

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

Custo adaptativo entre linhagens e em diferentes hospedeiros de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a diamidas

Fernando Elias Oliveira Padovez

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

**Piracicaba
2021**

Fernando Elias Oliveira Padovez
Engenheiro Agrônomo

**Custo adaptativo entre linhagens e em diferentes hospedeiros de *Spodoptera frugiperda*
(J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a diamidas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Dra. **ALINE SARTORI GUIDOLIN**

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

Piracicaba
2021

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

Padovez, Fernando Elias Oliveira

Custo adaptativo entre linhagens e em diferentes hospedeiros de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a diamidas / Fernando Elias Oliveira Padovez. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011,-- Piracicaba, 2021.

72 p.

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

1. Clorantraniliprole 2. Componente genético 3. Lagarta-do-cartucho 4. Manejo da resistência de pragas I. Título

AGRADECIMENTOS

A Dra. Aline S. Guidolin pela orientação, ensinamentos e paciência com que me possibilitou realizar e concluir este trabalho.

Ao Prof Dr. Celso Omoto pelos ensinamentos e disponibilização do laboratório para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Resistência de Artrópodes (ESALQ/USP), que me auxiliaram, ensinaram e promoveram grandes experiências.

A todos os amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP).

Aos membros da República Gambiarra, pelas amizades e experiências.

As empresas Bayer® e Basf® pelo fornecimento as sementes de milho, soja e algodão, que foram utilizadas neste trabalho.

Aos meus Pais, irmãos e namorada que sempre me apoiaram e me aconselharam.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta jornada.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE TABELAS..... | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| Referências..... | 15 |
| 2. CUSTO ADAPTATIVO ENTRE LINHAGENS COM DIFERENTES COMPONENTES GENÉTICOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES A CLORANTRANILIPROLE..... | 21 |
| Resumo..... | |
| Abstract..... | |
| 2.1. Introdução..... | 22 |
| 2.2 Material e Métodos..... | 24 |
| 2.2.1. Insetos..... | 24 |
| 2.2.2. Estabelecimento da linhagem de <i>Spodoptera frugiperda</i> quase-isogênica resistente a clorantraniliprole..... | 24 |
| 2.2.3. Validação da linhagem de <i>Spodoptera frugiperda</i> quase-isogênica resistente a clorantraniliprole..... | 26 |
| 2.2.4. Custo adaptativo das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> | 27 |
| 2.2.5. Análises Estatísticas..... | 28 |
| 2.3 Resultados..... | 29 |
| 2.3.1. Validação da linhagem de <i>Spodoptera frugiperda</i> quase-isogênica resistente a clorantraniliprole..... | 29 |
| 2.3.2. Custo adaptativo das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> com o componente genético similar..... | 29 |
| 2.3.3. Custo adaptativo das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> com o componente genético distante..... | 32 |
| 2.4. Discussão..... | 35 |
| 2.5. Conclusões..... | 40 |
| Referências..... | 40 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. CUSTO ADAPTATIVO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES A CLORANTRANILIPROLE EM DIFERENTES HOSPEDEIROS | 48 |
| Resumo | |
| Abstract..... | |
| 3.1. Introdução..... | 49 |
| 3.2. Material e Métodos..... | 50 |
| 3.2.1. Insetos..... | 50 |
| 3.2.2. Plantas..... | 51 |
| 3.2.3. Custo adaptativo da linhagem de <i>Spodoptera frugiperda</i> quase-isogênica resistente a clorantraniliprole em folhas de milho, soja ou algodão..... | 52 |
| 3.2.4. Análises estatísticas | 53 |
| 3.3. Resultados..... | 54 |
| 3.3.1. Peso de lagarta e pupa das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> em plantas de milho, soja e algodão | 54 |
| 3.3.2. Viabilidade das fases de ovo, lagarta e pupa e número de ovos por fêmea das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> em plantas de milho, soja e algodão | 54 |
| 3.3.3. Tempo de desenvolvimento das fases de ovo, lagarta e pupa das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> em plantas de milho, soja e algodão | 56 |
| 3.3.4. Parâmetros de crescimento populacional das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho, soja e algodão | 58 |
| 3.4. Discussão..... | 60 |
| 3.5 Conclusões..... | 68 |
| Referências | 68 |

RESUMO

Custo adaptativo entre linhagens e em diferentes hospedeiros de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a diamidas

O controle de pragas e o manejo da resistência a inseticidas são aspectos cruciais para o sucesso da agricultura. Muitos conceitos são de grande importância para estabelecer um programa de manejo da resistência, entre eles o conceito de custo adaptativo. Quando uma população sofre com custo adaptativo relacionado a resistência a um inseticida, o indivíduo resistente tem uma desvantagem em relação ao suscetível quando na ausência da pressão de seleção do inseticida. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga de difícil controle, devido a sua capacidade de adaptação, alta capacidade reprodutiva e de dispersão além de apresentar inúmeros casos de resistência a inseticidas e plantas Bt, inclusive aos inseticidas do grupo das diamidas. As diamidas são inseticidas seletivos e eficazes em campo, no entanto algumas linhagens resistentes de *S. frugiperda* já foram selecionadas para diamidas. O custo adaptativo de *S. frugiperda* resistente a diamidas permanece desconhecido, sendo assim nesta dissertação teve-se por objetivo avaliar o custo adaptativo de *S. frugiperda* resistente a diamidas, considerando a influência do componente genético das linhagens utilizadas e da fonte alimentar. Inicialmente, foi estabelecido uma linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas (Iso-RR), usando como parentais a linhagem resistente original a clorantraniliprole (RR) e a linhagem suscetível de referência (SS). No capítulo 2 foi determinado o custo adaptativo de *S. frugiperda* em dois experimentos, um utilizando linhagens de componente genético próximo (Iso-RR e SS) e outro utilizando linhagens de componente genético distante (RR e SS) e no capítulo 3 foi avaliado a influência da planta hospedeira sobre o custo adaptativo da linhagem Iso-RR, sendo utilizado plantas de milho, soja e algodão. Os resultados indicaram que o componente genético das linhagens influencia os resultados de custo adaptativo, pois a linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas não apresentou custo adaptativo, enquanto a linhagem resistente original apresentou um custo adaptativo significativo. Os resultados também indicaram uma influência da fonte alimentar sobre o custo adaptativo, visto que a linhagem quase-isogênica quando alimentada em plantas de milho não apresentou custo adaptativo, enquanto a mesma linhagem apresentou um custo quando alimentada em plantas de soja e algodão. Ambos resultados indicam que muitos parâmetros devem ser considerados antes de se tomar decisões de manejo com base nos estudos de custo adaptativo, sendo que estratégias de manejo devem levar em consideração a relação genética entre as populações de campo e a cultura que está sendo estabelecido a estratégia de manejo.

Palavras-chave: Clorantraniliprole, Componente genético, Lagarta-do-cartucho, Manejo da resistência de pragas

ABSTRACT

Fitness cost between strains and among different host plants in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to diamides

Pest control and insecticide resistance management are crucial aspects of agricultural success. Many concepts are of great importance to establish a resistance management program, including the fitness cost concept. When a population suffers from fitness cost related to resistance to an insecticide, the resistant individual is at a disadvantage in relation to the susceptible when under pressure of insecticide selection. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is a difficult pest to control as it presents numerous cases of resistance to insecticides and Bt plants, including insecticides of the diamide group. Diamides are selective and efficient insecticides in the field, however, some resistant strains of *S. frugiperda* have already been selected for diamides. The fitness cost of diamide-resistant *S. frugiperda* is unknown, so this dissertation aimed to evaluate the adaptive cost of diamide-resistant *S. frugiperda* considering the influence of the genetic component of the strains used and the food source. Initially, a near-isogenic strain of diamide-resistant *S. frugiperda* (Iso-RR) was established, using the original chlorantraniliprole resistant (RR) and the susceptible reference (SS) strains with parents. In chapter 2, the adaptive cost of *S. frugiperda* was determined in two experiments, one using strains with genetic component (Iso-RR and SS) and the other using strains with distant genetic component (RR and SS) and in chapter 3 the influence was evaluated of the host plant on the fitness cost of the Iso-RR strain, using corn, soybean and cotton plants. The results indicated that the genetic component of the strains influences the adaptive cost results, as the near-isogenic strain of *S. frugiperda* resistant to diamides did not present fitness cost, while the original resistant strain presented a significant fitness cost. The results also indicated an influence of the host plant on the fitness cost, since the near-isogenic strain when fed on corn plants did not present fitness cost, while the same strain presented a cost when fed on soybean and cotton plants. Both results indicate that many parameters must be considered before making management decisions based on fitness cost studies, and management planning must take into account the genetic relationship between field groups and the crop that is being established.

Keywords: Chlorantraniliprole, Genetic background, Fall armyworm, Resistant pest management

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Estabelecimento da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênia resistente a clorantraniliprole 26
- Figura 2.2.** Curvas concentração resposta de *Spodoptera frugiperda* a clorantraniliprole. 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1.** Parâmetros biológicos (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os heterozigotos (H1 e H2).31
- Tabela 2.2.** Parâmetros de crescimento populacional (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os heterozigotos (H1 e H2).32
- Tabela 2.3.** Parâmetros biológicos (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), resistente a clorantraniliprole (RR) e heterozigotos (H1 e H2).34
- Tabela 2.4.** Parâmetros de crescimento populacional (média \pm erro padrão) das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), resistente a clorantraniliprole (RR) e heterozigotos (H1 e H2).35
- Tabela 3.1.** Parâmetros biológicos (médias \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os heterozigotos (H1 e H2) alimentadas com milho, soja ou algodão.57
- Tabela 3.2.** Parâmetros de crescimento populacional de linhagens *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho, soja ou algodão.60

1. INTRODUÇÃO

O manejo de pragas é um dos fatores mais desafiadores para os agricultores, sendo que para maioria das culturas esse manejo é feito utilizando inseticidas, os quais podem ultrapassar 0,2 kg de ingrediente ativo por hectare nas culturas por ano (Zhang, 2018). Contudo, o controle químico é um desafio para o manejo de pragas, devido a casos de resistência de insetos aos principais produtos, e escassez de inseticidas com novos modos de ação (Gould et al., 2018). A resistência de insetos a inseticidas é considerada um problema mundial, sendo documentada em mais de 580 espécies de insetos e ácaros (Nauen et al., 2019). A evolução da resistência é uma questão de pressão de seleção e tempo, sendo que o aumento do uso de inseticidas e a aplicação de inseticidas de mesmo modo de ação aumentam a pressão de seleção, que com o tempo levam a seleção de indivíduos resistentes (Ffrench-Constant, 2007). Devido a evolução de resistência para vários modos de ação e a atual carência de novos modos de ação no mercado de produtos químicos, é fundamental preservar a eficácia dos produtos que se tem hoje, para que estes sejam utilizados em um programa de manejo integrado de pragas (Sparks, 2013).

Entre os grupos químicos que ainda apresentam alta eficácia em relação as pragas-alvos estão as diamidas. Essas apresentam características compatíveis com o que é esperado atualmente no mercado e na sociedade, sendo um grupo químico de baixa toxicidade a mamíferos e insetos benéficos, além de apresentar um modo de ação único permitindo o uso em rotação com outros grupos químicos (Ebbinghaus-kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012). Esse grupo de inseticidas tem como origem compostos extraídos da casca de uma árvore nativa da bacia amazônica e América Central, chamada *Ryania speciosa* Vahl (Flacoutiaceae) (Crosby, 1971). Nesses compostos foram identificadas características inseticidas que provocavam paralisia nos insetos, levando-os a morte rapidamente. Durante vários anos diversas moléculas foram diretamente ligadas a estas características e foram nomeadas como rianóides (Waterhouse et al., 1984; Cabras et al., 2001; Ruest et al., 2002). Esses compostos se ligam em canais de cálcio específicos no retículo sarcoplasmático das células musculares, conhecidos como canais de rianodina. Essa ligação provoca uma abertura contínua destes canais ocorrendo assim um grande influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) para dentro das células, causando contração muscular permanente nos insetos afetados, levando a paralisia e morte (Sutko et al., 1997). Porém esses compostos botânicos foram pouco explorados no manejo de pragas por não serem seletivos, sendo tóxicos a mamíferos e peixes (Lehmberg & Casida, 1994). No entanto, a partir desse mecanismo de

ação e deste extrato foram sintetizadas moléculas inseticidas, atualmente conhecidas como diamidas.

A molécula inseticida flubendiamida foi a primeira molécula sintetizada como inseticida e pertence ao grupo do ácido ftálico (Tonoishi et al., 2005). Posteriormente, foram sintetizadas duas outras moléculas inseticidas, clorantraniliprole e ciantraniliprole, que pertencem ao grupo das diamidas antranílicas (Lahm 2005, 2007, 2009). Essas moléculas têm o modo de ação muito semelhante aos rianóides, porém se ligam em sítios diferentes nos canais de rianodina. Isso faz com que as diamidas sejam mais seletivas a insetos benéficos e mamíferos quando comparado aos rianóides e a outros inseticidas sintéticos, sendo possível na utilização de um programa de manejo integrado de pragas (Cordova et al., 2006). As moléculas flubendiamida e clorantraniliprole atuam no controle de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Enquanto, o inseticida ciantraniliprole tem efeito em outras ordens como Hemiptera e Thysanoptera, e por ter características sistêmicas é utilizado em tratamento de sementes (Foster et al., 2012; Nauen & Steinbach, 2016). Apesar de serem lançados a pouco mais de uma década as vendas destes produtos é significativa, sendo que em 2015 já correspondia a mais de 8% dos mercados de inseticidas, a presença em grande escala destes produtos no campo pode significar um grande risco a evolução da resistência e a perda de eficiência (Teixeira & Andaloro, 2011; Sparks & Nauen, 2015).

Em laboratório já foram relatados casos de resistência em diversas espécies para os inseticidas diamidas como *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Silva et al., 2012; Troczka, 2012; Wang et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Steinbach, 2015), *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lai et al., 2011; Zuo et al., 2019), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Roditakis et al., 2015; Silva et al., 2016, Roditakis et al., 2017), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Pereira et al., 2020) e *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Gutierrez-Moreno et al., 2018; Bolzan et al., 2019). Na maioria destes casos, o principal mecanismo de resistência associado a resistência a diamidas foi atribuído a mutações no receptor de rianodina, principalmente nas substituições de amino ácidos como G4946E e I4792M (Troczka et al., 2015; Steinbach et al., 2015; Douris et al., 2015), porém a resistência metabólica também foi identificada como um componente importante em alguns casos, principalmente quando relacionadas a algumas enzimas de detoxificação (Li et al., 2017; Li et al., 2018; Mallot et al., 2019). Em *S. frugiperda* o principal mecanismo de resistência de uma linhagem resistente selecionada no Brasil (Bolzan et al., 2019) foi a mutação I4792M (Boaventura et al., 2019).

Spodoptera frugiperda, mais conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, é uma praga bastante desafiadora, pois este inseto tem alta capacidade de dispersão e reprodução (Pogue, 2002), além de apresentar um hábito polífago com mais de 350 hospedeiros incluindo diversas culturas agrícolas, como o milho, trigo, sorgo, soja, algodão e tomate (Montezano et al., 2018). Este lepidóptero é nativo das Américas, porém atualmente vem se destacando no cenário mundial pois já se encontra em diversos continentes como África, Ásia e Oceania, ameaçando a produção de alimento nos mesmos (Georgen et al, 2016; FAO, 2019; EPPO, 2021). No Brasil, *S. frugiperda* é considerada uma das principais pragas do cenário agrícola, pois a agricultura intensiva com a sobreposição de culturas hospedeiras como soja, milho e algodão permite a presença deste inseto durante todo o ano. Aliado a estas características, o manejo utilizado pela maioria dos produtores, com apenas a utilização de inseticidas químicos de mesmo modo de ação e plantas Bt, provocam uma grande pressão seletiva nas populações de *S. frugiperda* e, conseqüentemente aceleram a evolução da resistência. Como prova desse conceito inúmeros casos de resistência a diversos inseticidas e proteínas Bt já foram reportados no Brasil (Diez-Rodriguez & Omoto, 2001; Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2015; Okuma et al., 2017; Bolzan et al., 2019; Lira et al., 2020; Kaiser et al., 2021). Dentre esses casos destaca-se a população resistente a diamidas, que mundialmente foi a segunda população resistente a diamidas selecionada (Bolzan, 2019). O primeiro relato de uma linhagem resistente ao inseticida clorantraniliprole selecionada foi em Porto Rico um ano antes (Gutierrez-Moreno et al., 2018).

A linhagem resistente a clorantraniliprole do Brasil foi selecionada de uma população do estado da Bahia por meio da técnica de F₂ “screen”. A caracterização dessa linhagem demonstrou que a resistência de *S. frugiperda* a clorantraniliprole é autossômica (não dependendo do sexo ou do DNA mitocondrial), incompletamente recessiva (a suscetibilidade dos heterozigotos é mais similar a suscetibilidade dos indivíduos suscetíveis) e monogênica (regulado por apenas um gene ou locus). Além de apresentar resistência cruzada com as outras duas moléculas diamidas, flubendiamida e ciantraniliprole, podendo se considerar uma linhagem resistente ao grupo das diamidas (Bolzan et al., 2019). Estas características são de extrema importância para a implementação de um programa de manejo da resistência, principalmente para um grupo de inseticida tão importante quanto o grupo das diamidas. Além da caracterização da resistência, as decisões sobre o manejo da resistência se baseiam também no monitoramento da suscetibilidade e a avaliação do custo adaptativo associado a resistência (Stanley, 2014; Onstad, 2014). O monitoramento de *S. frugiperda* na cultura do milho vem sendo realizado pelo Laboratório de Resistência de Artrópodes

(ESALQ-USP) desde 2012, porém o custo adaptativo da linhagem de *S. frugiperda* associado à resistência a diamidas ainda segue desconhecido, e de fato há uma carência de estudos de custo adaptativo associados a diamidas em geral (Richardson et al., 2020).

O custo adaptativo associado a resistência é um fator genético, sendo que aspectos genéticos de populações de pragas resistentes influenciam na velocidade e intensidade da evolução da resistência (Kliot & Ghanim, 2012). Apresentar um custo adaptativo significa que o indivíduo resistente tem uma desvantagem no desenvolvimento em relação ao indivíduo suscetível na ausência de pressão de seleção, isto mantém baixa a frequência dos alelos associados a resistência. Caso não haja a presença de custo adaptativo a frequência dos indivíduos resistentes tende a crescer, mesmo com a ausência da pressão seletiva. Essa condição era considerada muito rara, porém com novos trabalhos, conceitos e pensamentos a respeito dos estudos adaptativos esta característica está se tornando mais comum (Kliot & Ghanim, 2012, Freeman et al., 2021). Entre as novas abordagens de se estudar custo adaptativo, está o conceito de expandir a métricas e considerar a influência do ambiente. Na maioria dos estudos, custo adaptativo é avaliado em relação a parâmetros biológicos como a fecundidade, tempo de desenvolvimento e longevidade (Gassmann et al., 2009; Kliot & Ghanim, 2012; Freeman et al., 2021). No entanto, vários aspectos influenciam os ensaios que determinam a presença de custo adaptativo, como o componente genético das populações a ser utilizadas e a fonte alimentar, este último é principalmente importante quanto se investiga insetos de hábito polífago (Freeman et al., 2021).

Em relação ao componente genético das populações objeto de estudo, existe a recomendação de que as linhagens utilizadas tenham o mesmo componente genético ou sejam as mais próximas possíveis. Isso é indicado para minimizar a influência de genes modificadores e/ou dos efeitos pleiotrópicos, ambos não obrigatoriamente associados a característica de resistência, sendo na maioria dos casos selecionados ao acaso. Gene modificadores e efeitos pleiotrópicos podem modificar totalmente a aptidão biológica de uma linhagem em comparação a outra (Riordan & Nadeau, 2017; Lenormand et al., 2018). Para se estabelecer linhagens cuja diferença genética seja majoritariamente entre os genes que conferem a resistência, é utilizado técnicas de introgressão do gene da resistência em uma linhagem de referência, quer seja por edição genética ou cruzamentos controlados (Ffrench-constant & Bass, 2017; Lenormand et al., 2018; Freeman et al, 2021; Leftwich et al., 2021). Contudo, o componente genético similar entre as linhagens é algo geralmente negligenciado em estudos de custo adaptativo devido às limitações técnicas. De modo geral, muitos estudos utilizam uma linhagem suscetível que está em condições de laboratório a anos, se alimentando

de dietas artificiais e em condições de temperatura, umidade e fotofase controladas. Com isso ocorre uma redução na variabilidade genética dessa linhagem suscetível, distanciando-a muito de uma população proveniente de campo que apresenta uma alta variabilidade genética, pois vem de um ambiente totalmente variável, principalmente em comparação ao laboratório (Freeman et al., 2021).

Além disto, a maioria destes estudos são feitos em condições de laboratório e exclusivamente com dietas artificiais ou apenas uma fonte alimentar (Ffrench-constant & Bass, 2017), isto restringe a aplicação dos estudos de uma maneira mais prática, pois não se avalia a influência de diferentes plantas hospedeiras e seus compostos em relação aos parâmetros biológicos e comportamentais. O conhecimento da presença ou ausência de custo adaptativo nos principais hospedeiros de uma praga agrícola é fundamental para estabelecer estratégias de manejo da resistência, fornecendo dados que podem sustentar modelos matemáticos capazes de prever a evolução da resistência e auxiliar na tomada de medidas para retardar esta evolução (Raymond et al., 2006; Gassmann et al., 2009; Williams et al., 2011; Ffrench-constant & Bass, 2017; Chen et al., 2018). Isso é fundamental para *S. frugiperda*, que nas grandes regiões produtoras do Brasil se alimenta das culturas de soja, milho e algodão, nas quais são utilizados vários produtos químicos para controle de pragas, dentre eles as diamidas (Agrofit, 2021). Por isso estudos de custo adaptativo feitos em diferentes fontes alimentares são de extrema importância quando se almeja exportar os estudos para o campo, especialmente devido a uma grande dificuldade em trazer um ensaio de custo adaptativo em condições reais de campo (Freeman et al., 2021).

Dessa forma, o objetivo geral dessa dissertação foi estudar o custo adaptativo associado a resistência a diamidas em linhagens de *S. frugiperda* resistentes a este grupo químico, visando auxiliar no estabelecimento de medidas de manejo a fim de retardar a evolução da resistência. Para tal, no capítulo 2 teve-se por objetivo investigar a influência do componente genético das linhagens para os resultados de custo adaptativo. Neste capítulo foi estabelecido uma linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas, sendo o custo adaptativo avaliado em dois experimentos nos quais a distância genética entre as linhagens resistente e suscetível diferiram. Enquanto no capítulo 3 teve-se por objetivo avaliar o impacto da fonte alimentar sobre o custo adaptativo. Neste capítulo o custo adaptativo da linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas foi mensurado utilizando plantas de milho, soja ou algodão como fonte alimentar.

Referências

- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 21/06/2021.
- Bolzan A, Padovez FEO, Nascimento ARB, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno HR, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to cloranthraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management science**, 75(10): 2682-2689
- Cabras, P, Caboni, P, Cabras, M (2001) Analysis by HPLC of ryanodine and dehydroryanodine residues on fruits and in ryania powdery wood. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(7): 3161-3163
- Carvalho, RA, Omoto, C, Field, LM, Williamson, MS, Bass, C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, 8(4): e62268
- Chen, X, Head, GP, Price, P, Kerns, DL, Rice, ME, Huang, F, Gilreath, RT, Yang, F (2019) Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. **Pest management science**, 75(4): 1074-1080
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y (2006) Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry Physiology** 84:196-214
- Crosby DG (1971) Minor insecticides of plant origin. **Naturally occurring insecticides**. Editor: Jacobson M, Crosby DG, pp.177-239, Dekker, Nova Iorque.
- Diez-Rodríguez, GI, Omoto, C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, 30(2): 311-316
- Ebbinghaus-Kintscher U, Luemmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Masaki T, Yasokawa N, Tohnishi M (2006) Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in insects. **Cell Calcium**, 39(1): 21-33
- EPPO (2021) European and Mediterranean Plant Protection Organization. Disponível em: <https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/shortnotes_qps/fall_armyworm>. Acessado em Junho 2021.

- FAO (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Briefing Note on FAO Actions on Fall Armyworm in Africa. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bt415e.pdf>>. Acessado em abril 2021
- Ffrench-Constant RH, Bass C (2017) Does resistance really carry a fitness cost? **Current opinion in insect science**, 21: 39-46
- Ffrench-Constant, RH (2007) Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, 23(1): 1-4
- Foster SP, Denholm I, Rison J, Portillo HE, Margaritopoulos J, Slater R (2012) Susceptibility of standard clones and European field populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), to the novel anthranilic diamide insecticide cyantraniliprole. **Pest Management Science**, 68:629-633
- Freeman, JC, Smith, LB, Silva, JJ, Fan, Y, Sun, H, Scott, JG (2021) Fitness studies of insecticide resistant strains: lessons learned and future directions. **Pest Management Science**, DOI:10.1002/ps.6306
- Gassmann, AJ, Carrière, Y, Tabashnik, BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, 54: 147-163
- Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M (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** 11:1-9
- Gould, F, Brown, ZS, Kuzma, J (2018) Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? **Science**, 360(6390): 728-732
- Gutiérrez-Moreno, R, Mota-Sanchez, D, Blanco, CA, Whalon, ME, Terán-Santofimio, H, Rodriguez-Maciél, JC, DiFonzo, C (2019) Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of economic entomology**, 112(2): 792-802
- Kaiser, IS, Kanno, RH, Bolzan, A, Amaral, FS, Lira, EC, Guidolin, AS, Omoto, C (2021) Baseline response, monitoring, and cross-resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to sodium channel blocker insecticides in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 114(2): 903-913
- Kliot, A, Ghanim, M (2012) Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest management science**, 68(11): 1431-1437
- Lahm GP, Cordova D, Barry JD (2009) New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 17:4127-4133

- Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Flexner L, Clark CE, Cordova D (2005) Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15:4898-906
- Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordova D, Flexner L, Bellin CA, Dubas CM, Smith BK, Hughes KA, Hollingshaus JG, Clark CE, Benner EA (2007) Ryanaxypyrtrm: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17:6274-6279
- Lai T, Li J, Su j (2011) Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to clorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry Physiology** 101:195-205
- Leftwich PT, Spurgin LG, Harvey-Samuel T, Thomas CJ, Paladino LC, Edgington MP, Alphey L (2021) Genetic pest management and the background genetics of release strains. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 376(1818): 20190805
- Lehmberg, E, Casida, JE (1994) Similarity of insect and mammalian ryanodine binding sites. **Pesticide biochemistry and physiology**, 48(2): 145-152
- Lenormand, T, Harmand, N, Gallet, R (2018) Cost of resistance: an unreasonably expensive concept. **bioRxiv**, 276675
- Lira, EC, Bolzan, A, Nascimento, AR, Amaral, FS, Kanno, RH, Kaiser, IS, Omoto, C (2020) Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest management science**, 76(8): 2674-2680
- Nascimento, ARBD, Farias, JR, Bernardi, D, Horikoshi, RJ, Omoto, C (2016) Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest management science**, 72(4): 810-815
- Nauen R, Steimbach D (2015) Resistance to diamides insecticides in Lepidopteran pests. In: **Advances in insect control and resistance management**, Springer International Publishing, 219-240
- Nauen, R, Slater, R, Sparks, TC, Elbert, A, Mccaffery, A (2019) IRAC: insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides. **Modern crop protection compounds**, 3: 995-1012
- Okuma, DM, Bernardi, D, Horikoshi, RJ, Bernardi, O, Silva, AP, Omoto, C (2018) Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest management science**, 74(6): 1441-1448

- Onstad, DW (2013). **Insect resistance management: biology, economics, and prediction.** Academic Press, 538p
- Pereira, RM, Neto, DA, Amado, D, Durigan, MR, Franciscatti, RA, Mocheti, M, Omoto, C (2020) Baseline susceptibility and frequency of resistance to diamide insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, 137: 105266
- Raymond, B, Sayyed, AH, Wright, DJ (2007) Host plant and population determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Biology Letters**, 3(1): 83-86
- Ribeiro LMS, Wanderley-Teixeira V, Ferreira HN, Teixeira AAC, Siqueira HAA (2014) Fitness costs associated with field-evolved resistance to clorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletin of Entomological Research**, 104:88-96
- Riordan JD, Nadeau JH (2017) From peas to disease: modifier genes, network resilience, and the genetics of health. **The American Journal of Human Genetics**, 101(2): 177-191
- Roditakis, E, Steinbach, D, Moritz, G, Vasakis, E, Stavrakaki, M, Ilias, A, Garcia-Vidal, L, Matinez-Aguirre, MDR, Bielza, P, Morou, E, Silva, JE, Silva, WM, Siqueira, HAA, Iqbal, S, Troczka, BJ, Williamson, MS, Bass, C, Tsagakarakou, A, Vontas, J, Nauen, R (2017) Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, 80: 11-20
- Roditakis, E, Vasakis, E, Grispou, M, Stavrakaki, M, Nauen, R, Gravouil, M, Bassi, A (2015) First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal of pest science**, 88(1): 9-16
- Ruest, L, Ménard, H, Moreau, V, Laplante, F (2002) Ryanoids and related compounds Chemoselective electrocatalytic hydrogenation of alkyl α -pyrrole carboxylates: Selective hydrogenation of ryanodine. **Canadian journal of chemistry**, 80(12): 1662-1667
- Silva, JE, Assis, CP, Ribeiro, LM, Siqueira, HA (2016) Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of economic entomology**, 109(5): 2190-2195
- Silva, JE, de Siqueira, HA, Silva, TB, de Campos, MR, & Barros, R (2012) Baseline susceptibility to clorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, 35: 97-101
- Sparks, TC (2013) Insecticide discovery: an evaluation and analysis. **Pesticide biochemistry and physiology**, 107 (1): 8-17

- Sparks, TC, Nauen, R (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide biochemistry and physiology**, 121: 122-128
- Stanley, BH (2014) Monitoring resistance. In: **Insect Resistance Management**, Academic Press, 485-513
- Steinbach D, Gutbrod O, Lümmlen P, Matthiesen S, Schorn C, Nauen R (2015) Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insecticide Biochemistry Molecular Biology** 63:14-22
- Sutko, JL, Airey, JA, Welch, W, Ruest, L (1997) The pharmacology of ryanodine and related compounds. **Pharmacological Reviews**, 49(1): 53-98
- Teixeira, LA, Andaloro, JT (2013) Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 106(3): 76-78
- Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T (2005) Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect 735 pests. **Journal of Pesticide Science**, 30:354-360
- Trocza B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slates R, Nauen R (2012) Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insecticide Biochemistry Molecular Biology** 42:873-880
- Wang X, Khakame SK, Ye C, Yang Y, Wu Y (2013) Characterization of field-evolved resistance to cloranthraniliprole in the diamond back moth, *Plutella xylostella*, from China. **Pest Management Science** 69:661-665
- Waterhouse, AL, Holden, I, Casida, JE (1984) 9, 21-Didehydroryanodine: a new principal toxic constituent of the botanical insecticide *Ryania*. **Journal of the Chemical Society**, 19: 1265-1266
- Williams, JL, Ellers-Kirk, C, Orth, R. G., Gassmann, AJ, Head, G, Tabashnik, BE, Carrière, Y (2011) Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. **PLoS One**, 6(6): e21863
- Zhang, W (2018) Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, 8(1): 1-27
- Zuo, YY, Ma, HH, Lu, WJ, Wang, XL, Wu, SW, Nauen, R, Wu, Y, Yang, YH (2020) Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide

insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect science**,
27(4): 791-800

2. CUSTO ADAPTATIVO ENTRE LINHAGENS COM DIFERENTES COMPONENTES GENÉTICOS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES A CLORANTRANILIPROLE

Resumo

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) é uma praga de difícil manejo principalmente por ser resistente a diversos inseticidas e proteínas Bt. Para dar suporte aos programas de manejo da resistência, muitos estudos são necessários, incluindo a avaliação de custo adaptativo. No entanto, a tomada de decisões de manejo baseadas em estudos de custo adaptativo pode ser mal orientada se os estudos forem baseados em linhagens de componente genético mais restritos. Neste estudo, avaliamos o custo adaptativo de linhagens resistentes de *S. frugiperda* a diamidas com diferentes componentes genéticos. O objetivo principal do trabalho foi investigar a importância da genética para experimentos de custo adaptativo, fornecendo suporte para programas de manejo da resistência. Inicialmente, foi estabelecida uma linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas (Iso-RR), a qual foi obtida a partir da linhagem parental resistente original a clorantraniliprole (RR) e da linhagem suscetível de referência (SS). Posteriormente, foi estimado o custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio de dois experimentos, um utilizando linhagens de componente genético próximo (Iso-RR e SS) e outro utilizando linhagens de componente genético distante (RR e SS). Os resultados confirmaram que a base genética das linhagens utilizadas alterou as conclusões sobre o custo adaptativo da espécie a diamidas. Nenhum custo adaptativo associado à resistência a clorantraniliprole em *S. frugiperda* foi observado ao utilizar a linhagem quase-isogênica (Iso-RR), no entanto um custo adaptativo foi observado para a linhagem resistente original a clorantraniliprole (RR). Os resultados também mostraram que as linhagens Iso-RR e RR diferem em sua razão de resistência, a linhagem Iso-RR teve uma redução em sua razão de resistência quando comparada à linhagem RR. Este trabalho dá suporte ao processo de tomada de decisão de programas de manejo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas e adiciona ao crescente corpo de pesquisas sobre a importância da genética das linhagens utilizadas em experimentos de custo adaptativo.

Palavras-chave: Diamidas, Lagarta-do-cartucho, Manejo da resistência de insetos

Abstract

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) is a hard pest to management mainly because it is resistant to several insecticides and Bt proteins. To support resistance management programs many studies are necessary including fitness cost evaluation. However, fitness cost might mislead the decision making of resistance management programs if disregard the genetic background of strains used in the experiments. In this study, we evaluated fitness cost of *S. frugiperda* resistant strains to diamides with different genetic background aiming to investigate the importance of genetics for fitness cost experiments and to provide support to resistance management programs. First, we established a near-isogenic strain of *S. frugiperda* resistant to diamides (Iso-RR), which was obtained by using the original chlorantraniliprole resistant strain (RR) and the susceptible reference strain (SS). Later, we estimated fitness cost in two experiments, one using strains with close-related genetic background (Iso-RR and SS) and other using strains with distant-related genetic background (RR and SS). Results confirmed that the genetic background of strains used in fitness cost experiments alter the outcomes. No fitness cost associated with chlorantraniliprole resistance in *S. frugiperda* was observed when assessing fitness using the near-isogenic strain (Iso-RR), but a significant

fitness cost was detected in the original chlorantraniliprole resistant strain (RR). Results also showed that Iso-RR and RR strains differ in their resistance ratio, the Iso-RR strain had a reduction on its resistance ratio in comparison to the RR strain. Our work supports the decision-making process of resistance management programs of *S. frugiperda* to diamide insecticides and add to the growing body of research that enlighten the importance of strain genetics in fitness cost experiments.

Keywords: Diamides, Fall armyworm, Insect resistance management

2.1. Introdução

A resistência a inseticidas é um problema recorrente, há muito empresas, academia e produtores discutem a respeito do manejo da resistência baseado nos modos de ação de inseticidas e mecanismos de resistência (Sparks et al., 2021). Atualmente, uma das pragas mais desafiadoras é *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda* é uma ameaça na maioria dos continentes como, Ásia, África, Oceania e América (Cruz, 2012; FAO, 2020). Esta é uma praga polífaga, com mais de 350 hospedeiros, apresenta grande capacidade de reprodução e dispersão e diversos casos de resistência a inseticidas e proteínas Bt (Diez-Rodrigues & Omoto, 2001; Pogue, 2002; Carvalho et al., 2013 Nascimento et al., 2015; Okuma et al., 2017; Montezano et al., 2018; Lira et al., 2019; Kaiser et al., 2021). No entanto, o manejo de *S. frugiperda* ainda depende principalmente de inseticidas e plantas que expressam proteínas Bt (Burtet et al., 2017).

O grupo químico das diamidas é um dos últimos introduzidos no mercado (Lahm et al., 2007, 2009), e diversos estudos estão sendo realizados para a preservar a eficácia deste grupo (Richardson et al., 2020). As diamidas tem como modo de ação a atuação nos canais de rianodina, que afetam diretamente o sistema muscular dos insetos (Cordova et al., 2006; Sattelle et al., 2008). Esse grupo químico tem grande eficácia contra insetos- praga (principalmente lepidópteros) e baixa toxicidade a mamíferos (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012). Entretanto, a resistência a diamidas foi reportada para algumas pragas incluindo *S. frugiperda* (Trocza et al., 2012; Roditakis, 2015; Silva et al., 2016; Zuo et al., 2017; Bolzan et al., 2019; Pereira et al., 2020).

Spodoptera frugiperda resistente a diamidas foi observada no Brasil e em Porto Rico (Bolzan et al., 2019, Guitierrez-Moreno et al., 2018). A caracterização da linhagem de *S. frugiperda* resistente a clorantraniliprole no Brasil mostrou um padrão de herança autossômico, incompletamente recessivo e monogênico (Bolzan et al., 2019). Esta linhagem também apresentou resistência cruzada a outros inseticidas diamidas, sendo considerada resistente ao grupo das diamidas (Bolzan et al., 2019). Ainda não foi reportado nenhum caso

de falha de controle desta praga no campo para diâmidas, sendo este um momento crucial para implementar um programa de manejo da resistência.

Muitos conceitos são de grande importância para estabelecer um programa de manejo da resistência, entre eles o conceito de custo adaptativo associado à resistência. Quando uma população sofre com custo adaptativo associado a resistência para um inseticida, o indivíduo resistente tem uma desvantagem em relação ao suscetível quando na ausência da pressão de seleção do inseticida. Portanto, o custo adaptativo auxilia a manter baixa a frequência dos indivíduos resistentes. De outra maneira, se não houver custo adaptativo a frequência dos indivíduos tende a crescer, evoluindo para um cenário de resistência (Kliot & Ghanim, 2012). Ainda não foi relatado nenhum estudo de custo adaptativo associado a resistência a diâmidas para *S. frugiperda*.

A maioria dos estudos de custo adaptativo são feitos baseados em parâmetros biológicos tais como, fertilidade, tempo de desenvolvimento e longevidade, sempre utilizando uma linhagem suscetível de referência (Gassmann et al., 2009; Kliot & Ghanim, 2012). Recentemente, tem se discutido sobre o uso de uma linhagem suscetível de referência, que normalmente é mantida em dieta artificial em condições de laboratório por muitos anos (Ffrench-Constant & Bass, 2017). A diferença genética entre os indivíduos de laboratório e indivíduos de campo pode influenciar nos resultados dos estudos de custo adaptativo, visto que pode ocorrer uma variabilidade genética reduzida em indivíduos suscetíveis de laboratórios ou/e a presença de genes modificadores nas linhagens resistentes selecionadas no campo (Ffrench-Constant & Bass, 2017; Singarayan et al., 2020).

A importância dos estudos genéticos em diferentes aspectos da resistência de insetos é comum no programa de manejo de pragas (Leftwich et al., 2021) e em custo adaptativo associado a resistência de proteínas Bt (Raymond et al., 2011), mas ainda é comumente negligenciada nos estudos de resistência a inseticidas. Contudo, pesquisas de custo adaptativo associado com a resistência a inseticidas utilizando linhagens com origem genética similar estão crescendo (Freeman et al., 2021).

Uma maneira de se obter linhagens com componente genético similar, exceto pelos genes da resistência, é estabelecer uma linhagem quase-isogênica por meio de uma série de retrocruzamentos, autrocruzamentos e seleção (Berticat et al., 2008; Zhu et al., 2015). Uma linhagem quase-isogênica pode ser obtida rapidamente, com três rodadas de retrocruzamentos e seleção em pragas de produtos armazenados como *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Laemophloeidae (Singarayan et al., 2020), porém normalmente o processo é mais longo. Uma linhagem de *S. frugiperda* resistente quase-isogênica a Cry1F levou dezesseis gerações para

ser estabelecida (Horikoshi et al., 2016). Embora, a metodologia consuma bastante tempo, este esforço é necessário para estudar os diferentes aspectos do mecanismo de resistência de importantes pragas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o custo adaptativo de linhagens de *S. frugiperda* resistentes a diamidas para verificar se o componente genético das linhagens suscetível e resistente altera o custo adaptativo estimado. Para isto, uma linhagem quase-isogênica resistente a diamidas foi estabelecida a partir da linhagem resistente original selecionada por Bolzan et al. (2019). Posteriormente, foi estimado o custo adaptativo em dois experimentos, um utilizando linhagens de componente genético similares, e o outro com linhagens de componente genético mais distantes. Este trabalho auxilia no processo de tomada de decisões no programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* resistente a diamidas e elencar a importância da genética das linhagens nos estudos de custo adaptativo.

2.2 Material e métodos

2.2.1. Insetos

A linhagem de *S. frugiperda* suscetível (SS) foi fornecida pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brazil) em 1996, e vem sendo mantida em dieta artificial sem pressão de nenhum inseticida. A linhagem resistente a clorantraniliprole (RR) foi selecionada através de uma população de campo de Correntina-BA usando o método de F_2 screen por Bolzan et al (2019). A linhagem RR vem sendo mantida em dieta artificial em pressão de seleção com o inseticida clorantraniliprole (Premio[®]) na concentração discriminatória ($100 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$) toda geração. Todas as linhagens foram criadas em dieta artificial (Kasten Jr et al., 1978) sob condições controladas de 25 ± 2 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E) h no Laboratório de Resistência de Artrópodes (Universidade de São Paulo, Brasil).

2.2.2. Estabelecimento da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênica resistente a clorantraniliprole

A linhagem quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) foi estabelecida por retrocruzamentos e autocruzamentos controlados a partir das linhagens RR e SS, e selecionada com a solução inseticida de clorantraniliprole (Premio[®]) na concentração

discriminatória ($100 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$) previamente definida (Bolzan et al., 2019). Inicialmente, dois grupos foram estabelecidos, um no qual machos da linhagem RR foram cruzados com fêmeas da linhagem SS para gerar a prole F1 (RS1), e outro no qual fêmeas da linhagem RR foi cruzada com machos da linhagem SS para gerar a prole F1 (RS2).

Os dois grupos (RS1 e RS2) de heterozigotos foram unidos para autocruzamento e produção de prole. As lagartas da progênie destes heterozigotos foram criadas em dieta artificial (Kasten et al., 1978) até alcançarem o terceiro ínstar larval. Para selecionar apenas indivíduos resistentes, as lagartas de terceiro ínstar foram submetidas a ensaios de aplicação superficial de solução inseticida de clorantroliprole na concentração discriminatória como citado acima. Estes bioensaios foram conduzidos em placas de acrílico de 24 poços (Costar[®], Corning Inc., Corning, NY, USA), contendo 1,25 mL de dieta artificial em cada poço. A concentração discriminatória foi obtida através da diluição do inseticida formulado (Premio[®] SC 200 g a.i. L⁻¹, DuPont do Brasil S.A.) em água destilada e a adição de 0,1% (v/v) do surfactante Triton X-100 (Sigma Aldrich Brasil Ltda). Em cada poço, foram aplicados 30 μ L de solução inseticida. Após a secagem da solução inseticida, uma lagarta de terceiro ínstar foi infestada por poço. Os insetos sobreviventes foram resgatados depois de 96 horas de exposição e mantidos até a fase de adulto.

Estes adultos foram separados por sexo e retrocruzados com a linhagem SS para gerar as proles BC1 e BC2 (RS + SS, 1:1). A prole BC autocruzada e a progênie selecionada com a dose discriminatória de clorantroliniprole novamente reiniciando o processo. O processo foi repetido por sete gerações para obtenção da linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamidas, chamada de Iso-RR (Figura 2.1).

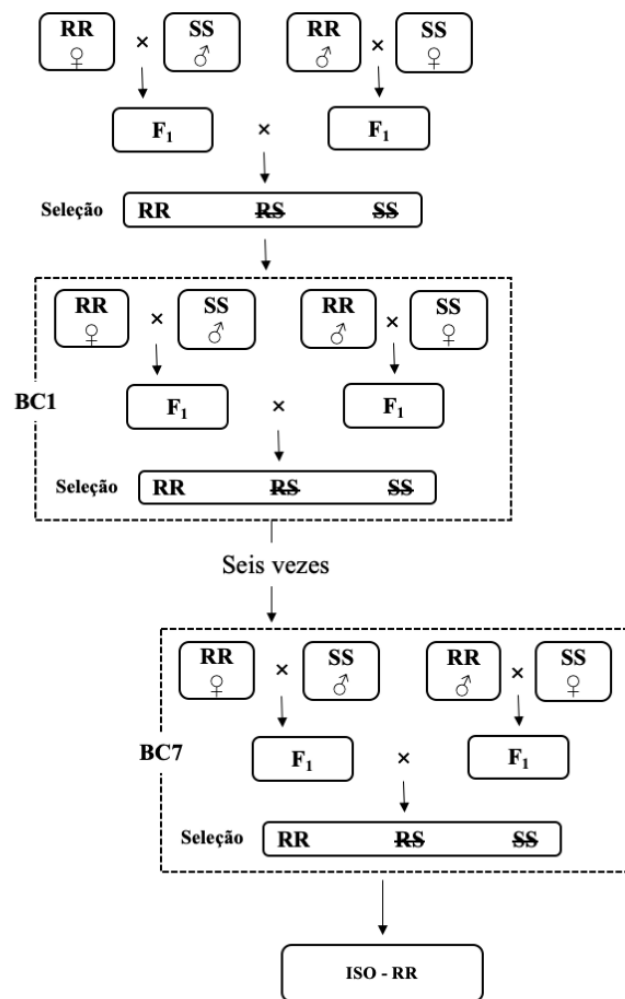


Figura 2.1. Estabelecimento da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênica resistente a clorantraniliprole

2.2.3. Validação da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênica resistente a clorantraniliprole

Para validar a linhagem quase-isogênica resistente, curvas concentração-resposta foram realizadas para caracterizar a suscetibilidade da linhagem Iso-RR em comparação as linhagens RR e SS. Todas as linhagens foram submetidas a bioensaios de concentração-resposta pelo método de aplicação superficial como citado acima. Os ensaios utilizaram sete concentrações espaçadas logaritmicamente, de 1 a 56 µg i.a de clorantraniliprole por mL para a linhagem SS, de 10 a 320 µg i.a de clorantraniliprole por mL para a linhagem Iso-RR e de 32 a 560 µg i.a de clorantraniliprole por mL para linhagem RR.

Os dados de mortalidade das curvas concentração-resposta foram avaliados depois de 96h, estes dados foram utilizados para calcular a CL₅₀ (concentração que mata 50% dos

indivíduos) e seus intervalos de confiança (95% IC). A razão de resistência foi estimada dividindo a CL_{50} das linhagens RR e Iso-RR pela CL_{50} da linhagem SS.

2.2.4. Custo adaptativo das linhagens de *Spodoptera frugiperda*

O custo adaptativo das linhagens de *S. frugiperda* associado à resistência a clorantraniliprole foi avaliado em dois experimentos distintos. Os experimentos se distinguiram devido a diferença do componente genético das linhagens resistentes e heterozigotas em relação a linhagem suscetível. No primeiro experimento, o custo adaptativo foi avaliado utilizando a linhagem suscetível de laboratório (SS), a linhagem quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os respectivos heterozigotos. No segundo experimento, o custo adaptativo foi avaliado utilizando a linhagem suscetível de laboratório (SS), a linhagem resistente anteriormente selecionada (RR) (Bolzan et al., 2019) e os respectivos heterozigotos. Em ambos os experimentos, os heterozigotos vieram pelo cruzamento dos machos suscetíveis e fêmeas resistentes (H1), e pelo cruzamento das fêmeas suscetíveis e machos resistentes (H2). O primeiro experimento se refere ao custo adaptativo entre linhagens com componente genético similares, enquanto o segundo experimento se refere ao custo adaptativo entre linhagens com componente genético mais distante.

Ambos os experimentos foram realizados da mesma maneira. Primeiramente, adultos de cada linhagem (resistente, suscetível e heterozigotos) foram colocados para acasalar em gaiolas de PVC (10 cm diâmetro × 20 cm de altura) com papel jornal como substrato para oviposição. Os adultos foram alimentados com solução de mel 10%. As massas de ovos foram coletadas e mantidas em copos plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido até a eclosão das lagartas. As lagartas neonatas (<24h) foram inoculadas em bandejas de 16 células (Bio Supply[®]). Cada célula anteriormente foi parcialmente preenchida com dieta artificial (Kasten et al., 1978). Um total de 160 lagartas foram testadas por linhagem (10 repetições de 16 lagartas). Diariamente, as lagartas eram examinadas e avaliadas para registrar os dados de mortalidade larval, tempo de desenvolvimento e peso larval no décimo dia.

As pupas foram pesadas após 24 horas de formadas, e em seguida individualizadas em bandejas contendo papel filtro umedecido, cada pupa foi coberta por um copo plásticos (50 mL) até a emergência dos adultos. O tempo de desenvolvimento e a mortalidade de pupas foram avaliados neste período. Os adultos foram aleatoriamente separados para formar 20 casais por linhagem. Cada casal foi alocado em uma gaiola de PVC (10 cm diâmetro × 20 cm de altura) coberta com papel jornal para a obtenção de ovos. Os adultos foram alimentados

com algodão umedecido com solução de mel a 10%, o substrato alimentar e o papel jornal eram trocados a cada dois dias. Os adultos foram avaliados todos os dias para verificar a mortalidade e a oviposição. Os ovos de cada dia foram contados com a ajuda de um microscópio estereoscópio. A segunda postura de cada casal foi separada para avaliação, contando o número de lagartas que eclodiram. Todas as fases destes experimentos foram mantidas sob condições controladas de 25 ± 2 °C, 70% umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E) h.

2.2.5. Análises Estatísticas

Os dados de mortalidade obtidos nas curvas concentração-resposta das linhagens Iso-RR, SS e RR foram submetidos a análise de Probit utilizando modelo linear generalizado (GLM) para estimar a CL_{50} e os respectivos intervalos de confiança (IC). Os dados de razão de resistência (RR) foram obtidos dividindo a CL_{50} de cada linhagem pela CL_{50} da linhagem suscetível de referência.

Nos experimentos de custo adaptativo foram avaliados os parâmetros biológicos: tempo de desenvolvimento e sobrevivência dos períodos de ovo, larva e pupa; peso larval dez dias após a eclosão; peso de pupa 24h depois da formação e fecundidade dos adultos. Os dados dos ensaios de custo adaptativos foram analisados utilizando GLM de acordo com a distribuição de cada dado. A distribuição apropriada foi determinada com base na qualidade do ajuste utilizando o pacote *hnp* (Moral et al., 2017). Os parâmetros foram avaliados por ANOVA utilizando o teste F para verificar a diferença entre as linhagens, os contrastes foram estimados pelo teste de Tukey utilizando o pacote *lsmeans* (Lenth, 2016). Os dados de parâmetros de tempo de desenvolvimento de ovo, lagarta e pupa não se encaixaram em nenhuma distribuição e foram analisadas utilizando teste Kruskal-Wallis (Dinno, 2017).

A tabela de vida e fertilidade foi construída através do procedimento *lifetable.r* (Maia et. al, 2014). Por meio da tabela de vida foram calculados os parâmetros taxa líquida de reprodução (R_0), média de duração de cada geração (T), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e taxa finita de crescimento (λ). Todas as análises estatísticas foram feitas no programa R (R Core Team, 2020).

2.3 Resultados

2.3.1. Validação da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênica resistente a clorantraniliprole

Depois de sete gerações de retrocruzamentos com a linhagem suscetível, a linhagem Iso-RR apresentou uma curva concentração-resposta similar a linhagem RR (Figure 2.2). No entanto, a CL_{50} e a razão de resistência da linhagem Iso-RR diminuíram em comparação com a linhagem resistente original. A linhagem RR apresentou uma CL_{50} de $157,8 \mu\text{g i.a L}^{-1}$ (95% IC: $142,2 - 175,1 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$), enquanto para a linhagem Iso-RR a CL_{50} foi de $67,8 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$ (95% IC: $60,5 - 75,8 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$). A linhagem SS apresentou uma CL_{50} de $0,7 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$ (95% IC: $0,6 - 0,8 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$). Esses valores resultaram em uma razão de resistência de 225,4 vezes para a linhagem RR e 96,8 vezes para a linhagem Iso-RR.

2.3.2. Custo adaptativo das linhagens de *Spodoptera frugiperda* com o componente genético similar

A maioria dos parâmetros biológicos avaliados diferiram entre as linhagens (Tabela 2.1). O tempo de desenvolvimento foi significativamente diferente entre as linhagens nas fases de lagarta e pupa, porém não na fase de ovos. O tempo de desenvolvimento de lagarta e pupa seguiram a mesma tendência, com a linhagem H2 apresentando um tempo mais longo de desenvolvimento, enquanto a linhagem Iso-RR mostrou menor tempo de desenvolvimento. Para o período larval, a linhagem H2 levou 20 dias para chegar na fase de pupa, enquanto na linhagem Iso-RR este tempo foi de 18 dias. Estes dois dias de diferença entre H2 e Iso-RR também foram observados no tempo de desenvolvimento de pupa. As linhagens H1 e SS não diferiram da linhagem Iso-RR.

O parâmetro peso foi medido nas fases de pupa e lagarta, em ambas as fases diferenças significativas foram observadas entre as linhagens. A respeito do peso larval no décimo dia, a linhagem Iso-RR teve o maior peso em comparação as outras linhagens, sendo aproximadamente 50 mg (95%) mais pesada que a linhagem H2, linhagem a qual apresentou menor peso larval. Não houve diferenças entre as linhagens H1 e SS. Os resultados foram diferentes quando as lagartas chegaram ao estágio de pupa, a linhagem SS apresentou o maior peso com cerca de 250 mg não diferindo da linhagem Iso-RR com um peso médio de 244 mg.

Os dois heterozigotos não diferenciaram entre si, e H2 apresentou o menor peso de pupa (Tabela 2.1).

A viabilidade de cada fase foi avaliada como porcentagem de sobrevivência. A sobrevivência de lagarta e pupa foram significativamente diferentes entre as linhagens. A linhagem H1 apresentou maior sobrevivência para ambas as fases. A sobrevivência larval de H1 foi quase 90%, enquanto a sobrevivência de pupa foi de aproximadamente 80%. Nas outras linhagens a sobrevivência larval variou de 67% a 80%, e a sobrevivência de pupa ficou em torno de 60% em todas as linhagens. A sobrevivência de lagarta e pupa não diferenciaram nas linhagens Iso-RR, SS e H2 (Tabela 2.1).

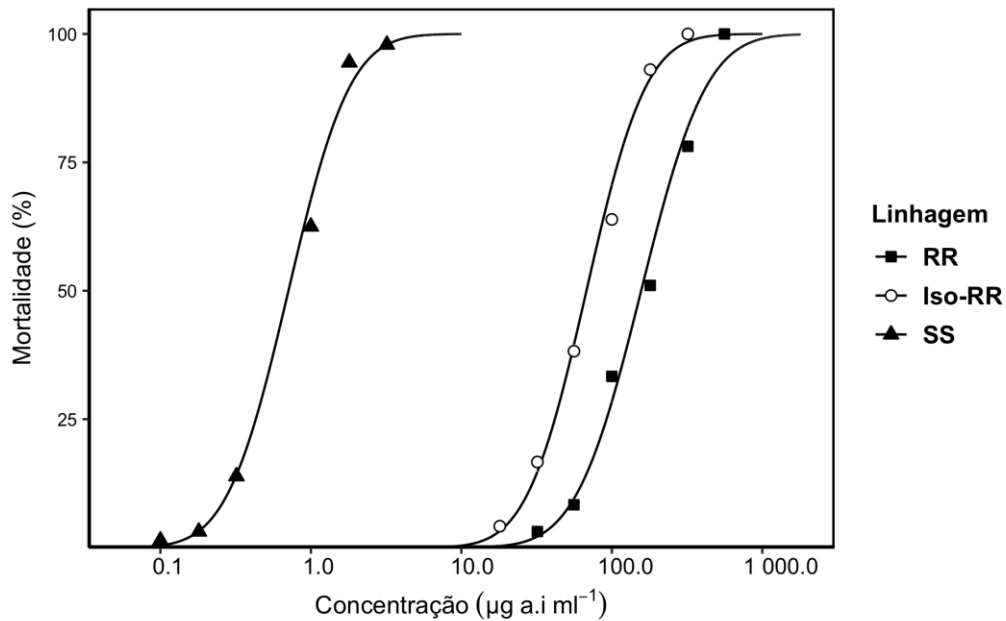


Figura 2. 2. Curvas concentração resposta de *Spodoptera frugiperda* a clorantraniliprole.

Tabela 2.1. Parâmetros biológicos (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os heterozigotos (H1 e H2).

| Parâmetros Biológicos | Linhagem | | | | Estatísticas | | |
|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------|----------|
| | SS | Iso-RR | H1 | H2 | χ^2 | <i>gl</i> | <i>p</i> |
| Desenvolvimento (Dias) | | | | | | | |
| Ovo | 2,8 \pm 0,1 a* | 3,0 \pm 0,0 a | 3,0 \pm 0,0 a | 3,0 \pm 0,1 a | 3,0 | 39 | 0,4 |
| Lagarta | 19,3 \pm 0,2 ab | 18,5 \pm 0,1 b | 19,4 \pm 0,6 b | 20,3 \pm 0,1 a | 22,0 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 10,9 \pm 0,2 ab | 10,4 \pm 0,2 b | 10,2 \pm 0,7 b | 11,2 \pm 0,2 a | 23,9 | 39 | < 0,01 |
| | | | | | <i>F</i> | <i>gl</i> | <i>p</i> |
| Peso (mg) | | | | | | | |
| Lagarta | 61,8 \pm 3,2 b** | 93,6 \pm 6,0 a | 72,5 \pm 4,5 b | 48,0 \pm 3,3 c | 18,6 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 248,3 \pm 2,4 a | 244,2 \pm 1,9 ab | 235,6 \pm 2,1 bc | 231,6 \pm 2,9 c | 49,1 | 39 | < 0,01 |
| Viabilidade (%) | | | | | | | |
| Ovo | 89,5 \pm 5,0 a | 79,0 \pm 11,0 a | 80,7 \pm 6,9 a | 91,7 \pm 4,5 a | 0,8 | 39 | 0,4 |
| Lagarta | 79,9 \pm 2,7 ab | 67,7 \pm 5,1 b | 89,2 \pm 2,7 a | 80,5 \pm 3,0 ab | 6,8 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 59,3 \pm 3,1 b | 61,3 \pm 3,9 b | 79,4 \pm 3,8 a | 59,6 \pm 3,1 b | 8,7 | 39 | < 0,01 |
| Fecundidade | | | | | | | |
| Nº de ovos por fêmea | 1845,2 \pm 199,0 a | 1816,8 \pm 195,6 a | 1522,1 \pm 158,7 a | 1601,3 \pm 153,3 a | 0,8 | 78 | 0,5 |

* letras após as médias indicam diferenças significativas entre as linhagens (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$)

** letras após as médias indicam diferenças significativas entre as linhagens (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Todos os parâmetros de crescimento na tabela de vida e fertilidade apresentaram diferenças significativas entre as linhagens. Os parâmetros R_0 , r_m e λ foram maiores na linhagem H1 e não diferiram entre as linhagens SS e Iso-RR. Por outro lado, as linhagens H1 e Iso-RR mostraram um menor valor no tempo médio de geração ($T= 34,6$ dias), enquanto o maior valor de T foi observado na linhagem H2 (Tabela 2.2). O parâmetro r_m foi utilizado para determinar custo relativo das linhagens Iso-RR, H1 e H2 dividindo pelo r_m de cada linhagem (Iso-RR, H1 ou H2) pelo r_m da linhagem SS. O custo relativo obtido para as linhagens Iso-RR, H1 e H2, foram de 1,02, 1,07 e 0,96 respectivamente.

Tabela 2.2. Parâmetros de crescimento populacional (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-

| Linhagem | R_0^a | T^b | r_m^c | λ^d |
|----------|----------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| SS | 361,0 \pm 38,9 ab* | 35,8 \pm 0,2 b | 0,164 \pm 0,002 bc | 1,178 \pm 0,003 bc |
| Iso-RR | 335,8 \pm 36,3 b | 34,6 \pm 0,1 c | 0,168 \pm 0,003 ab | 1,183 \pm 0,003 b |
| H1 | 452,3 \pm 45,4 a | 34,6 \pm 0,1 c | 0,176 \pm 0,002 a | 1,192 \pm 0,003 a |
| H2 | 340,7 \pm 35,3 b | 36,8 \pm 0,2 a | 0,158 \pm 0,003 c | 1,171 \pm 0,003 c |

RR) e os heterozigotos (H1 e H2).

^a Taxa líquida de reprodução, ^b Tempo médio de geração, ^c Taxa intrínseca de crescimento, ^d Taxa finita de crescimento. *As letras após as médias indicam diferenças significativa entre as linhagens (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

2.3.3. Custo adaptativo das linhagens de *Spodoptera frugiperda* com o componente genético distante

O tempo de desenvolvimento de ovo foi o único parâmetro biológico que não apresentou diferenças significativas entre as linhagens. O tempo de desenvolvimento das fases de lagarta e pupa apresentou tendências opostas, as linhagens RR e H1 apresentaram menor tempo de desenvolvimento de lagarta, porém houve um maior tempo de desenvolvimento na fase de pupa. Enquanto que as linhagens SS e H2 apresentaram o padrão inverso, com um maior tempo de desenvolvimento na fase de lagarta e menor tempo de desenvolvimento na fase de pupa (Tabela 2.3).

Para o parâmetro de peso, os heterozigotos H1 e H2 foram mais pesados que as linhagens SS e RR para ambas as fases, lagarta e pupa. As lagartas de H2 pesaram aproximadamente 50 mg (45,7%) a mais do que as lagartas de RR, para pupa as diferenças foram de 35 mg (Tabela 2.3). A viabilidade foi maior também para os heterozigotos H1 e H2 do que as linhagens SS e RR. A viabilidade da fase de ovos foi maior do que 90 % em todas as linhagens, com exceção da linhagem RR apresentou uma viabilidade de 80%. A viabilidade da fase de lagarta foi maior na linhagem RR, porém não apresentou diferenças significativas com as linhagens H1 e H2, enquanto na linhagem SS a viabilidade larval foi menor que 80%. A viabilidade da fase de pupa foi maior para linhagem H2 com mais de 80% de sobrevivência, o que foi 45 % maior do que a viabilidade da fase de pupa da linhagem RR (Tabela 2.3).

O parâmetro de números totais de ovos por fêmeas indica a fertilidade das linhagens. Este parâmetro só apresentou diferença significativa para a linhagem RR, na qual foi observado cerca que 520 ovos por fêmea, enquanto as outras linhagens apresentaram mais que 1000 ovos por fêmea (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Parâmetros biológicos (média \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), resistente a clorantraniliprole (RR) e heterozigotos (H1 e H2).

| Parâmetros biológicos | Linhagem | | | | Estatísticas | | |
|------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------|----------|
| | SS | RR | H1 | H2 | χ^2 | gl | P |
| Desenvolvimento (Dias) | | | | | | | |
| Ovo | 3,1 \pm 0,1 a* | 3,1 \pm 0,1 a | 2,8 \pm 0,1 a | 3,2 \pm 0,1 a | 3,0 | 39 | 0,12 |
| Lagarta | 15,3 \pm 0,1 a | 14,6 \pm 0,03 b | 14,3 \pm 0,04 b | 15,3 \pm 0,2 a | 22,2 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 12,3 \pm 0,3 b | 13,5 \pm 0,3 a | 13,6 \pm 0,2 a | 12,3 \pm 0,4 b | 12,3 | 39 | < 0,01 |
| | | | | | <i>F</i> | <i>gl</i> | <i>P</i> |
| Peso (mg) | | | | | | | |
| Lagarta | 123,5 \pm 8,1 b** | 117,0 \pm 7,0 b | 155,9 \pm 4,5 a | 170,5 \pm 7,4 a | 13,8 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 225,4 \pm 3,6 b | 208,3 \pm 3,0 c | 251,6 \pm 1,7 a | 243,4 \pm 2,8 a | 46,2 | 39 | < 0,01 |
| Viabilidade (%) | | | | | | | |
| Ovo | 93,9 \pm 1,9 a | 80,5 \pm 2,5 b | 93,9 \pm 1,9 a | 95,5 \pm 3,9 a | 3,9 | 39 | 0,02 |
| Lagarta | 76,9 \pm 3,7 b | 86,8 \pm 3,0 ab | 90,6 \pm 2,3 a | 90,0 \pm 1,9 a | 4,9 | 39 | < 0,01 |
| Pupa | 63,4 \pm 5,6 b | 36,4 \pm 2,9 c | 74,4 \pm 5,4 ab | 81,8 \pm 2,2 a | 21,8 | 39 | < 0,01 |
| Fecundidade | | | | | | | |
| N° de ovos por fêmea | 1635,2 \pm 149,8 a | 539,8 \pm 216,9 b | 2007,6 \pm 110,0 a | 1813,2 \pm 154,2 a | 13,2 | 78 | < 0,01 |

* letras após as médias indicam diferenças significativas entre as linhagens (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$)

** letras após as médias indicam diferenças significativas entre as linhagens (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

Os parâmetros calculados na tabela de vida mostraram diferenças significativas entre as linhagens SS e RR, porém nenhum parâmetro apresentou diferença estatística entre os heterozigotos. Os parâmetros R_0 , r_m e λ foram maiores nas linhagens H1 e H2 e menores na linhagem RR. Por exemplo, uma diferença de 10 vezes foi observada entre R_0 de maior valor visto na linhagem H1 com o R_0 de menor valor visto na linhagem RR. O parâmetro T indicou que a média de duração de uma geração foi maior na linhagem RR e não houve diferenças entre as linhagens SS, H1 e H2 (Tabela 2.4).

O custo relativo das linhagens RR, H1 e H2 foi estimada dividindo o r_m das linhagens RR, H1 e H2, com o r_m da linhagem SS, sendo obtido os valores de 0,64, 1,17 e 1,11 para as linhagens RR, H1 e H2 respectivamente.

Tabela 2.4. Parâmetros de crescimento populacional (média \pm erro padrão) das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), resistente a clorantraniliprole (RR) e heterozigotos

| Linhagem | R_0^a | T^b | r_m^c | λ^d |
|----------|---------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| SS | 329,4 \pm 30,2 b* | 32,9 \pm 0,2 b | 0,17 \pm 0,002 b | 1,19 \pm 0,003 b |
| RR | 64,3 \pm 25,9 c | 37,1 \pm 0,3 a | 0,11 \pm 0,012 c | 1,11 \pm 0,013 c |
| H1 | 699,9 \pm 38,4 a | 32,8 \pm 0,1 b | 0,20 \pm 0,001 a | 1,22 \pm 0,001 a |
| H2 | 635,6 \pm 54,0 a | 33,2 \pm 0,1 b | 0,19 \pm 0,002 a | 1,21 \pm 0,002 a |

(H1 e H2).

^a Taxa líquida de reprodução, ^b Tempo médio de geração, ^c Taxa intrínseca de crescimento, ^d Taxa finita de crescimento. *As letras após as médias indicam diferenças significativa entre as linhagens (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

2.4. Discussão

Este estudo indicou que o componente genético das linhagens utilizadas nos experimentos de custo adaptativo altera os resultados. Os resultados mostraram que não há custo adaptativo associado a clorantraniliprole em *S. frugiperda* quando as avaliações foram feitas utilizando a linhagem quase-isogênica (Iso-RR), mas foi observado um custo adaptativo significativo associado à resistência a clorantraniliprole quando utilizado a linhagem resistente original (RR). Os resultados também indicaram que houve uma diferença entre as

razões de resistência entre as linhagens Iso-RR e RR, sendo que a linhagem Iso-RR apresentou uma redução na razão da resistência em comparação a linhagem RR.

A linhagem quase-isogênica diferiu da linhagem suscetível apenas no parâmetro biológico de peso larval, onde a linhagem Iso-RR foi mais pesada que a linhagem SS. Enquanto que a linhagem resistente original (RR) apresentou diferenças com a linhagem suscetível (SUS) para os seguintes parâmetros biológicos: desenvolvimento de lagarta e pupa, peso de pupa, viabilidade de ovos, lagarta e pupa, e número de ovos por fêmea. Os parâmetros de crescimento estimados na tabela de vida também foram diferentes entre os ensaios. As linhagens Iso-RR e SS diferiram somente no parâmetro T , já as linhagens RR e SS diferiram em todos os parâmetros. Fortalecendo, portanto, a atual preocupação com a importância do componente genético nos estudos de custo adaptativo (Raymond et al., 2011; Leftwich et al., 2021), a qual se mostra válida para casos de resistência a inseticidas. A ausência de custo adaptativo em linhagens quase-isogênicas resistentes também foram reportadas na literatura considerando os mesmos parâmetros avaliados neste estudo (Horikoshi et al., 2015; Zhu et al., 2015; Bird et al., 2020), embora ainda deva ser investigado se estes resultados foram impactados pelo componente genético das linhagens. Recentemente, experimentos com o componente genético controlado apresentou resultados parecidos, com custo adaptativo observado na linhagem resistente, porém não na linhagem resistência quase-isogênica (Malekpour et al. 2018; Daghli et al. 2020; Singarayan et al., 2020).

O parâmetro de crescimento r_m foi utilizado para calcular o custo relativo, este valor pode ser compreendido como uma forma de resumir a ocorrência do custo adaptativo em relação a linhagem suscetível. O custo adaptativo é mais frequentemente estimado baseado na taxa líquida de reprodução (R_0) (Yu-ping et al., 2010; Abbas et al., 2014; Liu, et al., 2021), contudo, o uso de um parâmetro que reflete apenas uma característica reprodutiva parece ser muito limitado. Outra abordagem mais recente é estimar o custo relativo baseado na taxa líquida de reprodução pelo tempo de desenvolvimento de geração, ou seja, a taxa intrínseca de crescimento (r_m) (Huan e Yue, 2016; Bird et al., 2020). Para interpretar o custo relativo, a linhagem suscetível é considerada como sendo a mais bem adaptada em um ambiente sem tratamento e apresenta um custo relativo de 1 (Roush e McKenzie, 1987), sendo os demais custos relativos inferidos como superiores ou inferiores a esse parâmetro. O custo relativo da linhagem Iso-RR foi estimado em 1,02, que é essencialmente igual a 1, portanto as linhagens Iso-RR e SS devem ter uma performance similar no campo sem a pressão dos inseticidas diamidas. Já o custo relativo da linhagem RR foi estimado em 0,64, indicando que a linhagem

resistente teria uma aptidão biológica 35% menor do que a linhagem suscetível em ambientes sem tratamento.

A respeito dos programas de manejo de resistência, se a falta de custo adaptativo da linhagem Iso-RR for considerada, a frequência dos indivíduos resistentes não diminuiria mesmo sem a aplicação dos inseticidas diamidas no campo, mas se o custo adaptativo da linhagem RR for considerado, a frequência dos indivíduos resistentes diminuiria na ausência dos inseticidas diamidas no campo. Neste último caso, o manejo da resistência seria mais fácil por questões de aptidão biológica, pois medidas como rotação de modos de ação de inseticidas poderiam ser utilizadas para retornar a suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* a diamidas. Portanto, o componente genético das linhagens utilizadas nos experimentos de custo adaptativo tem influência nos programas de manejo da resistência. Esta preocupação também é importante quando considerados os indivíduos heterozigotos. Os resultados mostraram que os heterozigotos são esperados no campo, pois nenhuma barreira reprodutiva foi observada entre indivíduos resistente e suscetível, independente do componente genético.

A herança da resistência de *S. frugiperda* a diamidas foi caracterizada como incompletamente recessiva na concentração que é próxima ao recomendado para controlar esta praga no campo para a cultura do milho (Bolzan et al., 2019). Portanto, a maioria dos indivíduos heterozigotos irão se comportar fenotipicamente como indivíduos suscetíveis, mas alguns irão sobreviver, e a presença destes sobreviventes é uma ameaça ao manejo da resistência pois estes terão mais ferramentas para responder a adversidades no campo. Uma hipótese para o sucesso dos heterozigotos é uma alta variabilidade genética dos mesmos, causada pelo encontro de parentais com variabilidade genética reduzida. Os heterozigotos H1 e H2 dos cruzamentos entre as linhagens RR e SS apresentaram uma melhor aptidão biológica do que a linhagem suscetível, sendo que o custo relativo de ambos é superior a um. Indivíduos heterozigotos com melhores parâmetros biológicos e de crescimentos do que as linhagens parentais são comuns em estudos de custo adaptativos (Jia et al., 2009; Okuma et al., 2017; Shah & Shad, 2020). Contudo, este padrão não foi observado entre os heterozigotos H1 e H2 dos cruzamentos entre as linhagens Iso-RR e SS, cujos custos relativos foram menores ou iguais a um. Para este caso, provavelmente os heterozigotos não têm uma alta variabilidade genética já que são provenientes de linhagens com componentes genéticos similares. Baseado nestes resultados, apoia-se a hipótese que uma maior aptidão biológica observada em indivíduos heterozigotos é uma consequência da variabilidade genética ao invés de uma característica intrínseca da resistência de inseticidas e proteínas Bt.

As linhagens Iso-RR e RR também diferiram na razão de resistência, sendo que Iso-RR teve uma redução de aproximadamente 130 vezes na razão de resistência em comparação com a linhagem RR. Portanto, sugere-se que a introgressão da resistência em um componente genético suscetível tenha removido alguns fatores associados a resistência ao longo do processo. Estes resultados apontam que a resistência de *S. frugiperda* resistente a diamidas é associada a mais aspectos do que apenas a mutação do sítio de ação do grupo inseticida.

A base molecular da resistência a diamidas é atribuída a mutação do sítio de ação no receptor de rianodina em várias espécies (Wang et al., 2012; Roidakis et al., 2015; Yao et al., 2017; Bolzan et al., 2019; Shah & Shad, 2020). Os receptores de rianodina (RyR) são uma classe de canais de cálcio localizado no retículo sarco/endoplasmático dos tecidos neuromusculares, esses receptores foram extensivamente sequenciados em *Plutella xylostella*. Mutações associadas à resistência foram identificadas como substituições de aminoácidos G4946E, E1338D, Q4594L e I4790M (Trocza et al., 2012; Guo et al., 2014), posteriormente as mutações G4946E e I4790M foram diretamente associados à resistência a diamidas (Steinbach et al., 2015; Trocza et al., 2015; Douris et al., 2017). No entanto, a resistência metabólica a diamidas não foi descartada. Transcritomas de linhagens resistentes e suscetíveis de *P. xylostella* e estudos de RNA de interferência identificaram algumas enzimas de detoxificação potencialmente ligadas a resistência a diamidas, tal como CYP6BG1 (Li et al., 2018), UGT2B17 (Li et al., 2017) e FMO (Mallot et al., 2019).

O receptor de rianodina da linhagem de *S. frugiperda* RR foi parcialmente sequenciado por Boaventura e colaboradores (2019), este estudo indicou que esta linhagem de *S. frugiperda* carrega somente a mutação I4790M. A linhagem Iso-RR tem a mesma mutação (dados não mostrados), o que leva a hipótese de que há outros fatores associados à resistência a diamidas. Estes fatores podem ser mutações não identificadas em outros genes, além dos receptores RyR, ou alteração nas regiões regulatórias do genoma. Pesquisas futuras de análises genômicas da linhagem Iso-RR são necessários para melhor elucidar o processo genético e molecular associado à resistência de *S. frugiperda* a diamidas.

Outra hipótese seria que as diferenças entre as linhagens RR e Iso-RR podem não estar associadas diretamente a mecanismos de resistência, outros eventos como genes modificadores e/ou efeitos pleiotrópicos podem ser responsáveis pelos resultados observados. Genes modificadores são aqueles capazes de alterar a expressão fenotípica de genes alvos independentemente de sua própria expressão e função. Um exemplo de genes modificadores envolvendo resistência a inseticidas foi provado em *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) resistente a diazinon, neste caso o gene *Scalloped wings (Scl)* age como gene modificador ao

gene *Rop-I*, uma esterase que carrega a mutação responsável pela resistência a diazinon nesta espécie (Davies et al., 1996). Para *S. frugiperda* resistente a diamidas, os resultados apoiam a hipótese que genes desconhecidos da linhagem RR interagem com o receptor de rianodina de alguma maneira que modula a resistência de *S. frugiperda* a diamidas, e estes genes modificadores teriam sido perdidos na linhagem Iso-RR. Consequentemente, a linhagem Iso-RR é resistente a diamidas, pois conserva a mutação I4790M no receptor de rianodina, mas com uma razão de resistência menor devido a ao receptor não estar sob influência destes outros genes. A identificação de genes modificadores é um desafio, pois eles só podem ser compreendidos em um contexto integrado (Riordan e Nadeau, 2017), estudos de rede de interação gênica são necessários para elucidar a hipótese proposta.

Teorias de genes modificadores e efeitos pleiotrópicos não são mutualmente exclusivas. Efeitos pleiotrópicos são os impactos observados nas características (ex. expectativa de vida, alocação de recursos, movimento) causado por uma característica não relacionada a resistência a inseticidas (Lenormand et al., 2018). Muitos estudos de efeitos pleiotrópicos associados a adaptação a novos ambientes, como um campo onde se tem a pulverização constante de inseticidas, podem ser encontrados na literatura (Chevillon et al., 1997; Somers et al., 2016; Wang & Cong, 2020; Singarayan et al., 2020;). Contudo, efeitos pleiotrópicos nem sempre são atribuídos a mutações de resistência, esses efeitos podem ser a consequência de genes modificadores ou outra mutação natural cuja frequência depende do ambiente (Lenormand et al., 2018). Os resultados indicam que o custo adaptativo observado na linhagem RR não é causado por efeitos pleiotrópicos dos genes de resistência, pois esta ambas as linhagens, RR e Iso-RR, apresentam a mutação RyR I4790M, mas linhagem Iso-RR não apresenta custo adaptativo associado a resistência a diamidas. Dessa forma, os dados confirmam a hipótese de Ffrench-Constant e Bass (2017), a qual afirma que a resistência nem sempre carrega um custo.

Estes pesquisadores também enfatizam que no campo o custo adaptativo está sob condições bióticas e abióticas, enquanto no laboratório as condições são controladas artificialmente. Portanto, para estabelecer uma estratégia de manejo de resistência baseada em estudos de custo adaptativo, seria importante mensurar o custo também em condições de campo (Ffrench-Constant e Bass, 2017). Contudo, estudos de custo adaptativos no campo tem seus desafios e limitações. No ponto de vista do programa de manejo, estudos de custo em campo fornecem uma estratégia local no manejo da resistência pois somente o local onde o ensaio foi feito (Freeman, 2021). Resultados de estudos de custo adaptativo no campo são

influenciados por muitas variantes, como época do ano, temperatura e geografia (Gavaze et al., 2001; Pu et al., 2019; Freeman, 2021).

Outra questão para um programa de manejo é basear a decisão em estudos de custo adaptativo que só mensuram parâmetros de crescimento e biológicos. Apesar, da importância do potencial da população em deixar descendentes ser evidente para o sucesso biológico, é conhecido que o custo adaptativo é mais marcante em ambientes desafiadores (Raymond et al. 2005, 2011). Portanto, outros parâmetros são recomendados para ajudar no estudo do custo adaptativo. Recentemente, os estudos de custo adaptativo investigaram a resposta defensiva e comportamental por meio da mensuração de predação, parasitismo e atração a feromônios (Muller et al., 2019; Jackson et al., 2020; Guillem-Amat et al., 2020).

Por fim, os resultados de custo adaptativo da linhagem Iso-RR devem ser próximos aos resultados que poderiam ser observados em campo, pois a proximidade do componente genético das linhagens é um melhor reflexo das populações de campo, onde indivíduos suscetíveis e resistentes pertenceriam a mesma população local, possuindo assim componentes genéticos mais próximos. Este estudo enfatiza a importância da genética em um programa de manejo da resistência e da necessidade de uma abordagem mais ampla em futuros estudos de custo adaptativo, já que o desenho experimental e os critérios levados em conta alteram os resultados com consequências significantes no controle de pragas resistentes no campo.

2.5. Conclusões

- Não foi observado custo adaptativo para a linhagem quase-isogênia resistente de *S. frugiperda* a diamidas para os parâmetros avaliados,
- Foi observado custo adaptativo para linhagem de *S. frugiperda* resistente a diamidas originalmente selecionada de campo para os parâmetros avaliados.

Referências

Abbas N, Shad SA, Razaq M, Waheed A, Aslam M (2014) Resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to profenofos: Relative fitness and cross resistance. **Crop Protection**, 58:49-54

- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel, V (2008) Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. **BMC evolutionary biology**, 8(1):1-9
- Bird LJ, Drynan L J, Walker PW (2020) Relative fitness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, 76(12):4077-4085.
- Boaventura D, Bolzan A, Padovez FEO, Okuma DM, Omoto C, Nauen, R (2020) Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, 76(1): 47-54
- Bolzan A, Padovez FEO, Nascimento ARB, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno HR, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to clorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management science**, 75(10): 2682-2689
- Burtet LM, Bernardi O, Melo AA, Pes MP, Strahl TT, Guedes JV (2017) Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest management science**, 73(12): 2569-2577
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, 8(4): e62268
- Chevillon C, Bourguet D, Rousset F, Pasteur N, Raymond M (1997) Pleiotropy of adaptive changes in populations: comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. **Genetics Research**, 70(3): 95-204
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y (2006) Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 84(3): 196-214
- Cruz I, Figueiredo MDLC, Silva RBD, Silva IFD, Paula CD, Foster JE (2012) Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* [Smith][Lepidoptera: Noctuidae]) larvae in maize. **International Journal of Pest Management**, 58(1), 83-90
- Daglish GJ, Jagadeesan R, Nayak MK, McCulloch GA, Singarayan VT, Walter GH (2020). The gene introgression approach and the potential cost of genes that confer strong phosphine resistance in red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of economic entomology**, 113(3): 1547-1554

- Davies AG, Game AY, Chen Z, Williams TJ, Goodall S, Yen JL, McKeinze JA, Batterham P (1996) *Scalloped wings* is the *Lucilia cuprina* Notch homologue and a candidate for the modifier of fitness and asymmetry of diazinon resistance. **Genetics**, 143(3): 1321-1337
- Diez-Rodríguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, 30(2): 311-316
- Dinno, A., & Dinno, M. A. (2017). Package ‘**dunn.test**’. CRAN Repos, 10, 1-7.
- Douris V, Papapostolou KM, Ilias A, Roditakis E, Kounadi S, Riga M, Nauen R. Vontas J (2017) Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by CRISPR/Cas9 genome modification in *Drosophila*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 87: 127-135
- Ebbinghaus-Kintscher U, Luemmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Masaki T, Yasokawa N, Tohnishi M (2006) Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in insects. **Cell Calcium**, 39(1): 21-33
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Briefing Note on FAO Actions on Fall Armyworm in Africa. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bt415e.pdf>>. Acessado em abril 2021
- Ffrench-Constant RH, Bass C (2017) Does resistance really carry a fitness cost? **Current opinion in insect science**, 21: 39-46
- Freeman JC, Smith LB, Silva JJ, Fan Y, Sun H, Scott JG (2021) Fitness studies of insecticide resistant strains: lessons learned and future directions. **Pest Management Science**, DOI:10.1002/ps.6306
- Gassmann AJ, Carrière Y, Tabashnik BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, 54: 147-163
- Gazave É, Chevillon C, Lenormand T, Marquine M, Raymond M (2001) Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. **Heredity**, 87(4): 441-448.
- Guillem-Amat A, Ureña E, López-Errasquín E, Navarro-Llopis V, Batterham P, Sánchez L, Perry T, Hernández-Crespo T, Ortego F (2020) Functional characterization and fitness cost of spinosad-resistant alleles in *Ceratitis capitata*. **Journal of Pest Science**, 93: 1043-1058
- Guo L, Liang P, Zhou X, Gao X (2014) Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a cloranthraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). **Scientific Reports**, 4(1): 1-7

- Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciel JC, DiFonzo C (2019) Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of economic entomology**, 112(2):792-802
- Horikoshi RJ, Bernardi O, Bernardi D, Okuma DM, Farias JR, Miraldo LL, Amaral FSA, Omoto C (2016) Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 109(2): 854-859
- Jackson GE, Malloch G, McNamara L, Little D (2020) Grain aphids (*Sitobion avenae*) with knockdown resistance (kdr) to insecticide exhibit fitness trade-offs, including increased vulnerability to the natural enemy *Aphidius ervi*. **Plos one**, 15(11): e0230541
- Jia B, Liu Y, Zhu YC, Liu X, Gao C, Shen J (2009) Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, 65(9): 996-1002
- Kaiser IS, Kanno RH, Bolzan A, Amaral FS, Lira EC, Guidolin AS, Omoto, C (2021) Baseline response, monitoring, and cross-Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to sodium channel blocker insecticides in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 114(2): 903-913
- Kasten Jr P, Precetti AA, Parra JRP (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Brazilian Journal of Agriculture**, 53(1): 68-78
- Kliot A, Ghanim M (2012) Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest management science**, 68(11): 1431-1437
- Lahm GP, Cordova D, Barry JD (2009) New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 17(12): 4127-4133
- Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordova D, Flexner L, Bellin CA, Dubas CM, Hughes KA, Hollingshaus JG, Clark CE, Benner EA (2007) Rynaxypyr™: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17(22): 6274-6279
- Larson JL, Redmond CT, Potter DA, (2014) Impacts of a neonicotinoid, neonicotinoid-pyrethroid premix, and anthranilic diamide insecticide on four species of turf-inhabiting beneficial insects. **Ecotoxicology**, 23(2): 252-259

- Leftwich PT, Spurgin LG, Harvey-Samuel T, Thomas CJ, Paladino LC, Edgington MP, Alphey L (2021) Genetic pest management and the background genetics of release strains. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 376(1818): 20190805
- Lenormand T, Harmand N, Gallet R (2018) Cost of resistance: an unreasonably expensive concept. **BioRxiv**, 276675
- Lenth, RV (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. **Journal of statistical software**, 69(1), 1-33
- Li X, Li R, Zhu B, Gao X, Liang P, (2018) Overexpression of cytochrome P450 CYP6BG1 may contribute to cloranthraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Pest management science**, 74(6): 1386-1393
- Li, X Zhu, B Gao, X Liang, P (2017) Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in cloranthraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Pest management science**, 73(7): 1402-1409
- Lira EC, Bolzan A, Nascimento AR, Amaral FS, Kanno RH, Kaiser IS, Omoto C (2020) Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest management science**, 76(8): 2674-2680
- Liu H, Lu Y, (2016) Improvement on the index of relative fitness in resistant population of insects. **Journal of Environmental Entomology**, 38(2): 393-400
- Liu S, Yao X, Xiang X, Yang Q, Wang X, Xin T, Yu S (2020) Fitness costs associated with cloranthraniliprole resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, DOI: 10.1002/ps.6194
- Maia, AHN, Pazianotto, RA, Luiz, A. J. B., Marinho-Prado, JS, Pervez, A (2014). Inference on arthropod demographic parameters: computational advances using R. **Journal of Economic Entomology**, 107(1), 432-439
- Malekpour R, Rafter MA, Daghish GJ, Walter GH (2018) The movement abilities and resource location behaviour of *Tribolium castaneum*: phosphine resistance and its genetic influences. **Journal of Pest Science**, 91(2): 739-749
- Mallott M, Hamm S, Troczka BJ, Randall E, Pym A, Grant C, Baxter S, Vogel H, Shelton AM, Field LM, Williamson MS, Paine M, Zimmer CT, Slater R, Elias J, Bass C (2019) A flavin-dependent monooxygenase confers resistance to cloranthraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 115: 103247

- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, 26(2): 286-300
- Moral, MA, Hinde, J, Garcia, BDC (2017). Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, 81(10): 2-23
- Müller T, Gesing MA, Segeler M, Müller C (2019) Sublethal insecticide exposure of an herbivore alters the response of its predator. **Environmental Pollution**, 247: 39-45
- Nascimento ARB, Fresia P, Cônsoli FL, Omoto C (2015) Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC genomics**, 16(1): 1-12.
- Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018). Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest management science**, 74(6): 1441-1448
- Pereira RM, Neto DA, Amado D, Durigan MR, Franciscatti RA, Mocheti M, Omoto, C (2020). Baseline susceptibility and frequency of resistance to diamide insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, 137: 105266
- Pogue MG (2002). "A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae)." **Amer Entomological Society**, 1-202.
- Pu J, Wang Z, Chung H (2020). Climate change and the genetics of insecticide resistance. **Pest management science**, 76(3):846-852
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Raymond B, Sayyed AH, Wright DJ (2007). Host plant and population determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Biology Letters**, 3(1): 83-86
- Richardson EB, Troczka BJ, Gutbrod O, Davies TE, Nauen R (2020). Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. **Journal of Pest Science**, 93(3):911-928
- Riordan JD, Nadeau JH (2017). From peas to disease: modifier genes, network resilience, and the genetics of health. **The American Journal of Human Genetics**, 101(2): 177-191
- Roditakis E, Vasakis E, Grispou M, Stavrakaki M, Nauen R, Gravouil M, Bassi A (2015). First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal of pest science**, 88(1): 9-16
- Roush TR; Mckeinze AJ (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, 32: 361-380

- Sattelle DB, Cordova D, Cheek TR (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, 8(3): 107-119
- Shah RM, Shad SA (2020). House fly resistance to clorantraniliprole: Cross resistance patterns, stability and associated fitness costs. **Pest management science**, 76(5): 1866-1873
- Silva JE, Assis CP, Ribeiro LM, Siqueira HA (2016). Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of economic entomology**, 109(5): 2190-2195
- Singarayan VT, Jagadeesan R, Nayak MK, Ebert PR, Dargatzis GJ (2020). Gene introgression in assessing fitness costs associated with phosphine resistance in the rusty grain beetle. **Journal of Pest Science**, 113(3): 1547-1554
- Somers J, Luong HNB., Mitchell J, Batterham P, Perry, T (2017). Pleiotropic effects of loss of the D α 1 subunit in *Drosophila melanogaster*: implications for insecticide resistance. **Genetics**, 205(1): 263-271.
- Sparks TC, Storer N, Porter A, Slater R, Nauen R (2021). Insecticide resistance management and industry—The origins and evolution of the insecticide resistance action committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. **Pest Management Science**, 77(6): 2609-2619
- Troczka BJ, Williams AJ, Williamson MS, Field LM, Lüemmen P, Davies TE (2015). Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. **Scientific reports**, 5(1): 1-11
- Troczka B, Zimmer, CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TE, Field LM, Williamson MS, Slater R, Nauen R (2012). Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect biochemistry and molecular biology**, 42(11): 873-880
- Wang Z, Cong H (2021). Antagonistic pleiotropy can promote adaptation to patchy environments. **Evolution**, 75 (1): 197-199
- Yao R, Zhao DD, Zhang S, Zhou LQ, Wang X, Gao CF, Wu SF (2017). Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with special reference to diamides. **Pest management science**, 73(6): 1169-1178

- Yu-ping Z, Yong-yue L, Ling Z, Guang-wen L (2010). Life-history traits and population relative fitness of trichlorphon-resistant and-susceptible *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Psyche**, DOI: 10.1155/2010/895935
- Zhu X, Yang Y, Wu Q, Wang S, Xie W, Guo Z, Kang S, Xia J, Zhang Y (2016). Lack of fitness costs and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a near-isogenic strain of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Pest management science**, 72(2): 289-297
- Zuo Y, Wang H, Xu Y, Huang J, Wu S, Wu Y, Yang Y (2017). CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, 89:79-85.

3. CUSTO ADAPTATIVO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES A CLORANTRANILIPROLE EM DIFERENTES HOSPEDEIROS

Resumo

O custo adaptativo associado a resistência é um conhecimento fundamental para a implementação de estratégias de manejo da resistência. Porém, grande parte destes experimentos são realizados em condições controladas em apenas um substrato alimentar, o que restringe o uso desses estudos. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma praga de difícil manejo, sendo os inseticidas do grupo das diamidas bastante promissores para o manejo desta praga. No entanto não se conhece sobre o custo adaptativo associado à diamidas para *S. frugiperda* utilizando plantas hospedeiras como fonte alimentar. Neste trabalho foi investigado o custo adaptativo de *S. frugiperda* resistente a diamidas em cada uma das três grandes culturas brasileiras, milho, soja e algodão. Para isso, foi utilizado a linhagem quase-isogênica de *S. frugiperda* resistente a diamida (Iso-RR), a linhagem suscetível de referência (SS) e as linhagens heterozigotas (H1 e H2) para avaliar diversos parâmetros biológicos e de crescimento populacional por meio de uma tabela de vida. Os resultados indicaram que todas as linhagens se desenvolveram melhor em plantas de milho comparadas a plantas de soja e algodão. Para as três plantas hospedeiras, a linhagem heterozigota H1 apresentou uma maior aptidão biológica que as demais linhagens. O custo relativo da linhagem resistente de *S. frugiperda* para as plantas de milho, soja e algodão foram de 1,04, 0,85 e 0,88 respectivamente. Isso demonstrou que não há custo adaptativo de *S. frugiperda* associada a resistência quando estas se alimentaram de plantas de milho, porém foi observado um custo adaptativo de *S. frugiperda* quando estas se alimentaram de plantas de soja e algodão. Assim, este estudo indicou que a fonte alimentar influencia o custo adaptativo de *S. frugiperda* associada a resistência a diamidas. Esta informação poderá auxiliar a implementação de estratégias de manejo da resistência mais específica para cada cultura agrícola.

Palavras-chave: Custo relativo, Fonte alimentar, Resistência a inseticidas

Abstract

Fitness cost associated with resistance is a fundamental knowledge for the implementation of resistance management programs. However, most of the experiments are carried out under controlled conditions with one food source, which restricts the use of these results in the field. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) is a hard pest to control, but diamides insecticides are effective to control this pest. However, the fitness cost associated with diamides for *S. frugiperda* feeding on host plants remains unknown. In this work, the fitness cost of *S. frugiperda* resistant to diamides was evaluated in each of the three major Brazilian crops: corn, soybean and cotton. We used near-isogenic strain of *S. frugiperda* resistant to diamides (Iso-RR), the susceptible reference strain (SS) and heterozygotes strains (H1 and H2) to evaluate several biological parameters and population growth using a life table. Results indicated that all strains developed better on corn plants compared to soybean and cotton plants. For the three host plants, the heterozygous H1 strain showed greater biological capacity than the other strains. The relative costs of the *S. frugiperda* resistant strain for corn, soybean and cotton plants were 1.04, 0.85 and 0.88, respectively. This demonstrated that there is no fitness cost of *S. frugiperda* associated with resistance when it fed on corn plants, but a fitness cost was observed for *S. frugiperda* when it fed on soybean and cotton plants. Thus, this study indicated that the food source influences the fitness cost of *S. frugiperda* associated

with resistance to diamides. Such information may help to implement more specific resistance management strategies for each agricultural crop.

Keywords: Relative cost, Food source, Insecticide resistance

3.1. Introdução

O manejo da resistência de praga a inseticidas depende de estratégias baseadas em algumas características associadas a resistência, tais como o tipo de herança, a dominância e a presença de custo adaptativo. Vários estudos são necessários para determinar cada uma dessas características, as quais variam dependendo do inseticida e/ou do inseto praga. Dentre estes estudos, um dos mais importantes para implementar o manejo da resistência é a verificação da ausência ou presença do custo adaptativo (Gassman, 2009). O custo adaptativo associado a resistência é um fator genético, que altera a aptidão biológica dos indivíduos resistentes em comparação aos indivíduos suscetíveis na ausência da pressão de seleção, desta maneira quando não há pressão de seleção no ambiente os indivíduos suscetíveis tendem a se sobressair e suprimir a população resistente (Kliot & Ghanim, 2012).

Estes estudos são uma ferramenta muito importante, porém grande parte destes experimentos são realizados em condições controladas em apenas um substrato alimentar, sendo que na maioria das vezes é utilizado dieta artificial (Ffrench-constant & Bass, 2017). Estes fatores restringem a aplicação do custo adaptativo de uma maneira mais prática, por isto realizar estudos de custo adaptativo associado a resistência em diferentes hospedeiros de uma praga agrícola é fundamental para estabelecer estratégias de manejo da resistência. Principalmente em pragas polífagas como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), pois os compostos produzidos pelas diferentes plantas podem influenciar a presença ou ausência do custo adaptativo (Raymond et al., 2006; Gassmann et al., 2009; Williams et al., 2011; Ffrench-constant & Bass, 2017; Chen et al., 2018).

Spodoptera frugiperda, mais conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, é uma praga bastante desafiadora no contexto brasileiro e mundial. Nativa das Américas, essa praga encontra-se atualmente nos continentes da África, Ásia e Oceania (Georgen et al, 2016; FAO, 2019; EPPO, 2021). Esta praga apresenta alta taxa de reprodução e dispersão além de ter um hábito polífago com mais de 350 hospedeiros incluindo diversas culturas agrícolas, como o milho, trigo, sorgo, soja, algodão e tomate (Pogue, 2002; Montezano et al., 2018). A

agricultura intensiva e as condições climáticas nas grandes regiões produtoras do Brasil promovem um cenário perfeito para a manutenção de populações de *S. frugiperda* durante todo o ano, estas características aliadas a um manejo utilizando, na maioria das vezes, inseticidas químicos e proteínas Bt, fazem este inseto sofrer uma grande pressão de seleção no campo, favorecendo a evolução da resistência. Diversos casos de resistência já foram reportados para *S. frugiperda* a diferentes grupos químicos (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001; Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2015; Okuma et al., 2017; Bolzan et al., 2019; Lira et al., 2020; Kaiser et al., 2021). Dentre eles estão um dos grupos químicos mais novos lançados no mercado, as diamidas.

Este grupo químico tem como modo de ação a atuação nos canais de rianodina e afetam diretamente o sistema muscular dos insetos, causando paralisia muscular e morte por inanição (Cordova et al., 2006; Sattelle et al., 2008). As diamidas tem grande eficiência contra insetos pragas (principalmente lepidópteros) e baixa toxicidade a mamíferos (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012). Atualmente três moléculas se encontram disponíveis no mercado brasileiro que são, flubendiamida, clorantraniliprole e ciantraniliprole. Estas moléculas são amplamente utilizadas nas culturas agrícolas para o controle de *S. frugiperda*, sendo registrados produtos à base de diamidas para as três principais culturas do cenário brasileiro, a saber milho, soja e algodão (Agrofit, 2021). Interessantemente, ainda há poucos estudos de custo adaptativo associado a diamidas para *S. frugiperda* (Richardson et al., 2020).

Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar se a fonte alimentar influencia o custo adaptativo de *S. frugiperda* associado à resistência a clorantraniliprole. Para isto foi investigado o custo adaptativo em cada uma das três grandes culturas brasileiras, milho, soja e algodão. Esses resultados ajudarão a traçar estratégias de manejo da resistência a diamidas em cada cultura agrícola estudada, visando proporcionar programas de manejo mais específicos e consequentemente mais eficientes para as culturas do milho, da soja e do algodão.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Insetos

A linhagem de *S. frugiperda* utilizada como referencial de suscetibilidade (SS) foi obtida da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil) em 1996, e vem sendo mantida no Laboratório de Resistência de Artrópodes (ESALQ-USP) desde então, sem pressão de

seleção por inseticidas. Já a linhagem resistente a diamidas utilizada foi a linhagem quase-isogênica (Iso-RR) proveniente de sete retrocruzamentos e autocruzamentos, como descrito no capítulo 2 (item 2.2.2) desta dissertação. A linhagem Iso-RR vem sendo mantida com pressão de seleção com o inseticida clorantraniliprole (Premio[®]) na concentração discriminatória ($100 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$) previamente definida (Bolzan et al., 2019) toda geração. Ambas as linhagens são mantidas em dieta artificial (Kasten Jr et al., 1978) sob condições controladas de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E) h no Laboratório de Resistência de Artrópodes (Universidade de São Paulo, Brasil).

Ambas as linhagens foram alimentadas com folhas de cada tratamento por uma geração antes do início dos experimentos. Com as linhagens SS e Iso-RR se alimentando do material vegetal de interesse foi estabelecido de duas linhagens de heterozigotas. A primeira linhagem heterozigota (H1) foi proveniente do cruzamento de machos suscetíveis e fêmeas resistentes, já a segunda (H2) foi proveniente do cruzamento de fêmeas suscetíveis e machos resistentes.

3.2.2. Plantas

O custo adaptativo de *S. frugiperda* foi avaliado em três tratamentos, cada um compreendendo uma planta hospedeira de interesse agrícola. Dessa forma foram utilizadas plantas de milho (*Zea mays* L.) convencional da variedade 3700RR2 (Bayer®, Uberlândia, MG, Brasil), plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) convencional da variedade CZ37B19LL (BASF®, Goiânia, GO, Brasil) e plantas de algodão convencional (*Gossypium hirsutum* L.) da variedade FM944GL (BASF® Goiânia, GO, Brasil). Os materiais vegetais foram obtidos em sementes e plantados separadamente em vasos de 30 litros contendo solo e substrato. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, com irrigação e nutrição adequada.

As plantas de milho foram oferecidas para as lagartas a partir do estágio vegetativo cinco (V5), no qual as folhas foram retiradas e cortadas em pequenas porções para serem servidas as lagartas conforme o consumo. Os experimentos com plantas de soja utilizaram plantas a partir do estágio vegetativo seis (V6), no qual os trifólios foram retirados e separados em folíolos para serem servidos as lagartas conforme o consumo. Enquanto que para avaliar o custo adaptativo em algodão foram utilizadas plantas a partir do estágio vegetativo seis (V6), no qual as folhas foram retiradas e cortadas em tamanho adequado para serem servidas as lagartas conforme o consumo.

3.2.3. Custo adaptativo da linhagem de *Spodoptera frugiperda* quase-isogênica resistente a clorantranilprole em folhas de milho, soja ou algodão

Uma geração antes da realização dos ensaios as linhagens suscetível (SS) e quase-isogênica resistente (Iso-RR) foram condicionadas em folhas da planta hospedeira de interesse. Para isso, as lagartas se alimentaram de uma das três plantas como principal fonte alimentar ao invés de dieta artificial. As lagartas neonatas (<24h) foram individualizadas em placas translúcidas de 16 células (Bio Supply[®]) contendo em cada célula vermiculita grossa e papel filtro para controlar a umidade, os pedaços de folhas foram colocados sobre este papel. Todos os dias as folhas foram trocadas para evitar a contaminação e a morte dos indivíduos. Após a formação das pupas, estas foram lavadas com sulfato de cobre 10% e separadas por sexo. Dessa forma, foram estabelecidas as linhagens heterozigotas previamente descritas.

As pupas das quatro linhagens, SS, Iso-RR, H1 e H2 foram transferidas para gaiolas de PVC (10 cm diâmetro × 20 cm de altura) com papel jornal como substrato para oviposição. Os adultos foram alimentados com solução de mel 10%. As massas de ovos foram coletadas e mantidas em copos plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido até a eclosão das lagartas. Lagartas neonatas (<24h) destas quatro linhagens foi individualizada em placas de 16 células como citadas anteriormente, contendo vermiculita, papel filtro e pedaços de folhas de milho, soja ou algodão. Para cada planta hospedeira, um total de 160 lagartas foram testadas por linhagem (10 repetições de 16 lagartas). Estas bandejas foram examinadas diariamente para avaliar mortalidade larval, tempo de desenvolvimento até formação da pupa e peso larval no décimo dia.

As pupas obtidas foram pesadas após 24 horas de formadas, e em seguida individualizadas em bandejas contendo papel filtro umedecido, cada pupa foi coberta por um copo plásticos (50 mL) até a emergência dos adultos. O tempo de desenvolvimento e a mortalidade de pupas foram avaliados neste período. Os adultos foram aleatoriamente separados para formar 20 casais por linhagem por planta hospedeira. Cada casal foi alocado em uma gaiola de PVC (10 cm diâmetro × 20 cm de altura) coberta com papel jornal para a obtenção de ovos. Os adultos foram alimentados com algodão umedecido com solução de mel a 10%, o substrato alimentar e o papel jornal foram trocados a cada dois dias. Os adultos foram avaliados todos os dias para verificar a mortalidade e a oviposição. Os ovos de cada dia foram contados com a ajuda de um microscópio estereoscópio. A segunda postura de cada casal foi separada para verificar a viabilidade da postura contando o número de lagartas que

eclodiram. Todas as fases destes experimentos foram mantidas sob condições controladas de 25 ± 2 °C, 70% umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E) h.

3.2.4. Análises estatísticas

O custo adaptativo associado à resistência a clorantraniliprole em *S. frugiperda* foi investigado em três plantas, utilizando quatro linhagens de *S. frugiperda* em cada experimento. Em todos os experimentos foram avaliados os parâmetros biológicos: tempo de desenvolvimento e sobrevivência das fases de ovo, lagarta e pupa; peso de lagarta de 10 dias após a eclosão; peso da pupa com 24h após a transformação e fertilidade. Demais parâmetros como razão sexual e períodos de pré-oviposição e oviposição foram utilizados para construção da tabela de vida.

Os dados de peso de lagarta e pupa, número de ovos por fêmea, sobrevivência das fases de ovo, lagarta e pupa e o tempo de desenvolvimento da fase de lagarta foram avaliados por modelos generalizados mistos (GLM) de acordo com a distribuição de cada dado. A distribuição adequada para cada conjunto de dados foi avaliada pelo pacote *hpn* (Moral et al., 2017). As comparações entre as linhagens, as plantas hospedeiras e a interação dos fatores foram feitos utilizando teste de Tukey (5%) para comparações múltiplas pelo pacote *multcomp* (Hothorn et al., 2008). O parâmetro, tempo de desenvolvimento das fases de ovo e pupa não se adequou a nenhuma distribuição feita pelo método acima citado, portanto os valores foram analisados pelo teste não paramétrico de Kurskall-Wallis e comparados por meio do teste de Dunn (5%) (Dinno, 2017).

A tabela de vida foi calculada estimando-se o intervalo médio entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ) através do procedimento Jackknife proposto por Maia e colaboradores (2014). Foram feitas análises de variância (ANOVA) para cada parâmetro calculado para verificar o efeito de cada fator (linhagem; planta hospedeira) e sua interação. A comparação foi feita pelo teste de Tukey (5%) utilizando o pacote *multcomp* (Hothorn et al., 2008). Todas as análises citadas acima foram feitas no software R v.3.2.1 (R Core Team, 2020).

3.3. Resultados

3.3.1. Peso de lagarta e pupa das linhagens de *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho, soja e algodão

Para o parâmetro de peso de lagarta de 10 dias após a eclosão não houve efeito significativo entre as linhagens ($F=1,8$, $g.l=3$, 105, $p=0,14$), mas foi observado um efeito significativo entre as plantas hospedeiras e para a interação entre os fatores linhagem e planta hospedeira ($F=83,2$, $g.l=2$, 103, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=10,4$, $g.l=6$, 97, $p < 0,05$ para interação dos fatores). As linhagens H1 e H2 apresentaram maior peso em relação as linhagens SS e Iso-RR, independente da fonte alimentar. As linhagens que se alimentaram de milho foram as que obtiveram maior peso em relação as demais plantas hospedeiras, enquanto as linhagens que se alimentaram de algodão apresentaram o menor peso. A diferença de peso de lagartas entre a linhagem H1 alimentada em milho e algodão foi de aproximadamente 290 mg. A interação linhagem e planta hospedeira foi observada em relação as lagartas que se alimentaram de plantas de milho, visto que somente nesta planta hospedeira houve diferenças estatísticas entre as linhagens. Em plantas de milho, lagartas suscetíveis atingiram um peso médio de 247 mg, sendo a linhagem de menor peso (Tabela 3.1).

O parâmetro peso de pupa indicou efeito significativo entre as linhagens, entre as plantas hospedeiras e para a interação dos fatores ($F=27,7$, $g.l=3$, 105, $p < 0,05$ para linhagem; $F=31,3$, $g.l=2$, 103, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=13,8$, $g.l=6$, 97, $p < 0,05$ para interação dos fatores). A diferença de peso entre as linhagens foi observada em todas as plantas hospedeiras, no milho a linhagem suscetível foi a que apresentou menor peso em comparação as demais com média de 166 mg, porém em soja e algodão a linhagem resistente foi a que apresentou menor peso em comparação as demais com média de 188 mg e 156mg respectivamente. De modo geral, as linhagens alimentadas com algodão apresentaram pupas mais leves que quando alimentadas com milho ou soja (Tabela 3.1).

3.3.2. Viabilidade das fases de ovo, lagarta e pupa e número de ovos por fêmea das linhagens de *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho, soja e algodão

A viabilidade de cada fase foi avaliada como porcentagem de sobrevivência. A viabilidade da fase de ovo não apresentou diferenças estatísticas ($F=1,5$, $g.l=3$, 105, $p=0,2$ para linhagem; $F=1,4$, $g.l=2$, 103, $p=0,2$ para planta hospedeira; $F=0,3$, $g.l=6$, 97, $p=0,9$ para

a interação dos fatores). Todas as linhagens em todas as plantas obtiveram uma taxa de sobrevivência da fase de ovo de aproximadamente 100% (Tabela 3.1).

Para o parâmetro de viabilidade larval houve efeitos significativos para as linhagens, as plantas hospedeiras e a interação dos fatores ($F=6,2$, $g.l=3$, 105, $p<0,05$ para linhagem; $F=87,2$, $g.l=2$, 103, $p<0,05$ para planta hospedeira; $F=3,2$, $g.l=6$, 97, $p<0,05$ para interação dos fatores) (Tabela 3.1). Nas linhagens alimentadas com milho, a linhagem H1 apresentou maior viabilidade que a linhagem suscetível. Já em soja H1 se diferenciou da linhagem resistente. Em algodão não houve diferenças significativas entre as linhagens. Entre os hospedeiros, as linhagens alimentadas com milho apresentaram maior viabilidade do que quando as linhagens foram alimentadas com soja e algodão. A viabilidade em folhas de milho foi cerca de 90%, em algodão a viabilidade da fase larval foi bastante reduzida variando de 50-60% (Tabela 3.1).

Houve efeitos significativos entre as linhagens, entre as plantas hospedeiras e para a interação entre os fatores para o parâmetro viabilidade de pupa ($F=11,5$ $g.l=3$, 105, $p<0,05$ para linhagem; $F=10,4$, $g.l=2$, 103, $p<0,05$ para planta hospedeira; $F=1,5$, $g.l=6$, 97, $p<0,05$ para a interação dos fatores). Entre as linhagens alimentadas no milho não houve diferença na sobrevivência das pupas, já em soja a linhagem H1 apresentou maior taxa de sobrevivência em relação as linhagens suscetível e resistente, sendo que H1 apresentou uma viabilidade de 82% já as linhagens suscetível e resistente apresentaram 63% e 56% de sobrevivência, respectivamente. Em algodão somente a linhagem H1 se diferenciou da linhagem resistente. Entre as plantas hospedeiras, apenas a linhagem H2 no algodão se diferiu das demais com maior sobrevivência de pupas (Tabela 3.1).

No parâmetro de número de ovos por fêmea houve efeitos significativos entre as linhagens, entre as plantas hospedeiras e para a interação entre os fatores ($F=7,8$, $g.l=3$, 174, $p<0,05$ para linhagem; $F=3,4$, $g.l=2$, 172, $p<0,05$ para planta hospedeira; $F=3,2$ $g.l=6$, 166, $p<0,05$ para interação dos fatores). O número total de ovos por fêmea entre as linhagens não diferiu quando as linhagens foram alimentadas com milho ou algodão, porém em soja a linhagem resistente apresentou menor número de ovos em relação a linhagem suscetível e a linhagem H1. A linhagem resistente em soja apresentou apenas 799 ovos em média, enquanto as demais linhagens apresentaram mais de mil ovos por fêmea (Tabela 3.1).

3.3.3. Tempo de desenvolvimento das fases de ovo, lagarta e pupa das linhagens de *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho, soja e algodão

O parâmetro tempo de desenvolvimento da fase de ovo não apresentou efeito significativo ($\chi^2=1,4$, $g.l=3$, 105, $p=0,6$ para linhagem; $\chi^2=2,3$, $g.l=2$, 97, $p=0,3$ para planta hospedeira). Todos as linhagens em todas as plantas obtiveram um tempo médio de 3 dias para a fase de ovo (Tabela 3.1).

O tempo de desenvolvimento da fase larval apresentou efeito significativo entre as linhagens, entre as plantas hospedeiras e a para interação dos fatores ($F=24,5$, $g.l=3$, 105, $p < 0,05$ para linhagem; $F=580,2$, $g.l=2$, 103, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=4,0$, $g.l=6$, 97, $p < 0,05$ para interação dos fatores). No milho, as linhagens suscetível e resistente apresentaram maior tempo de desenvolvimento larval em comparação as linhagens H1 e H2, com cerca de um dia a mais para completar o desenvolvimento larval se comparada as linhagens heterozigotas. O mesmo foi observado em algodão, tanto a linhagem resistente quanto a suscetível apresentaram maior tempo larval em relação a H1 e H2, com as duas primeiras linhagens apresentando cerca de três dias a mais de desenvolvimento em comparação aos heterozigotos. Na soja não houve diferenças de tempo de desenvolvimento larval entre as linhagens. Entre as plantas hospedeiras, as lagartas alimentadas com milho apresentaram menor tempo de desenvolvimento, seguido pelas lagartas alimentadas em soja. Lagartas alimentadas com algodão demoraram em média dez dias a mais para completarem o desenvolvimento larval.

O tempo de desenvolvimento da fase de pupa apresentou efeito significativo entre as linhagens, plantas hospedeiras e para a interação dos fatores ($F=3,5$, $g.l=3$, 105, $p < 0,05$ para linhagem; $F=18,3$, $g.l=2$, 103, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=2,5$, $g.l=6$, 97, $p < 0,05$ para interação dos fatores). No entanto o efeito observado ocorreu somente devido as diferenças entre as linhagens criadas em algodão, na qual a linhagem H1 teve maior tempo de pupa do que a linhagem suscetível. Para as plantas hospedeiras, apenas a linhagem H1 em algodão apresentou um tempo maior de desenvolvimento de pupa em comparação a H1 criadas em soja ou milho (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Parâmetros biológicos (médias \pm erro padrão) de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SS), quase-isogênica resistente a clorantraniliprole (Iso-RR) e os heterozigotos (H1 e H2) alimentadas com milho, soja ou algodão.

| Hospedeiro | Parâmetros Biológicos | SS | Iso-RR | H1 | H2 |
|------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Milho | Peso larval (mg) | 247,47 \pm 6,32 cA* | 285,13 \pm 5,53 bA | 323,04 \pm 14,05 aA | 310,04 \pm 6,67 aA |
| | Peso de pupa (mg) | 166,50 \pm 1,91 bB | 173,15 \pm 8,09 aA | 176,54 \pm 2,12 aA | 177,35 \pm 7,28 aB |
| | Viabilidade de ovo (%) | 98 \pm 1,6 aA | 93,71 \pm 5,68 aA | 99,60 \pm 0,3 aA | 100,0 \pm 0,00 aA |
| | Viabilidade larval (%) | 84,7 \pm 1,76 bA | 91,63 \pm 1,7 abA | 97,99 \pm 1,01 aA | 94,38 \pm 1,57 abA |
| | Viabilidade de pupa (%) | 68,4 \pm 3,5 aA | 69,09 \pm 3,5 aA | 88,22 \pm 1,60 aA | 80,55 \pm 1,64 aAB |
| | Número total de ovos por fêmea | 1239 \pm 178,10 aA | 1151,78 \pm 198,7 aA | 1349,12 \pm 148,5 aA | 1646,57 \pm 166,0 aA |
| | Tempo de ovo (dias) | 3,00 \pm 0,00 aA | 2,90 \pm 0,09 aA | 3,00 \pm 0,00 aA | 2,75 \pm 0,12 aA |
| | Tempo de lagarta (dias) | 15,09 \pm 0,13 aC | 14,63 \pm 0,09 abC | 14,43 \pm 0,08 bC | 14,42 \pm 0,12 bC |
| Soja | Tempo de pupa (dias) | 10,59 \pm 0,13aA | 9,94 \pm 0,09aA | 9,96 \pm 0,10aB | 10,36 \pm 0,11aA |
| | Peso larval (mg) | 135,72 \pm 4,72aB | 129,26 \pm 4,68aB | 141,52 \pm 3,95aB | 151,15 \pm 6,73aB |
| | Peso de pupa (mg) | 191,21 \pm 2,75 abA | 188,63 \pm 2,30 bA | 202,93 \pm 2,18 aA | 202,24 \pm 1,59 aA |
| | Viabilidade de ovo (%) | 99,3 \pm 0,49 aA | 95 \pm 2,44 aA | 99 \pm 0,76 aA | 99,5 \pm 0,47 aA |
| | Viabilidade larval (%) | 70,00 \pm 6,71 abAB | 64,79 \pm 3,00 bB | 82,50 \pm 2,46 aB | 68,75 \pm 4,14 abB |
| | Viabilidade de pupa (%) | 63,87 \pm 4,66 bA | 56,81 \pm 3,00 bA | 83,10 \pm 3,45 aA | 68,93 \pm 4,04 abB |
| | Número total de ovos por fêmea | 1807,94 \pm 196,22 abA | 799,50 \pm 158,54 cA | 1996,94 \pm 179,10 aA | 1219,87 \pm 176,71 bcA |
| | Tempo de ovo (dias) | 2,90 \pm 0,094 aA | 2,80 \pm 0,13 aA | 2,80 \pm 0,12 aA | 2,90 \pm 0,94 aA |
| Algodão | Tempo de lagarta (dias) | 17,12 \pm 0,26 aB | 17,13 \pm 0,12 aB | 16,46 \pm 0,09 aB | 16,75 \pm 0,16 aB |
| | Tempo de pupa (dias) | 10,29 \pm 0,20aA | 10,21 \pm 0,15aA | 10,75 \pm 0,117aB | 10,77 \pm 0,18aA |
| | Peso larval (mg) | 16,74 \pm 0,472aC | 22,28 \pm 1,23aC | 32,65 \pm 1,96aC | 27,83 \pm 2,19aC |
| | Peso de pupa (mg) | 188,15 \pm 2,30 aA | 156,34 \pm 2,94 cB | 173,94 \pm 2,92 bB | 181,72 \pm 2,37 abB |
| | Viabilidade de ovo (%) | 98,27 \pm 0,88 aA | 93,89 \pm 4,13 aA | 95,88 \pm 2,17 aA | 93,89 \pm 3,92 aA |
| | Viabilidade larval (%) | 49,37 \pm 5,55 aB | 57,50 \pm 4,73 aB | 61,87 \pm 3,79 aC | 55,00 \pm 5,21 aB |
| | Viabilidade de pupa (%) | 79,57 \pm 3,25 abA | 70,27 \pm 4,73 bA | 88,19 \pm 3,79 abA | 92,18 \pm 2,09 aA |
| | Número total de ovos por fêmea | 1340,69 \pm 171,82 aA | 811,57 \pm 123,06 bA | 1295,31 \pm 130,02 aA | 1203,26 \pm 135,45 aA |
| Algodão | Tempo de ovo (dias) | 3,00 \pm 0,00 aA | 2,90 \pm 0,17 aA | 3 \pm 0,00 aA | 3,00 \pm 0,20 aA |
| | Tempo de lagarta (dias) | 26,50 \pm 0,209 aA | 26,64 \pm 0,39 aA | 23,44 \pm 0,26 bA | 23,99 \pm 0,31 bA |
| | Tempo de pupa (dias) | 10,65 \pm 0,203 bA | 10,87 \pm 0,49abA | 11,91 \pm 0,33aA | 11,45 \pm 0,32 abA |

* Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens de *S. frugiperda* nas criadas na mesma planta e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre a mesma linhagem em diferente planta hospedeira (Tukey, $p < 0,05$).

3.3.4. Parâmetros de crescimento populacional das linhagens de *Spodoptera frugiperda* em milho, soja e algodão

Os parâmetros de crescimento populacional das linhagens resistente, suscetível, H1 e H2 alimentadas com milho, soja e algodão apresentaram diferenças estatística para quase todos os parâmetros analisados (Tabela 3.2). O parâmetro R_0 apresentou diferenças para as linhagens, as plantas hospedeiras e para a interação entre os fatores ($F=26,6$, $g.l=3$, 185, $p < 0,05$ para linhagem; $F=3,5$, $g.l=2$, 183, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=2,9$, $g.l=6$, 177, $p < 0,05$ para a interação). A linhagem H1 apresentou maior valor de R_0 que as demais linhagens, independente da fonte alimentar. Em milho e algodão, os valores R_0 nas linhagens H1 e H2 não diferiram entre si, porém quando alimentadas em soja H1 apresentou valores R_0 que diferiram das demais linhagens. Entre as plantas hospedeiras, a linhagem H1 em algodão foi a única que diferiu das demais plantas, esta linhagem apresentou um valor de R_0 aproximadamente 400 vezes menor que os valores de R_0 observados em milho e soja

Houve diferenças significativas para linhagem, planta hospedeira e a interação entre eles para o parâmetro de tempo médio de geração (T) ($F=37,1$, $g.l=3$, 185, $p < 0,05$ para linhagem; $F=35,2$, $g.l=2$, 183, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=12,0$, $g.l=6$, 177, $p < 0,05$ para a interação). As diferenças entre as linhagens foram observadas somente em milho e algodão. A linhagem H1 alimentada com milho apresentou um T de aproximadamente 29,5 dias, que foi significativamente maior em comparação as linhagens suscetível e resistente. Já para as linhagens alimentadas com algodão o tempo médio entre gerações para as linhagens H1 e H2 foram menores do que para as linhagens resistente e suscetíveis, sendo que as linhagens H1 e H2 apresentaram cerca de 40 dias entre gerações e as linhagens suscetível e resistente cerca de 44 dias. Entre as plantas hospedeiras, as linhagens alimentadas em algodão tiveram o maior T , seguido pelas linhagens alimentadas em soja e milho.

O parâmetro r_m apresentou efeito significativos tanto para linhagem, planta hospedeira e a interação entre os fatores ($F=67,2$, $g.l=3$, 185, $p < 0,05$ para linhagem; $F=386,4$, $g.l=2$, 183, $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=5,7$, $g.l=6$, 177, $p < 0,05$ para interação dos fatores). Entre as linhagens, o valor de r_m foi maior para linhagem H1, seguido da linhagem H2, independente da fonte alimentar. A linhagem resistente diferiu das demais linhagens, com o menor valor de r_m , somente em soja e algodão. Entre as plantas hospedeiras, os valores de r_m foram maiores em milho e menores em algodão. Para a linhagem suscetível, r_m não diferiu entre milho e soja, no entanto para as demais linhagens houve diferenças

estatísticas entre as três plantas hospedeiras, sendo os valores maiores em milho, seguido por soja e algodão, respectivamente.

Efeitos significativos foram observados entre linhagem, planta hospedeira e a interação entre eles para o parâmetro razão finita de crescimento (λ) ($F=67,2$, $g.l=3$, 185 , $p < 0,05$ para linhagem; $F=386,4$, $g.l=2$, 183 , $p < 0,05$ para planta hospedeira; $F=5,7$, $g.l=6$, 177 , $p < 0,05$ para interação dos fatores). A linhagem H1 apresentou o maior valor em comparação as demais linhagens em todas as plantas hospedeiras. Em milho a linhagem H2 não se diferiu da linhagem resistente, porém se diferiu da linhagem suscetível, enquanto estas duas últimas linhagens não diferiram entre si. Em plantas de soja, as linhagens H2 e suscetível também não se diferenciaram entre si, porém apresentaram maiores valor de λ do que a linhagem resistente. Em algodão, a linhagem H1 apresentou diferenças significativas em relação as linhagens suscetível e resistente, mas não em relação a linhagem H2, está não se diferiu da linhagem suscetível, porém se diferiu da linhagem resistente. Entre as plantas hospedeiras, as linhagens H1, H2 e resistente apresentaram maior valor de λ em milho, seguido de soja e algodão, já para a linhagem suscetível o parâmetro não apresentou diferenças entre o milho e a soja, sendo estes maiores do que o algodão.

Com base no r_m da linhagem suscetível foi calculado o custo relativo das linhagens resistente, H1 e H2 em cada planta hospedeira. Nesta análise valores superiores a 1 indicam vantagem em relação a linhagem suscetível, enquanto valores inferiores 1 indicam um custo da linhagem em relação a linhagem suscetível. A linhagem H1 apresentou valores superior a 1 em todas as plantas hospedeiras, enquanto a linhagem resistente apresentou um custo relativo nas plantas de soja e algodão. A linhagem H2 apresentou valores próximos a 1 em todas as plantas hospedeiras. Esses resultados indicam que as linhagens heterozigotas, principalmente H1, apresentam um padrão de custo relativo diferente da linhagem resistente e que existe um custo adaptativo da linhagem resistente nas plantas de soja e algodão, mas não em milho (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Parâmetros de crescimento populacional de linhagens *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho, soja ou algodão.

| Parâmetros | Linhagens | Planta Hospedeira | | |
|-------------|-----------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Milho | Soja | Algodão |
| (R_0) | SS | 270,4 ± 33,3 bA* | 316,4 ± 34,4 bA | 290,4 ± 37,2 abA |
| | Iso-RR | 317,2 ± 51,5 bA | 140,1 ± 27,8 cA | 146,2 ± 22,2 bA |
| | H1 | 758,6 ± 79,0 aA | 761,6 ± 68,3 aA | 343,5 ± 36,5 aB |
| | H2 | 404,7 ± 54,2 abA | 293,4 ± 41,2 bA | 293,1 ± 33,0 abA |
| (T) | SS | 30,4 ± 0,2 aC | 33,1 ± 0,3 aB | 44,1 ± 0,1 aA |
| | Iso-RR | 30,0 ± 0,2 abC | 33,3 ± 0,4 aB | 44,1 ± 0,4 aA |
| | H1 | 29,5 ± 0,2 bC | 32,6 ± 0,2 aB | 40,6 ± 0,2 bA |
| | H2 | 29,7 ± 0,2 abC | 32,9 ± 0,2 aB | 40,9 ± 0,2 bA |
| (r_m) | SS | 0,184 ± 0,004 bA | 0,173 ± 0,003 bA | 0,128 ± 0,003 bB |
| | Iso-RR | 0,192 ± 0,005 bA | 0,148 ± 0,005 cB | 0,113 ± 0,002 cC |
| | H1 | 0,226 ± 0,003 aA | 0,203 ± 0,002 aB | 0,144 ± 0,002 aC |
| | H2 | 0,201 ± 0,004 bA | 0,172 ± 0,003 bB | 0,139 ± 0,002 abC |
| (λ) | SS | 1,20 ± 0,005 cA | 1,19 ± 0,003 bA | 1,14 ± 0,003 bcB |
| | Iso-RR | 1,21 ± 0,006 bcA | 1,16 ± 0,006 cB | 1,12 ± 0,003 cC |
| | H1 | 1,25 ± 0,004 aA | 1,22 ± 0,003 aB | 1,15 ± 0,002 aC |
| | H2 | 1,22 ± 0,005 bA | 1,19 ± 0,004 bB | 1,15 ± 0,002 abC |
| $(w)^a$ | SS | 1 | 1 | 1 |
| | Iso-RR | 1,04 | 0,85 | 0,88 |
| | H1 | 1,23 | 1,17 | 1,12 |
| | H2 | 1,09 | 0,99 | 1,08 |

* Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens de *S. frugiperda* nas criadas na mesma planta e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre a mesma linhagem em diferente planta hospedeira (Tukey, $p < 0.05$). ^a Custo relativo calculado por meio da divisão do valor de r_m da linhagem de interesse (Iso-RR, H1 ou H2) pelo valor de r_m da linhagem SS.

3.4. Discussão

Este estudo avaliou o custo adaptativo de *S. frugiperda* a clorantraniliprole utilizando linhagens de componente genético similares e três plantas distintas como fonte alimentar. Os resultados demonstraram que a presença de custo adaptativo de *S. frugiperda* associado à resistência ao inseticida clorantraniliprole depende da fonte alimentar. Essa informação é de

fundamental importância ao considerar a característica polífaga dessa espécie e o cenário agrícola brasileiro, no qual as três grandes culturas do país (milho, soja e algodão) são plantas hospedeiras para essa praga.

O componente genético similar entre as linhagens utilizadas em estudos de custo adaptativo vem sendo discutido na literatura (Raymond et al., 2011; Ffrench-Constant & Bass, 2017; Leftwich et al., 2021) e se mostrou importante para o custo adaptativo de *S. frugiperda* a clorantraniliprole, como discutido no capítulo anterior. Ao trabalhar com linhagens de componente genético mais próximos em diferentes plantas os resultados refletiram apenas a influência da fonte alimentar no custo adaptativo, e não possíveis interferências de fatores genéticos como genes modificadores e efeitos pleiotrópicos associados a genes da resistência (vide capítulo anterior para mais detalhes). No entanto, no campo os fatores genéticos e ambientais atuam em conjunto, dessa forma isolar os eventos é uma abordagem necessária para a realização dos estudos e compreensão do impacto de cada fator sobre os resultados, porém deve se considerar o cenário de forma holística quando usa-se desses resultados para propor uma estratégia de manejo da resistência aplicado ao campo.

No Brasil, as culturas do milho, da soja e do algodão são grandes commodities agrícolas com severos problemas de pragas. Há alguns anos, *S. frugiperda* não causava danos tão frequentes em soja e algodão como está sendo observado atualmente, tornando necessário traçar estratégias de manejo dessa praga nessas culturas para retardar a evolução da resistência. As plantas de milho, soja e algodão são viáveis para a alimentação e desenvolvimento de *S. frugiperda*, apesar das plantas de soja e algodão serem subótimas ao desenvolvimento da espécie quando comparada as plantas de milho (Barros et al., 2010; Silva et al., 2017; Wang et al., 2021).

Os resultados observados para os parâmetros biológicos indicaram que todas as linhagens se desenvolveram e completaram seu ciclo nas três plantas, no entanto os padrões de desenvolvimento diferiram entre as plantas hospedeiras. Em plantas de milho estas linhagens apresentaram um desenvolvimento melhor em quase todos os parâmetros biológicos em comparação as plantas de soja e algodão, por exemplo a viabilidade da fase de pupa para a linhagem resistente foi de 70% quando as lagartas se alimentaram em milho, mas valores inferiores a 60% foram observados quando as lagartas se alimentaram de soja ou algodão. Dessa forma, plantas de milho continuam sendo hospedeiros ótimo para *S. frugiperda* independentemente de qualquer alteração genética associada a resistência ao inseticida clorantraniliprole.

Os resultados observados para os parâmetros de crescimento populacional calculados por meio da tabela de vida demonstraram o mesmo cenário. Existem diferentes padrões de resposta em relação as plantas hospedeiras, em milho não há diferenças nos parâmetros entre a linhagem suscetível e resistente. De fato, o custo relativo calculado para a linhagem Iso-RR em milho foi de 1,04, ou seja, não há custo adaptativo associado a resistência à clorantraniliprole quando *S. frugiperda* se alimenta de milho. Isto certamente é uma informação importante para a implementação de um programa de manejo da resistência, pois a ausência de custo adaptativo no campo pode auxiliar no aumento da frequência de indivíduos resistentes (Kliot & Ghanim, 2012; Freeman et al., 2021), principalmente em regiões que ocorre o plantio de mais de uma safra consecutivamente. A constante oferta de alimento e abrigo, associado a pressão de seleção da aplicação contínua de inseticidas e a ausência de custo adaptativo associado a resistência, torna o manejo da resistência de *S. frugiperda* a diâmidas em milho um desafio.

Por outro lado, o manejo da resistência a diâmidas dessa espécie em soja e algodão tende a ser mais promissor, pois há custo adaptativo associado a resistência. O peso de pupa da linhagem resistente alimentada com soja ou algodão, apresentou um valor bem menor em relação as outras linhagens alimentadas nas mesmas plantas, da mesma forma a taxa de fecundidade foi menor para a linhagem resistente e comparação as outras. Isto pode estar ligado ao fato da fecundidade dos adultos estar intrinsecamente associada ao acúmulo de nutrientes na fase larval, e conseqüentemente ao peso de pupa (Hou et al., 2000; Awmack & Leather 2002; Razmjou et al. 2014). Os resultados indicaram que a linhagem resistente em comparação as outras linhagens, teve dificuldades em se desenvolver na fase larval em folhas de soja e algodão, a viabilidade da fase larval foi reduzida em plantas de soja e algodão enquanto o tempo de desenvolvimento foi maior nessas duas plantas em comparação a mesma linhagem alimentada com milho. Portanto, há uma desvantagem biológica associado a resistência a diâmidas para as culturas da soja e do algodão.

Estas diferenças também foram observadas nos parâmetros de crescimento populacional calculados na tabela de vida, em que a linhagem resistente apresentou os menores valores de R_0 , r_m e λ , e o maior valor de T quando alimentada em plantas de soja e algodão. O custo relativo da linhagem resistente em soja e algodão foi de 0,85 e 0,88, respectivamente. Esses dados indicam que os indivíduos resistentes têm uma desvantagem biológica de aproximadamente 20% em relação a indivíduos suscetíveis em um mesmo ambiente sem pressão de seleção por inseticida. Portanto, *S. frugiperda* apresentou um custo adaptativo associado a resistência à clorantraniliprole quando se alimenta de plantas de soja e

algodão. A alteração do custo adaptativo associado a resistência a diamidas em função das características nutricionais da fonte alimentar em que a praga se encontra também foi observado em *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), em que o aumento dos níveis de gossipol na dieta foi atrelado ao aumento do custo adaptativo associado as proteínas Bt (Carriere et al., 2004).

As características nutricionais da fonte alimentar são importantes para o desenvolvimento ótimo das espécies, mesma para aquelas com hábito polífago existe uma preferência por um determinado grupo de plantas (Silva & Clark, 2020). O desenvolvimento ótimo de *S. frugiperda* em plantas de milho pode estar associado a história co-evolutiva dessa espécie com gramíneas, *S. frugiperda* é mais adaptada aos compostos secundários das plantas de milho, como o DIMBOA (Rotás, 2007; Chen et al., 2020), e as características físicas, como a textura e pilosidade (Awmack & Leather, 2002), do que esses mesmos aspectos em plantas de soja e algodão (Wang et al., 2021). Sabe-se que soja e algodão possuem compostos que são antagônicos ao desenvolvimento de vários grupos de insetos (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). No algodão os principais compostos são os terpenóides, flavonoides e taninos (Ti & Zhang, 2009), já na soja os compostos mais conhecidos por afetar o desenvolvimento larval são os flavonoides, isoflavonoides e ácidos fenólicos (Piubelli, et al. 2005; Peruca et al., 2017; Bentivenha et al., 2018). Estes compostos são substâncias liberadas pelas plantas justamente para a proteção contra herbivoria, porém insetos polípagos como *S. frugiperda* tem um arsenal digestivo e genético para sobreviver e se adaptar a estas substâncias diversas (Hafeez et al., 2021).

No entanto, não são todos os casos que esses compostos de planta influenciam no custo adaptativo de *S. frugiperda*. Uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a proteína Bt Vip3A alimentada com algodão não apresentou custo adaptativo associado a resistência nessa planta (Chen et al., 2019). Da mesma forma que uma linhagem de *S. frugiperda* resistente ao inseticida clorpirefós apresentou custo adaptativo em todas as plantas avaliadas, a saber algodão, soja, aveia e milho (Garlet et al., 2021). Em todos os casos, incluindo este trabalho, a relação entre custo adaptativo e composto secundário de planta é uma hipótese, pois não foi caracterizado e mensurado os compostos secundários presentes nas plantas por métodos analíticos, como espectrometria de massas. Estudos que analisem a composição nutricional e bioquímicas das plantas utilizadas poderão trazer informações interessantes sobre os híbridos e variedades mais indicadas para o manejo da resistência, sendo assim uma área que precisa ser investigada no futuro.

Recentemente, *S. frugiperda* invadiu os continentes Asia, África e Oceania (Georgen et al., 2016; FAO, 2019; EPPO, 2021). Nesses locais, diversos países apresentam um sistema agrícola diferentes do que é visto no Brasil, com outras culturas agrícolas, estratégias de manejo e sistemas de cultivo. Como consequência das culturas agrícolas distintas, diversos estudos de biologia de *S. frugiperda* foram feitos em plantas anteriormente pouco associadas a esta praga, visando compreender a bioecologia da praga para se estabelecer estratégias de manejo. Por exemplo, o registro e/ou a biologia de *S. frugiperda* já foi investigada em cebola (Cokola et al., 2021), girassol (Li-mei et al., 2021) e solanáceas como berinjela, tomate e pimentão (Li-hong et al., 2021). Estes estudos não investigaram custo adaptativo de linhagens resistentes, porém todos os resultados desses estudos indicaram valores menores do que foi observado neste trabalho na linhagem suscetível para as plantas de milho, soja e algodão.

Os estudos realizados na África em especial indicam que diversos países vêm sofrendo com os danos causados por *S. frugiperda* e apresentam tendências de problemas maiores no futuro devido a bioecologia da praga e as características intrínsecas da agricultura no continente (Niassy et al., 2021). Na África existe uma predominância de pequenos agricultores, uma diversidade de culturas e pouco aporte financeiro para inseticidas mais seletivos. Assim, a perda financeira por pragas nesse sistema é maior e a agressividade de pragas polífagas se torna mais perigosa, pois todas as culturas podem ser atacadas. O controle químico é limitado a inseticidas de tecnologias mais antigas e mais baratos, o que pode causar a evolução rápida da resistência de *S. frugiperda* a diversos grupos químicos, piorando o cenário (Kumela et al., 2018; Tambo et al., 2019). Dessa forma, muitas estratégias de manejo estão sendo discutidas com base em biopesticidas, variedades resistentes e controle biológico (Sisay et al., 2018; Bateman et al., 2021; Hajek et al., 2021). No entanto, no manejo integrado de pragas, os inseticidas também fazem parte das estratégias de ação, inseticidas estes que nesse caso devem ser seletivos e compatíveis com outras estratégias de controle de pragas.

No mercado atual, as diamidas são o grupo de inseticidas com as melhores características de seletividade, sendo de fundamental importância realizar o manejo da resistência para esse grupo de inseticidas. Apesar de ser um grupo químico novo, estudos da resistência a diamidas já elucidaram os principais mecanismos de resistência em diversas espécies, sendo as mutações dos sítios de ligação os mecanismos mais comumente encontrados (Wang et al., 2014; Zuo et al., 2020; Boaventura et al., 2020). Porém a resistência metabólica também já foi atrelada como uma auxiliadora a resistência à diamidas, principalmente por meio de superexpressão das monooxigenases do citocromo P450 (Li et al., 2017; Li et al., 2018; Mallot et al., 2019). A produção destas enzimas requer um grande gasto

energético, deste modo o custo adaptativo associado à resistência a diamidas em soja e algodão podem estar associados a superprodução destas enzimas devido a resistência metabólica somado ao estresse causados pelos compostos secundários dessas plantas. A interface entre resistência e compostos secundários de plantas recai sobre o fato que ambos causam um aumento na produção de enzimas de detoxificação. Esta hipótese é reforçada pelos estudos de custo adaptativo em uma linhagem de *P. gossypiella* resistente a proteínas Bt em relação a quantidade do composto gossipol, onde quanto maior a concentração de gossipol na dieta maior foi o custo adaptativo encontrado (Willians et al., 2011; Carrière et al., 2019). Dessa forma, os efeitos de subnutrição das lagartas e o estresse metabólico causada por plantas subótimas, levariam a menor fecundidade dos adultos e consequente custo adaptativo. Esta relação as enzimas de detoxificação e custo adaptativo já foi observado em estudos com *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) na África, no qual a superexpressão de enzimas do citocromo P450 para resistência a piretróides foi relacionada ao custo adaptativo associado a resistência (Tchouakui et al., 2020).

Por fim, deve-se ressaltar a importância dos heterozigotos no manejo da resistência. Os resultados demonstraram que os dois heterozigotos se comportaram na maioria das vezes, superior ou igual as características biológicas da linhagem suscetível quando estas linhagens foram alimentadas com as três plantas hospedeiras. A linhagem heterozigota H1 apresentou valores de custo relativo melhores que a linhagem suscetível em todas as plantas, o indica que indivíduos da linhagem H1 teria uma aptidão biológica maior que indivíduos suscetíveis em condições ambientais iguais. Isto pode ser um fator importante quanto se diz respeito a implementação de um programa de manejo da resistência, pois os estudos de caracterização feitos para esta linhagem indicaram que a resistência de *S. frugiperda* a clorantraniliprole é incompletamente recessiva, assim a maioria dos heterozigotos morreriam com as doses de campo específicas para os produtos à base de clorantraniliprole. Porém, é possível a sobrevivência de alguns indivíduos, principalmente quando as práticas agrônômicas são equivocadas como a utilização de subdoses e aplicações sem a rotação de modos de ação. Essas técnicas de manejo inadequadas somadas a sobrevivência de heterozigotos com elevada aptidão biológica, pode elevar a frequência dos alelos da resistência acelerando a evolução da resistência. Alguns estudos sobre custo adaptativo, também apresentaram os heterozigotos com parâmetros biológicos superiores as linhagens parentais (Jia et al., 2009; Okuma et al., 2017; Shah & Shad, 2019), se este padrão ocorre devido ao encontro de componentes genéticos de variabilidade distintos (ver capítulo anterior para maiores discussões) ou se está

relacionado a alguma característica genética associada a resistência, é uma pergunta que permanece para ser elucidada.

Os resultados apresentados e discutidos levam em conta o cenário agrícola brasileiro, em que há a sobreposições destas culturas com a utilização de inseticidas do grupo das diamidas (Agrofit, 2021). Dessa forma, este trabalho oferece subsídios para a implementação de um programa de manejo da resistência a diamidas que considere cada cultura em sua relação específica com linhagens suscetíveis, heterozigotas e resistentes de *S. frugiperda*. O sistema da cultura do milho, no qual a pressão de seleção é alta devido a continuidade das safras e ausência de custo adaptativo, é necessário estratégias mais agressivas e urgentes. Enquanto para as culturas da soja e algodão ainda pode-se trabalhar sobre a presença do custo adaptativo associado a resistência.

3.5 Conclusões

- Não foi observado custo adaptativo de *S. frugiperda* associado a resistência a clorantraniliprole quando esta espécie foi alimentada com milho,
- Foi observado custo adaptativo de *S. frugiperda* associado a resistência a clorantraniliprole quando esta espécie foi alimentada com soja e algodão.

Referências

- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 21/06/2021.
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual review of entomology**, 47(1): 817-844
- Barros EM, Torres, JB, Bueno, AF (2010) Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, 39: 996-1001
- Bateman, ML, Day, RK, Rwomushana, I, Subramanian, S, Wilson, K, Babendreier, D, ... Edgington, S (2021). Updated assessment of potential biopesticide options for managing fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Africa. **Journal of Applied Entomology**, 145(5): 384-393

- Bentivenha JP, Canassa VF, Baldin EL, Borguini MG, Lima GP, Lourenção, AL (2018) Role of the rutin and genistein flavonoids in soybean resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). **Arthropod-plant interactions**, 12(2): 311-320
- Boaventura D, Bolzan A, Padovez FEO, Okuma DM, Omoto C, Nauen, R (2020) Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, 76(1): 47-54
- Bolzan A, Padovez FEO, Nascimento ARB, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno HR, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to cloranthraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management science**, 75(10): 2682-2689
- Carrière Y, Ellers-Kirk C, Biggs R, Higginson DM, Dennehy TJ, Tabashnik BE (2004) Effects of gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, 97(5), 1710-1718
- Carrière, Y, Yelich, AJ, Degain, BA, Harpold, VS, Unnithan, GC, Kim, JH, ... Tabashnik, BE (2019). Gossypol in cottonseed increases the fitness cost of resistance to Bt cotton in pink bollworm. **Crop Protection**, 126, 104914
- Carvalho, RA, Omoto, C, Field, LM, Williamson, MS, Bass, C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, 8(4): e62268
- Chen Y, Guo J, Gao Z, He K, Bai S, Zhang T, Wang Z (2020) Performance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on six host plants: potential risks to mid-high latitude crops in China. **Journal of Agricultural Science**, 12(10):16-27
- Chen, X, Head, GP, Price, P, Kerns, DL, Rice, ME, Huang, F, Yang, F (2019). Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. **Pest management science**, 75(4), 1074-1080
- Chiriboga Morales, X, Tamiru A, Sobhy, IS, Bruce, TJ, Midega, CA, Khan, Z (2021) Evaluation of african maize cultivars for resistance to fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Plants**, 10(2): 392
- Cokola, MC, Ndjadi, SS, Bisimwa, EB, Ahoton, LE, Francis, F (2021) First report of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on onion (*Allium cepa L.*) in South Kivu, Eastern DR Congo. **Revista Brasileira de Entomologia**, DOI: 10.1590/1806-9665-RBENT-2020-0083
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y (2006) Anthranilic

diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry Physiology** 84:196-214

Diez-Rodríguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, 30(2): 311-316

Dinno A, Dinno, MA (2017). Package ‘dunn.test’. **CRAN Repos**, 10, 1-7

Ebbinghaus-Kintscher U, Luemmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Masaki T, Yasokawa N, Tohnishi M (2006) Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in insects. **Cell Calcium**, 39(1): 21-33

EPPO (2021) European and mediterranean plant protection organization. Disponível em: <https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/shortnotes_qps/fall_armyworm>. Acessado em Junho 2021.

FAO (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Briefing Note on FAO Actions on Fall Armyworm in Africa. Disponível em:<<http://www.fao.org/3/a-bt415e.pdf>>. Acessado em abril 2021

Ffrench-Constant, RH (2007) Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, 23(1): 1-4

Freeman JC, Smith LB, Silva JJ, Fan Y, Sun H, Scott JG (2021) Fitness studies of insecticide resistant strains: lessons learned and future directions. **Pest Management Science**, DOI:10.1002/ps.6306

Fürstenberg-hägg, J Zagrobelny, M Bak, S (2013) Plant defense against insect herbivores. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242-10297

Garlet, CG, Moreira, RP, Gubiani, PDS, Palharini, RB, Farias, JR, Bernardi, O. (2021). Fitness cost of chlorpyrifos resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Environmental Entomology**

Gassmann, AJ, Carrière, Y, Tabashnik, BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, 54: 147-163

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M (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** 11:1-9

Hafeez M, Li XW, Zhang JM, Zhang ZJ, Huang J, Wang LK, Lu YB (2021) Role of digestive protease enzymes and related genes in host plant adaptation of a polyphagous pest, *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science**, 28(3), 611-626

- Hajek, AE, Gardescu S, Delalibera, I (2021) Summary of classical biological control introductions of entomopathogens and nematodes for insect control. **Biocontrol**, 66(2), 167-180
- He LM, Wu QL, Gao XW, Wu KM (2021) Population life tables for the invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* fed on major oil crops planted in China. **Journal of Integrative Agriculture**, 20(3): 745-754
- Hothorn, T, Bretz, F, Westfall, P, Heiberger, RM, Schuetzenmeister, A, Scheibe, S, Hothorn, MT (2016). Package ‘multcomp’. Simultaneous inference in general parametric models. **Project for Statistical Computing**, Vienna, Austria
- Hou, M, Sheng C (2000) Effects of different foods on growth, development and reproduction of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Entomologica Sinica**, 43(2): 168-175.
- Jia B, Liu Y, Zhu YC, Liu X, Gao C, Shen J (2009) Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, 65(9): 996-1002
- Kaiser IS, Kanno RH, Bolzan A, Amaral FS, Lira EC, Guidolin AS, Omoto, C (2021) Baseline response, monitoring, and cross-resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to sodium channel blocker insecticides in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 114(2): 903-913
- Kasten Jr P, Precetti AA, Parra JRP (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Brazilian Journal of Agriculture**, 53(1): 68-78
- Kliot A, Ghanim M (2012) Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest management science**, 68(11): 1431-1437
- Kumela, T, Simiyu, J, Sisay, B, Likhayo, P, Mendesil, E, Gohole, L, Tefera, T (2019). Farmers' knowledge, perceptions, and management practices of the new invasive pest, fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Ethiopia and Kenya. **International Journal of Pest Management**, 65(1): 1-9
- Lahm GP, Cordova D, Barry JD (2009) New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 17:4127-4133
- Larson JL, Redmond CT, Potter DA, (2014) Impacts of a neonicotinoid, neonicotinoid-pyrethroid premix, and anthranilic diamide insecticide on four species of turf-inhabiting beneficial insects. **Ecotoxicology**, 23(2): 252-259

- Li X, Li R, Zhu B, Gao X, Liang P, (2018) Overexpression of cytochrome P450 CYP6BG1 may contribute to clorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Pest management science**, 74(6): 1386-1393
- Li X, Zhu B, Gao X, Liang P (2017) Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in clorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Pest management science**, 73(7): 1402-1409
- Lira EC, Bolzan A, Nascimento AR, Amaral FS, Kanno RH, Kaiser IS, Omoto C (2020) Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest management science**, 76(8): 2674-2680
- Maia, AHN, Pazianotto, RA, Luiz, A. J. B., Marinho-Prado, JS, Pervez, A (2014). Inference on arthropod demographic parameters: computational advances using R. **Journal of Economic Entomology**, 107(1), 432-439
- Mallott M, Hamm S, Troczka BJ, Randall E, Pym A, Grant C, Baxter S, Vogel H, Shelton AM, Field LM, Williamson MS, Paine M, Zimmer CT, Slater R, Elias J, Bass C (2019) A flavin-dependent monooxygenase confers resistance to clorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 115: 103247
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, 26(2): 286-300
- Moral, RA, Hinde, J, & Demétrio, CG (2017) Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. **Journal of Statistical Software**, 81(1), 1-23
- Nascimento ARB, Fresia P, Cônsoli FL, Omoto C (2015) Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC genomics**, 16(1): 1-12.
- Niassy, S, Agbodzavu, MK, Kimathi, E, Mutune, B, Abdel-Rahman, EFM, Salifu, D, ... Subramanian, S. (2021). Bioecology of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), its management and potential patterns of seasonal spread in Africa. **PloS one**, 16(6), e0249042
- Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018). Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest management science**, 74(6): 1441-1448

- Peruca RD, Coelho RG, da Silva GG, Pistori H., Ravaglia LM, Roel AR, Alcantara GB (2018). Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development. **Arthropod-plant interactions**, 12(2): 257-266
- Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, De Oliveira MCN (2005). Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical ecology**, 31(7): 1509-1525
- Pogue MG (2002). "A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae)." **Amer Entomological Society**, 1-202.
- Raymond, B, Sayyed, AH, Wright, DJ (2007) Host plant and population determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Biology Letters**, 3(1): 83-86
- Raymond B, Wright DJ, Bonsall MB (2011) Effects of host plant and genetic background on the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Heredity**, 106(2), 281-288
- Razmjou J, Naseri B, Hemati SA (2014) Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. **Journal of Pest Science**, 87(1): 29-37
- Richardson EB, Troczka BJ, Gutbrod O, Davies TE, Nauen R (2020). Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. **Journal of Pest Science**, 93(3):911-928
- Rostás M (2007) The effects of 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one on two species of *Spodoptera* and the growth of *Setosphaeria turcica* in vitro. **Journal of Pest Science**, 80(1): 35-41.
- Shah RM, Shad SA (2020) House fly resistance to cloranthraniliprole: Cross resistance patterns, stability and associated fitness costs. **Pest management science**, 76(5): 1866-1873
- Silva DMD, Bueno ADF, Andrade K, Stecca CDS, Neves PMOJ, Oliveira MCND (2017) Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola**, 74: 18-31
- Silva, R, Clarke, AR (2020). The “sequential cues hypothesis”: a conceptual model to explain host location and ranking by polyphagous herbivores. **Insect science**, 27(6), 1136-1147
- Sisay, B, Simiyu, J, Malusi, P, Likhayo, P, Mendesil, E, Elibariki, N, ... Tefera, T (2018). First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), natural enemies from Africa. **Journal of Applied Entomology**, 142(8), 800-80
- Tambo, JA, Day, RK, Lamontagne-Godwin, J, Silvestri, S, Beseh, PK, Oppong-Mensah, B, ... & Matimelo, M (2020). Tackling fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) outbreak in

Africa: an analysis of farmers' control actions. **International Journal of Pest Management**, 66(4), 298-310

Tchouakui M, Miranda JR, Mugenzi LM, Djonabaye D, Wondji MJ, Tchoupo M, Tchappa W, Njiokou F, Wondji CS (2020) Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. **Heredity**, 124(5): 621-632.

Ti X, Zhang Q (2009) Advances in research of induced resistance to insects in cotton. **Frontiers of Biology in China**, 4(3): 289-297

Wang Z, Cong H (2021) Antagonistic pleiotropy can promote adaptation to patchy environments. **Evolution**, 75 (1): 197-199

Williams, JL, Ellers-Kirk, C, Orth, RG, Gassmann, AJ, Head, G, Tabashnik, BE, Carrière, Y. (2011). Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. **PLoS One**, 6(6), e21863

Wu, LH, Cao, Zh, OU, Long, GY, Yang, XB, Wei, ZY, Liao, YJ, ... Hu, CX (2021). Fitness of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* to three solanaceous vegetables. **Journal of Integrative Agriculture**, 20(3): 755-763

Zuo Y, Wang H, Xu Y, Huang J, Wu S, Wu Y, Yang Y (2017) CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, 89:79-85