 - 135,5) | 6,1 (7) |
| \mathbf{F}_1 | 912 | $2,6\pm0,1$ | 10,4 (9,3 - 11,6) | 83,8 (66,5 - 111,3) | 5,4 (7) |
| \mathbf{F}_1 | 936 | $2,1\pm0,1$ | 3,7 (3,2 - 4,2) | 48,2 (36,2 - 69,2) | 6,0 (7) |
| F_5 | 696 | $3,0 \pm 0,2$ | 4,7 (4,0 - 5,5) | 27,9 (20,5 - 43,4) | 8,3 (7) |
| F_3 | 648 | $1,9 \pm 0,1$ | 7,8 (6,1 - 10,1) | 127,6 (71,5 - 313,4) | 10,1 (6) |
| | | | Metaflumizone | | |
| - | 660 | $3,1 \pm 0,2$ | 4,6 (3,9 - 5,4) | 25,5 (18,7 - 39,8) | 7,9 (7) |
| F_2 | 599 | $2,9\pm0,2$ | 11,8 (10,2 - 13,8) | 74,6 (54,8 - 114,2) | 6,3 (6) |
| \mathbf{F}_1 | 1120 | $2,7\pm0,2$ | 11,6 (10,0 - 13,1) | 85,7 (66,7 - 120,0) | 6,9 (7) |
| \mathbf{F}_4 | 711 | $2,5\pm0,2$ | 5,1 (4,1 - 6,3) | 43,8 (28,9 - 82,0) | 12,4 (7) |
| \mathbf{F}_{1} | 960 | $2,6\pm0,1$ | 15,3 (12,7 - 18,5) | 120,5 (82,5 - 206,4) | 13,9 (7) |
| \mathbf{F}_{1} | 648 | $3,1 \pm 0,3$ | 4,9 (3,9 - 6,2) | 28,0 (17,6 - 64,9) | 9,3 (5) |
| F_4 | 695 | $3,1 \pm 0,2$ | 4,8 (4,1 - 5,5) | 27,7 (19,6 - 46,6) | 11,4 (7) |
| F_3 | 695 | $2,6\pm0,2$ | 6,4 (5,7 - 7,3) | 51,3 (39,3 -71,8) | 4,6 (7) |
| | F ₂ F ₁ F ₄ F ₁ F ₅ F ₃ F ₂ F ₁ F ₄ F ₅ F ₃ F ₄ F ₁ | - 1152 F ₂ 696 F ₁ 929 F ₄ 1200 F ₁ 912 F ₁ 936 F ₅ 696 F ₃ 648 - 660 F ₂ 599 F ₁ 1120 F ₄ 711 F ₁ 960 F ₁ 648 F ₄ 695 | $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | Indoxacarb- 1152 $2,8 \pm 0,2$ $3,7 (3,3 - 4,1)$ F2 696 $2,0 \pm 0,1$ $17,1 (13,4 - 22,0)$ F1 929 $1,8 \pm 0,1$ $12,4 (10,8 - 14,2)$ F4 1200 $2,0 \pm 0,1$ $6,7 (6,0 - 7,5)$ F1 912 $2,6 \pm 0,1$ $10,4 (9,3 - 11,6)$ F1 936 $2,1 \pm 0,1$ $3,7 (3,2 - 4,2)$ F5 696 $3,0 \pm 0,2$ $4,7 (4,0 - 5,5)$ F3 648 $1,9 \pm 0,1$ $7,8 (6,1 - 10,1)$ Metaflumizone- 660 $3,1 \pm 0,2$ $4,6 (3,9 - 5,4)$ F2 599 $2,9 \pm 0,2$ $11,8 (10,2 - 13,8)$ F1 1120 $2,7 \pm 0,2$ $11,6 (10,0 - 13,1)$ F4 711 $2,5 \pm 0,2$ $5,1 (4,1 - 6,3)$ F1 960 $2,6 \pm 0,1$ $15,3 (12,7 - 18,5)$ F1 648 $3,1 \pm 0,3$ $4,9 (3,9 - 6,2)$ F4 695 $3,1 \pm 0,2$ $4,8 (4,1 - 5,5)$ | |

¹Número de lagartas testadas. ² Concentração letal (μg i.a. mL ⁻¹) da solução de inseticida aplicada que mata 50% dos indivíduos. ³Concentração letal (μg mL ⁻¹) da solução de inseticida aplicada que mata 99% dos indivíduos. ⁴Chi-quadrado e graus de liberdade.

Pela análise conjunta dos dados de mortalidade das linhas-básicas de suscetibilidade de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone, foi estimada uma concentração diagnóstica baseada na CL_{99} de cada inseticida para ser utilizada no monitoramento da suscetibilidade. A CL_{99} estimada para indoxacarb foi 76,7 (95% IC [57,4 - 113,0]) µg indoxacarb mL^{-1} (n=4262; inclinação [\pm SE] = 2,0 [\pm 0,1]; χ^2 =21,7; gl=4) e para metaflumizone foi 56,1 (95% CI [39,2 - 94,7]) µg metaflumizone mL^{-1} (n=3849; inclinação [\pm SE] = 2,5 [\pm 0,2]; χ^2 =24,9; gl=4). Baseado no limite superior do intervalo de confiança, foi estabelecida a concentração diagnóstica de 100 µg mL^{-1} de água para monitorar a suscetibilidade da *S. frugiperda* para ambos os inseticidas.

A partir dos dados de monitoramento da suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de *S. frugiperda* coletadas de 2017 a 2020 (Tabela 2.5), as maiores médias de

sobrevivência foram observadas nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais para ambos os inseticidas, com a maior média de sobrevivência para as populações MG 28 (12,2%), GO 49 (12,0%) e BA 47 (10,6%) para indoxacarb e BA 48 (12,7%), MT 47 (9,1%) e MT 48 (7,6%) para metaflumizone. Com base na sobrevivência média na concentração diagnóstica ao longo das safras, verificou-se que houve um pequeno aumento na sobrevivência de lagartas testadas, principalmente para indoxacarb nas últimas safras (Figura 2.3).

Tabela 2.5 Monitoramento da suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas em cultivos de milho no período de 2017 a 2020.

| Código da População | Local _ | % Sobrevivência (IC) ¹ | | | | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------|--|--|--|
| Codigo da População | Locai | Indoxacarb | Metaflumizone | | | |
| Primeira safra 2017 | | | | | | |
| BA 47 | Luís Eduardo Magalhães – BA | 10,6a (7,0 - 14,2) | 6,5a (3,7 - 9,2) | | | |
| GO 41 | Rio Verde – GO | 2,5b (0,3 - 4,7) | 2,7b (0,6 - 4,8) | | | |
| GO 42 | Cristalina – GO | 2,7b (0,7 - 4,7) | 0,4b (0,0 – 1,0) | | | |
| MG 25 | Tupaciguara – MG | 2,9b (1,5 - 4,4) | 3,1b (1,0 - 5,3) | | | |
| PR 69 | Tibagi – PR | 1,5b (0,6 - 2,3) | 0,2b (0,0 - 0,6) | | | |
| PR 70 | Cascavel – PR | 0,4b (0,0 – 1,0) | 0,4b (0,0 – 1,0) | | | |
| RS 22 | Santo Antônio – RS | 3,3b (1,2 - 5,4) | 1,2b (0,1 - 2,4) | | | |
| SC 6 | Guatambu - SC | 1,0b (0,0 - 2,0) | 0,4b (0,0 – 1,0) | | | |
| SP 24 | Casa Branca – SP | 2,3b (0,7 - 3,9) | 0,8b (0,0 - 1,8) | | | |
| | Segunda safra 2 | 017 | | | | |
| GO 43 | Montividiu – GO | 0,2 (0,0 - 0,6) | 1,0b (0,0 - 2,7) | | | |
| MS 25 | Dourados -MS | 1,0 (0,0 - 2,0) | 0,8b (0,1 - 1,6) | | | |
| MT 40 | Lucas do Rio Verde MT | 0,2 (0,0 - 0,6) | 2,7a (1,0 - 4,4) | | | |
| MT 41 | Sapezal – MT | 1,5 (0,4 - 2,5) | 0,6b (0,0 - 1,3) | | | |
| MT 42 | Campo Verde – MT | 1,2 (0,1 - 2,4) | 3,1a (1,1 - 5,2) | | | |
| PR 71 | Cascavel – PR | 1,2 (0,0 - 2,6) | 0,4b (0,0 - 1,2) | | | |
| PR 72 | Luiziana – PR | 0,4 (0,0 - 1,2) | 0,8b (0,1 - 1,6) | | | |
| PR 73 | Sertanópolis – PR | 1,7 (0,2 - 3,2) | 0,2b (0,0 - 0,6) | | | |
| SP 25 | Pirassununga-SP | 0,4 (0,0 - 1,2) | 0,6b (0,0 - 1,3) | | | |
| | Entressafra 2017/ | /2018 | | | | |
| BA 48 | São Desidério – BA | 8,1a (5,1 - 11,2) | 12,7a (8,1 - 17,4) | | | |
| GO 44 | Rio Verde- GO | 3,5b (1,8 - 5,2) | 0,2b (0,0 - 0,6) | | | |
| MS 26 | Chapadão do Sul – MS | 4,2b (2,3 - 6,0) | 2,1b (0,6 - 3,6) | | | |
| | | | | | | |

| Código do Domulosão | | % Sobrevivência (IC) ¹ | | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|--|
| Código da População | Local - | Indoxacarb | Metaflumizone | |
| MT 44 | Sorriso – MT | 1,2b (0,0 - 3,7) | 3,7b (1,6 - 5,7) | |
| SP 26 | Casa Branca – SP | 4,4b (2,3 - 6,5) | 1,5b (0,4 - 2,5) | |
| | Primeira safra 2 | 2018 | | |
| BA 49 | São Desidério - BA | 4,4 (1,9 - 6,9) | 3,5b (1,3 - 5,8) | |
| GO 45 | Cristalina - GO | 4,1 (2,3 - 5,6) | 5,7a (3,2 - 8,0) | |
| GO 46 | Rio Verde - GO | 3,6 (1,0 - 6,1) | 2,0b (0,6 - 3,1) | |
| MG 26 | Araguari - MG | 4,1 (1,7 - 6,2) | 5,9a (2,3 - 9,4) | |
| PR 75 | Castro - PR | 1,1 (0,0 - 2,0) | 1,3b (0,4 - 2,1) | |
| PR 76 | Cascavel- PR | 4,7 (2,0 - 7,2) | 1,6b (0,2 - 2,7) | |
| RS 26 | Carazinho - RS | 1,1 (0,2 - 1,8) | 1,3b (0,4 - 2,1) | |
| SC 7 | Chapecó - SC | 2,0 (0,6 - 3,1) | 3,4b (1,3 - 5,3) | |
| SP 27 | Casa Branca - SP | 2,0 (0,1 - 3,7) | 2,0b (0,5 - 3,3) | |
| | Segunda safra 2 | 2018 | | |
| GO 47 | Rio Verde - GO | 5,4a (3,3 - 7,6) | 4,2b (1,9 - 6,5) | |
| MS 28 | Dourados -MS | 2,0b (0,9 - 2,8) | 2,4b (1,0 - 3,5) | |
| MT 45 | Lucas do Rio Verde - MT | 1,6b (0,4 - 2,5) | 0,3c (0,0 - 0,6) | |
| MT 46 | Sapezal - MT | 1,8b (0,4 - 2,9) | 0,7c (0,0 - 1,3) | |
| MT 47 | Campo Verde - MT | 0,7b (0,0 - 1,3) | 9,1a (6,0 - 11,9) | |
| PR 77 | Campo Mourão -PR | 0,7b (0,0 - 1,3) | 0,9c (0,1 - 1,6) | |
| PR 78 | Cascavel - PR | 0.5b (0.0 - 1.0) | 0,9c (0,1 - 1,6) | |
| PR 79 | Sertanópolis - PR | 5,7a (3,1 - 8,2) | 0,7c (0,0 - 1,3) | |
| SP 28 | Casa Branca - SP | 1,98b (0,5 - 3,3) | 1,3c (0,2 - 2,3) | |
| | Entressafra 2018. | /2019 | | |
| BA 50 | Luís Eduardo Magalhães - BA | 10,0a (5,0 – 15,0) | 1,9b (0,2 - 3,5) | |
| GO 49 | Rio Verde - GO | 12,0a (9,5 - 14,3) | 1,8b (0,6 - 2,8) | |
| MS 29 | Chapadão do Sul - MS | 2,8b (0,8 - 4,6) | 1,8b (0,0 - 3,7) | |
| MT 48 | Lucas do Rio Verde - MT | 8,0a (4,1 - 11,7) | 7,6a (5,4 - 9,6) | |
| SP 29 | Casa Branca - SP | 1,6b (0,1 - 2,8) | 2,8b (0,5 - 4,9) | |
| | Primeira safra 2 | 2019 | | |
| BA 51 | Luís Eduardo Magalhães - BA | 6,0b (2,6 - 9,5) | 5,0a (2,3 - 7,7) | |
| GO 50 | Cristalina - GO | 5,3b (2,8 - 7,6) | 1,6b (0,4 - 2,5) | |
| GO 51 | Santa Helena de Goiás- GO | 4,7b (2,0 - 7,2) | 2,8b (1,1 - 4,3) | |
| MG 28 | Araguari - MG | 12,2a (7,7 - 16,5) | 2,8b (1,3 - 4,1) | |
| PR 80 | Toledo - PR | 1,3b (0,2 - 2,3) | 1,6b (0,2 - 2,7) | |

| Cádigo do Donylosão | Local | % Sobrevivência (IC) ¹ | | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|--|
| Código da População | Local . | Indoxacarb | Metaflumizone | |
| PR 81 | Ponta Grossa - PR | 4,1b (1,4 - 6,5) | 0,7b (0,0 - 1,3) | |
| RS 28 | Santo Ângelo - RS | 2,2b (0,8 - 3,3) | 2,2b (0,6 - 3,6) | |
| SC 8 | Chapecó – SC | 2,6b (0,8 - 4,2) | 0.5b (0.0 - 1.0) | |
| SP 30 | Casa Branca – SP | 3,6b (1,7 - 5,3) | 1,3b (0,2 - 2,3) | |
| | Segunda safra 2 | 2019 | | |
| GO 52 | Rio Verde – GO | 2,3b (0,6 - 4,0) | 6,0a (3,3 - 8,8) | |
| MS 31 | Dourados -MS | 0,8b (0,0 - 1,8) | 0,0b (0,0 - 0,0) | |
| MT 50 | Lucas do Rio Verde – MT | 6,5a (3,1 - 9,8) | 2,1b (0,8 - 3,3) | |
| MT 51 | Sapezal-MT | 7,5a (4,4 - 10,6) | 6,7a (3,8 - 9,5) | |
| MT 52 | Campo Verde – MT | 8,1a (4,9 - 11,3) | 5,2a (2,8 - 7,6) | |
| PR 82 | Toledo – PR | 0,4b (0,0 – 1,0) | 3,3b (1,9 - 4,7) | |
| PR 83 | Campo Mourão -PR | 2,5b (1,1 - 3,9) | 3,5b (1,7 - 5,3) | |
| PR 84 | Londrina – PR | 2,9b (0,9 – 5,0) | 0,4b (0,0 - 1,2) | |
| SP 31 | Casa Branca – SP | 1,7b (0,4 - 2,9) | 5,8a (3,0 - 8,6) | |
| | Entressafra 2019 | /2020 | | |
| BA 52 | Correntina – BA | 7,5a (4,4 - 10,6) | 6,0 (2,6 - 9,5) | |
| GO 53 | Santa Helena de Goiás – GO | 3,1b (1,0 - 5,3) | 3,5 (1,4 - 5,7) | |
| MS 32 | Chapadão do Sul – MS | 10,0a (6,6 - 13,4) | 2,7 (0,5 - 4,9) | |
| MT 53 | Lucas do Rio Verde – MT | 3,9b (1,9 - 6,0) | 3,5 (2,4 - 4,6) | |
| SP 32 | Casa Branca – SP | 1,9b (0,6 - 3,1) | 3,9 (2,2 - 5,8) | |
| | Primeira safra 2 | 2020 | | |
| BA 53 | Luís Eduardo Magalhães – BA | 4,9b (3,0 - 6,8) | 1,6b (0,5 - 2,6) | |
| GO 54 | Rio Verde – GO | 4,9b (2,9 - 6,9) | 3,8a (1,1 - 6,5) | |
| GO 55 | Cristalina – GO | 8,0a (4,7 - 11,3) | 3,8a (2,0 - 5,7) | |
| MG 29 | Uberlândia | 5,1b (2,6 - 7,6) | 3,6a (1,9 - 5,3) | |
| PR 85 | Tibagi - PR | 2,2b (0,8 - 3,6) | 0,52b (0,0 - 1,1) | |
| PR 86 | Corbélia – PR | 2,2b (0,8 - 3,6) | 2,2b (0,9 - 3,4) | |
| RS 29 | Selbach – PR | 2,4b (1,1 - 3,6) | 0,7a (0,1 - 1,4) | |
| SC 9 | Chapecó – SC | 2,6b (0,8 - 4,4) | 0,3b (0,1 - 0,7) | |
| SP 33 | Casa Branca – SP | 2,8b (1,1 - 4,5) | 0,7a (0,1 - 1,4) | |
| | Segunda safra 2 | 2020 | | |
| GO 56 | Rio Verde – GO | 0,9b (0,0 - 1,9) | 3,6a (2,1 - 3,6) | |
| MS 34 | Dourados -MS | 0,3c (0,0 - 0,7) | 2,8a (2,0 - 2,8) | |
| MT 54 | Sapezal-MT | 0,3c (0,0 - 0,7) | 1,6b (1,2 - 1,6) | |

| Código da População | Local | % Sobrevivência (IC) ¹ | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------|--|--|
| Courgo da 1 opulação | Local | Indoxacarb | Metaflumizone | | |
| MT 55 | Lucas do Rio Verde-MT | 3,8b (2,2 - 5,5) | 1,8b (1,5 - 1,8) | | |
| MT 56 | Campo Verde-MT | 0,7c (0,1 - 1,4) | 1,3b (1,0 - 1,3) | | |
| PR 87 | Mamborê -PR | 0,5c (0,0 - 1,1) | 0,7b (0,9 - 0,7) | | |
| PR 88 | Cascavel -PR | 5,9a (3,6 - 8,2) | 1,8b (1,1 - 1,8) | | |
| PR 89 | Londrina-PR | 0,9c (0,0 - 1,9) | 2,4a (1,2 - 2,4) | | |
| SP 34 | Casa Branca - SP | 2,4b (1,0 - 3,8) | 4,3a (1,8 - 4,3) | | |

¹As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de bootstrap (p> 0,05).

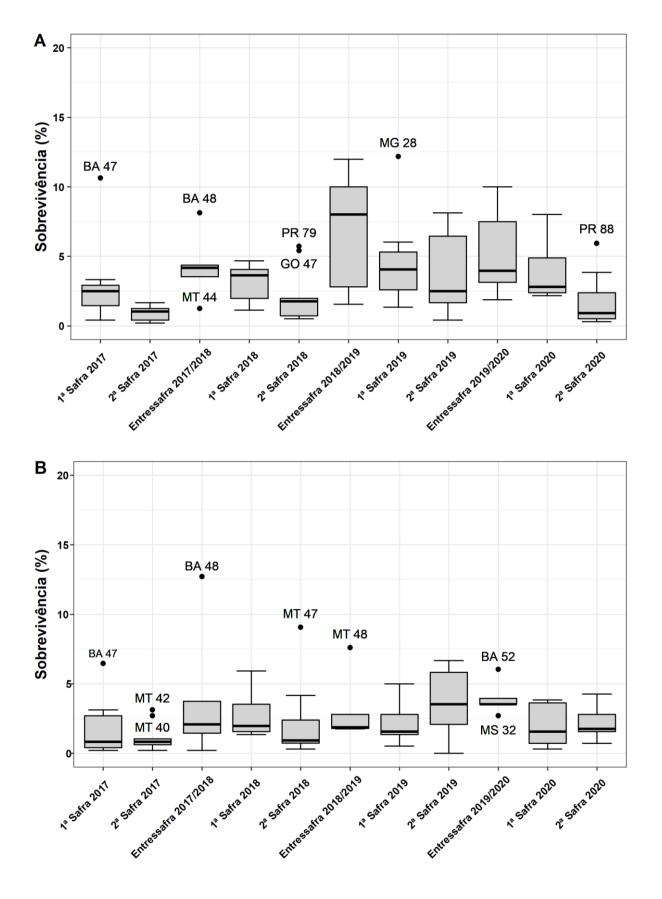


Figura 2.3 Boxplot ilustrando a porcentagem de sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* expostas na concentração diagnóstica no monitoramento da suscetibilidade dos inseticidas (A) indoxacarb e (B) metaflumizone ao longo das safras (2017 a 2020) no Brasil.

A frequência de alelos de resistência ao indoxacarb foi calculada de 2017 a 2018, sendo testadas 789 isolinhas utilizando o método F₂ screen (Tabela 2.6). A média de sobrevivência variou de 0,29 a 9,95%. As populações coletadas nos estados da Bahia e Goiás apresentaram a maior média de sobrevivência e as populações que mostraram isolinhas positivas são provenientes dos estados da Bahia, Goiás e São Paulo. A frequência média estimada foi de 0,0698 em 2017 e 0,0143 em 2018, já a frequência média estimada total foi de 0,0452.

Tabela 2.6 Frequência de alelos que conferem resistência a indoxacarb em populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas safras de milho 2017/2018 no Brasil.

| Código da | Isolinhas | Isolinhas | Isolinhas | % Sobrevivência | Isolinhas | Frequência estimada |
|-----------|----------------|----------------|-----------|-----------------------|-----------|--------------------------|
| População | $\mathbf{P_0}$ | $\mathbf{F_1}$ | testadas | ±SE | positivas | (IC 95%) |
| | | | | 2017 | | |
| BA 47 | 151 | 101 | 83 | 9,95 (± 0,82) | 53 | 0,1588 (0,1220 - 0,1994) |
| BA 48 | 168 | 118 | 115 | $3,38 \ (\pm \ 0,75)$ | 59 | 0,1282 (0,0995 - 0,1599) |
| GO 41 | 88 | 54 | 37 | $3,11 \ (\pm 0,69)$ | 6 | 0,0449 (0,0183 - 0,0824) |
| MT 40 | 152 | 122 | 110 | $0.58 \ (\pm \ 0.10)$ | 0 | 0,0022 (0,0001 - 0,0082) |
| SP 24 | 150 | 114 | 97 | $0,99 (\pm 0,21)$ | 5 | 0,0151 (0,0056 - 0,0293) |
| Subtotal | 709 | 509 | 442 | $3,60~(\pm 0,51)$ | 123 | 0,0698 (0,0584 - 0,0821) |
| | | | | 2018 | | |
| BA 49 | 177 | 102 | 100 | $1,42 \ (\pm \ 0,25)$ | 19 | 0,1282 (0,0995 - 0,1599) |
| GO 46 | 120 | 64 | 61 | $1,42~(\pm~0,23)$ | 0 | 0,0040 (0,0001 - 0,0147) |
| MT 45 | 140 | 80 | 78 | $0,69 \ (\pm \ 0,15)$ | 0 | 0,0032 (0,0001 - 0,0116) |
| PR 78 | 125 | 56 | 53 | $0,29 \ (\pm \ 0,10)$ | 0 | 0,0046 (0,0001 - 0,0168) |
| SP 28 | 139 | 56 | 55 | $0,39 \ (\pm \ 0,12)$ | 0 | 0,0044 (0,0001 - 0,0162) |
| Subtotal | 701 | 358 | 347 | $0.84~(\pm0.17)$ | 19 | 0,0143 (0,0088 - 0,0212) |
| Total | 1,410 | 867 | 789 | 2,80 (± 0,18) | 142 | 0,0452 (0,0382 - 0,0527) |

Todas as linhagens resistentes de *S. frugiperda* testadas apresentaran alta suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone (Tabela 2.7). A variação da razão de resistência foi baixa, variando de 1,4 a 3,5 vezes para indoxacarb e 1,0 a 2,6 vezes para metaflumizone.

Tabela 2.7 Respostas a indoxacarb e metaflumizone em diferentes linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível e resistente a inseticidas/proteínas Bt.

| Código da linhagem | n^1 | Coef. ang.± EP | CL ₅₀ (IC 95%) ² | $\chi^2 (gl)^3$ | RR ⁴ | | | |
|--------------------|-------|----------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------|--|--|--|
| Indoxacarb | | | | | | | | |
| SUS | 1152 | $2,8 \pm 0,2$ | 3,7 (3,3 -4,1) | 6,8 (7) | - | | | |
| Diam - R | 768 | $2,9 \pm 0,3$ | 4,5 (3,7 - 5,4) | 5,8 (5) | 1,5 | | | |
| Spin- R | 600 | $3,2 \pm 0,4$ | 7,3 (5,7 - 8,9) | 6,8 (6) | 2,0 | | | |
| Chlor – R | 576 | $2,4 \pm 0,3$ | 11,5 (8,7 - 14,4) | 6,4 (6) | 3,1 | | | |
| Lam - R | 504 | $3,1 \pm 0,3$ | 13,1 (9,8 - 17,3) | 8,3 (5) | 3,5 | | | |
| Luf - R | 576 | $2,6 \pm 0,2$ | 9,6 (7,4 - 12,1) | 8,5 (6) | 2,6 | | | |
| Teflu - R | 600 | $3,7 \pm 0,4$ | 7,9 (6,9 - 8,9) | 4,2 (6) | 2,1 | | | |
| PW - R | 600 | $3,1 \pm 0,2$ | 8,4 (7,5 - 9,5) | 4,6 (6) | 2,3 | | | |
| VIP - R | 552 | 2.8 ± 0.3 | 5,3 (3,9 -6,8) | 8,9 (5) | 1,4 | | | |
| | | Metaflumizo | one | | | | | |
| SUS | 660 | $3,1 \pm 0,2$ | 4,6 (3,9 - 5,4) | 7,9 (7) | - | | | |
| Diam - R | 576 | $3,7\pm0,4$ | 6,1 (5,3 -6,9) | 3,0 (6) | 1,3 | | | |
| Spin- R | 456 | $3,7 \pm 0,5$ | 7,6 (6,3 – 9,0) | 3,5 (5) | 1,7 | | | |
| Chlor - R | 597 | $2,8 \pm 0,3$ | 12,3 (10,4 - 14,2) | 2,8 (6) | 2,7 | | | |
| Lam - R | 503 | $2,9 \pm 0,2$ | 8,3 (7,3 - 9,5) | 3,4 (6) | 1,8 | | | |
| Luf - R | 575 | $3,7 \pm 0,3$ | 8,2 (7,2 - 9,2) | 2,5 (6) | 1,7 | | | |
| Teflu - R | 454 | $3,6 \pm 0,3$ | 6,7 (4,9 - 8,7) | 9,1 (5) | 1,5 | | | |
| PW - R | 528 | $4,3 \pm 0,4$ | 4,6 (3,9 - 5,4) | 7,3 (5) | 1,0 | | | |
| VIP - R | 552 | $2,9\pm0,2$ | 11,8 (10,2 - 13,8) | 6,3 (6) | 2,6 | | | |

 $^{^{1}}$ Número de lagartas testadas. 2 Concentração letal (μg i.a. mL $^{-1}$) da solução de inseticida aplicada que mata 50% dos indivíduos. 4 Chi-quadrado e graus de liberdade. 5 Razão de resistência (RR) = CL $_{50}$ da linhagem testada/CL $_{50}$ da linhagem suscetível SUS.

2.4. Discussão

Foi observada uma baixa variação na suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de *S. frugiperda* (menor que 5 vezes). Estas variações podem ser atribuídas principalmente à variação natural entre as populações de campo, pois a pressão de seleção destes inseticidas no controle de *S. frugiperda* e de outros lepidópteros pragas ainda é muito baixa em comparação com o uso de inseticidas diamidas, benzoilureias e espinosinas. A contribuição do indoxacarb e da metaflumizone no controle de *S. frugiperda* ainda é baixa (< 2%), comparada ao mercado total de inseticidas utilizados manejo das pragas de lepidópteros no Brasil (Spark Smarter Decisions). A baixa variação na suscetibilidade aos inseticidas

bloqueadores dos canais de sódio também tem sido relatada para populações de *Helicoverpa* punctigera (Lepidoptera: Noctuidae) para indoxacarb (Bird & Walker 2019) e *P. xylostella* para metaflumizone (Khakame et al. 2013). Tais variações naturais são esperadas entre as populações de campo em resposta aos inseticidas (Robertson et al. 1995), especialmente quando a frequência do alelo de resistência ainda é baixa (Kranthi 2005).

A frequência dos alelos de resistência nas populações de *S. frugiperda* a indoxacarb avaliadas em 2017 e 2018 foi baixa. Foram observadas isolinhas positivas pelo método F₂ *screen* para indoxacarb, principalmente para as populações coletadas nos estados da Bahia com frequência média do alelo que confere resistência de 0,0452 (0,0382 – 0,0527 IC 95%), valores esses próximos da frequência de resistência relatada em *H. armigera* para indoxacarb na Austrália (Bird et al. 2017).

A suscetibilidade das populações de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone variou geograficamente e temporalmente nos nove estados diferentes do Brasil de 2017 a 2020; contudo, a sobrevivência na concentração diagnóstica de indoxacarb e metaflumizone em populações de S. frugiperda avaliadas foi relativamente baixa. As populações de S. frugiperda provenientes dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais apresentaram as maiores médias de sobrevivência na concentração diagnótica. Nestes estados localizados no Cerrado brasileiro há uma grande expansão agrícola e as condições climáticas permitem o cultivo de duas ou três safras por ano em áreas irrigadas (Pereira et al. 2012, Rada 2013, Strassburg et al. 2017). Assim, o sistema de produção intensivo no Cerrado brasileiro e a ampla plasticidade biológica de S. frugiperda favorecem o estabelecimento de uma alta densidade populacional e a pressão de seleção com o uso de inseticidas e culturas Bt tem sido muito elevada. Diversos casos de resistência de S. frugiperda a diferentes inseticidas e proteínas Bt no Brasil já foram relatados principalmente com populações da região do Cerrado brasileiro (Carvalho et al. 2013, Farias et al. 2014, Bernardi et al. 2016, Nascimento et al. 2016, Omoto et al. 2016, Okuma et al. 2018, Bolzan et al. 2019, Lira et al. 2020). Além disso, já foram relatados casos de resistência ao indoxacarb em outras espécies de pragas no Brasil, como em P. xylostella (Santos et al. 2011) e S. zeamais (Haddi et al. 2015) com mais de 25 e 215 vezes a razão de resistência, respectivamente. Embora o uso comercial de metaflumizone seja mais recente no Brasil, já foi relatado resistência de T. absoluta com mais de 21 vezes razões de resistência (Silva et al. 2016), demonstrando o potencial de seleção da resistência dos inseticidas bloqueadores de canais de sódio a diferentes pragas de insetos.

Nossos dados de monitoramento de suscetibilidade também indicaram aumento na sobrevivência de lagartas testadas na concentração diagnóstica ao longo das safras avaliadas,

tanto ao indoxacarb quanto à metaflumizone (Tabela 2.4), indicando a possibilidade da diminuição da suscetibilidade a ambos os inseticidas se alguma estratégia de manejo da resistência a inseticidas não for implementada. Esta diminuição na suscetibilidade de *S. frugiperda* a estes inseticidas poderia ser a resposta do uso intenso de inseticidas com a detecção da espécie invasora *H. armigera* no Brasil, pois altas infestações de *H. armigera* foram detectadas nas safras de 2012/2013 e 2013/2014 no Brasil, e uma das medidas emergenciais de controle foi o uso de indoxacarb (Czepak et al. 2013, Specht et al. 2013, de Freitas Bueno & Sosa-Gómez 2014, Pomari-Fernandes et al. 2015).

Neste estudo, não foi detectada resistência cruzada entre inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) e outros inseticidas (chlorpyrifos, lambdacyhalothrin, lufenuron, teflubenzuron, spinetoram e chlorantraniliprole) e proteínas Bt (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F e Vip3Aa20). (Tabela 2.7). A ausência de resistência cruzada entre as linhagens resistentes a inseticidas e proteínas Bt aos bloqueadores de canais de sódio também foi relatada a outros insetos praga (Ramasubramanian & Regupathy 2004, Sayyed et al. 2005, Hewa-Kapuge et al. 2009, Khakame et al. 2013, Bird & Downes 2014, Xu et al. 2019). Indoxacarb e metaflumizone são inseticidas do grupo bloqueadores de canais de sódio que bloqueiam o fluxo de íons de sódio para a célula nervosa impedindo a transmissão do impulso nervoso, resultando em paralisia e morte de insetos (Wing et al. 2000, Zhang et al. 2016, Silver et al. 2017). Os piretroides são inseticidas que atuam nos mesmos canais, mas de maneira diferente, onde os piretroides modulam os canais de sódio e permitem um fluxo excessivo de sódio na célula causando impulsos repetitivos até a exaustão e morte (Soderlund 2012, Dong et al. 2014, Zhorov & Dong 2017). Assim, tanto o indoxacarb quanto metaflumizone são excelentes candidatos a serem utilizados na estratégia de rotação de inseticidas em programas de manejo de resistência de S. frugiperda a inseticidas.

Em geral, a suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone ainda é alta nas populações de *S. frugiperda* no Brasil. Não foi detectada resistência cruzada entre linhagens resitentes aos principais inseticidas e proteínas Bt a indoxacarb e a metaflumizone, que permitem o uso destes inseticidas em uma estratégia de rotação. Estas descobertas mostraram que os inseticidas bloqueadores de canais de sódio são ferramentas importantes a serem exploradas nas estratégias no manejo da resistência a inseticidas de *S. frugiperda* no Brasil.

Referências

- **Andow, D. A., and D. N. Alstad. 1998.** F₂ Screen for Rare Resistance Alleles. J. Econ. Entomol. 91: 572–578.
- Bernardi, D., E. Salmeron, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, P. M. Dourado, R. A. Carvalho, S. Martinelli, G. P. Head, and C. Omoto. 2015. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. PLoS One. 10: e0140130.
- Bernardi, O., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, D. M. Okuma, L. L. Miraldo, J. Fatoretto, F. C. Medeiros, T. Burd, and C. Omoto. 2016. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. Pest Manag. Sci. 72: 1794–1802.
- **Bird, L. J., and S. J. Downes**. **2014**. Toxicity and Cross-Resistance of Insecticides to Cry2Ab-Resistant and Cry2Ab-Susceptible *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 107: 1923–1930.
- **Bird, L. J., L. J. Drynan, and P. W. Walker**. **2017**. The Use of F₂ Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate, Chlorantraniliprole, and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 110: 651–659.
- **Bird, L. J., and P. W. Walker**. **2019**. Baseline Susceptibility of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Indoxacarb, Emamectin Benzoate, and Chlorantraniliprole. J. Econ. Entomol. 112: 818–826.
- Bolzan, A., F. E. Padovez, A. R. Nascimento, I. S. Kaiser, E. C. Lira, F. S. Amaral, R. H. Kanno, J. B. Malaquias, and C. Omoto. 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. Pest Manag. Sci. 75: 2682–2689.
- Carvalho, R. A., C. Omoto, L. M. Field, M. S. Williamson, and C. Bass. 2013. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. PLoS One. 8: e62268.
- Czepak, C., K. C. Albernaz, L. M. Vivan, H. O. Guimarães, and T. Carvalhais. 2013.

 Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesqui. Agropecuária Trop. 43: 110–113.
- **Demirci, Ö., K. Güven, D. Asma, S. Öğüt, and P. Uğurlu. 2018**. Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 147: 749–758.

- Dong, K., Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu, L. Wang, K. Silver, and B. S. Zhorov. **2014**. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 50: 1–17.
- Farias, J. R., D. A. Andow, R. J. Horikoshi, R. J. Sorgatto, P. Fresia, A. C. dos Santos, and C. Omoto. 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Crop Prot. 64: 150–158.
- **de Freitas Bueno, A., and D. R. Sosa-Gómez**. **2014**. The Old World Bollworm in the Neotropical Region: The Experience of Brazilian Growers with *Helicoverpa Armigera*. Outlooks Pest Manag. 25: 261–264.
- Ganiger, P. C., H. M. Yeshwanth, K. Muralimohan, N. Vinay, A. R. V. Kumar, and K. Chandrashekara. 2018. Occurrence of the New Invasive Pest, Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the Maize Fields of Karnataka, India. Curr. Sci. 115: 621.
- Goergen, G., P. L. Kumar, S. B. Sankung, A. Togola, and M. Tamò. 2016. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. PLoS One. 11: e0165632.
- Haddi, K., L. P. Mendonca, M. F. Dos Santos, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira. 2015.
 Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 108: 362–369.
- Hewa-Kapuge, S., S. McDougall, and A. A. Hoffmann. 2009. Effects of Methoxyfenozide, Indoxacarb, and Other Insecticides on the Beneficial Egg Parasitoid *Trichogramma* nr. brassicae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Under Laboratory and Field Conditions. J. Econ. Entomol. 96: 1083–1090.
- Jing, D., J. Guo, Y. Jiang, J. Zhao, A. Sethi, K. He, and Z. Wang. 2020. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. Insect Sci. 1744-7917.12700.
- **Kasten, P., P. AACM, and P. PARRA JR**. **1978**. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1977) em duas dietas artificiais e substrato natural. Rev. Agric. 53: 68–78.
- **Khakame, S. K., X. Wang, and Y. Wu**. **2013**. Baseline Toxicity of Metaflumizone and Lack of Cross Resistance Between Indoxacarb and Metaflumizone in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 106: 1423–1429.

- **Kranthi, K. 2005**. Insecticide resistance monitoring, mechanisms and management manual, Cent. Inst. Cott. Res. Nagpur Pp.
- **LeOra software**. **2002**. Polo-plus: Probit and logit analysis computer program. Version 1.0, LeOra Software, Berkeley, CA.
- Lira, E. C., A. Bolzan, A. R. B. Nascimento, F. S. A. Amaral, R. H. Kanno, I. S. Kaiser, and C. Omoto. 2020. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) to spinetoram: Inheritance and cross-resistance to spinosad. Pest Manag. Sci. 76: 2674–2680.
- McCann, S. F., G. D. Annis, R. Shapiro, D. W. Piotrowski, G. P. Lahm, J. K. Long, K. C. Lee, M. M. Hughes, B. J. Myers, S. M. Griswold, B. M. Reeves, R. W. March, P. L. Sharpe, P. Lowder, W. E. Barnette, and K. D. Wing. 2001. The discovery of indoxacarb: Oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. Pest Manag. Sci. 57: 153–164.
- Montezano, A. D. G., A. Specht, D. G. Montezano, and A. Specht. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. African Entomol. 26: 286–300.
- **Nascimento, A. 2019**. Exploiting next generation sequencing techniques (NGS) to identify molecular markers for monitoring the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides and Bt proteins. Ph.D. dissertation, University of São Paulo (USP), Piracicaba.
- Nascimento, A. R. B. do, J. R. Farias, D. Bernardi, R. J. Horikoshi, and C. Omoto. 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. Pest Manag. Sci. 72: 810–815.
- Nehare, S., B. S. Ghodki, G. K. Lande, V. Pawade, and A. S. Thakare. 2010. Inheritance of resistance and cross resistance pattern in indoxacarb-Resistant diamondback moth *Plutella xylostella* L. Entomol. Res. 40: 18–25.
- Okuma, D. M., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, A. P. Silva, and C. Omoto. 2018. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. Pest Manag. Sci. 74: 1441–1448.
- Omoto, C., O. Bernardi, E. Salmeron, R. J. Sorgatto, P. M. Dourado, A. Crivellari, R. A. Carvalho, A. Willse, S. Martinelli, and G. P. Head. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. Pest Manag. Sci. 72: 1727–1736.
- Pereira, P. A. A., G. B. M. Jr, C. A. Santana, and E. Alves. 2012. The development of Brazilian agriculture and future challenges. Agric. Food Secur. 1:4.
- **Pomari-Fernandes, A., A. De Freitas Bueno, and D. R. Sosa-Gómez**. **2015**. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. Curr. Agric. Sci. Technol. 21.

- R Development Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rada, N. 2013. Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle. Food Policy. 38: 146–155.
- **Ramasubramanian, T., and A. Regupathy**. **2004**. Pattern of cross-resistance in pyrethroid-selected populations of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep., Noctuidae) from India. J. Appl. Entomol. 128: 583–587.
- Robertson, J. L., H. K. Preisler, S. S. Ng, L. A. Hickle, and W. D. Gelernter. 1995. Natural Variation: A Complicating Factor in Bioassays with Chemical and Microbial Pesticides. J. Econ. Entomol. 88: 1–10.
- Santos, V., H. de Siqueira, J. da Silva, and M. de Farias. 2011. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 40: 264–270.
- Sayyed, A. H., M. N. R. Attique, A. Khaliq, and D. J. Wright. 2005. Inheritance of resistance and cross-resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. Pest Manag. Sci. 61: 636–642.
- Silva, G. A., M. C. Picanço, L. Bacci, A. L. B. Crespo, J. F. Rosado, and R. N. C. Guedes. **2011**. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 67: 913–920.
- Silva, T. B. M., W. M. Silva, M. R. Campos, J. E. Silva, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. Crop Prot. 79: 80–86.
- **Silver, K., K. Dong, and B. S. Zhorov**. **2017**. Molecular Mechanism of Action and Selectivity of Sodium Ch annel Blocker Insecticides. Curr. Med. Chem. 24: 2912–2924.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T. B. Stone, M. A. Caprio, and F. L. Gould. 1996. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins, pp. 229–242. *In*.
- **Soderlund, D. M. 2012**. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch. Toxicol. 86: 165–181.
- Specht, A., D. R. Sosa-Gómez, S. V. de Paula-Moraes, and S. A. C. Yano. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. Pesqui. Agropecuária Bras. 48: 689–692.

- **Stokstad, E. 2017**. New crop pest takes Africa at lightning speed. Science (80-.). 356: 473–474.
- Strassburg, B. B. N., T. Brooks, R. Feltran-Barbieri, A. Iribarrem, R. Crouzeilles, R. Loyola, A. E. Latawiec, F. J. B. Oliveira Filho, C. A. de M. Scaramuzza, F. R. Scarano, B. Soares-Filho, and A. Balmford. 2017. Moment of truth for the Cerrado hotspot. Nat. Ecol. Evol. 1: 0099.
- Wanumen, A. C., G. A. Carvalho, P. Medina, E. Viñuela, and Á. Adán. 2016. Residual Acute Toxicity of Some Modern Insecticides Toward Two Mirid Predators of Tomato Pests. J. Econ. Entomol. 109: 1079–1085.
- Wing, K. D., M. Sacher, Y. Kagaya, Y. Tsurubuchi, L. Mulderig, M. Connair, and M. Schnee. 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Prot. 19: 537–545.
- Xu, J., Z. Wang, Y. Wang, H. Ma, H. Zhu, J. Liu, Y. Zhou, X. Deng, and X. Zhou. 2019. ABCC2 participates in the resistance of *Plutella xylostella* to chemical insecticides. Pestic. Biochem. Physiol. 162: 52–59.
- **Zhang, Y., Y. Du, D. Jiang, C. Behnke, Y. Nomura, B. S. Zhorov, and K. Dong. 2016**. The Receptor Site and Mechanism of Action of Sodium Channel Blocker Insecticides. J. Biol. Chem. 291: 20113–20124.
- **Zhorov, B. S., and K. Dong**. **2017**. Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltage-gated sodium channel. Neurotoxicology. 60: 171–177.

3. PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA CRUZADA A INSETICIDAS BLOQUEADORES DE CANAIS DE SÓDIO EM Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

O conhecimento de bases genéticas da resistência a inseticidas pode ajudar na implementação de estratégias de manejo da resistência a inseticidas (MRI). Os inseticidas bloqueadores de canais de sódio tem sido uma das opções para o manejo da resistência de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas e proteínas de Bacillus thuringiensis Berliner (Bt) expressas em plantas geneticamente modificadas. Sendo assim, no presente estudo foram definidos o padrão herança da resistência e a relação de resistência cruzada entre os inseticidas que atuam nos canais de sódio, a partir de linhagens de S. frugiperda resistentes aos inseticidas indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) selecionadas em laboratório por meio da técnica de F₂ screen. Os valores de CL₅₀ de indoxacarb para as linhagens suscetível (SUS) e Indoxacarb-R foram de 3,72 (3,31 - 4,14) e 114,43 (92,45 - 142,32) µg indoxacarb mL⁻¹ respectivamente e os valores de CL₅₀ de metaflumizone para SUS e Metaflumizone-R foram de 4,57 (3,69 - 5,62) e 3141,96 (1638,32 - 6345,66) µg metaflumizone mL⁻¹ respectivamente. A razão de resistência para indoxacarb foi de ≈ 30 vezes e para metaflumizone > 600 vezes. A partir de cruzamentos recíprocos entre as linhagens suscetível (SUS) e as linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R, constatou-se que a resistência de S. frugiperda para ambos os inseticidas é autossômica e incompletamente recessiva. A partir de retrocruzamentos entre os descendentes dos cruzamentos recíprocos e a linhagem resistente de cada inseticida, verificou-se um efeito poligênico para indoxacarb e metaflumizone. Foi verificada a presença de resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone. Além disso, as linhagens de S. frugiperda resistentes a indoxacarb e metaflumizone (bloqueadores de canais de sódio) apresentaram menor suscetibilidade ao inseticida piretroide lambdacyhalothrin (modulador de canais de sódio) quando comparadas com a resposta da linhagem SUS para este inseticida, possivelmente devido à resistência múltipla. Estes resultados fornecem informações essenciais para a implementação de programas de MRI para preservar a vida útil de inseticidas bloqueadores de canais de sódio no controle de S. frugiperda no Brasil.

Palavras chave: 1. Herança da resistência 2. Lagarta-do-cartucho do milho 3. Indoxacarb 4. Metaflumizone 5. Piretroide 6. Manejo da resistência de insetos

ABSTRACT

Knowledge of the genetic basis of insecticide resistance can help to design insect resistance management (IRM) strategies. Sodium channel blocker insecticides have been one of the alternatives to manage resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides and *Bacillus thuringiensis*

Berliner (Bt) proteins expressed in genetically modified plants. Thus, in this study we characterized the inheritance of resistance and cross-resistance to sodium channel blocker insecticides, by using strains of S. frugiperda resistant to indoxacarb (Indoxacarb-R) and metaflumizone (Metaflumizone-R) selected under laboratory conditions by F2 screen. The values of LC50 of the susceptible strain (SUS) and Indoxacarb-R to indoxacarb were 3.72 (3.31 – 4.14) and 114.43 (92.45 - 142.32) µg indoxacarb mL⁻¹ respectively and the values of LC₅₀ to SUS and Metaflumizone-R to metaflumizone were 4.57 (3.69 – 5.62) and 3,141.96 (1,638.32) -6.345.66) µg metaflumizone mL⁻¹ respectively. The resistance ratio of S. frugiperda to indoxacarb was \approx 30-fold and to metaflumizone was > 600-fold. Reciprocal crosses between SUS and strains Indoxacarb-R and Metaflumizone-R revealed that resistance of S. frugiperda to both insecticides is autosomal incompletely recessive. The backcrosses of the F₁ progeny with the resistant strains to each insecticide suggest a resistance with polygenic effect to both indoxacarb and metaflumizone. Cross-resistance between indoxacarb and metaflumizone was detected. Moreover, strains of S. frugiperda resistant to indoxacarb and metaflumizone (sodium channel blockers) showed lower susceptibility to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (sodium channel modulators) when compared with the response of SUS strain to this insecticide, possibly due to multiple resistance. These results are essential to implement IRM programs to preserve the lifetime of the sodium channel blocker insecticides in the control of S. frugiperda in Brazil.

Keywords: 1. Resistance inheritance 2. Fall armworm 3. Indoxacarb 4. Metaflumizone 5. Piretroide 6. Insect resistance management

3.1. Introdução

Os inseticidas do grupo dos bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) são uma importante ferramenta no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A contribuição dos inseticidas indoxacarb e metaflumizone no controle desta praga ainda é baixa (< 2%), comparada ao mercado total de inseticidas utilizados no manejo de lepidópteros pragas no Brasil (Spark Smarter Decisions). Contudo, a implementação de estratégias proativas de manejo da resistência é de fundamental importância para preservar a vida útil destes inseticidas.

Há diversos casos descritos resistência a estes inseticidas no mundo tais como em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) na China e Austrália (Bird 2017, Bird et al. 2017, Cui et al. 2018), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) no Paquistão (Ahmad et al. 2008, Sayyed et al. 2008), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) na China e Pakistão (Su & Sun 2014, Ahmad et al. 2018), *Plutella xylostella* (Lepdoptera: Plutellidae) na China (Khakame et al. 2013, Wang et al. 2016, Shen et al. 2017, Zhang et al. 2017) e *Tuta*

absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) na Grécia (Roditakis et al. 2017). No Brasil, apesar de os inseticidas bloqueadores de canais de sódio serem relativamente recentes no mercado, já há casos de resistência em *P. xylostella* (Santos et al. 2011) e *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) para indoxacarb (Haddi et al. 2015) e em *T. absoluta* para indoxacarb e metaflumizone (Silva et al. 2011, Silva et al. 2016b).

Compreender as bases genéticas associadas a resistência é de fundamental importância na análise de risco de evolução de resistência em condições de campo (Georghiou & Taylor 1977, Roush & McKenzie 1987). O padrão da herança da resistência de *P. xylostella* a indoxacarb foi autossômica e incompletamente recessivo (Nehare et al. 2010, Marak et al. 2017). Já a herança da resistência de *H. armigera* a indoxarb (Bird 2017) e de *P. xylostella* a metaflumizone (Shen et al. 2017) foi considerada incompletamente dominante.

Outro fator que também pode influenciar a evolução da resistência é a resistência cruzada devido à pressão de seleção já exercida por outros inseticidas (Georghiou & Taylor 1977). Os inseticidas do grupo dos piretroides que atuam como moduladores de canais de sódio podem apresentar risco de resistência cruzada com inseticidas bloqueadores de canais de sódio (Zhorov & Dong 2017), como foi demonstrado em populações de *P. xylostella* resistentes a indoxacarb que apresentaram resistência cruzada a cypermethrin e beta-cypermethrin (Nehare et al. 2010, Zhang et al. 2017). Embora, indoxacarb (Subgrupo 22A) e metaflumizone (Subgrupo 22B) estejam em subgrupos distintos, de acordo com a classificação de IRAC (Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas), há possibilidade de resistência cruzada entre estes inseticidas, conforme demonstrado em *P. xylostella* (Wang et al. 2016, Zhang et al. 2017).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi entender o padrão herança da resistência e a relação de resistência cruzada entre os inseticidas que atuam nos canais de sódio, a partir de linhagens de *S. frugiperda* resistentes aos inseticidas indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) selecionadas em laboratório por meio da técnica de F₂ screen.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Insetos

As linhagens de *S. frugiperda* resistentes a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) foram selecionadas a partir de uma população de campo proveniente do município de São Desidério - BA (12°51'12,096" S e 45°28'12,72" W). A linhagem suscetível de referência (SUS) foi obtida da Embrapa Milho e Sorgo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Sete Lagoas – MG, e mantida em laboratório sobre dieta artificial na ausência de pressão de seleção de inseticidas e proteínas Bt por mais de 20 anos.

As linhagens resistentes Indoxacarb-R e Metaflumizone-R foram selecionadas mediante uso da técnica de F₂ *screen* (Andow & Alstad 1998). As pupas provenientes da população de campo foram separadas por sexo e individualizadas em copos plásticos (50 mL) invertidos sobre bandejas forradas com papel filtro umedecido onde permaneceram até a fase adulta. Os adultos foram individualizados em aproximadamente 168 casais (isolinhas). A progênie F₁ de cada isolinha foi criada até a fase adulta e colocadas em gaiolas de PVC para o acasalamento e oviposição. Os bioensaios foram realizados utilizando as lagartas da geração F₂ de cada isolinha. Para cada isolinha foram testadas 120 lagartas nas concentrações diagnósticas de 100 μg mL⁻¹ para indoxacarb e 100 μg mL⁻¹ para metaflumizone (Capítulo 2). Os indivíduos sobreviventes das isolinhas para cada inseticida foram agrupados para a formação das linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R.

As lagartas das linhagens resistentes e suscetível foram criadas em dieta artificial (Kasten et al. 1978) e mantidas em sala climatizada regulada (temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa de 70% e fotofase de 14 h). As linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R foram mantidas sob pressão de seleção nas respectivas concentrações diagnósticas por mais de 15 gerações para posterior realização dos experimentos de caracterização da resistência.

3.2.2. Bioensaios

O método de bioensaio toxicológico foi o de ingestão com tratamento superficial da dieta com os inseticidas comerciais de indoxacarb (Avatar® 150, 150 g de i.a. L⁻¹, FMC Química do Brasil LTDA) e de metaflumizone (Verismo®, 240 g de i.a. L⁻¹, Basf S. A.). Foram utlizadas placas de acrílico (Costar®) com 24 células contendo aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial em cada célula e esterilizada em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta. Foi aplicado uma alíquota de 30 μL da solução inseticida em cada célula e as concentrações foram obtidas através da diluição do produto comercial em água destilada com a adição do surfactante Triton a 0,1% (Triton® X-100, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Após secagem

completa do inseticida foi inoculada uma lagarta de 3º ínstar em cada célula. As placas foram mantidas em câmara climatizada (25±2°C, UR 70±10% e fotofase de 14h). A mortalidade das lagartas foi avaliada após 48 horas, sendo consideradas mortas quando não apresentavam movimentos coordenados após um leve toque de um pincel. Os critérios de avaliação foram adotados de forma semelhante para ambos inseticidas.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit com o uso do software Polo-PC (LeOra software 2002) para a estimativa das concentrações letais 50 (CL $_{50}$), respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular para todas as linhagens. A razão de resistência foi estimada por meio da divisão da CL $_{50}$ das linhagens resistentes ou dos cruzamentos recíprocos pela CL $_{50}$ da linhagem SUS. Além disso, foram realizados testes de paralelismo e igualdade (P < 0,05) para comparar os coeficientes angular e linear obtidos para as retas de regressão estabelecidas para cada linhagem e heterozigotos das linhagens resistentes (Robertson et al. 2007).

3.2.3. Padrão de herança da resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone

Para a caracterização do padrão de herança da resistência, as pupas das linhagens Indoxacarb-R, Metaflumizone-R e da linhagem SUS foram sexadas e individualizadas em copos plásticos (25 mL) invertidos sobre bandejas forradas com papel filtro umedecido. Após a emergência dos adultos foram realizados os cruzamentos recíprocos entre as linhagens resistente Indoxacarb-R e SUS, formando as linhagens Hi1(\mathrew Indoxacarb-R x \mathrew SUS) e Hi2 (\mathrew SUS x \mathrew Indoxacarb-R), e entre as linhagens Metaflumizone-R e SUS para a formação das linhagens Hm1(\mathrew Metaflumizone-R x \mathrew SUS) e Hm2 (\mathrew SUS x \mathrew Metaflumizone-R).

Os cruzamentos foram realizados em gaiolas (tubos de PVC de 10 cm de diâmetro e 20 cm de altura) revestidas internamente com papel jornal para acasalamento e oviposição com aproximadamente 25 casais. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10% e a cada dois dias foi retirado as posturas e trocado a solução de mel. Após a eclosão das lagartas, estas foram transferidas para copos plásticos (100 mL) contendo dieta artificial e foram mantidas até 3º ínstar onde foram realizados os bioensaios.

A caracterização toxicológica das linhagens SUS, Indoxacarb-R e Metaflumizone-R e seus respectivos cruzamentos recíprocos foi feita através de curvas de concentração-resposta utilizado o método de bioensaio descrito no item 3.2.2. As lagartas da linhagem SUS foram expostas a nove concentrações, espaçadas em escala logarítmica, de 1 a 100 µg mL⁻¹ tanto para

indoxacarb como para metaflumizone. Para a linhagem Indoxacarb-R foram utilizadas nove concentrações que variaram de 10 a 1000 μg mL⁻¹ de indoxacarb e para a linhagem Metaflumizone-R foram utilizadas nove concentrações de 32 a 56000 μg mL⁻¹ de metaflumizone. Para os heterozigotos Hi1 e Hi2 foram expostas a nove concentrações de 1,8 a 180 μg mL⁻¹ para indoxacarb e Hm1 e Hm2 foram expostas a oito concentrações de 3,2 a 1800 μg mL⁻¹ para metaflumizone. Para cada concentração foi testada pelo menos três repetições de 24 lagartas (72 lagartas).

3.2.3.1. Dominância da resistência

A determinação da dominância da resistência foi feita a partir dos dados de mortalidade e das CL₅₀s obtidas na caracterização das linhagens suscetível, resistente e dos cruzamentos recíprocos. O grau de dominância (D) foi estimado como nas metodologias sugeridas (Bourguet et al. 2000), como na equação abaixo:

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

onde: MRR, MSS E MRS é a mortalidade das linhagens resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente, nas concentrações avaliadas.

O valor de D próximos a 0 (D= 0), foi admitido como herança completamente recessiva e valores próximos a 1 (D=1), foi considerada como uma resistência completamente dominante.

O grau de dominância também foi analisado pelo método de Stone (1968):

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

em que XF, XR e XS são os logaritmos das CL50 estimadas a partir das linhagens heterozigotas e F_1 (resistente e suscetível), respectivamente. Valores de D próximos a -1 (D = -1), foi admitido como herança completamente recessiva e valores próximos a 1 (D = 1), foi considerada como uma resistência completamente dominante.

3.2.3.2. Número de genes

Na estimativa do número de genes relacionados à resistência, foi realizado um retrocruzamento dos heterozigotos Hi1 e Hi2 para Indoxacarb-R e Hm1 e Hm2 para Metaflumizone-R, com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto de F₁ (linhagem

resistente para ambas as linhagens resistentes testadas), de acordo com as metodologias propostas por Tsukamoto (1983) e Roush; Daly (1990). Para os bioensaios foi utilizado o mesmo procedimento mencionado anteriormente. A possibilidade de herança monogênica foi avaliada a partir do teste χ2 Sokal; Rohlf (1995):

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

em que Ni é representado pela mortalidade observada na concentração i, p a mortalidade esperada calculada a partir do modelo mendeliano (Georghiou & Taylor 1977), ni número de indivíduos testados e q = 1 - p.

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

em que a é a porcentagem de mortalidade da linhagem heterozigota e b é a porcentagem de mortalidade da linhagem resistente em determinada concentração. A hipótese de herança monogênica foi rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado a 1 grau de liberdade.

3.2.4. Resistência cruzada de S. frugiperda a inseticidas que atuam nos canais de sódio

Para estabelecer as relações de resistência cruzada, as lagartas das linhagens Indoxacarb-R e SUS foram testadas com os inseticidas metaflumizone (Verismo®, 240 g de i.a L-1, Basf S. A.) e lambda cyhalothrin (Karate Zeon 250 CS®, 250 de i.a. L-1, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) e as lagartas da linhagem Metaflumizone-R e SUS com os inseticidas indoxacarb (Avatar® 150, 150 g de i.a. L-1, FMC Química do Brasil LTDA) e lambda cyhalothrin. Para o inseticida lambda cyhalothrin foi utilizado concentrações de 0,32 a 18 μg lambda cyhalothrin mL⁻¹ para a linhagem SUS e 1,8 a 100 μg lambda cyhalothrin mL⁻¹ para as linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R. Para o inseticida metaflumizone foi utilizado concentrações de 1 a 56 μg metaflumizone mL⁻¹ para a linhagem SUS e 5,6 a 180 μg metaflumizone mL⁻¹ para a linhagem Indoxacarb-R e para o inseticida indoxacarb foi utilizado de 1 a 56 μg indoxacarb mL⁻¹ para a linhagem SUS e de 18 a 560 μg indoxacarb mL⁻¹ para a linhagem Metaflumizone-R. Os bioensaios foram conduzidos da mesma forma como descrito anteriormente, utilizando sete concentrações distribuídas logariticamente e no tratamento controle foram aplicados apenas água e surfactante. Em cada concentração foram testadas de 3 a 4 repetições de 24 lagartas. As placas foram mantidas em condições climatizadas a 25±2°C,

UR 70±10% e fotofase de 14h. A mortalidade foi avaliada após 48 horas de infestação para todos os inseticidas testados utizando o mesmo critério de resposta descrito no item 3.2.2.

Os dados de mortalidade da população Indoxacarb-R, Metaflumizone-R e SUS aos inseticidas indoxacarb, metaflumizone e lambda cyhalothrin foram submetidos à análise de Probit, com uso do software POLO-PC (LeOra software 2002) para estimar a concentração letal (CL₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança. A razão de resistência foi calculada dividindo a CL₅₀ da linhagem resistente pela CL₅₀ da linhagem SUS para cada inseticida.

3.3. Resultados

3.3.1. Padrão de herança da resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone

As linhagens Indoxacarb-R e SUS apresentaram CL_{50} de 114,43 (92,45-142,32) e 3,719 (3,31-4,14) μg indoxacarb mL^{-1} respectivamente, com uma razão de resistência > 30 vezes (Tabela 3.1). Não houve diferença na resposta dos heterozigotos (Hi1 e Hi2) a indoxacarb, com CL_{50} de 18,11 (15,63-20,92) e 17,46 (13,48-22,17) μg indoxacarb mL^{-1} , verificando-se a sobreposição dos intervalos de confiança da CL_{50} dos heterozigotos (Tabela 3.1). As hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 0,17$, gl= 2, P=0,917) e de paralelismo ($\chi^2 = 0,05$, gl= 1, P=0,823) não foram rejeitadas. Tais resultados indicam que os genes relacionados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb estão localizados em cromossomos autossômicos, e, portanto, não apresentando efeito maternal ou ligação ao cromossomo sexual.

Tabela 3.1 Concentração-resposta das linhagens suscetível (SUS), resistente a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) e progênies F₁ dos cruzamentos recíprocos de *Spodoptera frugiperda* aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone.

| Linhagem | agem n Coef. ang. ± | | CL ₅₀ (IC 95%) | $X^2(gl)$ | RR | | | | |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------|-----------------------------|-----------|-------|--|--|--|--|
| Indoxacarb | | | | | | | | | |
| SUS 1152 $2,785 \pm 0,18$ $3,719 (3,31 - 4,14)$ $6,77 (7)$ - | | | | | | | | | |
| Hi1: ♀Indoxacarb-R × ♂Sus | 718 | $2,174 \pm 0,15$ | 18,11 (15,63 - 20,92) | 3,77 (8) | 4,9 | | | | |
| Hi2: ♀ Sus × ♂ Indoxacarb-R | 715 | $2,127 \pm 0,16$ | 17,46 (13,48 - 22,17) | 13,71 (8) | 4,7 | | | | |
| Indoxacarb-R | 671 | $2,126 \pm 0,14$ | 114,43 (92,45 - 142,32) | 11,35 (7) | 30,8 | | | | |
| | | Metaflumi | zone | | | | | | |
| SUS | 516 | $3,11 \pm 0,24$ | 4,57 (3,69 - 5,62) | 7,92 (5) | - | | | | |
| Hm1: ♀SUS × ♂Metaflumizone-R | 947 | $1,32 \pm 0,08$ | 61,82 (51,19 - 74,58) | 4,90 (9) | 13,5 | | | | |
| Hm2: ♀Metaflumizone × ♂SUS | 879 | $1,36 \pm 0,09$ | 96,68 (73,99 - 128,57) | 9,63 (8) | 21,2 | | | | |
| Metaflumizone-R | 933 | 0.81 ± 0.05 | 3141,96 (1638,32 - 6345,66) | 27,75 (7) | 687,3 | | | | |

Número de insetos testados; ² Coeficiente angular e erro padrão da média; ³ Concentração letal 50 (μg i.a. mL⁻¹) e intervalo de confiança a 95%; ⁴valor do quiquadrado calculado e grau de liberdade; ⁵Razão de resistência da CL₅₀ da linhagem dividida pela CL₅₀ da linhagem suscetível (SUS)

Para a linhagem resistente a metaflumizone, a razão de resistência foi > 680 vezes, sendo a CL_{50} de 4,57 (3,69 – 5,62) µg metaflumizone mL^{-1} e 3141,96 (1638,32 – 6345,66) µg metaflumizone mL^{-1} para as linhagens suscetível SUS e Metaflumizone-R respectivamente (Tabela 1). Os heterozigotos apresentaram sobreposição no intervalo de confiança com valores de CL_{50} de 61,78 (49,97 - 76,47) µg metaflumizone mL^{-1} e 78,99 (62,54 - 98,59) µg metaflumizone mL^{-1} para Hm1 e Hm2 respectivamente. Os heterozigotos não diferiram entre si pelo teste de igualdade (χ^2 = 2,56, gl= 2, P=0,278) e paralelismo (χ^2 = 0,08, gl= 1, P=0,773), sugerindo que os genes relacionados à resistência de *S. frugiperda* a metaflumizone também estão localizados em cromossomos autossômicos, não possuindo efeito maternal ou ligação ao cromossomo sexual.

3.3.1.1. Dominância da resistência

A linhagem Indoxacarb-R em concentrações menores (abaixo de 56 μ g indoxacarb mL⁻¹) apresentou uma herança codominante e nas concentrações mais altas (acima de 100 μ g indoxacarb mL⁻¹) foi considerada funcionalmente recessiva (Figura 3.1), indicando que a dominância da resistência é dependente da concentração do inseticida, de acordo com Bourguet et al. (2000). Pelo método de Stone (1968), a dominância foi estimada de -0.076 e de -0.097 para os cruzamentos Hi1: 3SUS x 4Indoxacarb-R e Hi2: 3Indoxacarb-R x 4SUS, respectivamente, indicando que a resistência a indoxacarb apresentou traço incompletamente recessivo.

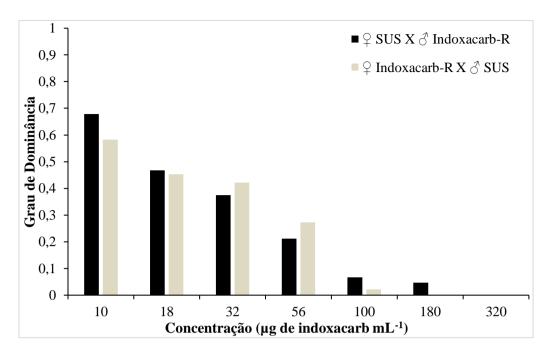


Figura 3.1 Grau de dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* em função da concentração de indoxacarb (Método de Bourguet et al. 2000).

Para a linhagem Metaflumizone-R, o mesmo comportamento foi observado, em concentrações abaixo de 1000 µg metaflumizone mL⁻¹ apresentou uma herança codominante e funcionalmente recessiva nas concentrações iguais ou acima de 1800 µg metaflumizone mL⁻¹ (Figura 3.2), calculado pelo método de Bourguet et al. (2000). O grau de dominância foi considerdo incompletamente recessivo, estimado pelo método de Stone (1968), apresentando - 0,203 e -0,066 para Hm1 ($\Colon SUS \times \Colon Metaflumizone-R$) e Hm2 ($\Colon Metaflumizone-R \times \Colon SUS$), respectivamente.

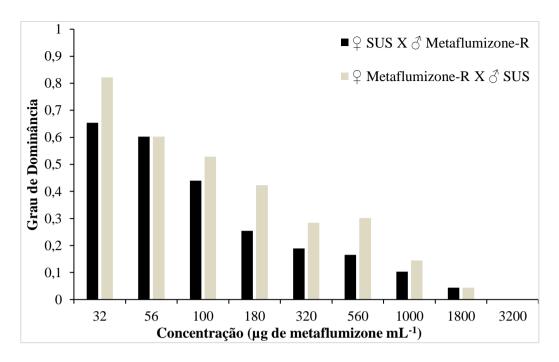


Figura 3.2 Grau de dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* em função da concentração de metaflumizone (Método de Bourguet et al. 2000).

3.3.1.2. Número de genes associados a resistência

Utilizando o teste do qui-quadrado, foi possível comparar a mortalidade observada e esperada dos indivíduos provenientes dos retrocruzamentos entre as linhagens heterozigotas (originados do cruzamento da linhagem SUS e Indoxacarb-R) com o parental fenotipicamente mais distinto (Indoxacarb-R). Nas duas concentrações mais altas, próximas a concentração diagnóstica, a hipótese da herança monogênica foi rejeitada para os retrocruzamentos testados, relacionando a sobrevivência de *S. frugiperda* em concentrações elevadas de indoxacarb a um efeito poligênico. Se considerarmos as concentrações mais baixas testadas, a mortalidade observada dos cruzamentos não diferiu da esperada (Tabela 3.2), demonstrando que a sobrevivência de *S. frugiperda* nestas concentrações pode também estar relacionada a um efeito monogênico.

Tabela 3.2 Análise do qui-quadrado (χ^2) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem resistente Indoxacarb-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (Hi1 = \bigcirc SUS \times \bigcirc Indoxacarb-R) expostas a diferentes concentrações de indoxacarb.

| Concentração | ♂ Hi1 > | < ♀ Indoxaca | rb-R (R1) | ♂ Indo | \circlearrowleft Indoxacarb-R × \updownarrow Hi1 (R2) | | |
|--------------|------------------|--------------|------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|-------------|--|
| μg i.a. mL-1 | Obs ^a | Espb | X ^{2c} | Obs ^a | Esp ^b | χ^{2c} | |
| 56 | 60,87 | 56,08 | 1,20 | 61,79 | 56,08 | 1,53 | |
| 100 | 86,96 | 66,62 | 14,11* | 88,24 | 66,62 | 15,61* | |
| 180 | 91,06 | 76,71 | 8,48* | 91,30 | 76,71 | 9,01* | |

^a Mortalidade observada; ^b Mortalidade esperada baseada em herança mendeliana e ^c valor do quiquadrado calculado *Diferença significativa (P < 0,05, grau de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada.

Para a linhagem Metaflumizone-R, a mortalidade observada e esperada de indivíduos provenientes dos retrocruzamentos das linhagens heterozigotas (oriundos do cruzamento da linhagem suscetível e Metaflumizone-R) com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto (Metaflumizone-R), foi verificado uma variação nas mortalidades observadas e esperadas (Tabela 3.3). Nos cruzamentos testados nas concentrações mais baixas não diferiu a mortalidade observada e esperada demonstrando que a sobrevivência de *S. frugiperda* nestas concentrações pode estar relacionada a um efeito monogênico. Nas concentrações mais altas a hipótese da herança monogênica foi rejeitada, relacionando a sobrevivência de *S. frugiperda* em concentrações elevadas de metaflumizone a um efeito poligênico.

Tabela 3.3 Análise do qui-quadrado ($\chi 2$) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem da resistente Metaflumizone-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (Hm2 = $\Im SUS \times \Im Metaflumizone-R$) expostas a diferentes concentrações de metaflumizone.

| Concentração | | | | | | | |
|--------------------------|-------|------------------|------------------|------------------|-------|------------------|--|
| μg i.a. mL ⁻¹ | Obsa | Esp ^b | χ ^{2 c} | Obs ^a | Espb | χ ^{2 c} | |
| 18 | 6,38 | 8,80 | 0,02 | 3,55 | 8,80 | 0,95 | |
| 32 | 9,22 | 12,20 | 0,08 | 19,45 | 12,20 | 5,29* | |
| 56 | 30,50 | 26,17 | 1,24 | 42,46 | 26,17 | 11,24* | |
| 100 | 31,91 | 37,51 | 0,54 | 47,52 | 37,51 | 3,78* | |
| 180 | 61,70 | 43,69 | 10,35* | 60,61 | 43,69 | 8,95* | |

^a Mortalidade observada; ^b Mortalidade esperada baseada em herança mendeliana e ^c valor do quiquadrado calculado. *Diferença significativa (P < 0.05, grau de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada.

3.3.2. Resistência cruzada de S. frugiperda entre inseticidas que atuam nos canais de sódio

Foram verificadas resistência cruzada entre os inseticidas que atuam nos canais de sódio testados (Tabela 4). A linhagem Indoxacarb-R se mostrou resistente a metaflumizone (RR = 5,9) e lambda-cyhalothrin (RR = 7,3), assim como a linhagem Metaflumizone-R se mostrou resistente a indoxacarb (RR = 22,8) e lambda-cyhalothrin (RR = 11,8).

Tabela 3.4 Concentração-resposta das linhagens suscetível (SUS), resistente a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) de *Spodoptera frugiperda* aos inseticidas lambda cyhalothrin, indoxacarb e metaflumizone.

| Inseticida | Linhagem | n¹ | Coef. ang. ± EP ² | CL ₅₀ (IC 95%) ³ | $\chi^2(\mathbf{gl})^4$ | RR ⁵ |
|---------------|-----------------|-----|---------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Lambda | SUS | 528 | $4,98 \pm 0,58$ | 4,64 (4,15 - 5,12) | 3,8 (5) | - |
| 241110 44 | Indoxacarb-R | 504 | $2,\!81\pm0,\!27$ | 34,05 (27,06 - 43,33) | 8,2 (5) | 7,3 |
| cyhalothrin | Metaflumizone-R | 552 | $1,\!89\pm0,\!18$ | 54,81 (41,28 - 80,93) | 7,6 (5) | 11,8 |
| Indoxacarb | SUS | 912 | $2,78 \pm 0,18$ | 3,72 (3,11 - 4,14) | 6,7 (5) | - |
| Indoxacarb | Metaflumizone-R | 504 | $2,25\pm0,19$ | 104,32 (87,56 - 122,95) | 3,0 (5) | 22,8 |
| Metaflumizone | SUS | 516 | $3,11 \pm 0,24$ | 4,57 (3,69 - 5,62) | 7,9 (5) | - |
| | Indoxacarb-R | 551 | $2,39 \pm 0,20$ | 21,96 (19,12 - 25,15) | 3,5 (5) | 5,9 |

¹Número de insetos testados; ²Coeficiente angular e erro padrão da média; ³ Concentração letal 50 (μg i.a. mL⁻¹) e intervalo de confiança a 95%; ⁴valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade; ⁵Razão de resistência da CL₅₀ da linhagem dividida pela CL₅₀ da linhagem suscetível (SUS)

3.4. Discussão

Embora o uso de inseticidas bloqueadores de canais de sódio não seja elevado no controle de lepidópteros praga no Brasil, demonstramos que há risco de evolução da resistência de S. frugiperda para indoxacarb ($RR \approx 30$ vezes) e metaflumizone (> 600 vezes), com padrão de herança da resistência incompletamente recessivo e com efeito poligênico. Apesar de o padrão de herança da resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone ser incompletamente recessiva, ou seja, com o fenótipo dos heterozigotos mais próximos ao da linhagem suscetível, o caráter resistência é dependente da dose e com a queda da atividade biológica dos inseticidas pulverizados no campo, poderá haver uma maior sobrevivência de

heterozigotos, acelerando assim a evolução da resistência, conforme demonstrado no caracterização da dominância da resistência no presente estudo.

O risco de evolução da resistência a indoxacarb e metaflumizone já foi apontado em diversos países, tais como em *H. armigera* em cultivos de algodão na Austrália e China (Bird 2017, Bird et al. 2017, Cui et al. 2018), *S. litura* no Paquistão (Ahmad et al. 2008, Sayyed et al. 2008), *S. exigua* (Su e Sun 2014, Ahmad et al. 2018), *P. xylostella* na China (Khakame et al. 2013, Wang et al. 2016, Shen et al. 2017, Zhang et al. 2017) e *T. absoluta* na Grécia (Roditakis et al. 2017). No Brasil, o inseticida indoxacarb tem sido comercializado há mais de 10 anos e já foram confirmados casos de resistência em *P. xylostella* (Santos et al. 2011), *T. absoluta* (Silva et al. 2011) e *S. zeamais* (Haddi et al. 2015). Já metaflumizone está no mercado há menos de cinco anos, contudo já foi relatado um caso de resistência para *T. absoluta* (Silva, et al. 2016b).

O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone foi caracterizado como autossômico e incompletamente recessivo, com efeito poligênico. A maioria dos casos reportados de resistência a estes inseticidas também concluíram que a resistência é de caráter autossômico e incompletamente recessivo, tais como em *P. xylostella* resistente a indoxacarb (Nehare et al. 2010, Marak et al. 2017) e metaflumizone (Shen et al. 2017). Entretanto, em *H. armigera* (Bird 2017), *S. litura* (Sayyed et al. 2008) e *P. xylostella* (Marak et al. 2017), a resistência a indoxacarb foi incompletamente dominante. Tais diferenças no padrão de herança da resistência nas diferentes espécies pode ser atribuído a diferentes pressões de seleção com inseticidas e variabilidade genética entre espécies ou populações de diferentes regiões geográficas levando à seleção de diferentes mecanismos de resistência (Heckel et al. 1999, Bourguet et al. 2000).

Foram encontradas a presença de resistência cruzada entre os inseticidas indoxacarb, e metaflumizone em *S. frugiperda* no presente estudo. Shen et al. (2020) também reportou a presença de resistência cruzada moderada a indoxacarb em uma população de *P. xylostella* resistente a metaflumizone e baixa para outros inseticidas de outros grupos químicos. Por outro lado, uma linhagem de *S. exigua* resistente a metaflumizone não apresentou resistência cruzada a indoxacarb (Su & Sun 2014).

As linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R de *S. frugiperda* apresentaram razões de resistência ao inseticida lambda cyhalothrin de 7,3 e 11,8 vezes respectivamente. Possivelmente trata-se de resistência múltipla e não resistência cruzada, uma vez que a linhagem de *S. frugiperda* resistente a lambda-cyhalotrin não apresentou resistência cruzada a indoxacarb e metaflumizone (Capítulo 2). Devido à evolução da resistência de *S. frugiperda* a

lambda-cyhalothrin no Brasil (Diez-Rodriguez & Omoto 2001, Carvalho et al. 2013), possivelmente as linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R foram selecionadas juntamente com os alelos que conferem resistência a lambda-cyhalothrin. A ausência de resistência cruzada entre inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) e piretroides foi reportada em *T. absoluta*, *H. armigera* e *P. xylostella* (Silva et al. 2016a, Bird 2017, Shen et al. 2017, 2020). Por outro lado, há relados de resistência cruzada moderada em populações de *P. xylostella* resistentes a indoxacarb e inseticidas piretroides (cypermethrin e beta-cypermethrin) (Nehare et al. 2010, Zhang et al. 2017). Contudo, como os autores não utilizaram linhagens resistentes quase-isogênicas para verificar a existência de resistência cruzada e os resultados reportados poderiam ser devido à resistência múltipla e não resistência cruzada.

Apesar de a maioria dos trabalhos de resistência a inseticidas bloqueadores de canais de sódio evidenciarem que a desintoxicação metabólica está envolvida como principal mecanismo de resistência (Shono et al. 2004, Nehare et al. 2010, Pang et al. 2012, Tian et al. 2014, Haddi et al. 2015, Silva, et al. 2016 a, Bird 2017), a resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone possivelmente está associado a mutações no sítio alvo devido à presença de resistência cruzada e ao caráter incompletamente recessivo da resistência. A resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone em duas populações de P. xylostella foi atribuída a duas mutações F1845Y e V1848I, identificadas no segmento S6 do domínio IV dos canais de sódio (Wang et al. 2016) e as mesmas mutações foram identificadas em uma população resistente a estes inseticidas em T. absoluta na Grécia e Itália (Roditakis et al. 2017). Quando as mutações foram expressas em oócitos de Xenopus, verificou-se que as mutações reduziram quase igualmente a inibição da corrente de sódio pelo indoxacarb e metaflumizone (Jiang et al. 2015). Posteriormente, essas mutações foram testadas in vitro empregando a estratégia CRISPR/Cas9 para gerar cepas de Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophiladae) portadoras destas mutações. Os resultados indicaram que ambas as mutações conferem resistência a indoxacarb e a metaflumizone, sendo que a mutação F1845Y conferiu uma maior razão de resistência a metaflumizone (Samantsidis et al. 2019).

Em suma, no presente trabalho caracterizamos a resistência de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone como sendo autossômica e incompletamente recessiva, com efeito poligênico. Foram verificadas a presença de resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone. Além disso, as linhagens de *S. frugiperda* resistentes a indoxacarb e metaflumizone (bloqueadores de canais de sódio) apresentaram menor suscetibilidade ao inseticida piretroide lambda-cyhalothrin (modulador de canais de sódio) quando comparadas com a resposta da linhagem SUS, possivelmente devido à resistência múltipla. Estes resultados

fornecem informações essenciais para a implementação de programas de manejo de resistência e para preservar a vida útil de inseticidas bloqueadores de canais de sódio no controle de *S. frugiperda* no Brasil.

Referências

- **Afzal, M. B. S., S. A. Shad, M. Ejaz, and J. E. Serrao**. **2020**. Laboratory selection, cross-resistance, and estimations of realized heritability of indoxacarb resistance in *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae). Pest Manag. Sci. 76: 161–168.
- **Ahmad, M., A. Farid, and M. Saeed**. **2018**. Resistancewe to new insecticides and their synergism in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Crop Prot. 107: 79–86.
- **Ahmad, M., A. H. Sayyed, M. A. Saleem, and M. Ahmad**. **2008**. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Crop Prot. 27: 1367–1372.
- **Andow, D. A., and D. N. Alstad. 1998.** F₂ Screen for Rare Resistance Alleles. J. Econ. Entomol. 91: 572–578.
- **Bird, L. J. 2017**. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag. Sci. 73: 575–581.
- **Bird, L. J., L. J. Drynan, and P. W. Walker**. **2017**. The Use of F₂ Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate, Chlorantraniliprole, and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 110: 651–659.
- **Bourguet, D., A. Genissel, and M. Raymond**. **2000**. Insecticide Resistance and Dominance Levels. J. Econ. Entomol. 93: 1588–1595.
- Carvalho, R. A., C. Omoto, L. M. Field, M. S. Williamson, and C. Bass. 2013. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. PLoS One. 8: e62268.
- Cui, L., Q. Wang, H. Qi, Q. Wang, H. Yuan, and C. Rui. 2018. Resistance selection of indoxacarb in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): cross-resistance, biochemical mechanisms and associated fitness costs. Pest Manag. Sci. 74: 2636–2644.
- **Diez-Rodríguez, G. I., and C. Omoto**. **2001**. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. Neotrop. Entomol. 30: 311–316.

- **Dong, K., Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu, L. Wang, K. Silver, and B. S. Zhorov. 2014.** Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 50: 1–17.
- Farias, J. R., D. A. Andow, R. J. Horikoshi, R. J. Sorgatto, P. Fresia, A. C. dos Santos, and C. Omoto. 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Crop Prot. 64: 150–158.
- Gao, M., W. Mu, W. Wang, C. Zhou, and X. Li. 2014. Resistance mechanisms and risk assessment regarding indoxacarb in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Phytoparasitica. 42: 585–594.
- **Georghiou, G. P., and C. E. Taylor**. **1977**. Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319–323.
- Ghodki, B. S., S. M. Thakare, M. P. Moharil, and N. G. V. Rao. 2009. Genetics of Indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner). Entomol. Res. 39: 50–54.
- Haddi, K., L. P. Mendonca, M. F. Dos Santos, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira. 2015.
 Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 108: 362–369.
- **Heckel, D. G., L. J. Gahan, Y.-B. Liu, and B. E. Tabashnik**. **1999**. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8373–8377.
- **Karaağaç, S. U. 2015**. Enzyme Activities and Analysis of Susceptibility Levels in Turkish *Tuta absoluta* Populations to Chlorantraniliprole and Metaflumizone Insecticides. Phytoparasitica. 43: 693–700.
- **Kasten, P., A. A. C. M. Precetti, and J. R. P. Parra**. **1978**. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. Rev. Agric. 53: 69–78.
- **Khakame, S. K., X. Wang, and Y. Wu**. **2013**. Baseline Toxicity of Metaflumizone and Lack of Cross Resistance Between Indoxacarb and Metaflumizone in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 106: 1423–1429.
- LeOra software. 2002. Polo-plus: Probit and logit analysis computer program.
- Lira, E. C., A. Bolzan, A. R. B. Nascimento, F. S. A. Amaral, R. H. Kanno, I. S. Kaiser, and C. Omoto. 2020. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) to spinetoram: Inheritance and cross-resistance to spinosad. Pest Manag. Sci. 76: 2674–2680.

- Marak, R. M., D. M. Firake, P. P. Sontakke, and G. T. Behere. 2017. Mode of inheritance of Indoxacarb resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and cross resistance to different groups of pesticides. Phytoparasitica. 45: 549–558.
- Nascimento, A. R. B. do, J. R. Farias, D. Bernardi, R. J. Horikoshi, and C. Omoto. 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. Pest Manag. Sci. 72: 810–815.
- Nehare, S., B. S. Ghodki, G. K. Lande, V. Pawade, and A. S. Thakare. 2010. Inheritance of resistance and cross resistance pattern in indoxacarb-Resistant diamondback moth *Plutella xylostella* L. Entomol. Res. 40: 18–25.
- Okuma, D. M., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, A. P. Silva, and C. Omoto. 2018. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. Pest Manag. Sci. 74: 1441–1448.
- Omoto, C., O. Bernardi, E. Salmeron, R. J. Sorgatto, P. M. Dourado, A. Crivellari, R. A. Carvalho, A. Willse, S. Martinelli, and G. P. Head. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. Pest Manag. Sci. 72: 1727–1736.
- Pang, S., W. You, L. Duan, X. Song, X. Li, and C. Wang. 2012. Resistance selection and mechanisms of oriental tobacco budworm (*Helicoverpa assulta* Guenee) to indoxacarb. Pestic. Biochem. Physiol. 103: 219–223.
- Robertson, J. L., R. M. Russel, P. H. K., and N. E. Savin. 2007. Bioassays with Arthropods, CRC Press. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Roditakis, E., K. Mavridis, M. Riga, E. Vasakis, E. Morou, J. L. Rison, and J. Vontas. 2017. Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 73: 1679–1688.
- **Roush, R. T., and J. C. Daly**. **1990**. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97–152. *In* Roush, R. T.; Tabashnik, B.E. (ed.), Pestic. Resist. Arthropods. Chapman and Hall, New York, NY.
- Roush, R. T., and J. A. McKenzie. 1987. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. Annu. Rev. Entomol. 32: 361–380.

- **Samantsidis, G. R., A. O. O'Reilly, V. Douris, and J. Vontas. 2019**. Functional validation of target-site resistance mutations against sodium channel blocker insecticides (SCBIs) via molecular modeling and genome engineering in *Drosophila*. Insect Biochem. Mol. Biol. 104: 73–81.
- Santos, V., H. de Siqueira, J. da Silva, and M. de Farias. 2011. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 40: 264–270.
- **Sayyed, A. H., and D. J. Wright**. **2006**. Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Pest Manag. Sci. 62: 1045–1051.
- **Sayyed, A. L. I. H., M. Ahmad, and M. A. Saleem**. **2008**. Cross-Resistance and Genetics of Resistance to Indoxacarb in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). 472–479.
- Shen, J., D. Li, S. Zhang, X. Zhu, H. Wan, and J. Li. 2017. Fitness and inheritance of metaflumizone resistance in *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 139: 53–59.
- Shen, J., Z. Li, D. Li, R. Wang, S. Zhang, H. You, and J. Li. 2020. Biochemical mechanisms, cross-resistance and stability of resistance to metaflumizone in *Plutella xylostella*. Insects. 11: 1–9.
- Silva, G. A., M. C. Picanço, L. Bacci, A. L. B. Crespo, J. F. Rosado, and R. N. C. Guedes.
 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 67: 913–920.
- Silva, J. E., C. P. O. Assis, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Field-Evolved Resistance and Cross-Resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations to Diamide Insecticides. J. Econ. Entomol. 109: 2190–2195. a
- Silva, T. B. M., W. M. Silva, M. R. Campos, J. E. Silva, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. Crop Prot. 79: 80–86. b
- **Sokal, R. R., and F. J. Rohlf**. **1995**. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Freeman, New York, NY.
- **Stone, B. A. 1968**. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. Bull WHO. 38: 325–326.
- **Su, J., and X. Sun**. **2014**. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. Crop Prot. 61: e353–e361.

- **Tsukamoto, M. 1983**. Methods of genetic analysis of insecticide resistance, pp. 71–93. *In* Georghiou, George P.; Saito, T. (ed.), Pest Resist. to Pestic. Plenum, New York, NY.
- Wang, X.-L., W. Su, J.-H. Zhang, Y.-H. Yang, K. Dong, and Y.-D. Wu. 2016. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Sci. 23: 50–58.
- **Zhang, S., X. Zhang, J. Shen, D. Li, H. Wan, H. You, and J. Li. 2017**. Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 140: 85–89.
- **Zhorov, B. S., and K. Dong**. **2017**. Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltage-gated sodium channel. Neurotoxicology. 60: 171–177.

4. CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDAS BLOQUEADORES DE CANAIS DE SÓDIO

RESUMO

Custos adaptativos estão frequentemente associados a alelos que conferem a resistência de insetos a inseticidas e estes custos podem ser explorados em programas de manejo da resistência. No presente estudo, foram avaliados os possíveis custos adaptativos associados à resistência de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone, mediante uso de linhagens geneticamente semelhantes. Foram utilizadas linhagens de S. frugiperda resistente a indoxacarb (Indoxacarb-R) e resistente a metaflumizone (Metaflumizone-R) selecionadas por F₂ screen a partir de uma população de campo proveniente de São Desidério-BA (BA-48), em comparação com a linhagem suscetível (SUS-BA) obtida a partir da população BA-48 mantida no laboratório na ausência da pressão de seleção com inseticidas por mais de 20 gerações. Houve redução significativa da CL₅₀ para indoxacarb de 17,07 (13,43 - 22,01) μg indoxacarb m L^{-1} (BA-48) para 5,10 (4,34 – 5,83) µg indoxacarb m L^{-1} (SUS-BA) e para metaflumizone de 11,85 (10,19 - 13,78) µg metaflumizone mL⁻¹ (BA-48) para 4,68 (3,47 - 5,88) µg metaflumizone mL⁻¹, indicando que a resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone é instável. Os parâmetros biológicos da tabela de vida de fertilidade foram avaliados nas linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R, Metaflumizone-R e heterozigotos de ambos inseticidas. O valor adaptativo relativo à linhagem SUS-BA, baseado na taxa intrínseca de crescimento (r_m), foi de 0,93 e 0,91 para as linhagens Indoxacarb-R e Metaflumizone-R respectivamente. Por outro lado, os heterozigotos de ambas os inseticidas não apresentaram redução no valor adaptativo relativo. Portanto, a presença de custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone podem ser explorados em programas de manejo da resistência de S. frugiperda para estes inseticidas.

Palavras chave: 1. Lagarta-do-cartucho do milho 2. Seleção 3. Custo adaptativo 4. Resistência a inseticidas 5. Indoxacarb 6. Metaflumizone

ABSTRACT

Fitness costs are often associated with alleles that confer insect resistance to insecticides and these costs can be exploited in resistance management strategies. In this study, we evaluated possible fitness costs associated with resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to indoxacarb and metaflumizone using genetically similar strains. We used strains of *S. frugiperda* resistant to indoxacarb (Indoxacarb-R) and metaflumizone (Metaflumizone-R) selected by F₂ screen from a field population collected in São Desidério-BA (BA-48) in compare with a susceptible strain (SUS-BA) obtained from BA-48 population maintained

under laboratory conditions in the absence of selection pressure with insecticides for more than 20 generations. There was a significant reduction in LC₅₀ to indoxacarb from 17.07 (13.43 – 22.01) μg indoxacarb mL⁻¹ (BA-48) to 5.10 (4.34 – 5.83) μg indoxacarb mL⁻¹ (SUS-BA) and to metaflumizone from 11.85 (10.19 – 13.78) μg metaflumizone mL⁻¹ (BA-48) to 4.68 (3.47 – 5.88) μg metaflumizone mL⁻¹, indicating that resistance of *S. frugiperda* to indoxacarb and metaflumizone is unstable. Life history traits were evaluated in SUS-BA, Indoxacarb-R, Metaflumizone-R and heterozygous individuals for both insecticides. The relative fitness to SUS-BA strain, based on intrinsic rate of increase (r_m), was 0.93 and 0.91 to Indoxacarb-R and Metaflumizone-R strains respectively. On the other hand, the heterozygous of both insecticides did not show reduction in the relative fitness. Thus, the presence of fitness costs associated with resistance of *S. frugiperda* to indoxacarb and metaflumizone can be exploited in resistance management programs of *S. frugiperda* to these insecticides.

Keywords: 1. Fall armyworm 2. Selection 3. Fitness cost 4. Insecticide resistance 5. Indoxacarb 6. Metaflumizone

4.1. Introdução

A evolução da resistência de insetos pragas a inseticidas tem sido um dos grandes obstáculos em programas de manejo integrado de pragas (Sparks & Lorsbach 2017, Nauen et al. 2019). Custos adaptativos podem estar associados à resistência na ausência da pressão de seleção e podem ser explorados em estratégias e manejo da resistência (Roush & McKenzie 1987, Roush & Daly 1990, Kliot & Ghanim 2012, Freeman et al. 2021). Os insetos que apresentam custos associados à resistência geralmente exibem menor aptidão biológica, tais como atraso no desenvolvimento e menor viabilidade.

Apesar da relevância da avaliação de custos adaptativos associados à resistência de insetos a inseticidas, em muitos dos estudos reportados não se utiliza linhagens geneticamente semelhantes (ffrench-Constant & Bass 2017, Freeman et al. 2021). Para as avaliações de custo adaptativo é recomendado a utilização de linhagens resistentes quase-isogênicas à linhagem suscetível a ser comparada, em que a obtenção é realizada a partir de retrocruzamentos sucessivos da linhagem resistente com a linhagem suscetível (Roush & McKenzie 1987, Roush; Tabashnik 1991, Bird et al. 2020), entretanto, para obtenção destas linhagens quase-isogênicas é demorado e trabalhoso. Outra possibilidade é o uso de linhagens com similaridade genética, como uso de linhagens com o mesmo componente genético em que as linhagens resistentes e suscetíveis apresentam diferenças apenas em pequenas regiões do genoma que confere

resistência, o que torna adequado para a avaliação dos custos adaptativos associados à resistência (ffrench-Constant & Bass 2017, Shen et al. 2017, Freeman et al. 2021).

A maioria dos trabalhos têm demonstrado a presença de custos adaptativos associados a inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) (Sayyed & Ahmad 2008, Afzal et al. 2015, Shen et al. 2017, Cui et al. 2018, Barbosa et al. 2020). A linhagem de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a indoxacarb apresentou menor taxa de crescimento e fecundidade em relação à linhagem suscetível (Cui et al. 2018), assim como em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em que após 37 gerações sob pressão de seleção com metaflumizone em laboratório, a linhagem resistente apresentou um atraso no desenvolvimento larval e pupal e redução na sobrevivência larval em comparação à linhagem não selecionada (Shen et al. 2017).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar os possíveis custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone, mediante o uso de linhagens geneticamente semelhantes obtidas a partir de uma mesma população.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Insetos

As linhagens de *S. frugiperda* resistentes a indoxacarb (Indoxacarb-R) e metaflumizone (Metaflumizone-R) foram selecionadas por F₂ *screen* (vide Capítulo 3), a partir de uma população de campo proveniente do município de São Desidério - BA (12°51'12,096" S e 45°28'12,72" W) (população designada BA-48) e mantidas sob constante pressão de seleção utilizando concentrações de 100 μg mL⁻¹ de indoxacarb e de 560 μg mL⁻¹ de metaflumizone para a linhagem Indoxacarb-R e Metaflumizone-R, respectivamente. A linhagem suscetível de referência (SUS-BA) no presente estudo foi proveniente a partir da população BA-48 mantida em laboratório na ausência da pressão de seleção com inseticidas por mais de 20 gerações.

4.2.2. Respostas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone

A caracterização das curvas de concentração-resposta das linhagens SUS-BA Indoxacarb-R e Metaflumizone-R foi realizada mediante o uso do método de bioensaio por ingestão com tratamento superficial da dieta artificial, conforme descrito no Capítulo 3.

Foram utilizadas nove concentrações (10 a 1000 μg mL⁻¹) de indoxacarb (Avatar® 150, 150 g de i.a. L⁻¹, FMC Química do Brasil Ltda.) para a linhagem Indoxacarb-R, nove concentrações (32 a 56000 μg mL⁻¹) de metaflumizone (Verismo®, 240 g de i.a. L⁻¹, Basf S. A.) para a linhagem Metaflumizone-R e para a linhagem SUS-BA foram expostas a nove concentrações (1 a 100 μg mL⁻¹) para ambos os inseticidas. Para cada concentração foram testadas no mínimo três repetições de 24 lagartas cada, totalizando pelo menos 72 lagartas por concentração.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit com o uso do software Polo-PC (LeOra software 2002) para a estimativa das concentrações letais 50 (CL₅₀), respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular. A razão de resistência foi estimada por meio da divisão da CL₅₀ da linhagem resistente pela CL₅₀ da linhagem suscetível.

4.2.3. Custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda a inseticidas bloqueadores de canais de sódio

A avaliação de custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* a inseticidas bloqueadores de canais de sódio foi realizada mediante avaliação de parâmetros biológicos para a confecção de tabelas de vida de fertilidade das linhagens Indoxacarb-R, SUS-BA e heterozigotos HZi (SUS-BA $\circlearrowleft \times$ Indoxacarb-R \circlearrowleft) para indoxacarb e linhagens Metaflumizone-R, SUS-BA e heterozigotos HZm (SUS-BA $\circlearrowleft \times$ Metaflumizone-R \circlearrowleft) para metaflumizone.

Para cada tratamento, os parâmetros biológicos foram avaliados a partir de 160 neonatas. Foram utilizadas placas plásticas (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) de 16 células contendo dieta artificial (Kasten et al. 1978) e mantida em condições controladas (25±2°C, 70±10% UR, fotofase de 14 horas) para cada tratamento. Posteriormente as pupas foram individualizadas em copos plásticos transparentes (50 mL), invertidos sobre um papel filtro umedecido, até a emergência dos adultos. Em seguida, os adultos separados em casais (20 casais tratamento) e transferidos em gaiolas de PVC (20 cm altura × 10 cm de diâmetro) revestidas internamente com papel para substrato de oviposição e os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10%. A cada dois dias foi trocado a solução de mel, as posturas foram retiradas

diariamente para contagem do número de ovos e para avaliação da viabilidade dos ovos foi contado o número de lagartas eclodidas da 2ª postura.

Foram avaliados os parâmetros de duração (dias) e viabilidade (%) do período embrionário, larval, pupal e ovo-adulto, além do peso das lagartas com 10 dias e pupas após 24 horas. Em que os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas por teste Tukey ($p \le 0.05$) (R Development Core Team 2020).

A tabela de vida de fertilidade foi confeccionada para a estimativa da taxa líquida de reprodução (R_0) , duração média de uma geração (T), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e razão finita de aumento (λ) com o 'lifetable.r' (Maia et al. 2014) de cada tratamento. O custo adaptativo relativo foi obtido pela razão entre r_m da linhagem resistente Indoxacarb-R ou Metaflumizone-R e o r_m da linhagem suscetível (SUS-BA) (Bird et al., 2020).

4.3. Resultados

4.3.1. Respostas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone

As caracterizações da concentração-resposta a inseticidas bloqueadores de canais de sódio para a linhangens SUS-BA, Indoxacarb-R e Metaflumizone-R estão na Tabela 4.1. Para o inseticida indoxacarb, houve redução no valor da CL_{50} de 17,07 (13,43 – 22,01) μ g indoxacarb mL⁻¹ (BA-48) para 5,10 (4,34 – 5,83) μ g indoxacarb mL⁻¹ (SUS-BA) após 20 gerações na ausência de pressão de seleção. A razão de resistência para indoxacarb foi > 22. A redução no valor de CL_{50} foi também observada para metaflumizone na ausência de pressão de seleção por 27 gerações com valores de 11,85 (10,19 – 13,78) (BA-48) para 4,68 (3,47 – 5,88) μ g metaflumizone mL⁻¹ (SUS-BA). A razão de resistência para metaflumizone foi de 671 vezes.

Tabela 4.1 Concentração-resposta da população BA 48 e das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e Metaflumizone-R de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas bloqueadores de canais de sódio.

| População/Linhagem | \mathbf{F}^{1} | n^2 | Coef. Ang. (± EP ³) | $CL_{50} (IC 95\%)^4$ | $\chi^2(gl)^{5}$ | RR ⁶ |
|--------------------|------------------|-------|---------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|
|--------------------|------------------|-------|---------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|

| BA-48 | F_2 | 696 | $2,\!01\pm0,\!13$ | 17,07 (13,43 - 22,01) | 13,26 (7) | - |
|-----------------|-------------------|-----|-------------------|-----------------------------|-----------|-------|
| SUS-BA | F_{22} | 550 | 3,49 (±0,38) | 5,10 (4,34 - 5,83) | 1,96 (5) | - |
| Indoxacarb-R | - | 671 | $2,126 \pm 0,14$ | 114,43 (92,45 - 142,32) | 11,35 (7) | 22,4 |
| BA 48 | F_2 | 599 | $2,91 \pm 0,20$ | 11,85 (10,19 - 13,78) | 6,28 (6) | - |
| SUS-BA | \mathbf{F}_{27} | 478 | $2,\!81\pm0,\!33$ | 4,68 (3,47 - 5,88) | 6,58 (6) | - |
| Metaflumizone-R | - | 933 | $0,\!81\pm0,\!05$ | 3141,96 (1638,32 - 6345,66) | 27,75 (7) | 671,3 |

¹ Geração; ²Número de insetos testados; ³ Coeficiente angular e erro padrão da média; ⁴ Concentração letal 50 (μg i.a. mL⁻¹) e intervalo de confiança a 95%; ⁵valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade; ⁶Razão de resistência em comparação a SUS-BA: CL₅₀ da linhagem resistente dividida pela CL₅₀ da linhagem SUS-BA.

4.3.2. Custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone

Os parâmetros biológicos obtidos para as linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e heterozigoto (HZi) estão apresentados na Figura 4.1. Não foram observadas diferenças significativas no período embrionário e na duração da fase de pupa entre as linhagens. Por outro lado, a linhagem resistente (Indoxacarb-R) apresentou maior duração no período larval em comparação com a linhagem SUS-BA e HZi, o que ocasionou um aumento significativo do ciclo total de mais de quatro dias em relação a SUS-BA. Não houve diferença significativa na viabilidade larval para as linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e HZi. A viabilidade da fase de ovo, pupa e ovo-adulto foi similar entre as linhagens SUS-BA e Indoxacarb-R, sendo a linhagem dos heterozigotos HZi apresentou maior viabilidade para as fases de ovo (79,42%), pupa (85,63%) e ovo-adulto (65,05%).

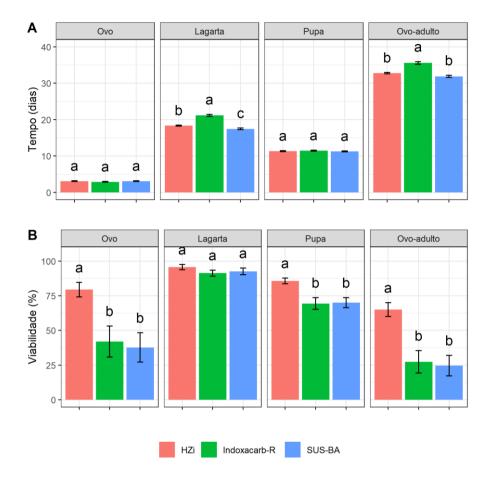


Figura 4.1 Duração (A) e viabilidade (B) das fases das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e heterozigoto (HZi) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (P > 0,05, teste de Tukey).

Para os parâmetros de período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, não houve diferença significativa entre as linhagens (Figura 4.2). A linhagem Indoxacarb-R apresentou o menor peso larval com 10 dias (59,18 mg) e peso pupal (217,33 mg) comparadas as outras linhagens avaliadas.

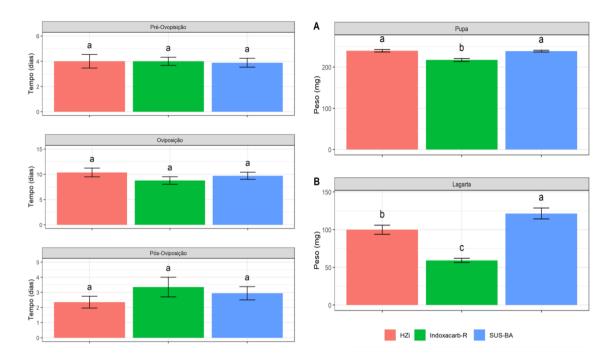


Figura 4.2 Duração do período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, peso de pupa e lagarta das linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e heterozigoto (HZi) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (P > 0,05, teste de Tukey).

A taxa líquida de reprodução (Ro) para a linhagem HZi foi significativamente superior aos valores para as linhagens Indoxacarb-R e SUS-BA (Tabela 4.2). Foram observadas diferenças significativas para a taxa intrínseca de crescimento (r_m), com valores de 0,14; 0,13 e 0,17 para as linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e HZi respectivamente. No que se refere à razão finita de aumento (λ) os valores foram diferentes entre as linhagens, com valores de 1,15; 1,13 e 1,19 para as linhagens SUS-BA, Indoxacarb-R e HZi respectivamente.

Tabela 4.2 Parâmetros da tabela vida de fertilidade de linhagens suscetível SUS-BA, resistente Indoxacarb-R e heterozigotos HZi de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial.

| Linhagens | \mathbf{R}_0 | T | r _m | λ |
|-----------------------------------|----------------|---------------|----------------|-------------|
| SUS-BA | 245,71±21,27 b | 38,76±0,17 b | 0,14±0,01 b | 1,15±0,01 b |
| Indoxacarb-R | 206,63±25,41 b | 42,86 ±0,36 a | 0,13±0,01 c | 1,13±0,01 c |
| HZi (SUS-BA × Indoxacarb-R) | 734,14±48,27 a | 38,84±0,13 b | 0,17±0,01 a | 1,19±0,01 a |

Taxa líquida de reprodução (R_0), duração média de uma geração (T), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e taxa finita de aumento (λ).

O custo adaptativo relativo da linhagem Indoxacarb-R foi de 0,93 indicando que essa linhagem apresenta uma desvantagem competitiva em comparação com a linhagem SUS-BA,

na ausência de pressão de seleção por indoxacarb. Por outro lado, a linhagem dos heterozigotos (HZi) mostrou um valor de custo adaptativo relativo de 1,21, demonstrando ausência de custo.

Com relação ao custo adaptativo da resistência de *S. frugiperda* a metaflumizone, não foi observado diferenças significativas no período embrionário e na duração da fase de larva e ovo-adulto entre as linhagens testadas, havendo maior duração no período de pupa para a linhagem resistente (Metaflumizone-R) (9,69 dias) e suscetível (SUS-BA) (9,39 dias) (Figura 4.3). Para a viabilidade das fases somente a viabilidade do ovo-adulto apresentou diferença significativa, sendo que a viabilidade do heterozigoto HZm (51,77%) foi maior comparado com os valores obtidos para as linhagens Metaflumizone-R (26,08%) e SUS-BA (28,87%). O peso das lagartas com dez dias foi semelhante para as linhagens testadas 74,89; 66,41 e 76,41 mg para SUS-BA, Metaflumizone-R e HZm, respectivamente, entretanto para peso de pupa o heterozigoto diferiu com 225,81 mg com as demais linhagens testadas 214,54 e 208,45 mg para SUS-BA e Metaflumizone-R.

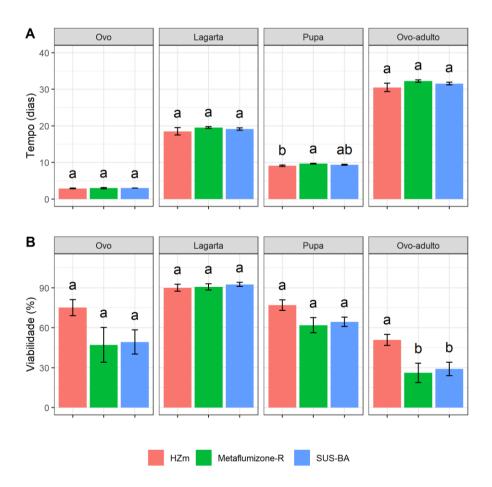


Figura 4.3 Duração (A) e viabilidade (B) das fases das linhagens SUS-BA, Metaflumizone-R e heterozigoto (HZm) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (P > 0.05, teste de Tukey).

Não houve diferença significativa entre os períodos de pré-oviposição e oviposição para as linhagens testadas (Figura 4.4). Houve diferença significativa apenas para o período de pós-oviposição em que HZm apresentou mais de dois dias comparada às outras linhagens. O peso de lagartas com dez dias foi significativamente diferente e maior para a linhagem heterozigota HZm, entretanto o mesmo não foi observado para o peso de pupa, que não apresentou diferença significativa para as linhagens avaliadas.

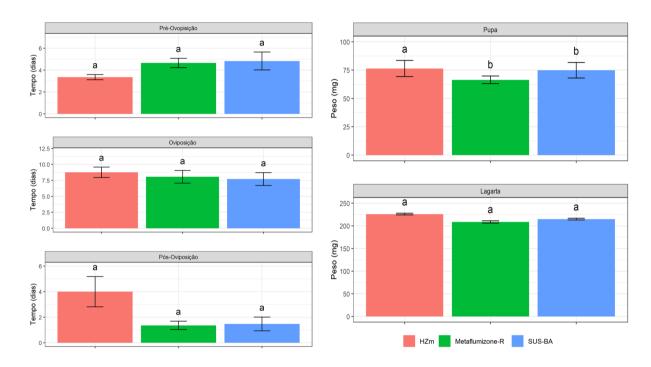


Figura 4.4 Duração do período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, peso de pupa e lagarta das linhagens SUS-BA Metaflumizone-R e heterozigoto (HZm) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (P > 0,05, teste de Tukey).

Em relação a a taxa líquida de reprodução (R_0) , não houve diferença significativa entre a linhagem resistente a metaflumizone (Metaflumizone-R) e suscetível (SUS-BA), mas difereriram significativamente dos heterozigotos (HZm) (Tabela 4.3). Os heterozigotos apresentaram maior capacidade de aumentar de aproximadamente 448,20 vezes de uma geração para a outra, em um tempo médio de geração de 38 dias, diferindo estatisticamente das linhagens SUS-BA e Metaflumizone-R que apresentaram maior tempo médio de geração de 41,38 e 42,06 dias respectivamente.

| Tabela 4.3 Parâmetros | da tabela vida d | le fertilidade de linhagens | suscetível SUS-BA, resistente |
|-------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Metaflumizone-R e heter | ozigotos HZm de | Spodoptera frugiperda em o | lieta artificial. |

| Linhagens | \mathbf{R}_0 | T | r _m | λ |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SUS-BA | 132,39 ± 27,14 b | $41,38 \pm 0,50$ a | 0.12 ± 0.01 b | $1,12 \pm 0,01$ b |
| Metaflumizone-R | $116,70 \pm 19,17 \text{ b}$ | $42,06 \pm 0,48$ a | $0,11 \pm 0,01 \text{ b}$ | $1,12 \pm 0,01 \text{ b}$ |
| HZm (SUS-BA $∂$ × | $448,20 \pm 54,33$ a | $38,79 \pm 0,27 \text{ b}$ | 0.16 ± 0.01 a | 1 17 + 0.01 a |
| Metaflumizone-R $\stackrel{\bigcirc}{\downarrow}$) | 446,20 ± 34,33 a | 36,79 ± 0,27 0 | $0.10 \pm 0.01 a$ | $1,17 \pm 0,01 \ a$ |

Taxa líquida de reprodução (R_0), duração média de uma geração (T), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e taxa finita de aumento (λ).

Para os valores da taxa intrínseca de crescimento (r_m) , os valores encontrados foram positivos indicando aumentos populacionais nas três linhagens avaliadas. A razão finita de aumento (λ) foi de 1,12 para as linhagens SUS-BA e Metaflumizone-R e de 1,17 para HZm 1,17. O custo adaptativo relativo da linhagem Metaflumizone-R foi de 0,91 indicando que, na ausência de pressão de seleção por metaflumizone, essa linhagem apresenta uma desvantagem competitiva em comparação com a linhagem suscetível. Por outro lado, a linhagem dos heterozigotos (HZm) mostrou um custo adaptativo relativo de 1,33, demonstrando ausência de custo.

4.4. Discussão

No presente estudo foram verificadas presença de custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* a inseticidas bloqueadores de canais de sódio, baseado em parâmetros biológicos da tabela de vida de fertilidade mediante uso de linhagens geneticamente semelhantes. O valor adaptativo para a linhagem Indoxacarb-R e Metaflumizone-R foi de 0,93 e 0,91 respectivamente, relativamente ao valor da taxa intrínseca de crescimento (r_m) para linhagem SUS-BA. A linhagem suscetível de referência (SUS-BA) foi obtida da mesma população de campo (BA-48) que originou as linhagens resistentes (Indoxacarb-R e Metaflumizone-R). Portanto, as linhagens avaliadas no presente estudo apresentavam o mesmo componente genético, sendo as linhagens resistentes e suscetíveis diferentes apenas em pequenas regiões do genoma que confere resistência a indoxacarb ou metaflumizone, o que torna mais adequado para a avaliação dos custos adaptativos associados à resistência (ffrench-Constant & Bass 2017, Shen et al. 2017).

Houve aumento da CL_{50} com a pressão de seleção da população BA-48 com indoxacarb e metaflumizone, ao passo que houve redução na CL_{50} desta mesma população BA-

48 na ausência de pressão de seleção por mais de 20 gerações para dar origem à linhagem SUS-BA utilizado no presente estudo. A CL₅₀ de SUS-BA foram próximos da CL₅₀ da linhagem suscetível de referência de laboratório (SUS) (Capítulo 3). De modo semelhante, linhagens de *P. xylostella* apresentaram redução da razão de resistência na ausência de pressão de seleção e aumento com pressão de seleção do inseticida metaflumizone em laboratório (Shen et al. 2017, 2020). Esta instabilidade pode ser explicada devido ao caráter incompletamente recessivo de resistência a estes inseticidas e custos adaptativos associados à resistência (Afzal et al. 2015, Zhang et al. 2017, Barbosa et al. 2020). A resistência sendo instável, esta característica pode ser explorada para manejar a resistência dos insetos a inseticidas, mediante a rotação de inseticidas com diferentes mecanismos de ação.

No presente estudo, os custos adaptativos associados à resistência de S. frugiperda aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone foram avaliadas medindo-se parâmetros biológicos da tabela de vida de fertilidade. Foi observado uma maior duração do tempo larval e ovo-adulto para a linhagem Indoxacarb-R e este atraso no desenvolvimento pode promover uma desvantagem significativa mediante, por exemplo, uma maior exposição aos inimigos naturais (Dmitriew & Rowe 2005). Além disso, este atraso poderia resultar em uma emergência assíncrona da maioria dos adultos suscetíveis/heterozigotos e resistentes no campo, principalmente na linhagem Indoxacarb-R que apresentou quatro dias a mais que a linhagem suscetível SUS-BA. Uma vez que o acasalamento de S. frugiperda ocorre em média três dias após a emergência do adulto (Simmons & Marti 1992) e considerando que há uma redução na fecundidade e fertilidade após esse período é possível que ocorra acasalamentos mal-sucedidos entre as linhagens resistente e suscetível/heterozigoto. Esta falta de sincronia do entre a emergência dos adultos promoveriam o acasalamento entre os indivíduos da linhagem resistente, e o acasalamento entre a população resistente e suscetível contribuem para diminuir a frequência de alelos resistentes e retardar a evolução da resistência (Gassmann et al. 2009, Jakka et al. 2014). Outras pesquisas sobre o desenvolvimento assíncrono de suscetíveis e resistente S. frugiperda em condições de campo seria necessário entender sua importância para evolução da resistência.

Outros parâmetros biológicos como viabilidade das fases foram afetados, entretanto a maioria das viabilidades para as linhagens resistentes e a linhagem suscetível foram similares, sendo os heterozigotos que apresentaram maiores viabilidades das fases avaliadas. Assim como para peso de lagartas e pupas em que as linhagens resistentes avaliadas foram afetadas e os heterozigotos apresentaram maior peso. Da mesma forma, foi relatado um aumento no custo adaptativo devido a resistência a indoxacarb a *H. armigera* (Cui et al. 2018, Bird 2020),

Chroridea virescens (Lepidoptera: Noctuidae) (Sayyed & Ahmad 2008) e *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) (Afzal et al. 2015) e para metaflumizone em *P. xylostella* (Shen et al. 2017).

As linhagens resistentes Indoxacarb-R e Metaflumizone-R apresentaram valores baixos de R₀ e demais parâmetros da tabela de vida comparados aos heterozigotos das respectivas linhagens. Respostas semelhantes foram reportados para *P. xylostella* para metaflumizone e *H. armigera* para indoxacarb, em que os autores associaram o custo a desvios de recursos normalmente investidos em características biológicas para manutenção de mecanismos de resistência assim como aumento na produção de enzimas de desintoxicação (Shen et al. 2017, Cui et al. 2018). No Brasil, linhagens de *S. frugiperda* resistentes a metaflumizone e spinosad também interferiram negativamente em algumas características biológicas, como o desenvolvimento das lagartas e parâmetros da tabela de vida (Okuma et al. 2018, Barbosa et al. 2020).

O custo adaptativo relativo foi menor e semelhante para ambas linhagens resistentes, e os resultados indicam que na ausência de pressão de seleção as linhagens resistentes terão desempenho inferior em relação à linhagem suscetível, possibilitando assim o restabelecimento da suscetibilidade, como abordado por Afzal et al. (2020) que a resistência a indoxacarb em *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) apresentou uma redução significativa na resistência após oito gerações, devido provavelmente aos custos adaptativos. Por outro lado, os heterozigotos não apresentaram custo relativo e melhores índices na tabela de vida, provavelmente devido a um efeito de heterose. O custo adaptativo dos heterozigotos é considerado bastante importante, pois os heterozigotos que são os principais carreadores de alelos da resistência nos estágios iniciais da evolução da resistência (Roush & McKenzie 1987, Roush & Daly 1990).

Em resumo, este estudo fornece informações úteis para explorar os custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas indoxacarb e metaflumizone em programas de MRI.

Referências

Afzal, M. B. S., S. A. Shad, E. Basoalto, M. Ejaz, and J. E. Serrao. 2015. Characterization of indoxacarb resistance in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, stability and fitness cost. J. Asia. Pac. Entomol. 18: 779–785.

- Barbosa, M. G., T. P. P. André, A. D. S. Pontes, S. A. Souza, N. R. X. Oliveira, and P. L. Pastori. 2020. Insecticide Rotation and Adaptive Fitness Cost Underlying Insecticide Resistance Management for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol.
- **Bird, L. J., Drynan, L. J., Walker, P. W. 2020**. Relative fi tness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).
- Cao, G., and Z. Han. 2006. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. Pest Manag. Sci. 62: 746–751.
- Cui, L., Q. Wang, H. Qi, Q. Wang, H. Yuan, and C. Rui. 2018. Resistance selection of indoxacarb in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): cross-resistance, biochemical mechanisms and associated fitness costs. Pest Manag. Sci. 74: 2636–2644.
- **Demirci, Ö., K. Güven, D. Asma, S. Öğüt, and P. Uğurlu. 2018**. Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 147: 749–758.
- **Dmitriew, C., and L. Rowe**. **2005**. Resource limitation, predation risk and compensatory growth in a damselfly. 150–154.
- **ffrench-Constant, R. H., and C. Bass. 2017**. Does resistance really carry a fitness cost? Curr. Opin. Insect Sci. 21: 39–46.
- Freeman, J. C., L. B. Smith, H. Sun, J. G. Scott, J. J. Silva, and Y. Fan. 2021. Fitness studies of insecticide resistant strains: lessons learned and future directions. Pest Manag. Sci.
- **Gassmann, A. J., Y. Carrière, and B. E. Tabashnik**. **2009**. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 54: 147–163.
- Haddi, K., L. P. Mendonca, M. F. Dos Santos, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira. 2015.
 Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 108: 362–369.
- Hewa-Kapuge, S., S. McDougall, and A. A. Hoffmann. 2009. Effects of Methoxyfenozide, Indoxacarb, and Other Insecticides on the Beneficial Egg Parasitoid *Trichogramma* nr. brassicae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Under Laboratory and Field Conditions. J. Econ. Entomol. 96: 1083–1090.
- **Jakka, S. R. K., V. R. Knight, and J. L. Jurat-Fuentes**. **2014**. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 107: 342–351.

- **Kasten, P., A. A. C. M. Precetti, and J. R. P. Parra**. **1978**. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. Rev. Agric. 53: 69–78.
- **Kliot, A., and M. Ghanim**. **2012**. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Manag. Sci. 68: 1431–1437.
- **LeOra software**. **2002**. Polo-plus: Probit and logit analysis computer program. Version 1.0, LeOra Software, Berkeley, CA.
- Maia, A. D. H. N., R. A. D. A. Pazianotto, A. J. B. Luiz, J. S. Marinho-Prado, and A. Pervez. 2014. Inference on arthropod demographic parameters: Computational advances using R. J. Econ. Entomol. 107: 432–439.
- McCann, S. F., G. D. Annis, R. Shapiro, D. W. Piotrowski, G. P. Lahm, J. K. Long, K. C. Lee, M. M. Hughes, B. J. Myers, S. M. Griswold, B. M. Reeves, R. W. March, P. L. Sharpe, P. Lowder, W. E. Barnette, and K. D. Wing. 2001. The discovery of indoxacarb: Oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. Pest Manag. Sci. 57: 153–164.
- Nauen, R., T. C. Sparks, A. Elbert, and A. Mccaffery. 2019. IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides, pp. 995–1012. *In* Mod. Crop Prot. Compd. Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha.
- Okuma, D. M., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, A. P. Silva, and C. Omoto. 2018. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. Pest Manag. Sci. 74: 1441–1448.
- **R Development Core Team. 2020.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- **Roush, R. T., and J. C. Daly**. **1990**. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97–152. *In* Roush, R. T.; Tabashnik, B.E. (ed.), Pestic. Resist. Arthropods. Chapman and Hall, New York, NY.
- Roush, R. T., and J. A. McKenzie. 1987. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. Annu. Rev. Entomol. 32: 361–380.
- Santos, V., H. de Siqueira, J. da Silva, and M. de Farias. 2011. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 40: 264–270.
- **Sayyed, A. L. I. H., and M. Ahmad**. **2008**. Fitness Costs Limit the Development of Resistance to Indoxacarb and Deltamethrin in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). 1927–1933.

- Shen, J., D. Li, S. Zhang, X. Zhu, H. Wan, and J. Li. 2017. Fitness and inheritance of metaflumizone resistance in *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 139: 53–59.
- Shen, J., Z. Li, D. Li, R. Wang, S. Zhang, H. You, and J. Li. 2020. Biochemical mechanisms, cross-resistance and stability of resistance to metaflumizone in *Plutella xylostella*. Insects. 11: 1–9.
- Silva, G. A., M. C. Picanço, L. Bacci, A. L. B. Crespo, J. F. Rosado, and R. N. C. Guedes.
 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manag. Sci. 67: 913–920.
- Silva, T. B. M., W. M. Silva, M. R. Campos, J. E. Silva, L. M. S. Ribeiro, and H. A. A. Siqueira. 2016. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. Crop Prot. 79: 80–86.
- Silver, K. S., W. Song, Y. Nomura, V. L. Salgado, and K. Dong. 2010. Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pestic. Biochem. Physiol. 97: 87–92.
- **Simmons, A. M., and O. G. Marti. 1992.** Mating by the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): frequency, duration, and effect of temperature. Environ. Entomol. 21: 371–375.
- **Sparks, T. C., and B. A. Lorsbach**. **2017**. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. Pest Manag. Sci. 73.
- von Stein, R. T., K. S. Silver, and D. M. Soderlund. 2013. Indoxacarb, metaflumizone, and other sodium channel inhibitor insecticides: Mechanism and site of action on mammalian voltage-gated sodium channels. Pestic. Biochem. Physiol. 106: 101–112.
- Wanumen, A. C., G. A. Carvalho, P. Medina, E. Viñuela, and Á. Adán. 2016. Residual Acute Toxicity of Some Modern Insecticides Toward Two Mirid Predators of Tomato Pests. J. Econ. Entomol. 109: 1079–1085.
- Wing, K. D., M. Sacher, Y. Kagaya, Y. Tsurubuchi, L. Mulderig, M. Connair, and M. Schnee. 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Prot. 19: 537–545.
- **Zhang, S., X. Zhang, J. Shen, D. Li, H. Wan, H. You, and J. Li. 2017**. Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 140: 85–89.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) tem sido baseado no uso de plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) e inseticidas químicos convencionais no Brasil, e em consequência da alta pressão de seleção pelo intenso uso destes métodos de controle os problemas com resistência de insetos têm se tornado cada vez mais constantes. Desta forma, estudos que permitam gerar informações de inseticidas com novo modo de ação, como os inseticidas bloqueadores de canal de sódio (indoxacarb e metaflumizone), são fundamentais para programas de manejo de resistência de insetos (MRI) de forma proativa e eficiente.

No presente estudo, foi estabelecido linhas básicas de suscetibilidade de *S. frugiperda* aos inseticidas bloqueadores de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) no Brasil, antes da ocorrência de falhas de controle com o uso destes inseticidas no campo. Foram obtidas baixa variação na suscetibilidade a indoxacarb e metaflumizone em populações de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2017/2018. A frequência de alelos que conferem resistência a indoxacarb, estimada pelo método de F₂ *screen*, foi de 0,0452 (0,0382 - 0,0527 CI 95%). Além disso, foi possível determinar uma concentração diagnóstica, baseada na CL₉₉ de cada inseticida, a ser utilizado em programas de monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone nas principais regiões produtoras de milho. Resultados do monitoramento realizado de 2017 a 2020 evidenciaram variação geográfica e temporal na suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone. Reduções na suscetibilidade a estes inseticidas foram mais evidentes em populações de *S. frugiperda* provenientes da região do Cerrado brasileiro.

O risco potencial de evolução da resistência de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone foi demonstrado a partir da seleção de linhagens resistentes a estes inseticidas em condições laboratório, com razões de resistência de ≈ 30 vezes para indoxacarb e > 600 vezes para metaflumizone. Estudos de bases genéticas da resistência evidenciaram um caráter incompletamente recessivo, com efeito poligênico, tanto para indoxacarb quanto para metaflumizone. Não foi observada a presença de resistência cruzada dos inseticidas bloqueadors de canais de sódio (indoxacarb e metaflumizone) e outros inseticidas (chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, lufenuron, teflubenzuron, spinetoram e chlorantraniliprole) e proteínas Bt (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F e Vip3Aa20). Por outro lado, foi verificada a presença de resistência cruzada entre indoxacarb e metaflumizone. Custos adaptativos associadas à

resistência de *S. frugiperda* a indoxacarb e metaflumizone foram verificadas para os parâmetros da tabela de vida de fertilidade.

O presente estudo fornece informações úteis para o manejo proativo da resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone no Brasil, mediante, por exemplo, a rotação de inseticidas com diferentes modos de ação. Um dos requisitos básicos para o sucesso da estratégia de rotação está na ausência de resistência cruzada entre os inseticidas e a presença de custos adaptativos associados à resistência. Infelizmente não foi possível explicar os mecanismos de resistência de S. frugiperda a indoxacarb e metaflumizone. O uso destes inseticidas no controle de lepidópteros praga no Brasil ainda é baixo. Contudo, verificamos a redução na suscetibilidade a estes inseticidas no decorrer do tempo, principalmente para as populações de S. frugiperda provenientes da região do Cerrado. Não verificamos a presença de resistência cruzada entre inseticidas bloqueadores de canais de sódio e os principais inseticidas e proteínas Bt. Há necessidade de verificar a relação de resistência cruzada a inseticidas carbamatos (thiodicarb e methomyl) e avermectinas (emamectin benzoate) que não foram testados no presente estudo. O uso de inseticidas carbamatos e avermectinas tem aumentado de maneira expressiva com a detecção de Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil em 2013. Com o avanço de ferramentas moleculares, estudos de sequenciamento de RNA/DNA poderiam auxiliar na compreensão dos mecanismos de resistência a indoxacarb e metaflumizone em S. frugiperda.