

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
DIAMIDAS E ESPINOSINAS

Por

MATEUS RIBEIRO DE CAMPOS

(Sob a orientação do Prof. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

RESUMO

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é hoje uma praga mundialmente importante em cultivos de tomate, principalmente após sua introdução na Europa, Norte da África e Oriente Médio. As diamidas e espinosinas consistem às novas moléculas que foram introduzidas recentemente para o controle de *T. absoluta*. As populações de *T. absoluta* apresentaram variações razoáveis a clorantraniliprole, e responderam homogeneamente a ciantraniliprole e a flubendiamida, entretanto, às diamidas foram efetivas para *T. absoluta*. As respostas das populações a espinetoram foram homogêneas, mas para espinosade a respostas foram altas. Em função das altas variações de resposta das populações *T. absoluta* a espinosade, a população selecionada em laboratório por várias gerações, e, posteriormente, foi feita a caracterização e o estudo da herança genética, verificando-se também a existência de resistência cruzada e se o metabolismo estava envolvido na resistência a espinosade. Após a seleção da população de Iraquara-BA (IRQ) a resistência alcançou níveis extremos (RR = 329045,8 vezes). A atividade metabólica avaliada reduziu ao logo das gerações

em que população foi selecionada, indicando que o metabolismo não confere resistência de *T. absoluta* a espinosade. A caracterização desta resistência demonstrou que ela é autossômica, incompletamente recessiva e monofatorial. Além disso, foi estimada a concentração discriminatória de 5 mg i.a./L, que pode ser usada no monitoramento da resistência a espinosade. A população selecionada apresentou resistência cruzada com espinetoram, entretanto, não apresentou resistência cruzada com outras classes de inseticidas. Portanto, antes que o inseticida seja usado no controle de espécies-praga é necessária a realização da linha base de suscetibilidade. Dessa forma, se for detectada resistência a um inseticida, a caracterização e o estudo da herança genética devem ser realizados, gerando informações extremamente importantes para que o manejo da resistência a inseticida seja implementado de forma mais precisa.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-do-tomateiro, linha base de suscetibilidade, herança genética, resistência cruzada, metabolismo

RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO
DIAMIDES AND SPINOSYNS

by

MATEUS RIBEIRO DE CAMPOS

(Under the Direction of Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

ABSTRACT

The tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), is now a worldwide important pest in tomato crops mainly after their introduction in Europe, Africa and the Middle East. Spinosyns and diamides consist of new molecules which have been introduced recently to control *T. absoluta*. The populations of *T. absoluta* showed variation reasonable to chlorantraniliprole, and responded homogeneously to cyantraniliprole and flubendiamide, however, diamides were effective to populations of *T. absoluta*. The populations were homogeneous to spinetoram and showed high variation to spinosad. The high variation of response of populations of Iraquara–BA (IRQ–BA) *T. absoluta* was selected to spinosad in the laboratory for several generations, and posteriorly was made characterization and study of genetic inheritance, also verifying the existence of cross-resistance and metabolism was involved in resistance to spinosad. After selection of the Iraquara–BA population, the second most resistant population from the survey, resistance reached extreme levels (RR = 329,046 times). The reduced metabolic activity assessed over generations where the population was selected, indicating that the metabolism does not confer resistance in *T. absoluta* to spinosad. The

characterization of this resistance has shown that it is autosomal, incompletely recessive and monofactorial. Furthermore, discriminatory concentration was estimated in 5 mg a.i./L that may be used in monitoring of spinosad resistance. The population selected showed cross-resistance with spinetoram, however, showed not cross-resistant to other classes of insecticides. Therefore, before the insecticide is used to control pest species is necessary to conduct the baseline susceptibility thus be detected resistance to an insecticide, characterization and study of genetic inheritance should be performed, generating extremely important information for the management of insecticide resistance is implemented more accurately.

KEY WORDS: tomato pinworm, baseline susceptibility, resistance inheritance, cross-resistance, metabolism

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
DIAMIDAS E ESPINOSINAS

Por

MATEUS RIBEIRO DE CAMPOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE – PE

Julho – 2013

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
DIAMIDAS E ESPINOSINAS

Por

MATEUS RIBEIRO DE CAMPOS

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – DEPA/UFRPE

Raul Narciso Carvalho Guedes – DBA/UFV

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
DIAMIDAS E ESPINOSINAS

Por

MATEUS RIBEIRO DE CAMPOS

Orientador: _____

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Examinadores: _____

Raul Narciso Carvalho Guedes – UFV

Eugênio Eduardo de Oliveira – UFV

Jorge Braz Torres – UFRPE

Agná Rita dos Santos Rodrigues – UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo amor incondicional.

À minha esposa pelo carinho e ajuda.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Ciência sem Fronteiras (CsF), processo 202090/2012-4.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) pela oportunidade da realização deste curso.

À University of Nebraska-Lincoln (UNL) pela oportunidade de aprimoramento sobre o comportamento de insetos.

Ao meu Orientador Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pelo suporte e ajuda nos desenvolvimentos dos trabalhos.

Ao meu Co-Orientador, professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela confiança e os ensinamentos que levarei por toda vida.

Aos professores do PPGEA por promoverem nossa formação profissional, em especial a Jorge Braz Torres, José Vargas de Oliveira, Reginaldo Barros, Edmilson Jacinto Marques e Manoel G. C. Gondim Junior.

Ao professor Uemerson S. da Cunha e ao engenheiro agrônomo Celso Ogassawara pela ajuda na coleta do material em campo.

Aos professores Blair Siegfried, Terence A. Spencer, Marion D. Ellis e sua esposa Susan Larkins Ellis por toda ajuda e conhecimento passado durante o estágio na UNL.

À Dra. Agna R.S. Rodrigues pelo apoio e incentivo na realização dos trabalhos.

Ao Matheus Geraldo Pires de Mello Ribeiro, Adriano Pereira, Thais Barros Rodrigues, Arnúbio Valencia Jimenez, Camila F. de Oliveira, Karen da Silva, Thais Moreira Teixeira, Ana

Maria Vélez, Erin M. Ingram, Julianne Matczyszyn, Bruce Koehler, Jeri A. Cunningham e Marilyn A. Weidner pela amizade estabelecida.

À secretária da Fitossanidade, Darci, Romildo e Ariella, pela dedicação e presteza.

Aos amigos do PPGA: Felipe Colares, Solange, Robério, Eduardo, Itílio, Ézio, Martin, Mauricéia, Mariana, Nicole, Alice Maria, Flávia, Mario Jorge, Karla Fernanda, Jennifer, Ana Paula, Cecília, Carla, José Wagner, Debora, Vaneska, Douglas, Aline, Sérgio, Roberta Leme.

Ao amigos do LIIT: Wellington M. Silva, Tadeu B. Martins, Jefferson E. Silva, Andresa Cristina Oliveira, Lilian M.S. Ribeiro, Paolo Augustus, Jaconias Escócio Lima Neto, Diogo Couto Galindo, Dr. Alberto Belo Esteves Filho, Vitória F. da Silva, Marcelo Amaral, Flávia Araújo, Rebeka Alves, Liliane Marques da Silva, Kamila Mello Freitas, Barbara Gondim.

Às minhas irmãs Hellen e Elizabeth, e meu cunhado Juliano; à minha sogra Rachel, ao meu ao sogro Sr. Lobato, meu cunhado Lucas e sua esposa Emiliane pela confiança depositada; Aos meus sobrinhos Maria Isabel, Miguel e João Lucas pelo inigualável amor e alegria que sempre me proporcionaram.

A toda minha família, primos, tios e avós Luzia e Dorvina.

À minha esposa Laura Maria de Mello Azevedo pela ajuda e dedicação.

E, principalmente, aos meus pais Benedito Ribeiro de Campos e Celia Ribeiro de Campos que sempre acreditaram que o estudo é a maior herança que poderiam deixar aos seus filhos, algo que pode ser desfrutado por toda à vida.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
1. A importância do tomate.....	01
2. Bioecologia da traça-do-tomateiro	02
2.1. Hospedeiros.....	03
3. Manejo integrado de <i>Tuta absoluta</i>	04
4. Riscos reduzidos.	06
5. Inseticidas.....	07
5.1. Diamidas: clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida	07
5.2. Espinosinas: espinosade e espinetoram.	08
6. Resistência de pragas a inseticidas	09
6.1. Esterase	10
6.2. Glutathione-S-transferase.....	11
6.3. Monooxigenases dependentes do citocromo P450.....	11
6.4. Alterações de sítios alvos	12

6.4.1. Receptores da rianodina	12
6.4.2. Receptores nicotínicos da acetilcolina (nRACHs)	13
6.5. Resistência cruzada.....	15
7. Genética da resistência.....	16
7.1. Dominância da resistência.....	16
7.2. Número de genes	17
8. Concentração diagnóstica	19
9. Monitoramento da resistência	20
10. Resistência de <i>Tuta absoluta</i> a inseticidas e programa de MRI.....	21
11. Objetivos	22
LITERATURA CITADA	23
2 SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>Tuta absoluta</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A MODULADORES DE RECEPTORES DE RIANODINA	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO	44
AGRADECIMENTOS	48
LITERATURA CITADA	48

3	RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>T. absoluta</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A ESPINOSINAS.....	59
	RESUMO.....	60
	ABSTRACT.....	61
	INTRODUÇÃO.....	62
	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
	RESULTADOS.....	67
	DISCUSSÃO.....	69
	AGRADECIMENTOS.....	73
	LITERATURA CITADA.....	73
4	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A ESPINOSADE E RESISTÊNCIA CRUZADA.....	84
	RESUMO.....	85
	ABSTRACT.....	86
	INTRODUÇÃO.....	87
	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
	RESULTADOS.....	96
	DISCUSSÃO.....	99
	AGRADECIMENTOS.....	104
	LITERATURA CITADA.....	104

CAPÍTULO 1

Introdução

1. A importância do tomate

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum* (Mill), é uma cultura de grande importância econômica e social em quase todo o mundo. Essa hortaliça ocupa o segundo lugar entre as mais produzidas no mundo (FAOSTAT 2011). O consumo *per capita* mundial de tomate passou de 14 Kg para 19 Kg (FAOSTAT 2011). O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno. Possui, ainda, beta-caroteno, vitamina E, compostos fenólicos, *lignans* (precursores de fito-hormônios) e folatos (inibidores do acúmulo de homocisteína no sangue). A ingestão regular de tomate pode ainda diminuir os riscos de câncer no estômago, pulmão e nas vias respiratórias (FAO 2007). O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking em produtividade de tomate com 62 t/ha, atrás apenas dos Estados Unidos, com 85 t/ha, e da Espanha, com 77 t/ha. Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 4,42 milhões de toneladas de tomate, distribuídas numa área de 64,9 mil hectares (FAOSTAT 2011, IBGE 2012). O setor é responsável por mais de 250 mil empregos em todo o país. Mais de 70% da produção de tomate no Brasil é produzido nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. O Sudeste é responsável por 35% da produção brasileira e o Estado de São Paulo é o maior produtor, com 46% da produção de tomate. No Centro-Oeste, o Estado de Goiás é o maior produtor, com produção de 1,4 milhões de toneladas de tomate, o que equivale a 35 % da produção nacional. A produtividade média do Estado de Goiás está acima da média nacional, com 79 t/ha, produtividade semelhante aos grandes produtores mundiais. Já os 30% restantes da produção de tomate no Brasil estão entre as

regiões Nordeste e. Em 2009, o Estado de Pernambuco, que era o maior produtor de tomate da região Nordeste, passou em 2012 a ser o terceiro maior produtor de tomate, com 14% (FAOSTAT 2011, IBGE 2012).

2. Bioecologia da traça-do-tomateiro

As pragas estão um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de tomate (Souza & Reis 2003). A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), na década de 90 foi uma das principais pragas do tomateiro no Brasil (Picanço *et al.* 1998). A *T. absoluta* é nativa da América do Sul, centro de origem do tomateiro, que compreende o território limitado pelo Equador, Cordilheira dos Andes, Norte do Chile e litoral do oceano Pacífico, incluindo o arquipélago das Ilhas Galápagos. A traça-do-tomateiro foi originalmente descrita em 1917 em Huancayo, Peru, por Meyrick, como *Phthorimaea absoluta*. Entretanto, passou por enquadramentos taxômicos para *Gnorimoschema absoluta* (Clark 1962). Em 1964 foi registrada como *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny) e, finalmente, em 1994, por Povolny, passou a ser descrita como *Tuta absoluta*, sob o gênero (Desneux *et al.* 2010). A *T. absoluta* era restrita à América do Sul, contudo, no final de 2006 foi confirmada a presença da traça-do-tomateiro no norte da província de Castellón de La Plana, Espanha Oriental (Urbaneja *et al.* 2007). Desde então, espalhou-se por vários locais da bacia do Mediterrâneo, causando sérios prejuízos à cultura do tomateiro (Urbaneja *et al.* 2009). Em 2009, a presença de *T. absoluta* foi confirmada na Itália, França, Malta, Reino Unido, Grécia, Suíça, Portugal, Marrocos, Argélia, Tunísia, Líbia e Albânia (EPPO 2009).

A traça-do-tomateiro foi constatada no sul do Brasil no início da década de 80 (Morais & Normanha Filho 1982). Nos anos seguintes, a *T. absoluta* se espalhou para todas as principais

regiões produtoras de tomate, comprometendo seriamente a produtividade devido à sua alta capacidade destrutiva (Coelho & Franca 1987), causando sérios danos à tomaticultura, que variam entre 40 e 100% (Giustolin *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2009). As lagartas desse inseto diminuem a produtividade do tomateiro devido à redução da área fotossintética ao consumir o mesófilo foliar (Coelho & Franca 1987, Borgoni *et al.* 2003), por afetar o crescimento vertical ao se alimentar dos ponteiros e por broquear os botões florais, flores e, principalmente, os frutos (Coelho & Franca 1987, Picanço *et al.* 1997).

O ciclo de vida da *T. absoluta*, da postura até a emergência do adulto, pode variar de acordo com a temperatura, chegando à média de 30 dias (Barrientos *et al.* 1998). Desse modo, ocorrem numerosas gerações em regiões de clima tropical, havendo sobreposição nas fases da *T. absoluta*. A deposição dos ovos ocorre em pequenos grupos colocados na face inferior das folhas ou caule, e em menor proporção, nos frutos de tomate; sendo que, preferencialmente, a postura é feita nas folhas do terço apical e mediano do tomateiro. Os ovos são pequenos (0,36 mm de largura por 0,22 mm de comprimento), cilíndricos, e inicialmente apresentam coloração branco-brilhante ou amarelo-claro, evoluindo para marrom ou avermelhado no período próximo à eclosão (EPPO 2006). Na fase larval a *T. absoluta* passa por quatro instares, diferenciados em função do comprimento do corpo e da largura da cápsula cefálica, que variam no primeiro instar de 0,4 – 0,6 mm a 0,16 – 0,18; no segundo instar de 0,6 – 6,0 mm a 0,22 – 0,28 mm; o terceiro instar de 6,0 – 7,0 mm a 0,34 – 0,40 mm e o quarto instar 7,8 – 8,0 mm a 0,52 – 0,60 mm. A lagarta quando atinge o quarto instar pode abandonar os tecidos internos das folhas e migrar para outro órgão da planta de tomate (Coelho & Franca 1987, Imenes *et al.* 1990).

2.1 Hospedeiros

Apesar da *T. absoluta* atacar preferencialmente o tomateiro, esta praga também se alimenta, desenvolve e reproduz em outras solanáceas. A família Solanaceae contém mais de 1.400 espécies. Além do tomate, são espécies de importância econômica a batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*Solanum melogena* L.), pimentão (*S. muricatum* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Torres *et al.* 2001, Prastissoli *et al.* 2003, Desneux *et al.* 2010). A *T. absoluta* pode ocorrer também em solanáceas não cultivadas (*S. nigrum* L., *S. eleagnifolium* L., *S. bonariense* L., *S. sisymbriifolium* Lam., *S. saponaceum*, *Lycopersicum puberulum* Ph. *S. lyratum* Thunberg, *S. puberulum* Nutt.); e ainda, ser encontrada em espécies selvagens como: *Datura stramonium* L., *Datura ferox* L., *Lycium chilense* (Coralillo), *Lycopersicum hirsutum* L., *Nicotiana glauca* (Graham) (EPPO 2007). Em batata, a *T. absoluta* ataca somente a parte aérea, não afetando, desse modo, o tubérculo. Contudo, sob condições climáticas adequadas, as injúrias causadas às folhas pela *T. absoluta* podem reduzir o desenvolvimento da planta de batata (Pereyra & Sánchez 2006). Desde que chegou na Europa foi observada a presença de *T. absoluta* em plantas hospedeiras. Isto indica que a *T. absoluta* apresenta alta propensão para o uso de várias plantas secundárias, principalmente em solanáceas (Desneux *et al.* 2010). Dessa forma, na área de plantio de tomate são necessários cuidados com as plantas não desejáveis, que podem exercer influência no crescimento e desenvolvimento da planta de tomate, mas também é importante observar as potenciais plantas hospedeiras, que podem assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento da *T. absoluta* no campo.

3. Manejo Integrado de *Tuta absoluta*

O conhecimento da bioecologia e a correta identificação da espécie-praga são importantes para o adequado manejo integrado de pragas. Isto porque, as táticas de manejo devem ser implementadas com o objetivo da redução do ataque da praga na cultura (Salgado & Saar 2004). Para tanto, tais táticas de manejo podem ser realizadas através do controle cultural, biológico e químico (de Castro *et al.* 2013).

No controle cultural da *T. absoluta*, dentro do manejo integrado, uma das principais táticas é a destruição de restos culturais. Frequentemente é recomendada a remoção de plantas e dos frutos na área de plantio de tomate, contudo, estas recomendações nem sempre são realizadas ou são feitas de maneira incorreta. O ataque da traça-do-tomateiro não se limita aos frutos, portanto, a destruição de toda planta de tomate, após o término do cultivo, é necessária e extremamente importante. Outras táticas recomendadas são o uso de variedades resistentes de tomate e o controle de plantas daninhas que são hospedeiras da *T. absoluta* (Desneux *et al.* 2010, Guedes & Picanço 2012, de Castro *et al.* 2013).

Diversos inimigos naturais foram descritos para o uso no controle biológico de *T. absoluta*, a maioria parasitóides, que com sucesso vêm sendo usados no controle de *T. absoluta* em casas de vegetação na Europa. Todavia, no Brasil, a utilização do controle biológico em campo aberto não tem sido eficiente (Prastissoli *et al.* 2003, Urbaneja *et al.* 2012).

Por sua vez, o controle químico, tática de manejo mais promissora, pode ser feito atualmente com 92 inseticidas registrados para o controle de *T. absoluta* no Brasil (MAPA 2013). Os inseticidas químicos são os métodos mais rápidos e eficientes para promover a redução das populações de pragas. Entretanto, os riscos não devem ser ignorados e esforços devem ser realizados para reduzi-los utilizando-se testes experimentais, mais precisos, leis

rigorosas e, principalmente, o treinamento adequado para o manejo dos inseticidas. Portanto, os inseticidas devem ser utilizados de forma racional e cuidadosa, em conjunto com outras tecnologias no sistema de manejo integrado de pragas. Os benefícios são particularmente importantes nos países em desenvolvimento, onde as pragas causam prejuízo em bilhões de dólares na renda nacional (FAO 2004).

4. Riscos reduzidos

A integração de inseticidas seletivos em programas de manejo de pragas é fundamental para o sucesso da produção de tomate. No entanto, o desenvolvimento de resistência a inseticidas é uma ameaça contínua, até mesmo com a introdução de novos inseticidas. A avaliação do risco de resistência em pragas como a *T. absoluta* antes de ocorrer falha de controle no campo pode fornecer informações valiosas e que podem servir de suporte para a implementação do manejo da resistência a inseticida. Portanto, devem ser adotadas estratégias para retardar o desenvolvimento da resistência a inseticidas (Sial & Brunner 2010).

Diversos países têm procurado reduzir os riscos ambientais associados a inseticidas mais antigos, que serão provavelmente substituídos por inseticidas de risco reduzido (AAFC 2003). Dessa forma, os inseticidas que são utilizados no controle de *T. absoluta* e que apresentam certos níveis de resistência, como: fosforados, abamectina, cartape e piretróides (Siqueira *et al.* 2000b, Siqueira *et al.* 2000a, Siqueira *et al.* 2001, Lietti *et al.* 2005), poderão ser substituídos por inseticidas de riscos reduzidos, como, por exemplo: as diamidas antranílicas (cloraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida) e as espinosinas (espinetoram e espinosade).

5. Inseticidas

5.1. Diamidas: clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida

As diamidas antranílicas e ftálicas compreendem um grupo de inseticidas que tem sido recentemente comercializado. A diamida do ácido ftálico, flubendiamida, e as antranílicas, clorantraniliprole e ciantraniliprole, foram as primeiras diamidas comercializadas. Este grupo é derivado de alcalóides isolados da planta *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae), encontrada na América do Sul e no Caribe (Sattelle *et al.* 2008). Os inseticidas do grupo das diamidas antranílicas ativam os receptores da rianodina. Estes receptores são encontrados no retículo sarcoplasmático, nos músculos, no retículo endoplasmático e em neurônios, entre outros tipos de células que servem de suporte molecular para proteínas. Dessa forma, as diamidas regulam as funções dos canais de íons e fazem a interação entre as células. Os inseticidas clorantraniliprole e a flubendiamida alteram os receptores de rianodina desregulando a liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático de células musculares (Lahm *et al.* 2009). Conseqüentemente, reduzem a contração muscular e causam a letargia, de forma que o inseto passa a se alimentar menos e finalmente chega à paralisia muscular e à morte (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2009). O clorantraniliprole e a flubendiamida apresentaram alta toxicidade para os epidópteros, incluindo *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (da Silva *et al.* 2012) *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera Noctuidae) (Lai & Su 2011), *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Tohnishi *et al.* 2005) e *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lahm *et al.* 2007). A partir desta nova classe de inseticida, a nova diamida, ciantraniliprole, está já em processo de registro para ser utilizado no controle de *T. absoluta* (Clark *et al.* 2008, Sattelle *et al.* 2008, Lahm *et al.* 2009).

Embora os mamíferos e os insetos tenham receptores de rianodina, existe significativa diferença entre a sequência da codificação de proteínas de insetos e mamíferos, tornando as diamidas seletivas. Dessa forma, os receptores de rianodina são alvo de maior estudo para encontrar moléculas de inseticidas com baixa toxicidade a mamíferos e a inimigos naturais (Sattelle *et al.* 2008). Os inimigos naturais estão sob risco de exposição aos inseticidas durante o forrageamento. Devido à baixa toxicidade das diamidas antranílicas a mamíferos, aves e peixes, estas não apresentam potencial risco a organismos não-alvo, como observado em diversos trabalhos (Lahm *et al.* 2007, Gradish *et al.* 2010, Campos *et al.* 2011).

5.2. Espinosinas: espinosade e espinetoram

A família das espinosinas compreende inseticidas que foram derivados a partir de fermentações do actinomiceto de solo *Sacharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao 1990) com potente atividade inseticida e reduzido impacto ambiental (Kirst 2010). As espinosinas atuam nos receptores nicotínicos da acetilcolina, cujos exemplos são o espinosade e o espinetoram. O espinosade tem rápida atividade por contato e ingestão, o que é raro em produtos de origem natural. O modo de ação do espinosade é caracterizado pela excitação do sistema nervoso dos insetos, levando às contrações musculares involuntárias, prostração com tremores e paralisia (Sparks *et al.* 2012). Estes efeitos são consistentes com a ativação de receptores nicotínicos da acetilcolina, o que provoca mudança na conformação do receptor, e, portanto, causam a abertura dos canais iônicos e a condução do estímulo nervoso (Salgado *et al.* 1998, Thompson *et al.* 2000, Cisneros *et al.* 2002). As espinosinas e os neonicotinóides atuam sobre os mesmos receptores nicotínicos da acetilcolina (Sparks *et al.* 2012). Apesar do conhecimento da base genética da

resistência, nenhum caso de resistência cruzada foi observado entre espinosinas e neonecotinoides (Thompson *et al.* 2000).

O espinetoram foi lançado no final de 2007, mas ainda está em processo de registro para o controle de *T. absoluta* no tomateiro no Brasil. O espinetoram apresenta perfil toxicológico e ambiental semelhante aos do espinosade. A atividade residual de espinetoram foi de 4 a 6 vezes superior ao espinosade em lagartas de Lepidópteras (Sparks *et al.* 2008). Em abelhas da espécie *Bombus terrestris* (Linnaeus) (Hymenoptera: Apidae) o espinetoram foi menos tóxico que o espinosade (Besard *et al.* 2011).

As perspectivas da ação de espinosade e espinetoram combinados com a baixa toxicidade em organismo não-alvos e mamíferos fazem desta classe de inseticida promissora para utilização no programa de manejo integrado de pragas (MIP) e no manejo da resistência a inseticidas (MRI).

6. Resistência de pragas a inseticidas

A resistência é definida como a habilidade de uma população sobreviver a algum tóxico que seria letal à maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie (WHO 1957). O processo que determina o desenvolvimento da resistência é a pressão contínua na utilização do mesmo inseticida sucessivamente. Portanto, a aplicação constante do mesmo produto químico aumenta a frequência relativa de alguns indivíduos "pré-adaptados" presentes na população de praga. Com o uso contínuo de um mesmo produto, a frequência de resistência poderá alcançar níveis em que a eficácia deste é comprometida. A resistência pode ocorrer por mutação aleatória ou em resposta a um agente mutagênico. Estes dois processos podem

selecionar indivíduos que têm o gene de resistência. Desse modo, a característica genética pode ser passada de geração em geração (Price 1991, McKenzie & Batterham 1998).

Para reduzir as perdas causadas por *T. absoluta*, os produtores de tomate normalmente chegam a fazer três ou mais aplicações semanais, atingindo um uso inadequado e intenso de pulverizações por cultivo (Guedes & Picanço 2012). Os dois principais motivos para a redução da eficiência do inseticida são a tecnologia de aplicação utilizada (França & Castelo Branco 1992) e o desenvolvimento de populações resistentes a inseticidas (Siqueira *et al.* 2000b). O objetivo de proteger os cultivos do ataque de espécies-praga impõe forte seleção a compostos químicos, o que pode resultar no desenvolvimento do fenômeno da resistência a inseticidas (Brattsten *et al.* 1986). Dentre os diversos mecanismos que caracterizam a resistência a inseticidas podem ser citados, por exemplo: (i) aumento na destoxificação metabólica resultante dos níveis elevados de esterase, glutathione-S-transferase ou monooxigenase dependente do citocromo P450 (ii) redução da sensibilidade do sítio de ação e a (iii) baixa eficiência do inseticida (Feyereisen 1999). Um ou mais mecanismos podem atuar em conjunto, o que, por sua vez, pode conferir altos níveis de resistência para diversas classes de inseticidas disponíveis (Hemingway *et al.* 2004). Por exemplo, o DDT e a permetrina, entre outros inseticidas, podem influenciar na mudança comportamental dos insetos (Lines *et al.* 1987, Mbogo *et al.* 1996, Mathenge *et al.* 2001).

6.1. Esterase

As populações selecionadas a inseticidas como, por exemplo, organofosforados e carbamatos, podem apresentar como resposta evolutiva aumento em excesso na produção de esterase, como relatada para mosquitos, pulgões e baratas. As esterases em insetos suscetíveis

são significativamente menos ativas, em xenobióticos (incluindo inseticidas) do que em insetos resistentes (Karunaratne *et al.* 1995). Há relatos do aumento da atividade de esterase com o aumento da resistência a inseticidas (Brogdon & Barber 1990, Vulule *et al.* 1999). Entretanto, ainda não existem estudos das atividades de esterase em populações de *T. absoluta*.

6.2. Glutathione-S-transferase (GST)

A glutathione-S-transferase (GST) tem a função central na destoxificação e no desenvolvimento da resistência a inseticida, mas as funções adicionais são atribuídas ao complexo enzimático da família GST (Ranson & Hemingway 2004). A função primária do GST é geralmente a destoxificação de compostos endógenos e xenobióticos, diretamente ou catalisando o metabolismo secundário de uma vasta gama de compostos oxidativos pela família do citocromo P450.

Resistência devido ao aumento da atividade de GST foi identificada primeiro em organofosforado e resultou na resistência a estes em diversas espécies (Hayes & Wolf 1988). Atividades das GSTs, como, por exemplo, em *P. xylostella* e *M. Domestica*, foram observadas atuando na metabolização de organofosforado (Huang *et al.* 1998, Kristensen 2005).

6.3 Monooxigenases dependentes do citocromo P450

Monooxigenases dependentes do citocromo P450 são enzimas importantes e diversificadas que estão envolvidas no metabolismo de numerosos compostos endógenos e exógenos. Os aumentos da atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450, que são medidos espectrofotometricamente, em grande maioria estão ligados ao desenvolvimento de resistência. As correlações entre a razão de resistência e a atividade das monooxigenases dependentes do

citocromo P450 podem dar algum indicativo de que a resistência pode ser conferida pelo aumento da atividade de citocromo P450 (Feyereisen 1999). Em trabalhos realizados com piretróides e organofosforados, a resistência foi mediada pelo aumento da atividade de monooxigenase dependente do citocromo P450 (Bergé *et al.* 1998, Scott 1999).

6.4 Alterações de sítios alvos

6.4.1 Receptores da rianodina

Os metabólitos da rianodina e 9,21-dehidrorianodina são derivados do extrato de *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae), que atua nos receptores de rianodina (rRi), modificando os canais de Ca^{2+} (fig.1). Nos ensaios em que foi usado o $[\text{}^3\text{H}]$ rianodina, este apresentou ligações evidente com os receptores de rianodina de mamíferos e insetos. Entretanto, os produtos da hidrólise de rianodol e 9,21 didehidorianodol foram encontrados em baixa toxicidade para mamíferos e ainda potente para insetos. Estudos posteriores com o produtos da hidrólise foram encontrados fracos deslocadores de $[\text{}^3\text{H}]$ rianodina nos músculos de mamíferos e a ainda potentes para insetos (Jefferies *et al.* 1997). Diante disso, a possível diferença nos sítios alvo de mamíferos e insetos confere à seletividade a diamidas (Waterhouse *et al.* 1987). Outro fato importante com relação à seletividade das diamidas em insetos e mamíferos é que, nos insetos, determinadas sequências de aminoácidos são similares em insetos, em contrapartida quando estes aminoácidos são comparados com a dos mamíferos as sequências são estritamente diferente (Sattelle *et al.* 2008). As diamidas (flubendiamida, clorantraniliprole e ciantraniliprole) ligam-se aos rRi que descontrolam a liberação de Ca^{2+} (Fig. 1) (Ebbinghaus-Kintscher *et al.* 2006, Sattelle *et al.* 2008, Casida & Durkin 2013).

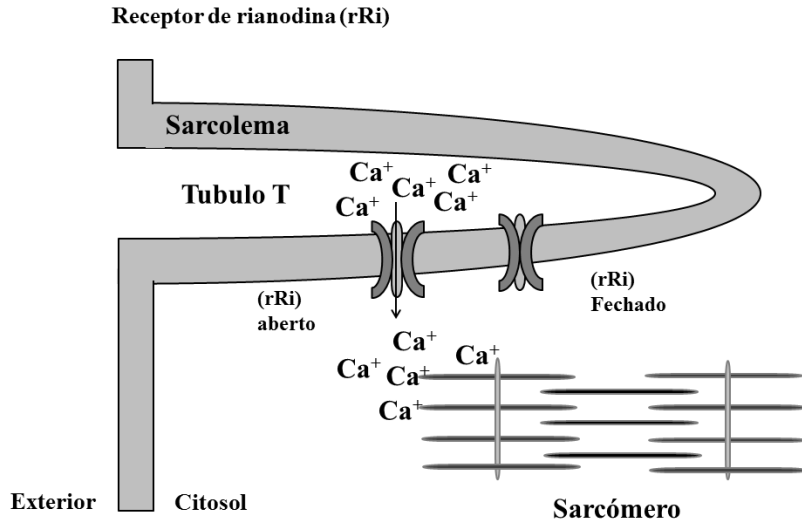


Figura 1. Esquema simplificado dos receptores de rianodina (rRi), que são moduladores de Ca⁺ para o sistema muscular (Casida & Durkin 2013).

6.4.2. Receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs)

Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) desempenham uma série de funções fisiológicas essenciais em animais vertebrados e insetos, incluindo a mediação bem caracterizada pela rápida neurotransmissão excitatória nas sinapses colinérgicas (Dale 1914). Os receptores nicotínicos da acetilcolina são ativados por ligantes evolutivamente relacionados e estruturalmente semelhantes, que também incluem receptores de glicina e os receptores 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5HT3) (Gao *et al.* 2007).

Os nAChRs sofrem alterações conformacionais, conduzindo à abertura do canal e ocorrendo o influxo extracelular de sódio (Na⁺) (Fig. 2). Os alvos das espinosinas são primariamente os nAChRs (Salgado & Sparks 2005), mas elas também podem interagir com receptores do GABA (Salgado *et al.* 1998). Em 12 estudos, Avaliou-se a resistência a espinosade, 67% foram atribuídos à alteração no nAChR, 25% estão associados à resistência

metabólica e 8% estão associados a mecanismos de múltiplos genes. Portanto, o mecanismo mais comum de resistência para espinosinas é a redução da sensibilidade do sítio de ação (Sparks *et al.* 2012).

A mutação que confere resistência às espinosinas pode ocorrer em diferentes subtipos dos nAChRs. A região cromossômica em que ocorre a mutação que confere resistência a espinosina engloba 29 genes. Desse modo, portanto, pode ser explicada a provável inexistência de resistência cruzada entre espinosinas e outras classes de inseticidas (Salgado & Saar 2004, Guillén & Bielza 2013).

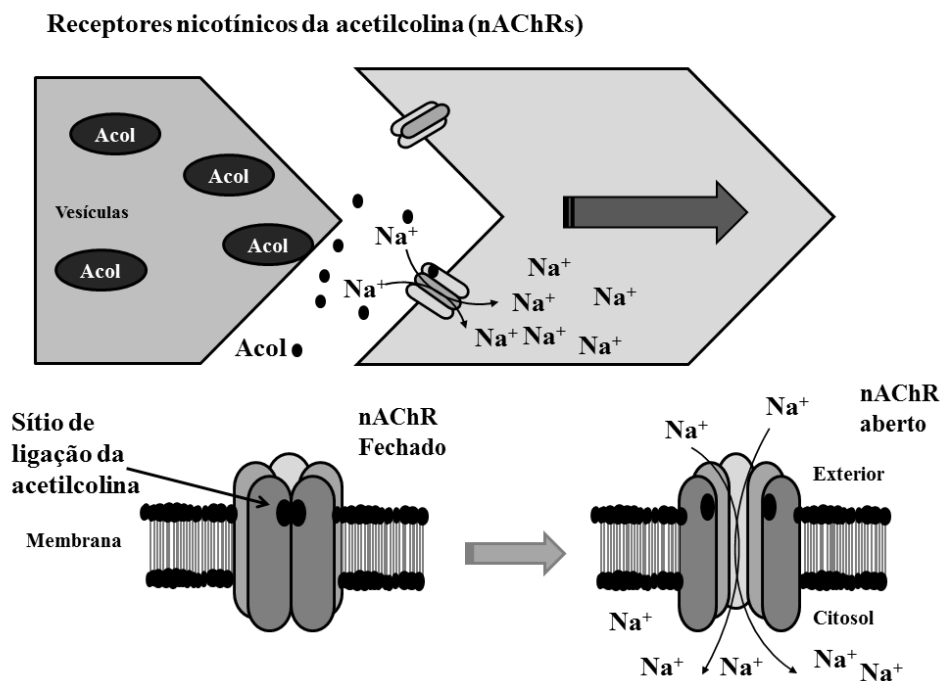


Figura 2. Esquema simplificado da transmissão de impulso nervoso após a abertura dos canais dos receptores nicotínicos da acetilcolina. Quando a acetilcolina (Acol) se liga ao sítio de ação nos nAChR, os canais são abertos (Casida & Durkin 2013).

6.5. Resistência cruzada

Espécies-praga podem apresentar resistência a dois ou mais compostos tóxicos mediante o surgimento de resistência cruzada ou resistência múltipla (Berticat *et al.* 2008). A resistência múltipla envolve a coexistência de dois ou mais mecanismos de ação, conferindo resistência a dois ou mais compostos tóxicos. Já quanto à resistência cruzada, um único mecanismo de ação confere resistência a um ou mais inseticidas, como ocorre, por exemplo, com as mutações genéticas no canais de sódio em DDT e piretróide (Soderlund & Knipple 2003). Embora populações resistentes a espinosade apresentem resistência cruzada com outra espinosina, normalmente estas populações resistentes não apresentam resistência cruzada com outras classes de inseticidas. A população de *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) resistente a espinosade e espinetoram, por exemplo, não apresentou resistência cruzada a neonicotinóides, avermectinas, permetrina, oxadiazinas (Watson *et al.* 2010). Do mesmo modo, para *M. domestica* não foi observado resistência cruzada a organofosforado, carbamato, piretróide, avermectina, oxadiazina e fiproles (Shono & Scott 2003, Sparks *et al.* 2012). Desde que foram descobertas, as espinosinas não têm demonstrado resistência cruzada em uma variedade de classes de inseticidas que atuam nos receptores nicotínicos da acetilcolina e em outros inseticidas com modos de ação diferente (Salgado & Sparks 2005, Guillén & Bielza 2013).

A resistência cruzada é um problema em potencial que pode limitar o tempo de uso de um novo inseticida (Wen & Scott 1997). O conhecimento dos padrões de resistência cruzada permite o desenvolvimento do programa de manejo da resistência para prevenir ou minimizar a evolução da resistência. Estudos da resistência cruzada também podem fornecer informações úteis para ajudar a identificar mecanismos de resistência (Scott 1989, Sayyed & Wright 2006).

7. Genética da Resistência

7.1. Dominância da resistência

Dominância é uma medida da posição relativa do fenótipo heterozigoto (RS) em relação ao fenótipo resistente (RR) e suscetível (SS) (Roush & McKenzie 1987, Bourguet *et al.* 2000). Resistência a inseticida parece ser um bom modelo para a investigação de relações de dominância (Bourguet *et al.* 1996), porque a maioria dos genes e mutações responsáveis pela resistência foi identificada, e os processos fisiológicos em que estão envolvidos são conhecidos (McKenzie & Batterham 1998). O grau de dominância pode variar de completa recessividade a completa dominância (Bourguet & Raymond 1998). Alguns fatores afetam a dominância da resistência, como a concentração aplicada no campo, o estágio de vida do inseto e a existência de indivíduos que são mais suscetíveis que resistentes. Dessa forma, a dominância da resistência não é um parâmetro fixo, podendo variar em função do ambiente e do conhecimento genético (Roush & McKenzie 1987, Bourguet *et al.* 2000).

O grau de dominância (D) da resistência pode ser estimado usando o método de Stone (1968), como segue abaixo:

$$D = \frac{(2L_2 - L_1 - L_3)}{(L_1 - L_3)}$$

Onde, L_1 , L_2 e L_3 são os valores dos logaritmos das CL_{50s} dos parentais resistente e suscetível, e da progênie do cruzamento recíproco, respectivamente. O valor da dominância pode variar de $-1 < D < +1$, se for -1 a resistência é completamente recessiva, e se for $+1$ a resistência é completamente dominante (Stone 1968). O erro padrão da dominância pode ser estimado pela raiz quadrada da variância da dominância (σ_D^2), de acordo com a fórmula:

$$\sigma_D^2 = \frac{4}{(L_1 - L_3)} \cdot \left\{ \sigma_{x2}^2 \frac{(L_2 - L_3)^2}{(L_1 - L_3)^2} \sigma_{x1}^2 \frac{(L_2 - L_1)^2}{(L_1 - L_3)^2} \sigma_{x3}^2 \right\}$$

Onde, $\sigma_{x_1}^2$, σ_x^2 e $\sigma_{x_3}^2$ são as variâncias das inclinações das retas dos parentais resistente e suscetível, e da progênie do cruzamento recíproco, respectivamente.

A dominância em função da concentração (h) pode também ser calculada a partir da fórmula descrita por Hartl (1992):

$$h = \frac{W_{TRS} - W_{TSS}}{W_{TRR} - W_{TSS}}$$

Onde, W_{TRS} , W_{TSS} e W_{TRR} correspondem ao desempenho calculado para indivíduos homozigotos dominantes, heterozigotos e homozigotos recessivos, respectivamente. Para os indivíduos homozigotos dominantes, o desempenho foi definido como 1. O desempenho para heterozigotos e homozigotos recessivos foi obtido na relação entre os adultos que sobreviveram do F₁ agrupado e da população suscetível e a sobrevivência observada dos adultos da população resistente. Os valores de h variam entre 0 (recessividade completa) e 1 (dominância completa). Se h corresponde a 0,5 (co-dominante ou aditivo) ou está entre $0 < h < 0,5$ (recessividade incompleta) ou entre $0,5 < h < 1$ (dominância incompleta) (Liu & Tabashnik 1997).

7.2. Número de genes

O método para determinar o número mínimo de genes que influência a resistência é baseado na relação das variações fenotípicas entre os parentais e as populações híbridas. O método de Lande (1981) é uma extensão do método de Wright (1968), que pode ser usado no cruzamento de populações selvagens e parentais heterozigotos. No método desenvolvido por Lande (1981), reconhece-se que toda variância genética é aditiva, qualquer número e frequência de alelos são permitidos para cada *locus* dentro das populações parentais, e as duas populações parentais têm sequências de genes homólogos. Todos cruzamentos ocorrem por acasalamento individual pela escolha aleatória e apropriada dos indivíduos da população. Desse modo, os *locus*

são diferentes e combinam aleatoriamente a cada população parental. Conseqüentemente, o número efetivo de genes estimados não podem exceder o número de segmentos cromossômicos que segregam independentemente nas gerações (Lande 1981). O teste direto também pode ser utilizado para estimar o número mínimo de genes que tem influência na resistência. O teste direto avalia a mortalidade observada e esperada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) do retrocruzamento, podendo, dessa forma, verificar a resistência se é monogênica ou poligênica (Tabashnik 1991).

No teste direto é observado se as concentrações-mortalidade ajustam-se ao modelo monofatorial. Se a resistência é monogênica, o retrocruzamento do F₁ agrupado com a população resistente vai produzir 50% RR e 50% RS. Para o teste de hipótese, a mortalidade esperada pode ser calculada como a mortalidade da concentração $x = 0,5$ (a mortalidade da F₁ agrupada + a mortalidade da população suscetível na concentração x), respectivamente (Tabashnik *et al.* 1990). O valor do qui-quadrado (χ^2) pode ser calculado a partir das mortalidades observadas no retrocruzamento e das mortalidades esperadas segundo a fórmula descrita por Sokal & Rohlf (Sokal & Rohlf 2012).

$$\chi^2 = \frac{F1 - pn}{pqn}$$

Onde, F1 corresponde ao número de mortos da progênie do retrocruzamento na concentração x ; p corresponde à mortalidade esperada; n corresponde ao número total de indivíduos da progênie retrocruzada; e $q = 1 - p$. Desta forma, a hipótese de herança monogênica é rejeitada ($P > 0,05$) se o valor de qui-quadrado (χ^2) calculado para cada concentração é maior que o tabelado, considerando um grau de liberdade.

O número mínimo de genes efetivos pode ser calculado, utilizando-se o método de Lande (1981) através da fórmula:

$$n_E = \frac{(L_{p2} - L_{p1})^2}{8\sigma_s^2}$$

Onde, L_{p2} e L_{p1} são os logaritmos dos valores da CL_{50} das populações resistente e suscetível. A variância (σ_s^2) é estimada pela fórmula:

$$\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - \left[\sigma_{F1}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{P1}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{P2}^2 \right]$$

Onde, σ_{B1}^2 , σ_{B2}^2 , σ_{P1}^2 e σ_{P2}^2 são as variâncias fenotípicas dos retrocruzamentos, e dos parentais resistente e suscetível, respectivamente., a variância fenotípica σ_{B1}^2 foi considerado igual zero, porque este retrocruzamento não foi feito.

8. Concentração diagnóstica

A dose ou concentração diagnóstica é uma técnica bastante simples e utilizada para detectar baixos níveis de resistência, podendo ser delineada provisoriamente após estudos de linha base de suscetibilidade. A concentração diagnóstica é utilizada para estimar a frequência de genótipos na população de campo e ajudar no entendimento da resposta da seleção de populações resistentes a inseticidas. Já os testes de doses-resposta, para uma precisão mínima, requerem no mínimo cinco concentrações dos inseticidas que deverão produzir necessariamente mortalidade na faixa de 10 a 90%. Posteriormente, a resistência é expressa pela razão da CL_{50} ou CL_{90} (concentração que mata 50% ou 90% dos indivíduos de uma população) dos indivíduos resistentes e suscetível. Desse modo, é possível apenas detectar níveis altos de resistência, e não pequenas variações na frequência de indivíduos resistentes. Portanto, a frequência de indivíduos no campo não pode ser mais facilmente reduzida (Halliday & Burnhaw 1990).

A concentração diagnóstica é determinada no levantamento da suscetibilidade da população ao inseticida, podendo ser utilizada para o monitoramento da resistência. Além disso,

a concentração diagnóstica exige poucos indivíduos e menos tempo do que à dose-resposta, e pode ser utilizada em bioensaios com números maiores de populações. A escolha da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência é relativamente fácil, entretanto, esta resistência deve estar bem caracterizada para a espécie em estudo (Robertson *et al.* 1984, Roush & Miller 1986).

9. Monitoramento da resistência

A caracterização e o monitoramento da resistência para determinar a resposta da população de praga a determinado produto são ideais para o programa de manejo da resistência (Roush & Miller 1986). O desenvolvimento efetivo de um programa de manejo da resistência deve ser capaz de detectar a resistência precocemente, permitindo aplicações rápidas do manejo da resistência (Dennehey 1987). O estabelecimento de linha base de suscetibilidade para inseticidas em uso no campo e para os novos inseticidas em populações de *T. absoluta* consiste no primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência. O segundo passo é o estabelecimento de técnicas de monitoramento e detecção precoce da resistência, como a concentração diagnóstica, antes que ela atinja níveis críticos para iniciar o manejo. Quanto à linha base de suscetibilidade, ela fornece referências para comparação das mudanças de suscetibilidade da população a inseticidas, antes do amplo uso, e permite a detecção das fases iniciais de desenvolvimento de resistência, sendo importante para mostrar que populações de pragas de diversas regiões geográficas podem estar relacionadas com o problema da resistência (Siegfried *et al.* 2000). Portanto, é fundamental estabelecer níveis de suscetibilidade de várias populações, no início e até mesmo depois do uso de inseticidas, para o controle de *T. absoluta*. Além disso, o monitoramento contínuo de populações de *T. absoluta* deve ser feito para o

registro de mudanças na suscetibilidade com a utilização dos inseticidas comerciais ou de novos inseticidas, auxiliando, deste modo, na introdução de estratégias de manejo da resistência antes de ocorrerem falhas de controle no campo.

10. Resistência de *Tuta absoluta* a inseticidas e programa de MRI

A traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, entrou no Sul do Brasil no início da década de 80 e chegou a causar 100% de dano no tomateiro (Giustolin *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2009). A traça-do-tomateiro foi considerada a praga mais importante desta cultura (Barrientos *et al.* 1998, Gilardón *et al.* 2001). Recentemente, a traça-do-tomateiro foi detectada e se espalhou rapidamente pela Europa (Urbaneja *et al.* 2009), Norte da África e Oriente Médio (EPPO 2006, FERA 2009). Desde a sua constatação, o principal método de controle de *T. absoluta* é o uso de inseticidas. O uso contínuo e intensivo de inseticidas na cultura do tomate é fator chave para a evolução da resistência. A evolução da resistência a inseticidas por espécies-praga ameaça a saúde humana e a proteção de culturas (Denholm *et al.* 2002).

O presente trabalho estabelece estratégias do manejo da resistência, que são dependentes do desenvolvimento de programas capazes de detectar o início da resistência, para assim implementar o seu manejo em tempo hábil (Dennehey 1987). Além da detecção, é necessário o desenvolvimento de trabalhos de monitoramento para verificar a suscetibilidade de espécies-praga a inseticidas (Marçon *et al.* 2000). As respostas das populações a inseticidas visam estabelecer parâmetros para o monitoramento da resistência, de preferência antes do uso comercial do inseticida. Dessa forma, para implementar o programa de monitoramento da resistência é necessário desenvolver técnicas de bioensaios, não apenas em laboratório, mas que possam ser realizadas diretamente no campo. A linha base de suscetibilidade pode fornecer uma

referência para comparar mudanças na suscetibilidade das populações de *T. absoluta* aos inseticidas (Prabhaker *et al.* 2008). Portanto, é fundamental estabelecer níveis de suscetibilidade das populações de pragas antes do uso de novos inseticidas. Em seguida, é determinada a concentração diagnóstica para ser usada no monitoramento e na detecção de populações de *T. absolutas* resistentes (Roush & Miller 1986).

Depois de detectada resistência de população de *T. absoluta* a inseticida, esta população será selecionada por várias gerações em laboratório, dessa forma, será possível realizar a caracterização da resistência e o estudo de resistência cruzada, informações que foram geradas antes da introdução de novos inseticidas (Wen & Scott 1997). Ao mesmo tempo, será feito o estudo de herança genética e estabilidade da resistência da população de *T. absoluta* a inseticida. O estudo da herança genética poderá fornecer informações sobre o número de fatores que estão envolvidos na resistência (monofatorial ou polifatorial), se a resistência está ligada ao sexo ou é autossomal, e sobre a dominância ou recessividade da resistência a inseticidas (Roush & McKenzie 1987, Roush 1989). Já no estudo da estabilidade da resistência a população de *T. absoluta* que foi selecionada por várias gerações não será mais exposta ao inseticida, possibilitando verificar se sem exposição a resistência permanece ou reduz ao longo das gerações.

11. Objetivos

O objetivo desta pesquisa foi realizar a linha base de suscetibilidade das populações de *T. absoluta* às diamidas (clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida) e às espinosinas (espinosade e espinetoram), no segundo e terceiro capítulos, respectivamente. Ao mesmo tempo, foi realizado o levantamento das atividades de esterase, glutational-S-transferase e

monooxigenase dependente do citocromo P450 das oito populações de traça-do-tomateiro. Dessa forma, foi observado se a resistência às diamidas e às espinosinas estaria associada ao mecanismo metabólico. O levantamento da suscetibilidade a espinosinas, no terceiro capítulo, indicou que as populações estavam resistentes a espinosade. Em razão disso, portanto, no quarto capítulo, o objetivou-se selecionar a população resistente ao espinosade. Dessa foram, permitiu a avaliação da atividade enzimática ao longo das gerações da população selecionada. Ainda no quarto capítulo, foi possível desenvolver um trabalho de genética da resistência, observando se a resistência está ligada ao sexo ou é autossomal, bem como estimar o grau de dominância e estimar o número de genes envolvidos na resistência a inseticida. Em decorrência da seleção, também foi possível fazer avaliações da herdabilidade, resistência cruzada e estabilidade da resistência.

Literatura Citada

- AAFC. 2003.** Pesticide risk reduction and minor use programs: improving ways to manage pests with new technology, Agriculture and Agri-Food Canada. Government of Canada, Ottawa.
- Barrientos, Z.R., H.J. Apablaza, S.A. Norero & P.P. Estay. 1998.** Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Cienc. Inv. Agr. 25: 133-137.
- Bergé, J., R. Feyereisen & M. Amichot. 1998.** Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 353: 1701-1705.
- Berticat, C., J. Bonnet, S. Duchon, P. Agnew, M. Weill & V. Corbel. 2008.** Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. BMC Evol Biol 8: 1-9.
- Besard, L., V. Mommaerts, G. Abdu-Alla & G. Smagghe. 2011.** Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. Pest Manage. Sci. 67: 541-547.

- Borgoni, C.P., R.A. Silva & G.S. Carvalho. 2003.** Consumo de mesofilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) por três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cienc. Rural 33: 7-11.
- Bourguet, D. & M. Raymond. 1998.** The molecular basis of dominance relationships: the case of some recent adaptive genes. J. Evol. Biol. 11: 103-122.
- Bourguet, D., M. Prout & M. Raymond. 1996.** Dominance of Insecticide Resistance Presents a Plastic Response. Genetics 143: 407-416.
- Bourguet, D., A. Genissel & M. Raymond. 2000.** Insecticide Resistance and Dominance Levels. J. Econ. Entomol. 93: 1588-1595.
- Brattsten, L.B., C.W. Holyoke, J.R. Leeper & K.F. Raffa. 1986.** Insecticide Resistance: Challenge to Pest Management and Basic Research. Science 231: 1255-1260.
- Brogdon, W.G. & A.M. Barber. 1990.** Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Pestic. Biochem. Physiol. 37: 130-139.
- Campos, M.R., M.C. Picanço, J.C. Martins, A.C. Tomaz & R.N.C. Guedes. 2011.** Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. Crop Protect. 30: 1535-1540.
- Casida, J.E. & K.A. Durkin. 2013.** Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. Annu. Rev. Entomol. 58: 99-117.
- Cisneros, J., D. Goulson, L.C. Derwent, D.I. Penagos, O. Hernández & T. Williams. 2002.** Toxic Effects of Spinosad on Predatory Insects. Biol. Control 23: 156-163.
- Clark, D.A., G.P. Lahm, B.K. Smith, J.D. Barry & D.G. Clagg. 2008.** Synthesis of insecticidal fluorinated anthranilic diamides. Bioorg. Med. Chem. 16: 3163-3170.
- Clark, J.F. 1962.** New species of microlepidoptera from Japan. Entomol. News 73: 102.
- Coelho, M.C.F. & F.H. Franca. 1987.** Biologia e quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. Pesqui. Agropecu. Bras. 22: 129-135.
- Cordova, D., E.A. Benner, M.D. Sacher, J.J. Rauh, J.S. Sopa, G.P. Lahm, T.P. Selby, T.M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D.F. Rhoades, L. Wu, R.M. Smith & Y. Tao. 2006.** Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pestic. Biochem. Physiol. 84: 196-214.
- da Silva, J.E., H.A.A. de Siqueira, T.B.M. Silva, M.R. de Campos & R. Barros. 2012.** Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. Crop Protect. 35: 97-101.
- Dale, H.H. 1914.** The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 6: 147-190.

- de Castro, A.A., A.S. Corrêa, J.C. Legaspi, R.N.C. Guedes, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2013.** Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*.
- Denholm, I., G.J. Devine & M.S. Williamson. 2002.** Insecticide Resistance on the Move. *Science* 297: 2222-2223.
- Dennehey, T.J. 1987.** Decision-making for managing pest resistance to pesticides, pp. 118-126. In M.G. Ford, D.W. Holloman, B.P.S. Khanbay & R.M. Sawicki [eds.], *Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches*. Ellis Horwood, Chichester, England.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narvaez-Vasquez, J. Gonzalez-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83: 197-215.
- Ebbinghaus-Kintscher, U., P. Luemmen, N. Lobitz, T. Schulte, C. Funke, R. Fischer, T. Masaki, N. Yasokawa & M. Tohnishi. 2006.** Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in insects. *Cell Calcium* 39: 21-33.
- EPPO. 2006.** Sheets on quarantine pests. *Tuta absoluta* document, pp. 434-435. European Mediterranean Plant Protection Organization
- EPPO. 2007.** EPPO Plant quarantine data retrieval system PQR version 4.6. EPPO.
- EPPO. 2009.** Reporting Service, pp. 39. European Mediterranean Plant Protection Organization.
- FAO. 2004.** Forest Genetic Resources Working Papers, Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO. 2007.** The world's mangroves, 1980-2005: a thematic study in the framework of the Global Forest Resources Assessment 2005, FAO Forestry Paper 153. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAOSTAT. 2011.** Statistical Database. Food and Agricultural Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- FERA. 2009.** confirms the first outbreak in the UK of *Tuta absoluta* – the SouthAmerican tomato moth. The Food and Environment Research Agency.
- Feyereisen, R. 1999.** Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 507-533.
- França, F.H. & M. Castelo Branco. 1992.** Ocorrência de traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. *Hortic. bras.* 10: 6-10.

- Gao, J.R., J.M. Deacutis & J.G. Scott. 2007.** The nicotinic acetylcholine receptor subunits Mda5 and Mdβ3on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. *Insect Mol. Biol.* 16: 691-701.
- Gilardón, E., M. Pocovi, C. Hernández & A. Olsen. 2001.** Papel dos tricomas glandulares da folha do tomateiro na oviposição de *Tuta absoluta*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 36: 585-588.
- Giustolin, T.A., J.D. Vendramim, S.B. Alves, S.A. Vieira & R.M. Pereira. 2001.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *J. Appl. Entomol.* 125: 551-556.
- Gradish, A.E., C.D. Scott-Dupree, L. Shipp, C.R. Harris & G. Ferguson. 2010.** Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manage. Sci.* 66: 142-146.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPA Bulletin* 42: 211-216.
- Guillén, J. & P. Bielza. 2013.** Thiamethoxam acts as a target-site synergist of spinosad in resistant strains of *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manage. Sci.* 69: 188-194.
- Halliday, R.W. & K.P. Burnhaw. 1990.** Choosing the Optimal Diagnostic Dose for Monitoring Insecticide Resistance. *J. Econ. Entomol.* 83: 1151-1159.
- Hartl, D.L. 1992.** A primer of population genetics. 2 ed. Sunderland, MA, Sinauer, p.
- Hayes, J.D. & C.R. Wolf. 1988.** Role of glutathione transferase in drug resistance, pp. 315. In H. Sies & B. Ketterer [eds.], *Glutathione conjugation*. Academic Press.
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 653-665.
- Huang, H.-S., N.-T. Hu, Y.-E. Yao, C.-Y. Wu, S.-W. Chiang & C.-N. Sun. 1998.** Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 651-658.
- IBGE. 2012.** Levantamento sistemático da produção agrícola, pp. 1-88, Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., Rio de Janeiro.
- Imenes, S.D.L., M.A.U. Fernandes, T.B. Campos & A.P. Takematsu. 1990.** Aspecto biológicos e comportamentais da traça do tomateiro *Scropipalpula absoluta* (Meyrick), (Lepidoptera: Gelechiidae). *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* 57: 63-68.
- Jefferies, P.R., P. Yu & J.E. Casida. 1997.** Structural modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. *Pestic. Sci.* 51: 33-38.

- Karunaratne, S.P., J. Hemingway, K.G. Jayawardena, V. Dassanayaka & A. Vaughan. 1995.** Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J. Biol. Chem.* 270: 31124-31128.
- Kirst, H.A. 2010.** The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J. Antibiot.* 63: 101-111.
- Kristensen, M. 2005.** Glutathione S-Transferase and Insecticide Resistance in Laboratory Strains and Field Populations of *Musca domestica*. *J. Econ. Entomol.* 98: 1341-1348.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- Lahm, G.P., T.M. Stevenson, T.P. Selby, J.H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C.A. Bellin, C.M. Dubas, B.K. Smith, K.A. Hughes, J.G. Hollingshaus, C.E. Clark & E.A. Benner. 2007.** Rynaxypyr™: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274-6279.
- Lai, T. & J. Su. 2011.** Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Pest Sci.* 84: 381-386.
- Lande, R. 1981.** The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541-553.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- Lines, J.D., J. Myamba & C.F. Curtis. 1987.** Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med. Vet. Entomol.* 1: 37-51.
- Liu, Y. & B.E. Tabashnik. 1997.** Inheritance of Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1C in the Diamondback Moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2218-2223.
- MAPA. 2013.** AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Marçon, P.C.R.G., B.D. Siegfried, T. Spencer & W.D. Hutchison. 2000.** Development of Diagnostic Concentrations for Monitoring *Bacillus thuringiensis* Resistance in European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 925-930.
- Mathenge, E.M., J.E. Ginnig, M. Kolczak, M. Ombok, L.W. Irungu & W.A. Hawley. 2001.** Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 38: 531-536.

- Mbogo, C.N.M., N.M. Baya, A.V.O. Ofulla, J.I. Githure & R.W. Snow. 1996.** The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10: 251-259.
- McKenzie, J.A. & P. Batterham. 1998.** Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 1729-1734.
- Mertz, F.P. & R.C. Yao. 1990.** *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from Soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 34-39.
- Morais, G.J. & J.A. Normanha Filho. 1982.** Surto de *Scropipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no Trópico Semi-Árido. *Pesqui. Agropecu. Bras.*
- Oliveira, F.A., D.J.H. da Silva, G.L.D. Leite, G.N. Jham & M. Picanço. 2009.** Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Scientia Horticulturae* 119: 182-187.
- Pereyra, P.C. & N.E. Sánchez. 2006.** Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 671-676.
- Picanço, M., G.L.D. Leite, R.N.C. Guedes & E.A. Silva. 1998.** Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. *Crop Protect.* 17: 447-452.
- Picanço, M.C., F.G. Faleiro, A. Pallini Filho & A.L. Matioli. 1997.** Perdas na produtividade do tomateiro em sistemas alternativos de controle fitossanitário. *Hortic. bras.* 15: 88-91.
- Prabhaker, N., S.J. Castle, L. Buckelew & N.C. Toscano. 2008.** Baseline Susceptibility of *Bemisia tabaci* B Biotype (Hemiptera: Aleyrodidae) Populations from California and Arizona to Spiromesifen. *J. Econ. Entomol.* 101: 174-181.
- Prastissoli, D., J.R.P. Parra, O.A. Fernandes, R.C. Oliveira, H.B. Zago & F.F. Perreira. 2003.** Oviposition pattern of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), on tomato under different population densities of adults in greenhouse. *Agrociencia* 19: 11-15.
- Price, N.R. 1991.** Insect resistance to insecticides: Mechanisms and diagnosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100: 319-326.
- Ranson, H. & J. Hemingway. 2004.** Insect pharmacology and control: glutathione S-transferases. In L.I. Gilbert, K. Iatrou & S. Gill [eds.]. Elsevier Ltd Oxford, UK.
- Robertson, J.L., K.C. Smith, N.E. Savin & R.J. Lavigne. 1984.** Effects of Dose Selection and Sample Size on the Precision of Lethal Dose Estimates in Dose Mortality Regression. *J. Econ. Entomol.* 77: 833-837.
- Roush, R.T. 1989.** Designing resistance management programs: How can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-441.

- Roush, R.T. & G.L. Miller. 1986.** Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. *J. Econ. Entomol.* 79: 293-298.
- Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Salgado, V.L. & R. Saar. 2004.** Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J. Insect Physiol.* 50: 867-879.
- Salgado, V.L. & T.C. Sparks. 2005.** The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. In L.J. Gilbert, K. Iatrou & S.S. Gill [eds.], *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford.
- Salgado, V.L., J.J. Sheets, G.B. Watson & A.L. Schmidt. 1998.** Studies on the Mode of Action of Spinosad: The Internal Effective Concentration and the Concentration Dependence of Neural Excitation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 103-110.
- Sattelle, D., D. Cordova & T. Cheek. 2008.** Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8: 107-119.
- Sayed, A.H. & D.J. Wright. 2006.** Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 62: 1045-1051.
- Scott, J.G. 1989.** Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 27-31.
- Scott, J.G. 1999.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 757-777.
- Shono, T. & J.G. Scott. 2003.** Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 1-7.
- Sial, A.A. & J.F. Brunner. 2010.** Toxicity and Residual Efficacy of Chlorantraniliprole, Spinetoram, and Emamectin Benzoate to *Obliquebanded Leafroller* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 103: 1277-1285.
- Siegfried, B.D., T. Spencer & J. Nearman. 2000.** Baseline Susceptibility of the Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 1265-1268.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000a.** Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). *J. Appl. Entomol.* 124: 233-238.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000b.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.

- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manage.* 47: 247-251.
- Soderlund, D.M. & D.C. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563-577.
- Sokal, R. & F. Rohlf. 2012.** Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 4 ed. New York, W.H. Freeman and Company, 937p.
- Souza, J.C. & P.R. Reis. 2003.** Principais pragas de tomate para mesa: biologia, dano e controle. *Informe Agropecuário* 24: 79-92.
- Sparks, T.C., J.E. Dripps, G.B. Watson & D. Paroonagian. 2012.** Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102: 1-10.
- Sparks, T.C., G.D. Crouse, J.E. Dripps, P. Anzeveno, J. Martynow, C.V. DeAmicis & J. Gifford. 2008.** Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 22: 393-401.
- Stone, B.F. 1968.** A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. W.H.O.* 38: 325-326.
- Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the Mode of Inheritance of Pesticide Resistance with Backcross Experiments. *J. Econ. Entomol.* 84: 703-712.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Thompson, G.D., R. Dutton & T.C. Sparks. 2000.** Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manage. Sci.* 56: 696-702.
- Tohnishi, M., H. Nakao, T. Furuya, A. Seo, H. Kodama, K. Tsubata, S. Fujioka, H. Kodama, T. Hirooka & T. Nishimatsu. 2005.** Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests. *J. Pestic. Sci.* 30: 354-360.
- Torres, J.B., C.A. Faria, W.S. Evangelista & D. Pratissoli. 2001.** Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. *Int. J. Pest Manage.* 47: 173-178.
- Urbaneja, A., H. Montón & O. Mollá. 2009.** Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *J. Appl. Entomol.* 133: 292-296.
- Urbaneja, A., J. González-Cabrera, J. Arnó & R. Gabarra. 2012.** Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Manage. Sci.* 68: 1215-1222.

- Urbaneja, A., R. Vercher, V. Navarro, J.L. Porcuna & F. García-Mari. 2007.** La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. Phytoma Esp. 194: 16-24.
- Vulule, J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, J.C. McAllister, W.G. Brogdon, J.M. Roberts, R.W. Mwangi & W.A. Hawley. 1999.** Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. Med. Vet. Entomol. 13: 239-244.
- Waterhouse, A.L., I.N. Pessah, A.O. Francini & J.E. Casida. 1987.** Structural aspects of ryanodine action and selectivity. J. Med. Chem. 30: 710-716.
- Watson, G.B., S.W. Chouinard, K.R. Cook, C. Geng, J.M. Gifford, G.D. Gustafson, J.M. Hasler, I.M. Larrinua, T.J. Letherer, J.C. Mitchell, W.L. Pak, V.L. Salgado, T.C. Sparks & G.E. Stilwell. 2010.** A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 376-384.
- Wen, Z. & J.G. Scott. 1997.** Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). Pestic. Sci. 49: 367-371.
- WHO. 1957.** World health organization. Expert committee on insecticides, seventh report., WHO technical report series, No. 125. WHO, Geneva, Switzerland.
- Wright, D.J. 1968.** Evolution and genetics of population, Genetic and Biometric Foundations. University of Chicago Press, Chicago.

CAPÍTULO 2

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A MODULADORES DOS RECPETORES DE RIANODINA¹

Mateus R. Campos², Tadeu B. M. Silva², Wellington M. Silva², Jefferson E. Silva², Herbert A.
A. Siqueira²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE, Brasil.

¹Campos, M.R., T.B. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. Susceptibility *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to ryanodine receptor modulators. Submetido a Pest Management Science.

RESUMO – As diamidas compreende a nova classe de inseticidas que foram registradas recentemente no Brasil para controle de *Tuta absoluta*. Dessa forma, a linha base de suscetibilidade a diamidas foi determinada com oito populações de *T. absoluta* de campo para estabelecer programa de monitoramento de resistência. Além disso, a potencial resistência cruzada, bem como as associações do metabolismo na destoxicação foram avaliadas para contribuir com o programa de manejo da resistência. As CL_{50s} das populações brasileiras variaram de 3,17 a 29,64 µg i.a./L para clorantraniliprole, de 8,61 a 28,95 µg i.a./L para ciantraniliprole, e para flubendiamida de 94 a 230 µg i.a./L, com razão de resistência de 9,33; 3,36; e 2,45 vezes entre as populações, respectivamente. As correlações entre as diamidas antranílicas foram significativas, o que sugere risco de resistência cruzada. No entanto, as correlações entre as CL_{50s} das populações de traça-do-tomateiro para diamidas antranílicas e diamida do ácido ftálico não foram significativas. A atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 correlacionou significativamente com as CL_{50s} das populações de *T. absoluta* para as diamidas antranílicas, sugerindo que a atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 das populações pode estar atuando na destoxificação das diamidas antranílicas. As diamidas foram altamente eficazes contra as populações de *T. absoluta*. Entretanto, as populações apresentaram razoáveis variações para clorantraniliprole. Resistência cruzada é esperada entre as diamidas antranílicas em *T. absoluta*. A monooxigenase dependente do citocromo P450 poderá desempenhar papel no metabolismo oxidativo associado à resistência de populações *T. absoluta* para diamidas antranílicas.

PALAVRAS-CHAVE: Destoxicação do metabolismo; clorantraniliprole; flubendiamida; ciantraniliprole; resposta natural; traça-do-tomate

SUSCEPTIBILITY *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO
RYANODINE RECEPTOR MODULATORS

ABSTRACT – Phthalic and anthranilic diamides comprise a new insecticide class recently registered in Brazil to control of *Tuta absoluta*. Therefore, baseline of susceptibility to diamides was determined with eight representative field populations *T. absoluta* to establish a resistance monitoring program. Furthermore, the potential cross-resistance as well as associations of metabolism was evaluated in detoxification to contribute with the resistance management program. The LC_{50s} of brazilian populations ranged from 3.17 to 29.64 µg a.i./L to chlorantraniliprole, varied from 8.61 to 28.95 µg a.i./L to cyantraniliprole, and flubendiamide varied from 94 to 230 µg a.i./L, with tolerance ratios of 9.33; 3.36; and 2.45 times between populations, respectively. The correlations between anthranilic diamides were significant, this suggests risk of cross-resistance. However, the correlations between the LC_{50s} logarithm of tomato pinworm to phthalic diamide and acid phthalic diamide did not show significant correlation. The activity of cytochrome P450-dependent monooxygenase significantly correlated with the LC₅₀ of populations *T. absoluta* to anthranilic diamides, suggesting that the activity of cytochrome P450-dependent monooxygenase populations may be acting in detoxification of anthranilic diamides. The diamides were highly effective against *T. absoluta*. Although the populations *T. absoluta* showed reasonable variations to chlorantraniliprole. Cross-resistance is highly expected between anthranilic diamides in *T. absoluta*. The cytochrome P450-dependent monooxygenase may play a role in the oxidative metabolism associated with resistance populations of *T. absoluta* to anthranilic diamides.

KEY WORDS: Detoxification metabolism; chlorantraniliprole; flubendiamide; cyantraniliprole; natural response; tomato pinworm

Introdução

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), é uma importante praga na produção de tomate na América do Sul. A *T. absoluta* foi descrita originalmente em 1917, por Meyrick, em Huancayo, no Peru. No Brasil, foi detectada pela primeira vez no início da década de 1980 (Morais & Normanha Filho 1982), e se espalhou por todas as regiões produtoras de tomate, causando sérios prejuízos econômicos aos seus produtores. Em 2006, a *T. absoluta* foi observada pela primeira vez no Leste da Espanha (Urbaneja *et al.* 2007). Hoje, a traça-do-tomateiro pode ser encontrada em quase todos os países da Europa, Norte de África, e Oriente Médio (Desneux *et al.* 2011). A queda da produtividade em campos de tomate é resultado da redução da área fotossintética devido ao ataque da traça-do-tomateiro, que consome o tecido foliar, sendo que a alimentação da lagarta também afeta o crescimento vertical quando ataca o meristema apical (Desneux *et al.* 2010). Além disso, as lagartas causam lesões nos botões florais e flores, mas estes somente são perceptíveis quando as lagartas se alimentam dos frutos de tomate.

O controle químico é o método mais utilizado para o controle *T. absoluta* (Gontijo *et al.* 2013). As diamidas são as novas moléculas que compõem uma nova classe de inseticidas sintéticos (IRAC 2012). As diamidas são moduladores dos receptores de rianodina e estão divididas em dois subgrupos, as diamidas antranílicas, clorantraniliprole e ciantraniliprole, e a diamida do ácido fitálico, flubendiamida. Os receptores de rianodina são canais de cálcio (Ca^+) que regulam as liberações de Ca^+ intracelulares para as contrações musculares. As diamidas se ligam aos receptores de rianodina e ativam as liberações descontroladas de Ca^+ , causando interrupção na alimentação, letargia, paralisia contrátil e, finalmente, morte (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2009).

Estudos dos padrões de resistência cruzada são extremamente importantes para estabelecer um programa de manejo de resistência adequado, com o objetivo de impedir ou minimizar o desenvolvimento da resistência a inseticidas (Scott 1989, Sayyed & Wright 2004). O programa de manejo da resistência pode ser também melhorado se os mecanismos bioquímicos que conferem resistência a inseticidas são conhecidos ou estão relacionados ao potencial risco de metabolizar inseticidas.

Poucos estudos detectaram resistência em populações de *T. absoluta* a inseticidas. Resistência de *T. absoluta* a organofosforado foi detectada pela primeira vez na Bolívia (Moore 1983). No Chile foi observada resistência a piretróides e organofosforados (Salazar & Araya 2001), no Brasil foi relatada resistência a abamectina, cartape, permetrina e metamidofós (Siqueira *et al.* 2000b, Siqueira *et al.* 2000a, Siqueira *et al.* 2001), enquanto na Argentina foi verificada resistência a deltametrina e metamidofós (Lietti *et al.* 2005). Recentes pesquisas detectaram resistência a inibidores da síntese de quitina, além de ter sido feito estudo sobre a influência do clima e relevo na resistência de populações brasileiras de *T. absoluta* a inseticidas (Silva *et al.* 2011, Gontijo *et al.* 2013). Estes estudos mostram que *T. absoluta* é propensa a desenvolver resistência a muitas classes de inseticidas, se estratégias de manejo da resistência não são estabelecidas, o que, portanto, impõem alto risco para as diatomáceas. A detecção e o mecanismo de resistência foram constatados após vários anos de uso de inseticidas no controle de *T. absoluta*. Assim, tem-se que “status” real da resistência de *T. absoluta* foi negligenciado durante vários anos.

O estabelecimento da linha de base suscetibilidade de *T. absoluta* às diatomáceas é fundamental para o monitorar o desenvolvimento da resistência e, dessa forma, implementar de forma eficaz o programa de manejo da resistência (French-Constant & Roush 1991). AO uso da

concentração ou dose diagnóstica ou discriminatória pode distinguir com precisão entre indivíduos suscetíveis e resistentes, sendo mais adequado do que os bioensaios de concentração resposta. A concentração diagnóstica apresenta maior eficiência na detecção da resistência em baixas frequências (Roush & Miller 1986). Como não existem informações sobre toxicidade das diamidas para *T. absoluta*, o objetivo deste estudo foi realizar o levantamento da suscetibilidade de *T. absoluta* para as diamidas. Portanto, estabelecer linha base para projetar as concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência. Além disso, objetivou-se detectar se existem associações entre às diamidas e as enzimas de destoxificação que desempenhariam papel importante na resistência às diamidas no futuro.

Material e Métodos

Obtenção das populações de *Tuta absoluta*. As populações foram coletadas em lavouras comerciais e em campos experimentais no período de 2010 a 2011, em quatro regiões do Brasil (Tabela 1). As coletas das lagartas de *T. absoluta* foram feitas em folhas, caule e frutos atacados. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e enviado ao Laboratório de Interação Inseto-Tóxico (LIIT) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife-PE).

Depois de recebidas, as lagartas de cada população foram imediatamente transferidas para gaiolas de madeira (45 × 45 × 45 cm) com tela anti-afídeo. As gaiolas de adultos (30 × 30 × 30 cm) foram utilizadas apenas para oviposição. As folhas de tomate foram fornecidas diariamente como substrato. Os adultos de *T. absoluta* foram alimentados com solução de glicose a 10% (Yoki[®], Brasil), enquanto as lagartas foram alimentadas com folhas de tomate da cultivar Santa Clara (IC 5500). As plantas de tomate foram cultivadas em casa de vegetação, sem aplicação de

inseticidas. As populações foram criadas em laboratório a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h.

Inseticidas. As diamidas antranílicas utilizadas foram clorantraniliprole (Prêmio[®], 200 g i.a./L SC, concentrado solúvel da DuPont, Brasil, Paulínia, SP, Brasil) e ciantraniliprole (100 g i.a./L de óleo dispersível da DuPont, Brasil, Paulínia, SP, Brasil), que está em processo de registro para ser utilizado no controle de *T. absoluta* na cultura do tomate. A diamida do ácido fitálico utilizada foi a flubendiamida (Belt[®], 480 g i.a./L concentrado solúvel de Bayer SA, Socorro, SP, Brasil).

Ensaio toxicológico. Os bioensaios toxicológicos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, e todos os bioensaios foram repetidos duas vezes. Os testes preliminares foram realizados para determinar resposta "tudo ou nada", a fim de estabelecer faixas de concentrações para as linhas de concentrações-respostas. As faixas de concentrações foram de 0,0078125 a 0,180 mg i.a./L para clorantraniliprole, 0,0025 a 0,640 mg i.a./L para ciantraniliprole, e 0,02 a 1,5 mg i.a./L para flubendiamida. As diamidas antranílicas foram usadas simultaneamente com 0,25% de Agroleo[®], e no controle (para corrigir a mortalidade natural) foi utilizado água destilada e Agroleo[®]. As concentrações de flubendiamida foram preparadas simultaneamente com 0,01% de Triton X-100, e no controle foi usada água destilada e 0,01% de Triton X-100.

Os folíolos de tomate foram imersos durante 30 segundos na solução de inseticida e secos durante 2h. Em seguida, Os folíolos foram colocados em placas de Petri (8 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), que continham papel filtro úmido com 500 μL de água destilada. Em cada placa de Petri foram colocadas 10 lagartas de segundo instar de *T. absoluta* sobre os folíolos de tomate tratados com inseticida. Logo após, as placas de Petri foram acondicionadas em câmaras de

crescimento a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h. Após 72h de exposição ao inseticida foi avaliada a mortalidade das lagartas com auxílio de fonte de luz e lupa (Olympus SZ61, Olympus[®], Center Valley, PA, EUA). As lagartas foram consideradas mortas quando não conseguiam se mover por pelo menos a extensão do seu comprimento após o toque com pincel de cerdas macias (Tabashnik *et al.* 1990).

Extração de enzima. Para avaliar o metabolismo, 10 lagartas de *T. absoluta* de segundo instar foram coletadas e transferidas para tubos de microcentrifuga em triplicada. Este procedimento de coleta e transferência de lagartas para o tubo de microcentrífuga foi feito para cada população. Na extração de enzimas foram utilizados 200 μL de tampão fosfato de sódio para esterase (0,02 M, pH 7,2) e glutathione-S-transferase (0,1 M, pH 7,5), utilizando o homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogenatos foram centrifugados (Eppendorf 5810R, Eppendorf[®], Hamburg, Germany) a 15000 g e 4°C durante 15 minutos, em seguida foram recolhidos e armazenados a -80°C . Para os ensaios da monooxigenase dependente do citocromo P450, as amostras foram homogeneizadas em 500 μL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) e o microssomo foi processado em 500 μL tampão de ressuspensão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) + glicerol (Wright *et al.* 2000). A quantificação de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinonínico usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985).

Ensaio de esterase. A atividade de esterase foi medida pelo método de van Asperen (1962) adaptado. A solução estoque (250 mM) dos substrados α -naftil e β -naftil acetato foi preparada em acetona. Para reação, foi usado 2 μL do substrato α -naftil acetato, 10 μL de amostra, que havia sido diluída para 1:100 e 188 μL de tampão fosfato de sódio por poço na micro placa. O procedimento foi repetido para análise de esterase usando o substrato β -naftil acetato. As amostras foram diluídas em 1:10. As amostras foram incubadas em 30°C por 15 minutos. A

reação foi parada usando 33,2 µL de FAST Blue B a 0,3%. A absorvância foi lida em 595 nm na leitora de micro placa (Elx800, BioTek®, Winooski, VT, USA). Cada amostra das populações de *T. absoluta* foi analisada em triplicata, com nove repetições no total. A curva padrão foi preparada com α -naphthol e β -naphthol. A atividade de esterase é expressa como nmol naftol x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

Ensaio de glutathiona-S-transferase. A atividade de conjugação de glutathiona reduzida foi determinada usando o substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) na presença de glutathiona-S-transferase formando 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona (Habig *et al.* 1974). O CDNB (150 mM) foi preparado em etanol e a glutathiona reduzida (10 mM) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5). Para a reação, 138 µL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), 10 µL de amostra contendo 1 mg de proteína, 150 µL de glutathiona reduzida (10 mM) foram misturadas. A pré mistura foi incubada em banho-maria a 30°C por 5 minutos. A seguir, 2 µL de CDNB (150 mM) foram adicionados à reação. Imediatamente, a formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona foi medida utilizando um biofotômetro a 340 nm. A reação foi analisada por 5 minutos com intervalos de leitura de 30 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata, somando nove repetições no total para cada população. Os dados de absorvâncias foram analisados em função do tempo de reação após a adição do CDNB. A inclinação da reta (absorvância/min) foi transformada em unidade de concentração nmol de GS-DNB/min/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de CDNB (9,6 mM⁻¹.cm⁻¹).

Ensaio de monooxigenase dependente do citocromo P450 (*O*-demethylase). A atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 foi determinada através do método que utiliza o substrato *p*-nitroanisole (O₂N-C₆H₄-O-CH₃), produzindo nitrofenol. O processo de *O*-demetilação é levemente alcalino e absorve a luz no comprimento de onda de 420 nm. Assim, o

processo não pode interferir na proteína microsomal ou no substrato (Netter & Seidel 1964). Dessa forma, sob a influência de *p*-nitroanisol e *O*-demetilase a atividade da enzima monooxigenase dependente do citocromo P450 pode ser medida (Rose & Brindley 1985). A reação de atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 foi determinada misturando 178,8 µL do tampão fosfato de sódio de ressuspensão (0,1 M, pH 7,5), 56,2 mL de amostra, 2,5 µL *p*-nitroanisol (150 mM em etanol), 12,5 µL de NADPH reduzido (9,6 mM) em cada poço, nesta ordem. A mistura foi incubada durante 15 minutos a 37°C. Em seguida, 10 µL de HCl (1 M) foi adicionado a mistura para interromper a reação. A mistura foi centrifugada a 14000 g durante 10 minutos, e 200 µL do sobrenadante foi transferido para os poços da placa de microtitulação para ser lido no leitor de micro placas no filtro de 405 nm. As amostras foram analisadas em triplicata, e as medidas no total foram compostas de nove repetições. Atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 por amostra foi determinada com base na curva padrão de *p*-nitrofenol em $\text{nmol } p\text{-nitrofenol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

Análises estatísticas. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit com $P > 0,05$, após correção da mortalidade do controle através da fórmula de Abbott (1925) usando o programa POLO-Plus (LeOra-Software 2005). As razões de resistência foram calculadas pelo "teste da razão letal" e consideradas significativas quando o intervalo de confiança (IC) a 95% não incluem o valor 1 (Robertson *et al.* 2007). A população de Guaraciaba do Norte-CE (GBN) apresentou a menor CL_{50} para as três diamidas, dessa forma, foi usada como a população de referência de suscetibilidade. As médias de atividade de esterase, atividades da monooxigenase dependente do citocromo P450 e glutatona-S-transferase foram analisadas e testadas usando o programa SAS (SAS Institute 2001). As premissas da variância foram testadas usando PROC UNIVARIATE e GPLOT. Quando os dados não atendiam as pressuposições da ANOVA, os

dados foram transformados em logaritmo. As médias foram submetidas à análise de variância (PROC ANOVA) e teste de Tukey (HSD) $P < 0,05$ para verificar diferenças entre as populações. Os dados das atividades enzimáticas e os valores das CL_{50s} das populações as diamidas das oito populações de *T. absoluta* foram utilizados para análises de correlação de Pearson, com $P < 0,05$ (PROC CORR). Os dados que apresentaram correlações significativas foram submetidos à análise de regressão (PROC REG) (SAS Institute 2001).

Resultados

Suscetibilidade. A população GBN foi a mais suscetível para as três diamidas. Os valores das CL_{50s} para clorantraniliprole variaram de 3,17 $\mu\text{g i.a./L}$ (GBN) a 29,64 $\mu\text{g i.a./L}$ (ANP), apresentando alta suscetibilidade (Tabela 1). As razões de resistência para este inseticida variaram de 1,79 (VDN) a 9,33 vezes (ANP), entretanto, a resposta foi razoavelmente homogênea entre as populações. Em geral, as inclinações da reta foram relativamente baixas entre as populações, o que sugere variabilidade interpopulacional. Os valores das CL_{99s} para clorantraniliprole variaram de 53,88 $\mu\text{g i.a./L}$ (GBN) para 395,64 $\mu\text{g i.a./L}$ (ANP) (Tabela 1), o que proporcionou de forma semelhante razões de resistência homogêneas (RR_{99} variou de 1,49 a 7,34 vezes), como os valores das RR_{50} .

As populações de *T. absoluta* foram suscetíveis a ciantraniliprole. Os valores das CL_{50s} das populações variaram de 8,61 $\mu\text{g i.a./L}$ (GBN) a 28,95 $\mu\text{g i.a./L}$ (ANP) (Tabela 2). As razões de resistência (RR_{50}) para ciantraniliprole apresentaram menores variações entre as populações em comparação com o clorantraniliprole. As populações de IRQ e ANP apresentaram os maiores razões de resistência para ciantraniliprole RR_{50} (3,11 e 3,36, respectivamente). A população TNG apresentou a maior inclinação (3,25), sugerindo uma resposta mais homogênea em

comparação com as outras populações de *T. absoluta* para ciantraniliprole que foram similarmente rasas (Tabela 2). Os valores de CL₉₉ para ciantraniliprole variaram de 189,71 mg i.a./L (PLN) a 924,29 mg i.a./L (SMR) (Tabela 2), o que também proporcionou similaridade homogênea nas razões de resistência (RR₉₉ variou de 1,95 a 4,88 vezes), como o valores RR₅₀.

Flubendiamida foi a menos tóxica das três diamidas para as populações de *T. absoluta*. Contudo, as populações de traça-do-tomateiro apresentaram resposta mais homogênea à diamida do ácido fitálico, quando comparado com as diamidas antranílicas. Os valores das CL_{50s} para flubendiamida variaram de 0,094 mg i.a./L (GBN) a 0,230 mg i.a./L (VDN) (Tabela 4). As razões de resistência (RR₅₀) variaram de 1,03 vezes para (ANP) a 2,45 vezes para (VDN). Os valores de CL₉₉ variaram de 1,12 mg i.a./L para (SMR) para 7,81 mg i.a./L para (VDN), porém, ao contrário das diamidas antranílicas, os valores da RR₉₉ apresentaram maiores variações de 1,31 (SMR) a 9,18 (VDN) do que os valores RR₅₀. A inclinação da reta das populações de *T. absoluta* a flubendiamida não apresentaram grandes variações (Tabela 3).

Atividade enzimática. As atividades de esterase diferiram entre as populações de *T. absoluta* com o substrato α -naftil acetato, mas não com β -naftil acetato (Tabela 4). As atividades α -esterase variaram de 1,12 (PLT) a 2,32 (IRQ), enquanto que as atividades β -esterase variaram de 1,01 (ANP) a 1,29 (TNG). Pequena variação de 2,07 vezes na atividade α -esterase foi observada entre as populações. As diferenças significativas foram observadas nas atividades da glutathiona-S-transferase das populações de *T. absoluta*, com variação de 3,13 vezes (Tabela 4). Nas atividades de monooxigenases dependentes do citocromo P450 entre as populações de *T. absoluta* foram observadas diferenças significativas. A atividade de O-demetilase variou de 4,23 (PLN) a 18,13 (IRQ), portanto, variação de 4,28 vezes nas atividades de monooxigenase dependente de citocromo P450 entre as populações de *T. absoluta* (Tabela 4).

Correlações. A suscetibilidade de cada população da traça-do-tomateiro a clorantraniliprole apresentou alta correlação com as respostas da *T. absoluta* para ciantraniliprole ($r = 0,76$, $P = 0,0287$, $n = 8$) (Fig. 2). No entanto, não foi observada correlação entre a suscetibilidade a flubendiamida e clorantraniliprole ($r = -0,30$, $P = 0,47$, $n = 8$) ou ciantraniliprole ($r = -0,14$, $P = 0,73$, $n = 8$).

As atividades das monooxigenases dependente do citocromo P450 foram significativas e correlacionaram positivamente com suscetibilidade das populações da traça-do-tomateiro para clorantraniliprole ($r = 0,34$, $P < 0,0033$, $n = 8$), ciantraniliprole ($r = 0,66$, $P < 0,0001$, $n = 8$) e flubendiamida ($r = 0,41$, $P = 0,0003$, $n = 8$) (Fig. 3). Do mesmo modo, as atividades de esterase foram significativas e correlacionaram negativamente com suscetibilidades das populações de traça-do-tomateiro ao clorantraniliprole quando usados os substratos α -naftil ($r = -0,34$, $P = 0,003$, $n = 8$) e β -naftil acetato ($r = -0,30$, $P = 0,009$, $n = 8$). As atividades de esterase não correlacionaram com a suscetibilidade de *T. absoluta* a ciantraniliprole. Entretanto, as atividades de esterase das populações de traça-do-tomateiro correlacionaram significativamente com suscetibilidades das populações a flubendiamida, quando usado o substrato β -naftil acetato ($r = -0,35$, $P = 0,002$, $n = 8$). Não foi observada correlação significativa entre as atividades de glutatona-S-transferase e a suscetibilidades das populações de *T. absoluta*.

Discussão

As populações brasileiras de *T. absoluta* responderam de forma homogênea e foram suscetíveis a três diamidas avaliadas. Embora o clorantraniliprole e a flubendiamida foram liberados recentemente para o controle de *T. absoluta* na cultura do tomate no ano de 2008 e 2009, respectivamente, ainda não foram detectadas falhas de controle. A população de ANP foi a

mais resistente, com 9,33 vezes, sugerindo variação razoável entre as populações de traça-do-tomateiro a clorantraniliprole. Resultado semelhante foi encontrado em populações de *T. absoluta* na Europa, com razões de resistência menores que seis vezes para clorantraniliprole (Roditakis *et al.* 2013). Entretanto, as populações européias apresentaram maiores valores de CL_{50s} quando comparadas com as populações brasileiras, mesmo com histórico de resistência a outros inseticidas (Siqueira *et al.* 2000b, Siqueira *et al.* 2000a, Siqueira *et al.* 2001, Lietti *et al.* 2005, Silva *et al.* 2011, Gontijo *et al.* 2013).

A resistência cruzada é um risco em potencial, visto que as correlações foram significativas entre as respostas das populações de traça-do-tomateiro às diamidas antranílicas. Surpreendentemente, não foram observadas correlações significativas entre as diamidas antranílicas e do ácido ftálico, indicando que a resistência cruzada pode não existir entre os dois subgrupos das diamidas. As diamidas se ligam nos receptores de rianodina modulando a abertura do canal de Ca^{+2} e liberando o estoque de Ca^{+2} interno a partir das células, dessa forma, prejudicam o funcionamento normal dos músculos (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2009). Estudo recente mostrou que as diamidas antranílicas e do ácido ftálico se ligam em locais diferentes nos receptores de rianodina de *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera, Muscidae) (Isaacs *et al.* 2012), o que minimiza a resistência cruzada entre os dois tipos de diamidas. Este parece ser o caso em *T. absoluta*, pois não foram observadas correlações entre as diamidas antranílicas e do ácido ftálico no presente estudo. Contudo, na China, populações resistentes de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) a clorantraniliprole exibiram resistência cruzada com flubendiamida, embora a diamida do ácido ftálico não tenha sido utilizada para o controle *P. xylostella*. (Wang *et al.* 2012). Entretanto, não pode ser afirmado que não existe resistência cruzada entre as diamidas antranílicas e do ácido ftálico. O presente estudo representa

os primeiros conjuntos de dados de respostas das populações de *T. absoluta* do Brasil para todas as diamidas comercialmente disponíveis. Portanto, sugerimos que a rotação com os dois tipos de diamidas deve ser feita com cautela em programas de controle de pragas.

A implementação de estratégias adequadas para o manejo da resistência a inseticidas pode retardar o desenvolvimento de resistência em tempo hábil em associação a outras táticas de controle de pragas. Além disso, a eficácia das estratégias de manejo da resistência pode ser ainda mais precisa com o conhecimento dos mecanismos bioquímicos que podem conferir resistência aos inseticidas (Sial *et al.* 2011). A avaliação da atividade de monooxigenases dependente do citocromo P450 em populações de *T. absoluta* para diamidas antranílicas e os valores das CL_{50s} apresentaram associações significativas, sugerindo causa e efeito entre essas variáveis. Portanto, há um potencial risco da resistência às diamidas antranílicas ser resultante da atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450 (Sial *et al.* 2011). No entanto, essas variações às diamidas em associações com as monooxigenases dependente do citocromo P450 observadas nas populações de traça-do-tomateiro podem estar relacionadas com a exposição prévia a outras classes de inseticidas. No entanto, a resistência às diamidas esteja relacionado com a redução da sensibilidade no sítio de ação, como foi observada em *P. xylostella* (Trocza *et al.* 2012).

O estudo de linha de base de suscetibilidade é importante para estabelecer as variações de resposta das populações de diferentes localidades geográficas a inseticidas. Além disso, o conjunto de dados da suscetibilidade deve ser um ponto de referência para se começar a manejar as populações. A partir do estudo de linha de base de suscetibilidade a concentração ou dose diagnóstica pode ser provisoriamente determinada para monitorar a resistência no campo (Marçon *et al.* 2000, da Silva *et al.* 2012). A concentração diagnóstica pode distinguir precisamente indivíduos suscetíveis dos resistentes, quando ainda os mecanismos não estão

disponíveis (Roush & Miller 1986). Dessa forma, permite determinar precocemente a mudança na frequência de resistência e mudar a tomada de decisões iniciais com inseticidas de modos de ação diferentes. Além disso, a concentração diagnóstica é mais adequada do que os bioensaios com amplas faixas de concentrações, com a detecção da resistência a inseticida em baixas frequências (Marçon *et al.* 2000). Portanto, sugerimos as concentrações diagnósticas provisórias de 3 mg i.a./L e 10 mg i.a./L com base nos valores iniciais para manejar respectivamente as primeiras mudanças na suscetibilidade das diamidas antranílicas e fitálica.

O controle de *T. absoluta* foi sempre difícil, geralmente levando a uma forte dependência de uso de inseticidas, principalmente em culturas de campo. Esta situação, naturalmente, gera problemas se os insetos já são resistentes ao inseticida, e a traça-do-tomate apresentou resposta rápida as novas moléculas, como foi ilustrado em um estudo recente no Brasil (Guedes & Siqueira 2012). Às diamidas, como novos inseticidas, estão agora dentro de uma gama de inseticidas destinados ao controle de *T. absoluta* e devem desempenhar papel importante nos programas de manejo da resistência. A rotação de outros inseticidas de modos de ação diferentes com diamida são necessários dentro do manejo da resistência a inseticidas, a fim de preservar a eficácia desses produtos no controle de *T. absoluta*. A presença da *T. absoluta* nos campos de tomate foi reduzida consideravelmente devido a forte pressão que as diamidas estão exercendo neste momento, o que sugere que outros fatores de resistência foram eliminados por diamidas. Porém, há uma preocupação de que a resistência às diamidas em *T. absoluta* seja apenas uma questão de tempo no Brasil, entretanto, agora podem ser manejadas por meio de monitoramento utilizando as concentrações diagnósticas provisórias sugeridas neste presente trabalho. As primeiras mudanças podem ser revertidas por meio de inseticidas de diferentes modos de ação com semelhante eficiência e disponíveis para controle da *T. absoluta*. Para tanto, às estratégias

de manejo da resistência devem ser realizadas imediatamente para obtenção de resultados efetivos antes que ocorram falhas de controle no campo.

Agradecimentos

Agradecemos à fundação CAPES (Ministério da Educação), pelo suporte financeiro e bolsa de estudo ao primeiro autor, e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq). Ao IRAC–BR, Dow Agrochemical CO, pelo suporte e doação das formulações de inseticidas, ao Prof. Uemerson S. da Cunha e ao Engenheiro Agrônomo Celso Ogassawara, que agradecemos aqui pela coleta de material em campo.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18 265-267.
- Cordova, D., E.A. Benner, M.D. Sacher, J.J. Rauh, J.S. Sopa, G.P. Lahm, T.P. Selby, T.M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D.F. Rhoades, L. Wu, R.M. Smith & Y. Tao. 2006.** Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84: 196-214.
- da Silva, J.E., H.A.A. de Siqueira, T.B.M. Silva, M.R. de Campos & R. Barros. 2012.** Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. *Crop Protect.* 35: 97-101.
- Desneux, N., M.G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narvaez-Vasquez, J. Gonzalez-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83: 197-215.
- French-Constant, R. & R. Roush. 1991.** Resistance Detection and Documentation: The Relative Roles of Pesticidal and Biochemical Assays, pp. 4-38. In R. Roush & B. Tabashnik (eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer US.

- Gontijo, P.C., M.C. Picanço, E.J.G. Pereira, J.C. Martins, M. Chediak & R.N.C. Guedes. 2013.** Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Ann. Appl. Biol.* 162: 50-59.
- Guedes, R.N.C. & H.A.A. Siqueira. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 7: 1-7.
- Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- IRAC. 2012.** Insecticide resistance action committee., IRAC MoA Classification Scheme.
- Isaacs, A.K., S. Qi, R. Sarpong & J.E. Casida. 2012.** Insect ryanodine receptor: distinct but coupled insecticide binding sites for [N-C³H₃]chlorantraniliprole, flubendiamide, and [3H]ryanodine. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 1571-1573.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA. computer program, version By LeOra-Software.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- Marçon, P.C.R.G., B.D. Siegfried, T. Spencer & W.D. Hutchison. 2000.** Development of Diagnostic Concentrations for Monitoring *Bacillus thuringiensis* Resistance in European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 925-930.
- Moore, J.E. 1983.** Control of tomato leafminer (*Scrobipalpula absoluta*) in Bolivia. *Trop Pest Manage* 29: 231-238.
- Morais, G.J. & J.A. Normanha Filho. 1982.** Surto de *Scropipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no Trópico Semi-árido. *Pesq Agropec Bras* 17: 1.
- Netter, K.J. & G. Seidel. 1964.** An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146: 61-65.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & Savin, N.E. 2007.** Pesticide bioassays with arthropods. 2^a ed. Boca Raton, FL, CRC Press Taylor & Francis Group, 200p.
- Roditakis, E., C. Skarmoutsou, M. Staurakaki, M. del Rosario Martínez-Aguirre, L. García-Vidal, P. Bielza, K. Haddi, C. Rapisarda, J.-L. Rison, A. Bassi & L.A. Teixeira. 2013.** Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method. *Pest Manage. Sci.* 69: 217–227.

- Rose, R.L. & W.A. Brindley. 1985.** An evaluation of the role of oxidative enzymes in Colorado potato beetle resistance to carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23: 74-84.
- Roush, R.T. & G.L. Miller. 1986.** Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. *J. Econ. Entomol.* 79: 293-298.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. *Agricultura Técnica* 61: 429-435.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- Sayed, A.H. & D.J. Wright. 2004.** Fipronil resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae): inheritance and number of genes involved. *J. Econ. Entomol.* 97: 2043-2050.
- Scott, J.G. 1989.** Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 27-31.
- Sial, A.A., J.F. Brunner & S.F. Garczynski. 2011.** Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 274-279.
- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.** Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manage. Sci.* 67: 913-920.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000a.** Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). *J Appl Entomol* 124: 6.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000b.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragozo & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manage.* 47: 247-251.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Troczka, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G.E. Davies, L.M. Field, M.S. Williamson, R. Slater & R. Nauen. 2012.** Resistance to diamide insecticides in

diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42: 873-880.

Urbaneja, A., R. Vercher, V. Navarro, F. García Marí & J. Porcuna. 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma Española* 194: 16–23.

van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401-416.

Wang, X., S.K. Khakame, C. Ye, Y. Yang & Y. Wu. 2012. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manage. Sci.*: n/a-n/a.

Wright, R.J., M.E. Scharf, L.J. Meinke, X. Zhou, B.D. Siegfried & L.D. Chandler. 2000. Larval susceptibility of an insecticide-resistant Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification enzymes, and field performance. *J. Econ. Entomol.* 93: 7-13.

Table 1. Toxicidade relativa de clorantraniliprole para lagartas de segundo instar de *Tuta absoluta*.

Populações	n ^a	GL ^b	Inclinação ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₉₉ (IC95%) ^d	χ ^{2e}	RR ₅₀ (IC95%) ^f	RR ₉₉ (IC95%) ^f
GBN	306	6	1,89 ± 0,22	3,17 (2,29 – 4,18)	53,88 (32,42 – 116,86)	4,21	1,00 (0,66 – 1,52)	1,00 (0,41 – 2,41)
VDN	326	6	1,33 ± 0,15	5,70 (3,98 – 7,80)	319,63 (159,26 – 913,39)	1,72	1,79 (1,35 – 2,24)*	5,96 (5,56 – 6,35)*
TNG	306	6	1,60 ± 0,16	6,92 (5,60 – 8,82)	197,98 (111,73 – 452,84)	3,87	2,18 (1,76 – 2,59)*	3,68 (3,35 – 4,00)*
PLN	309	6	1,59 ± 0,27	7,05 (3,77 – 10,44)	203,66 (103,96 – 722,63)	5,71	2,22 (1,60 – 2,84)*	3,78 (3,37 – 4,19)*
PLT	279	5	1,70 ± 0,19	9,05 (6,87 – 11,55)	83,86 (55,98 – 151,41)	3,43	2,85 (2,40 – 3,30)*	3,92 (3,60 – 4,24)*
SMR	276	5	1,73 ± 0,18	10,23 (7,81 – 13,05)	225,69 (133,38 – 488,54)	1,31	3,22 (2,78 – 3,66)*	4,19 (3,89 – 4,50)*
IRQ	243	4	2,84 ± 0,38	12,18 (9,38 – 15,10)	80,31 (54,90 – 148,75)	2,41	3,84 (3,33 – 4,34)*	1,49 (1,24 – 1,73)*
ANP	277	5	2,07 ± 0,24	29,64 (22,80 – 37,69)	395,64 (241,80 – 840,69)	0,90	9,33 (8,88 – 9,78)*	7,34 (7,04 – 7,63)*
Agrupado	2322	22	1,42 ± 0,06	7,54 (5,38 – 9,99)	330,29 (178,62 – 828,66)	101,72	2,38 (2,23 – 2,52)*	6,15 (5,96 – 6,35)*

^a Número total de insetos

^b Grau de liberdade.

^c Erro padrão da média.

^d Microgramas de ingrediente ativo por litro de água

^e Qui-quadrado.

^f Razão de resistência: razão da CL₅₀ e CL₉₉ estimada entre as populações tolerantes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson and Preisler (1992) e a razão do intervalo confiança de a 95%. * A razão de resistência significativa porque o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Table 2. Toxicidade relativa de ciantraniliprole para lagartas de segundo instar de *Tuta absoluta*.

Populações	n ^a	GL ^b	Inclinação ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₉₉ (IC95%) ^d	χ ^{2e}	RR ₅₀ (IC95%) ^f	RR ₉₉ (IC95%) ^f
GBN	346	7	1,34 ± 0,14	8,61 (6,07 – 11,51)	468,25 (246,14 – 1222,61)	6,32	1,00 (0,64 – 1,57)	2,47 (2,03 – 2,91)*
PLN	317	6	1,82 ± 0,22	9,95 (6,94 – 13,30)	189,71 (113,16 – 419,95)	1,14	1,15 (0,95 – 1,35)	1,00 (0,42 – 2,37)
PLT	317	6	1,57 ± 0,18	16,17 (11,13 – 21,91)	486,99 (273,59 – 1170,11)	2,22	1,87 (0,75 – 3,00)	2,57 (1,38 – 3,74)*
VDN	329	7	1,41 ± 0,15	20,38 (14,30 – 27,68)	920,15 (483,34 – 2403,15)	1,88	2,37 (2,17 – 2,57)*	4,86 (4,42 – 5,30)*
TNG	279	6	3,25 ± 0,65	20,60 (15,60 – 26,52)	370,72 (223,80 – 777,46)	3,35	2,39 (1,15 – 3,63)*	1,95 (0,22 – 3,69)
SMR	318	6	1,47 ± 0,17	23,88 (16,08 – 33,01)	924,29 (497,93 – 2361,81)	0,89	2,77 (2,57 – 2,98)*	4,88 (4,45 – 5,31)*
IRQ	289	6	1,74 ± 0,17	26,78 (20,65 – 34,39)	582,95 (342,50 – 1249,06)	4,32	3,11 (2,93 – 3,29)*	3,07 (2,68 – 3,46)*
ANP	327	6	1,83 ± 0,27	28,95 (18,61 – 39,52)	541,63 (305,36 – 1474,78)	2,77	3,36 (3,15 – 3,57)*	2,85 (2,43 – 3,28)*
Agrupado	2353	7	1,54 ± 0,06	17,82 (15,01 – 20,82)	581,27 (423,53 – 856,11)	8,59	2,07 (1,92 – 2,22)*	3,07 (2,77 – 3,37)*

^a Número total de insetos

^b Grau de liberdade.

^c Erro padrão da média.

^d Microgramas de ingrediente ativo por litro de água.

^e Qui-quadrado.

^f Razão de resistência: razão da CL₅₀ e CL₉₉ estimada entre as populações tolerantes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson and Preisler (1992) e a razão do intervalo confiança de a 95%. * A razão de resistência significativa porque o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Table 3. Toxicidade relativa de flubendiamida para lagartas de segundo instar de *Tuta absoluta*.

Populações	n ^a	GL ^b	Inclinação ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₉₉ (IC95%) ^d	χ ^{2e}	RR ₅₀ (IC95%) ^f	RR ₉₉ (IC95%) ^f
GBN	282	5	1,78 ± 0,22	0,094 (0,067 – 0,124)	1,89 (1,09 – 4,44)	2,71	1,00 (0,65 – 1,53)	2,21 (1,86 – 2,58)*
ANP	281	5	2,46 ± 0,25	0,097 (0,079 – 0,117)	0,85 (0,58 – 1,50)	1,31	1,03 (0,91 – 1,15)	1,00 (0,52 – 1,94)
SMR	257	5	2,21 ± 0,23	0,099 (0,080 – 0,121)	1,12 (0,72 – 2,13)	3,11	1,05 (0,93 – 1,17)	1,31 (1,01 – 1,62)*
IRQ	282	5	1,99 ± 0,23	0,117 (0,088 – 0,149)	1,73 (1,07 – 3,60)	2,58	1,24 (1,05 – 1,43)*	2,03 (1,70 – 2,36)*
TNG	258	5	2,22 ± 0,23	0,123 (0,099 – 0,152)	1,38 (0,89 – 2,60)	2,71	1,31 (1,16 – 1,45)*	1,62 (1,31 – 1,93)*
PLT	280	5	1,98 ± 0,22	0,130 (0,099 – 0,166)	1,93 (1,18 – 4,06)	3,49	1,39 (1,19 – 1,58)*	2,27 (1,94 – 2,60)*
PLN	269	5	1,76 ± 0,18	0,181 (0,142 – 0,231)	3,81 (2,18 – 8,57)	2,18	1,93 (1,77 – 2,08)*	4,47 (4,11 – 4,83)*
VDN	258	5	1,52 ± 0,18	0,230 (0,176 – 0,310)	7,81 (3,69 – 25,24)	2,75	2,45 (2,29 – 2,61)*	9,18 (8,73 – 9,63)*
Agrupado	2187	19	1,81 ± 0,07	0,127 (0,111 – 0,146)	2,45 (1,78 – 3,64)	42,66	1,36 (1,22 – 1,49)*	2,88 (2,65 – 3,10)*

^a Número total de insetos.

^b Grau de liberdade.

^c Erro padrão da média.

^d Microgramas de ingrediente ativo por litro de água.

^e Qui-quadrado.

^f Razão de resistência: razão da CL₅₀ e CL₉₉ estimada entre as populações tolerantes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson and Preisler (1992) e a razão do intervalo cofiança de a 95%. * A razão de resistência significativa porque o interval de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 4. Média (\pm erro padrão, n=30) atividade de enzimas nas populações de *Tuta absoluta*.

Pop	Esterase		Glutationa-S-transferase	O-demetilase
	α -naftol acetato ^a	β -naftol acetato ^a	GS-DNB ^a	p-nitrofenol ^a
PLT	1,12 \pm 0,10 d	1,14 \pm 0,10 a	7,77 \pm 0,20 a	14,39 \pm 1,47 ab
ANP	1,34 \pm 0,09 cd	1,01 \pm 0,06 a	7,65 \pm 0,11 a	14,75 \pm 0,77 ab
SMR	1,62 \pm 0,10 bcd	1,26 \pm 0,08 a	6,86 \pm 0,22 b	14,56 \pm 2,19 ab
PLN	1,88 \pm 0,05 abc	1,26 \pm 0,04 a	5,50 \pm 0,02 c	4,23 \pm 0,72 d
GBN	2,07 \pm 0,07 ab	1,12 \pm 0,02 a	7,13 \pm 0,18 ab	5,57 \pm 0,49 cd
VDN	2,09 \pm 0,30 ab	1,26 \pm 0,07 a	7,12 \pm 0,21 ab	14,59 \pm 1,50 ab
TNG	2,10 \pm 0,09 ab	1,29 \pm 0,06 a	2,48 \pm 0,13 d	10,58 \pm 1,50 bc
IRQ	2,32 \pm 0,10 a	1,07 \pm 0,05 a	6,50 \pm 0,15 b	18,13 \pm 1,31 a

Médias seguidas da mesma letras dentro da mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

^a nmol/min/mg de proteína.

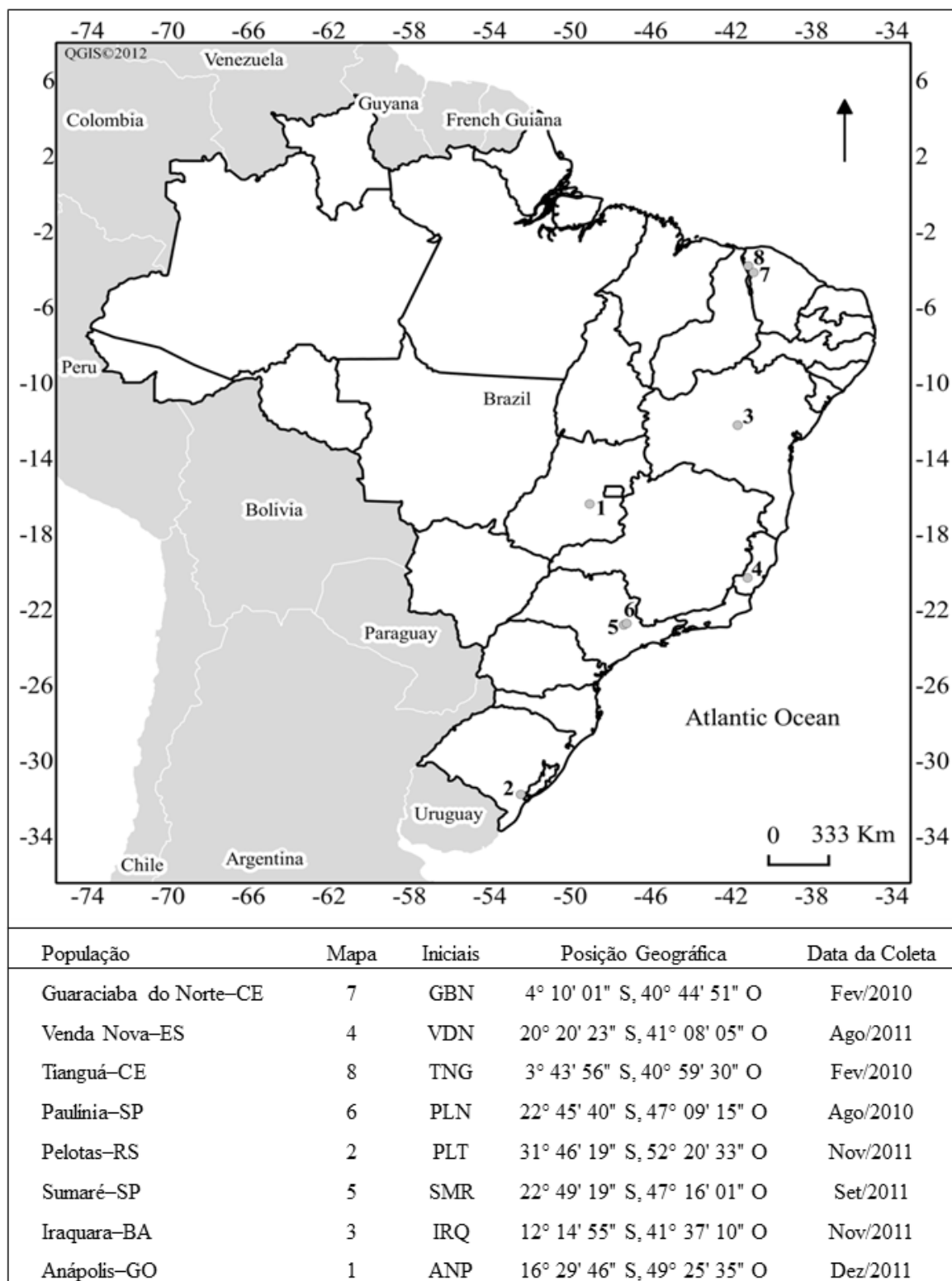


Figura 1. Locais de coleta das populações de *Tuta absoluta* no Brasil.

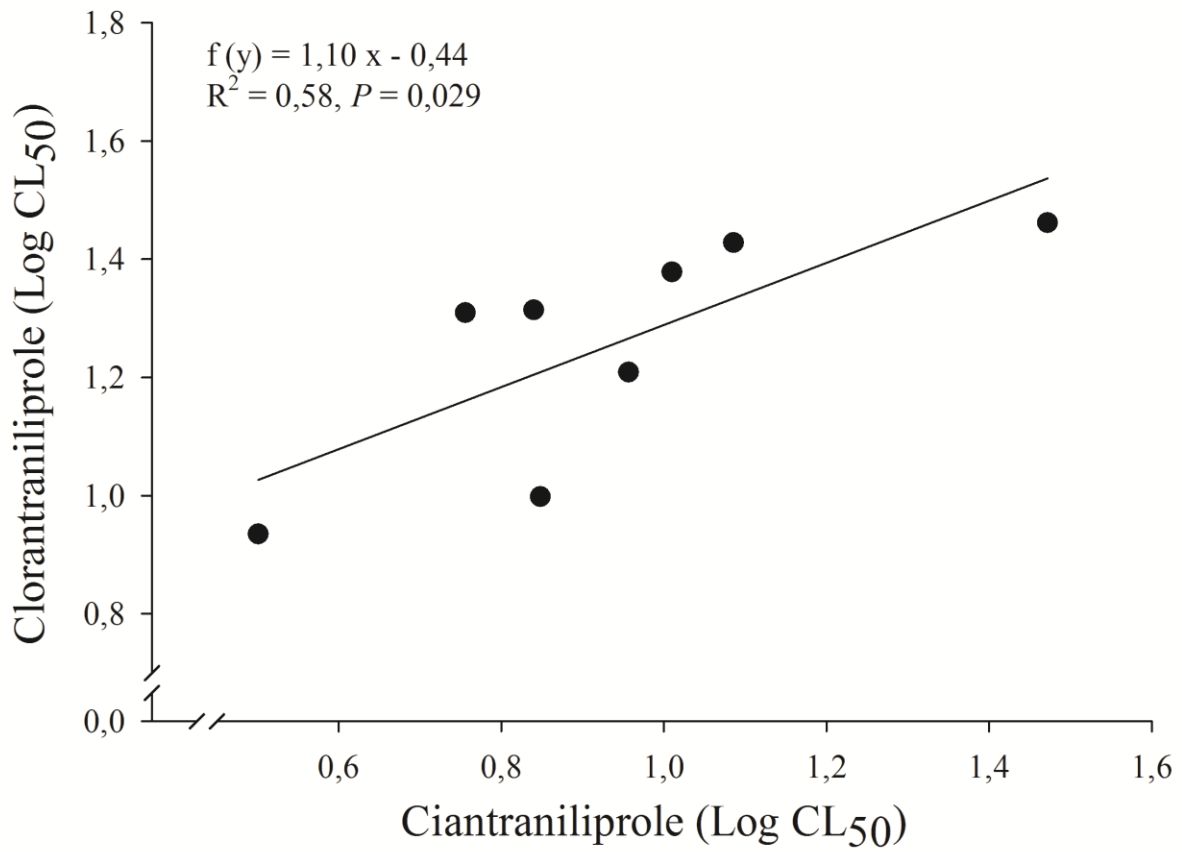


Figura. 2. Resistência cruzada das populações de *Tuta absoluta* entre as diamidas antranflicas.

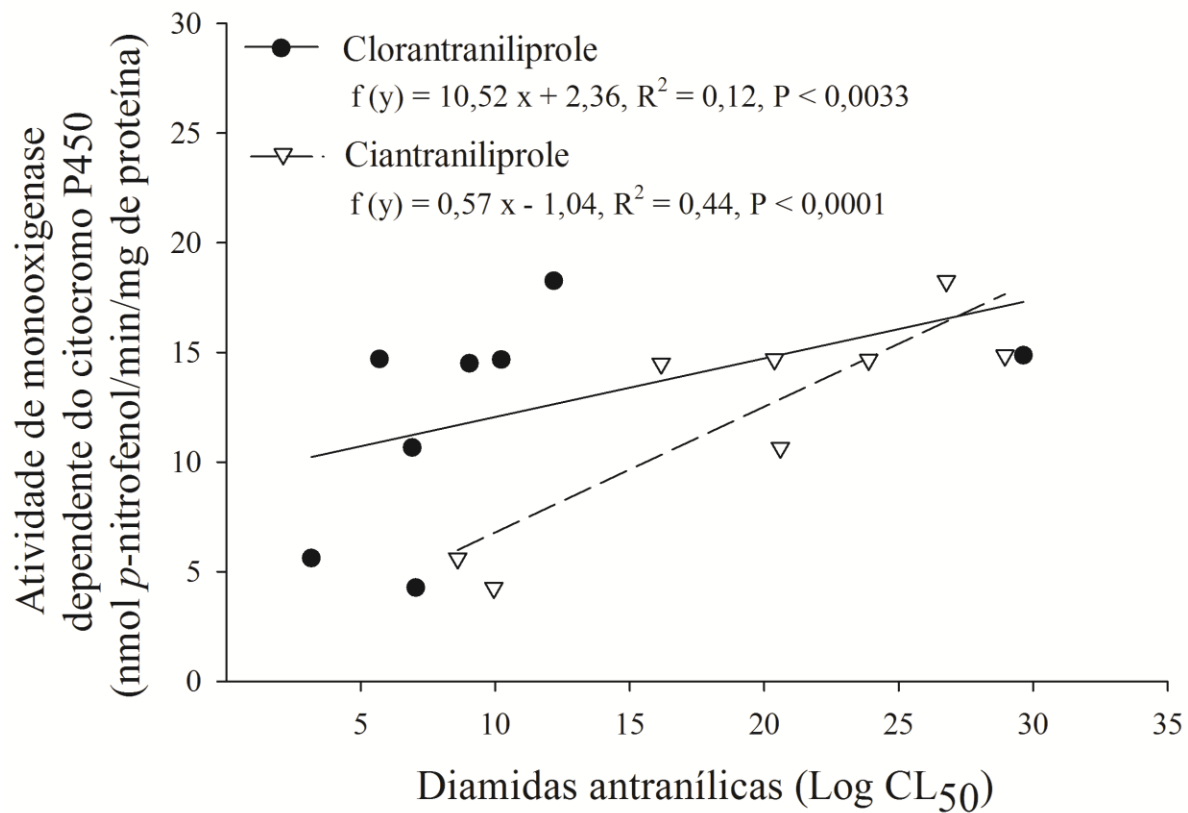


Figura 3. Atividade de *O*-demetilase associado com aumento da resistência das populações de *Tuta absoluta* para diamidas antranílicas.

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *T. absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A ESPINOSINAS¹

Mateus R. Campos², Tadeu B. M. Silva², Wellington M. Silva², Jefferson E. Silva², Herbert A.
A. Siqueira²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171–900 Recife, PE, Brasil.

¹Campos, M.R., T.B. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. Resistance of Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosyns. A ser Submetido a Journal of Economic Entomology.

RESUMO – Há mais de uma década a classe de inseticidas espinosinas é usada para o controle de *Tuta absoluta* no Brasil. O espinetoram é uma nova molécula que será lançada para o controle de *T. absoluta* nos campos de tomate, embora exista grande potencial de resistência cruzada com espinosade. Portanto, as suscetibilidades de espinosade e espinetoram foram determinadas utilizando-se oito populações de *T. absoluta* para estabelecer programas de monitoramento da resistência, bem como destoxificação pelo metabolismo. As populações apresentaram baixas e altas resistências a espinosade. As populações do Nordeste e do Sudeste do Brasil apresentaram alta resistência a espinosade, 60,3 e 93,8 vezes, respectivamente. No entanto, a variação das respostas a espinetoram foi homogênea com razões de tolerância menores que 7 vezes. As populações de *T. absoluta* apresentaram correlações significativas entre as suas toxicidades para espinosade e espinetoram, sugerindo grande risco de resistência cruzada entre ambas. A atividade de glutatona-S-transferase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 correlacionaram fracamente com a suscetibilidade das populações de *T. absoluta* apenas a espinetoram. Entretanto, as atividades de β -esterase das populações de traça-do-tomate correlacionaram com a suscetibilidade a espinosinas, o que sugere potencial contribuição dessas enzimas para a evolução da resistência a espinosinas. A evolução das populações de *T. absoluta* a espinosinas observada neste trabalho sugere que as estratégias para mitigar a resistência devem ser cuidadosamente implementadas a curto prazo. Como parte disso, a concentração diagnóstica provisória de 10 mg i.a./L é sugerida para o monitoramento da resistência a ambas espinosinas, a fim de detectar precocemente sobreviventes.

PALAVRAS-CHAVE: Destoxificação do metabolismo, resistência cruzada, espinosade, espinetoram, mitigação

RESISTANCE OF BRAZILIAN POPULATIONS OF *Tuta absoluta* (MEYRICK)

(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) THE SPINOSYNS

ABSTRACT – Spinosyns comprise an insecticide class that has been used for one decade in Brazil to control *Tuta absoluta*. Spinetoram is a new molecule that will be released to control of *T. absoluta* tomato, although there is great potential of cross-resistance with spinosad. Therefore, susceptibility to spinosad and spinetoram was determined using eight representative field populations of *T. absoluta* to establish resistance monitoring programs as well as detoxification metabolism were assessed to fine-tune the resistance management program. Populations showed low to high resistance to spinosad. The populations from Northeast and Southeast of Brazil showed high resistance to spinosad 60.3 and 93.8 times, respectively. However, the variation of response to insecticide spinetoram was very homogeneous with less than 7 fold in the tolerance ratios. Spinosad and spinetoram showed significant correlations between their toxicities towards the *T. absoluta* populations, suggesting a great risk of cross-resistance between both. Activities of glutathione-S-transferase and cytochrome P450-dependent monooxygenase weakly correlated with susceptibilities of *T. absoluta* populations only with spinetoram. However, β -esterase activities of *T. absoluta* populations correlated with susceptibilities to spinosyns, which suggest a potential contribution of these enzymes to evolving resistance to spinosyns. Brazilian populations of *T. absoluta* are evolving for resistance to spinosyns, suggesting that strategies to mitigate the resistance must be carefully deployed in the short term. As part of that, a provisory diagnostic concentration of 10 mg a.i./L is suggested to monitor resistance to both spinosyns to detect early survivors.

KEY WORDS: Detoxification metabolism, cross-resistance, spinosad, spinetoram, mitigation.

Introdução

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ficou restrita apenas na América do Sul e causou grandes prejuízos à tomaticultura brasileira até meados do ano 2000 (Guedes & Picanço 2012). Entretanto, em 2006 a *T. absoluta* foi observada pela primeira vez no Leste da Espanha (Urbaneja *et al.* 2012). Até o momento, ela pode ser encontrada em quase todos os países europeus, Norte da África e Oriente Médio. As larvas de *T. absoluta* afetam o crescimento vertical do tomateiro devido ao consumo do tecido foliar, reduzindo a produtividade de tomate (Desneux *et al.* 2010). O controle químico tem sido o método mais utilizado para reduzir os prejuízos causados por *T. absoluta*, em geral com inseticidas de largo espectro. As pulverizações com inseticidas ocorrem de modo excessivo e intenso por estação de cultivo no Brasil (Guedes & Siqueira 2012).

O uso excessivo e intenso de inseticidas em cultivos de tomate selecionou populações de *T. absoluta* resistentes a vários inseticidas no Brasil, e, após a entrada desta praga em países da Europa, África e Oriente Médio, os casos de resistência tendem a aumentar, particularmente pela pressão inicial das populações sobre os cultivos. Resistências de *T. absoluta* a piretróides, organofosforados, abamectina, cartape e inibidores da síntese de quitina foram observadas na América do Sul (Siqueira *et al.* 2000a, Siqueira *et al.* 2000b, Salazar & Araya 2001, Siqueira *et al.* 2001, Lietti *et al.* 2005, Silva *et al.* 2011). Estes estudos para a detecção de resistência e para determinar o mecanismo de resistência a inseticidas foram conduzidos depois de vários anos de uso de inseticidas para o controle de *T. absoluta*. Assim, o “status” da resistência de *T. absoluta* a inseticidas foi negligenciado e sua associação com as falhas de controle em campos de produção de tomate ficou obscura até recentemente (Silva *et al.* 2011, Gontijo *et al.* 2013). No entanto, tais estudos mostraram que *T. absoluta* pode desenvolver resistência a muitas classes de

inseticidas se estratégias de manejo da resistência não forem estabelecidas corretamente, impondo, portanto, risco elevado para inseticidas à base de espinosinas, uma das poucas classes de inseticidas efetivas a esta espécie no Brasil.

O espinosade e o espinetoram pertencem ao grupo das espinosinas (grupo 5, de acordo com a classificação de modos de ação do IRAC), uma família naturalmente derivada de lactonas macrocíclicas (Salgado & Sparks 2005). O espinetoram, mistura de duas espinosinas sinteticamente modificadas, foi recentemente introduzido como um novo agente de controle de insetos com velocidade e maior potencial de ação do que espinosade (Sparks *et al.* 2008). As espinosinas ativam primariamente os receptores nicotínicos de acetilcolina (Salgado & Saar 2004). Dessa forma, podem levar à resistência cruzada entre as espinosinas, o que limita o tempo de vida de novos espinosoides. O conhecimento dos padrões de resistência cruzada e mecanismos de resistência permite o desenvolvimento de programa de manejo de resistência preciso, o que pode evitar ou minimizar o desenvolvimento da resistência em populações de insetos (Scott 1989).

O estabelecimento da linha básica de suscetibilidade de *T. absoluta* para espinosinas é fundamental para retardar a evolução da resistência de pragas a inseticidas (Siegfried *et al.* 2005). Consequentemente, podem ser desenvolvidos e implementados programas de manejo da resistência a inseticidas mais eficientes. O espinosade foi registrado no Brasil no início dos anos 2000 para controlar uma ampla variedade de pragas, incluindo a *T. absoluta* (MAPA 2013). Desde então, nenhum caso de resistência a espinosade foi relatado para traça-do-tomateiro, embora em trabalho recente desenvolvido no Chile tenha sido relatada a ocorrência de indivíduos sobreviventes em concentração diagnóstica de 1 mg i.a./L, sugerindo evolução de resistência a espinosade (Reyes *et al.* 2012). Contudo, tal concentração pode não ser suficiente para

discriminar indivíduos resistentes a espinosade, particularmente porque nenhuma caracterização da resistência a espinosade em *T. absoluta* existe. No presente trabalho, foi realizado não somente um levantamento da resistência de *T. absoluta* a espinosade e resistência cruzada a espinosoides, mas também a verificação da existência de possíveis mecanismos bioquímicos que contribuam para a sobrevivência de populações da traça-do-tomateiro a espinosinas.

Material e Métodos

Insetos. Folhas, caule e frutos infestados com larvas de *T. absoluta* foram coletadas em lavouras comerciais e em campos experimentais no período 2010 a 2011 em quatro regiões do Brasil (Tabela 1). O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e enviado em caixas ao Laboratório de Interações Inseto-Tóxico (LIIT) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife – PE). O material recebido foi imediatamente transferido para gaiolas de madeira revestidas com tela antiafídeo. Cada população foi mantida em quatro gaiolas, sendo três para criação de larvas (45 x 45 x 45 cm) e uma para adultos (30 x 30 x 30 cm). As populações de *T. absoluta* foram mantidas em laboratório a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.

Inseticidas. Os inseticidas utilizados nos experimentos foram espinosade (Tracer[®] 480 g i.a./L suspensão concentrada, Dow AgroSciences Industrial Ltda, Franco da Rocha, SP, Brasil) e espinetoram (250 g i.a./L granulado dispersível, Dow AgroSciences, Brasil, Franco da Rocha, SP, Brazil), que ainda está em processo de registro para o uso no controle de *T. absoluta*.

Bioensaios. Os bioensaios toxicológicos foram realizados usando folíolos de tomate imersos em soluções de inseticidas em delineamento inteiramente casualizado com duas repetições por concentração. O bioensaio foi repetido mais uma vez no tempo. Teste preliminar foi realizado

para determinar a resposta "tudo ou nada" de maneira a estabelecer um gradiente de concentrações para estimar curvas de concentração-resposta. As concentrações variaram de 0,0078125 a 0,180 mg i.a./L e 0,02 a 1,5 mg i.a./L. As soluções de inseticidas foram diluídas com água + 0,01% Triton X-100, e para o controle foi utilizado apenas água destilada + 0,01% Triton X-100. Os folíolos de tomate foram imersos durante 30 segundos em cada solução de inseticida e secos durante duas horas, e em seguida colocados em placas de Petri (8 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) contendo papel de filtro umedecido com 500 µL de água destilada. Dez larvas de segundo instar foram transferidas para cada placa de Petri, que foi colocada em câmara de crescimento a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. A mortalidade das larvas foi avaliada após 48 h de exposição. As avaliações de mortalidade foram realizadas com auxílio de fonte de luz e lupa (Optium[®] 5x, Alemanha). O critério de mortalidade utilizado baseou-se na movimentação das larvas após leve toque com pincel macio (Tabashnik *et al.* 1990). Larvas foram retiradas cuidadosamente das galerias de folíolos de tomate, sendo consideradas mortas aquelas que não conseguiam se mover por pelo menos a extensão do seu comprimento após o toque.

Atividade enzimática. Larvas de terceiro instar de *T. absoluta* foram coletadas para a análise de enzimas detoxificativas. Três amostras foram obtidas para cada população e cada amostra conteve 10 larvas de *T. absoluta* de terceiro instar. Para a análise de atividade de esterases foi utilizada a metodologia descrita por van Asperen (1962) adaptada à microplacas. Os α -naftil e β -naftil acetatos foram usados como substratos. Curvas padrão foram preparadas com α -naftol e β -naftol para determinação da atividade. A atividade específica de esterase foi calculada em nmols naftol x min^{-1} x mg de proteína⁻¹.

A atividade de conjugação da glutatona reduzida ao substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) foi determinada segundo Habig *et al.* (1974). O coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para determinar a quantidade de conjugado do CDNB utilizando a inclinação da reta (absorbância/min) para se obter a unidade de concentração da atividade de glutatona-S-transferase.

A atividade de monooxigenase dependente de citocromo P450 (*O*-desmetilação) foi determinada utilizando o substrato *p*-nitroanisole ($\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}_3$) para *p*-nitrofenol pelo método de Netter & Seidel (1964). A atividade de citocromo P450 por amostra foi obtida através da equação linear estimada para a absorbância em função da curva padrão de *p*-nitrofenol que foi disposta em $\text{nmols } p\text{-nitrofenol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

A quantificação de proteína foi determinada através do método do ácido bicinconínico usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985).

Análises estatísticas. Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de concentrações resposta foram corrigidos pela mortalidade observada no controle (Abbott 1925) e analisados por Probit a $P > 0,05$ (Finney 1971), usando o programa Polo-Plus[®] (LeOra-Software 2005). As razões de resistência foram calculadas pelo teste de razão letal (do inglês, “lethal ratio test”) e consideradas significantes quando o intervalo de confiança (IC) a 95 % não inclui o valor 1,0. A população de Pelotas-RS (PLT), com a CL_{50} mais baixa para as espinosinas, foi usada como referência para fazer comparações com as demais populações. Os resultados de atividade enzimática para esterase, glutatona-S-transferase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 foram estatisticamente analisados no programa SAS (SAS Institute 2001). As premissas de normalidade e homocedasticidade de variância foram testadas através do PROC UNIVARATE e PROC GLM (SAS Institute 2001). Os dados de atividades foram sujeitos à análise de variância (ANOVA)

usando PROC ANOVA e teste de Tukey (HSD) a $P < 0,05$ para agrupamento das médias (SAS Institute 2001). Correlação de Pearson a $P < 0,05$ foi conduzida entre as variáveis atividades enzimáticas e as suscetibilidades médias (CL_{50}) das populações para cada inseticida usando PROC CORR (SAS Institute 2001).

Resultados

Suscetibilidade. A população de *T. absoluta* de Pelotas-RS (PLT) apresentou a menor CL_{50} para espinosade (0,0067 mg i.a./L) e espinoteram (0,047 mg i.a./L) (Tabelas 2 e 3). As demais populações de *T. absoluta* apresentaram valores de CL_{50} variando de 0,060 mg i.a./L (Paulínia-SP) a 0,63 mg i.a./L (Sumaré-SP) para espinosade. Conseqüentemente, as razões de resistência (RR_{50}) variaram gradualmente entre as populações de 8,9 a 93,8 vezes para o espinosade. Ainda quanto às respostas ao espinosade, os valores de CL_{99} variaram de 0,23 mg i.a./L (Pelotas-RS) a 11,56 mg i.a./L (Venda Nova do Imigrante-ES). Conseqüentemente, as razões de resistência (RR_{99}) variaram gradualmente entre as populações de 2,6 (Paulínia-SP) a 51,5 vezes (Venda Nova do Imigrante-ES) para o espinosade. As populações de *T. absoluta* de Sumaré-SP (SMR) e Venda Nova do Imigrante-ES (VDN) apresentaram o maior e o menor coeficiente linear para o inseticida espinosade, indicando maior e menor homogeneidade das populações ao espinosade, respectivamente (Tabela 2).

As estimativas de CL_{50} para espinoteram variaram de 0,047 mg i.a./L (Pelotas-RS) a 0,31 mg i.a./L (Sumaré-SP), enquanto as CL_{99} variaram de 0,56 mg i.a./L (Pelotas-RS) a 6,71 mg i.a./L (Iraquara-BA). As razões de resistência RR_{50} variaram conseqüentemente de 1,02 (Paulínia-SP) a 6,51 vezes (Sumaré-SP), enquanto as RR_{99} variaram de 1,2 (Tianguá-CE) a 12,1 vezes (Iraquara-BA) (Tabela 3). A população de Paulínia-SP (PLN) apresentou a maior

inclinação da reta (2,98), sendo a resposta mais homogênea dentre as populações. Por outro lado, a população de Tianguá-CE apresentou a menor inclinação da reta (1,28), sugerindo uma resposta mais heterogênea dos indivíduos para o espinetoram (Tabela 3).

Atividade enzimática. A atividade de esterase diferiu estatisticamente entre as populações de *T. absoluta* quando utilizados os substratos α e β -naftil acetato (Fig. 1A). Para o substrato α -naftil acetato, os valores de atividade específica variaram de 0,79 (Pelotas-RS) a 2,11 $\mu\text{mol } \alpha\text{-naftol /min/mg}$ de proteína (Iraquara-BA). Para o substrato β -naftil acetato, os valores de atividade específica variaram de 0,79 (Paulínia-SP) a 1,58 $\mu\text{mol } \beta\text{-naftol /min/mg}$ de proteína (Sumaré-SP). As populações de *T. absoluta* apresentaram atividades enzimáticas frente ao substrato β -naftil acetato superior àquelas frente ao substrato α -naftil acetato. A atividade de conjugação por glutationa-S-transferases diferiu estatisticamente entre algumas populações de *T. absoluta* (Fig. 1B) com os valores de atividade específica variando de 1,70 nmol de GS-DNB/min/mg de proteína (Venda Nova do Imigrante-ES) a 4,26 de nmol GS-DNB/min/mg de proteína (Iraquara-BA). Entretanto, a maioria das populações apresentaram atividades similares entre si (Fig. 1B). A atividade de monooxigenases dependentes de citocromo P450 diferiu estatisticamente entre as populações de *T. absoluta* (Fig. 1C) com os valores de atividade específica variando de 2,94 (Guaraciaba do Norte-CE) a 18,73 nmol 4-nitrofenol/min/mg de proteína (Venda Nova do Imigrante-ES). Entretanto, a maioria das populações apresentaram atividades similares entre elas (Fig. 1C). As demais populações de *T. absoluta* apresentaram atividades intermediárias significativamente diferentes entre os extremos (Fig. 1C).

Correlações. Alta correlação ($r = 0,82$, $P = 0,0116$, $n = 8$) entre logaritmos das CL_{50s} do inseticida espinosade e das CL_{50s} do espinetoram foi observada para as populações *T. absoluta* (Fig 2). Não houve correlações significativas para espinosade ($r = 0,19$, $P = 0,1035$, $n = 72$) e

espinetoram ($r = 0,22$, $P = 0,0522$, $n = 72$) entre o logaritmo das CL_{50s} das populações de *T. absoluta* e as atividades de esterase das populações frente ao substrato α -naftol. Porém, correlações significativas foram observadas para o inseticida espinosade ($r = 0,50$, $P < 0,0001$, $n = 72$) (Fig. 3A) e espinetoram ($r = 0,43$, $P < 0,0001$, $n = 72$) (Fig. 3B) entre o logaritmo das CL_{50s} das populações de *T. absoluta* e as atividades de esterase das populações frente ao substrato β -naftol. A atividade de glutationa-S-transferase das populações de *T. absoluta* apresentou fraca correlação significativa com o logaritmo das CL_{50s} das populações ao inseticida espinetoram ($r = 0,26$, $P = 0,025$, $n = 72$). Entretanto, para o espinosade a correlação não foi significativa ($r = 0,05$, $P = 0,63$, $n = 72$). O logaritmo das CL_{50s} das populações de *T. absoluta* correlacionou com as atividades de monooxigenases dependentes de citocromo P450 das populações ao espinetoram ($r = 0,25$, $P = 0,034$, $n = 72$), embora não tenha sido observada correlação significativa ($r = 0,13$, $P = 0,282$, $n = 72$) entre as atividades de monooxigenases dependentes de citocromo P450 das populações de *T. absoluta* e o logaritmo das CL_{50s} das populações ao espinosade.

Discussão

O uso excessivo e intensivo de inseticidas tem selecionado cada vez mais pragas à resistência, levando à rápida substituição de produtos com novos modos de ação, embora novos produtos sejam descobertos em proporções menores. Após pouco mais de uma década de uso do espinosade no controle de populações de *T. absoluta* na cultura do tomate no Brasil, resistência moderada a alta ao espinosade foi detectada neste estudo. As populações de Iraquara-BA (IRQ) e de Sumaré-SP (SMR) apresentaram altos graus de resistência ao inseticida espinosade, 60,4 e 93,8 vezes, respectivamente. Estes resultados sugerem que o espinosade tem sido usado sem

critérios nestas localidades para o controle de pragas, embora falhas de controle ainda não tenham sido observadas em campo. Apesar da dose recomendada de espinosade para controle de *T. absoluta* ser superior aos valores de CL₉₉ das populações avaliadas, tais populações devem ser monitoradas a curto prazo para evitar possíveis falhas de controle da *T. absoluta* ao inseticida.

A resistência a espinosade já foi relatada em laboratórios e no campo, em poucos anos após a introdução do espinosade para o controle de Lepidoptera (Moulton *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2002, Shono & Scott 2003). Portanto, a abordagem utilizada sobre resistência a inseticida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) pode se adequar melhor neste contexto do levantamento da suscetibilidade feita para as populações de *T. absoluta* a espinosinas no Brasil (Guedes & Siqueira 2012, Gontijo *et al.* 2013). O aumento das respostas das populações de traça-do-tomateiro ao espinosade observado neste trabalho pode ter ocorrido em menos de três anos. Isto porque, trabalhos anteriores realizados com populações coletadas em diferentes localidades no Brasil apresentaram baixas variações (< 5 vezes) de respostas das populações ao espinosade (Silva *et al.* 2011). Isso pode sugerir que a evolução da resistência ao espinosade em populações de *T. absoluta* ocorre de forma lenta no campo. Contudo, recentemente, deve ter se agravado em função de maior pressão de seleção em algumas áreas. Portanto, o uso de produtos em rotação com modos de ação diferentes das espinosinas deve ser encorajado.

As populações de *T. absoluta* apresentaram baixa variação de resposta ao inseticida espinetoram. O espinetoram possui grupo etil ($-C_2H_5$) no maior e menor componente (espinosina A e D) e o espinosade possui grupo metil ($-CH_3$) (Sparks *et al.* 2012). Portanto, esta resposta mais homogênea das populações ao espinetoram pode estar relacionada à diferença estrutural das espinosinas. Entretanto, a alta correlação entre as suscetibilidades das populações de *T. absoluta*

ao espinetoram e ao espinosade demonstra que existe grande risco para a resistência cruzada entre as espinosinas.

Outros trabalhos observaram resistência cruzada entre as espinosinas para as espécies de *Plutella xylostella* (Linnaeus), *Drosophila melanogaster* (Meigen) e *Choristoneura rosaceana* (Harris) quando selecionadas ao espinosade (Sial & Brunner 2010, Watson *et al.* 2010, Sparks *et al.* 2012). Todavia, embora os mecanismos de resistência a espinosinas em outras pragas tenham sido sugeridos e/ou elucidados (Sparks *et al.* 2012), em *T. absoluta* ainda estão por ser desvendados.

A partir do tipo de mecanismos de resistência é possível prever os padrões de resistência cruzada e múltipla. As atividades de esterase (β -esterases) das populações correlacionaram moderadamente com a variação de suscetibilidade das populações de *T. absoluta* para espinosinas, enquanto glutathione-S-transferase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 correlacionaram fracamente com a suscetibilidade das populações de *T. absoluta* a espinetoram. Dessa forma, as atividades de esterase (β -esterases) podem contribuir para resistência das populações de traça-do-tomateiro a espinosinas em graus moderados de resistência.

Em estudo recente, Reyes *et al.* (2012) não encontraram associação da suscetibilidade de *T. absoluta* a enzimas detoxificativas. Existe grande evidência que a resistência a inseticida pode surgir como consequência do aumento da detoxificação metabólica (Scott 1989), mas a maioria dos casos de resistência a espinosinas tem sido associada à alteração de sítio alvo. Na maioria dos casos relatados, a resistência a espinosade estava associada a alterações nos receptores nicotínico de acetilcolina (Sparks *et al.* 2012, Puinean *et al.* 2013). Mais especificamente, estudos conduzidos com a resistência da *Drosophila melanogaster* ao

espinosade têm atribuído a resistência à alteração na subunidade do domínio $\alpha 6$ ($D\alpha 6$) dos receptores da acetilcolina (Perry *et al.* 2007, Watson *et al.* 2010). Portanto, pode-se sugerir que a provável resistência das populações de *T. absoluta* a espinosade esteja relacionada com a alteração no sítio alvo. Em diversos estudos tem-se demonstrado que espinosinas atuam no sistema nervoso do inseto, entretanto, as espinosinas atuam em um novo sítio de ação diferente das outras classes de inseticidas (Salgado & Saar 2004). Estudos fisiológicos sugerem que a ação das espinosinas atua em uma nova interação nos receptores nicotínicos da acetilcolina (Salgado & Saar 2004).

Os graus de resistência observados no presente estudo estão ainda abaixo da dose recomendada pelo fabricante, mas sugerem que o desenvolvimento de estratégias para o manejo da resistência de *T. absoluta* a espinosinas se faz urgente. O monitoramento da suscetibilidade das populações de *T. absoluta* a espinosinas em diferentes distribuições geográficas deve ser estabelecido o mais rápido possível para mitigar a evolução da resistência antes que falhas de controle possam ocorrer no campo.

Desse modo, qualquer mudança que ocorra nas respostas das populações para as espinosinas pode ser observada rapidamente com a concentração diagnóstica. A concentração diagnóstica provisória aos inseticidas espinosade e espinetoram sugerida com base nos resultados deste estudo é de 10 mg i.a./L para o monitoramento da resistência. Portanto, em populações de *T. absoluta* monitoradas com a dose diagnóstica e que apresentem sobreviventes, a troca de produto deve ser sugerida para manutenção da eficácia de espinosinas no campo.

O manejo da resistência a inseticida pode ser aplicado de maneira rápida e no tempo certo quando se conhece o padrão de resposta da praga ao inseticida. O cuidado deve ser redobrado com as espinosinas para que não ocorram problemas com a resistência cruzada e,

consequentemente, a redução da eficiência dos inseticidas, especialmente quando se trata de um inseticida que apresenta baixa toxicidade a insetos não-alvo, como o espinosade (Torres *et al.* 2002, Campos *et al.* 2011, Biondi *et al.* 2012).

Apesar da evolução de populações de *T. absoluta* para resistência a espinosinas a níveis relativamente altos, a rotação com outros produtos, tais como diamidas, pirroles, oxadiazinas, pode reverter a resistência a espinosinas estendendo a vida de prateleira de produtos à base destas moléculas. Adicionalmente, a seleção de *T. absoluta* para resistência a espinosade e sua caracterização poderá esclarecer o envolvimento de enzimas detoxificativas e as bases genéticas da resistência a espinosinas. Dessa forma, o modo de herança da resistência a espinosade poderá auxiliar na detecção, monitoramento, modelagem e avaliação de risco (Balasubramani *et al.* 2008), refinando o programa de manejo da resistência.

Agradecimentos

Agradecemos à fundação CAPES (Ministério da Educação) pelo suporte financeiro e bolsa de estudo ao primeiro autor, assim como ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), ao IRAC–BR, Dow Agrochemical CO, pelo suporte e doação das formulações de inseticidas, ao Prof. Uemerson S. da Cunha e ao Engenheiro Agrônomo Celso Ogassawara pela coleta de material em campo.

Literatura Citada

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18 265-267.

- Balasubramani, V., A.H. Sayyed & N. Crickmore. 2008.** Genetic Characterization of Resistance to Deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from India. *J. Econ. Entomol.* 101: 1911-1918.
- Biondi, A., V. Mommaerts, G. Smagghe, E. Vinuela, L. Zappala & N. Desneux. 2012.** The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag. Sci.* 68: 1523-1536.
- Campos, M.R., M.C. Picanço, J.C. Martins, A.C. Tomaz & R.N.C. Guedes. 2011.** Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Protect.* 30: 1535-1540.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narvaez-Vasquez, J. Gonzalez-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83: 197-215.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis. 3^a ed. London, Cambridge University Press, 333p.
- Gontijo, P.C., M.C. Picanço, E.J.G. Pereira, J.C. Martins, M. Chediak & R.N.C. Guedes. 2013.** Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Ann. Appl. Biol.* 162: 50-59.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *E.P.P.O. Bulletin* 42: 211-216.
- Guedes, R.N.C. & H.A.A. Siqueira. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 7: 1-7.
- Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA. computer program, version By LeOra-Software.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- MAPA. 2013.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. MAPA/CGAF/DFIA/DAS, Brasília, Brazil.

- Moulton, J.K., D.A. Pepper & T.J. Dennehy. 2000.** Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Manag. Sci.* 56: 842-848.
- Netter, K.J. & G. Seidel. 1964.** An adaptively stimulated *O*-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146: 61-65.
- Perry, T., J.A. McKenzie & P. Batterham. 2007.** A knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 184-188.
- Puinean, A.M., S.J. Lansdell, T. Collins, P. Bielza & N.S. Millar. 2013.** A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J. Neurochem.* 124: 590-601.
- Reyes, M., K. Rocha, L. Alarcón, M. Siegwart & B. Sauphanor. 2012.** Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102: 45-50.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. *Agricultura Técnica* 61: 429-435.
- Salgado, V.L. & R. Saar. 2004.** Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J. Insect Physiol.* 50: 867-879.
- Salgado, V.L. & T.C. Sparks. 2005.** The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance, pp. 137-173. In I.G. Lawrence, I. Kostas & S.G. Sarjeet (eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, Amsterdam.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- Scott, J.G. 1989.** Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 27-31.
- Shono, T. & J.G. Scott. 2003.** Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 1-7.
- Sial, A.A. & J.F. Brunner. 2010.** Toxicity and residual efficacy of chlorantraniliprole, spinetoram, and emamectin benzoate to *Obliquebanded Leafroller* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 103: 1277-1285.

- Siegfried, B.D., T.T. Vaughn & T. Spencer. 2005.** Baseline Susceptibility of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Crysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* Toxin. J. Econ. Entomol. 98: 1320-1324.
- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.** Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manage. Sci. 67: 913-920.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000a.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000b.** Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). J. Appl. Entomol. 124: 233-238.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Int. J. Pest Manage. 47: 247-251.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.
- Sparks, T.C., J.E. Dripps, G.B. Watson & D. Paroonagian. 2012.** Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. Pestic. Biochem. Physiol. 102: 1-10.
- Sparks, T.C., G.D. Crouse, J.E. Dripps, P. Anzeveno, J. Martynow, C.V. DeAmicis & J. Gifford. 2008.** Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram. J. Comput. Aided Mol. Des. 22: 393-401.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.
- Torres, J.B., C.S.A. Silva-Torres, M.R. Silva & J.F. Ferreira. 2002.** Compatibilidade de inseticidas e acaricidas com o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em algodoeiro. Neotrop. Entomol. 31: 311-317.
- Urbaneja, A., J. González-Cabrera, J. Arnó & R. Gabarra. 2012.** Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest Manage. Sci. 68: 1215-1222.
- van Asperen, K. 1962.** A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.

- Watson, G.B., S.W. Chouinard, K.R. Cook, C. Geng, J.M. Gifford, G.D. Gustafson, J.M. Hasler, I.M. Larrinua, T.J. Letherer, J.C. Mitchell, W.L. Pak, V.L. Salgado, T.C. Sparks & G.E. Stilwell. 2010.** A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 376-384.
- Zhao, J.Z., Y.X. Li, H.L. Collins, L. Gusukuma-Minuto, R.F. Mau, G.D. Thompson & A.M. Shelto. 2002.** Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.* 95: 430-436.

Tabela 1. Locais de coleta das populações de *Tuta absoluta* no Brasil.

Populações	Iniciais	Posição geográfica	Data de coleta
Guaraciaba do Norte–CE	GBN	4° 10' 01" S, 40° 44' 51" O	Fev/2010
Venda Nova–ES	VDN	20° 20' 23" S, 41° 08' 05" O	Ago/2011
Tianguá–CE	TNG	3° 43' 56" S, 40° 59' 30" O	Fev/2010
Paulínia–SP	PLN	22° 45' 40" S, 47° 09' 15" O	Ago/2010
Pelotas–RS	PLT	31° 46' 19" S, 52° 20' 33" O	Nov/2011
Sumaré–SP	SMR	22° 49' 19" S, 47° 16' 01" O	Set/2011
Iraquara–BA	IRQ	12° 14' 55" S, 41° 37' 10" O	Nov/2011
Anápolis–GO	ANP	16° 29' 46" S, 49° 25' 35" O	Dez/2011

Tabela 2. Toxicidade relativa de espinosade a larvas de segundo instar de *Tuta absoluta*.

População	n ^a	GL ^b	Intercepto ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₉₉ (IC95%) ^d	χ ^{2e}	RR ₅₀ (IC95%) ^f	RR ₉₉ (IC95%) ^f
PLT	323	6	1,52 ± 0,19	0,007 (0,005 – 0,009)	0,23 (0,12 – 0,62)	1,34	1,0 (0,8 – 1,2)*	1,0 (0,3 – 3,1)*
PLN	405	5	2,33 ± 0,26	0,060 (0,048 – 0,073)	0,60 (0,39 – 1,12)	3,72	8,9 (8,7 – 9,2)	2,6 (1,3 – 4,0)*
TNG	257	5	1,61 ± 0,23	0,129 (0,087 – 0,176)	3,63 (1,85 – 11,37)	3,89	19,3 (18,9 – 19,8)	16,1 (14,0 – 18,1)
ANP	279	5	2,14 ± 0,21	0,145 (0,118 – 0,178)	1,78 (1,14 – 3,39)	4,41	21,7 (21,3 – 22,1)	7,9 (6,5 – 9,3)
GBN	265	5	1,85 ± 0,25	0,168 (0,118 – 0,224)	3,03 (1,72 – 7,68)	1,25	25,2 (24,7 – 25,7)	13,5 (11,5 – 15,4)
VDN	317	6	1,47 ± 0,16	0,305 (0,214 – 0,409)	11,56 (6,36 – 28,38)	2,92	45,7 (45,1 – 46,3)	51,5 (49,6 – 53,5)
IRQ	264	5	1,85 ± 0,23	0,410 (0,301 – 0,525)	7,37 (4,36 – 17,05)	1,51	60,4 (60,6 – 62,1)	32,8 (30,7 – 34,9)
SMR	276	5	2,44 ± 0,29	0,626 (0,490 – 0,776)	5,60 (3,71 – 10,56)	1,58	93,8 (93,0 – 94,6)	24,9 (22,9 – 26,9)

^a Número total de insetos usados.

^b Grau de Liberdade.

^c Erro padrão.

^d Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

^e Qui-quadrado.

^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ e CL₉₉ entre população resistente e suscetível, calculado pelo método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de confiança a 95% das CL₅₀ e CL₉₉. * Razão de resistência significativa a espinosade, já que o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0.

Tabela 3. Toxicidade relativa de espinetoram a segundo instar larval de *Tuta absoluta*.

População	n ^a	GL ^b	Intercepto ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₉₉ (IC95%) ^d	χ ^{2e}	RR ₅₀ (IC95%) ^f	RR ₉₉ (IC95%) ^f
PLT	290	6	2,18 ± 0,40	0,047 (0,030 – 0,063)	0,554 (0,317 – 1,694)	4,04	1,00 (0,32 – 1,68)*	1,00 (0,34 – 2,90)*
PLN	317	6	2,98 ± 0,21	0,048 (0,036 – 0,061)	0,724 (0,454 – 1,440)	2,41	1,02 (0,46 – 1,58)*	1,30 (0,33 – 2,28)*
TNG	283	5	1,28 ± 0,18	0,077 (0,060 – 0,096)	0,698 (0,462 – 1,318)	2,54	1,62 (1,09 – 2,15)*	1,25 (0,23 – 2,28)*
GBN	283	5	1,35 ± 0,16	0,085 (0,065 – 0,106)	0,881 (0,571 – 1,717)	3,13	1,78 (0,71 – 2,85)*	1,59 (0,74 – 3,10)*
ANP	281	5	2,27 ± 0,27	0,103 (0,079 – 0,131)	1,089 (0,703 – 2,129)	2,85	2,13 (1,65 – 2,62)*	1,96 (0,87 – 3,05)*
VDN	274	5	2,28 ± 0,27	0,117 (0,090 – 0,147)	1,223 (0,795 – 2,354)	2,19	2,46 (2,00 – 2,93)	2,20 (1,10 – 3,30)*
IRQ	276	5	1,72 ± 0,18	0,298 (0,234 – 0,379)	6,712 (3,821 – 15,323)	2,29	6,28 (6,01 – 6,54)	12,11 (10,84 – 13,38)
SMR	280	5	1,83 ± 0,18	0,308 (0,246 – 0,389)	5,794 (3,409 – 12,464)	0,89	6,51 (6,23 – 6,78)	10,45 (9,23 – 11,69)
Agupado	2199	23	1,52 ± 0,07	0,097 (0,061 – 0,139)	3,323 (1,643 – 11,169)	196,25	2,01 (1,53 – 2,50)	6,01 (5,10 – 6,91)

^a Número total de insetos usados.

^b Grau de Liberdade.

^c Erro padrão.

^d Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

^e Qui-quadrado.

^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ e CL₉₉ entre população resistente e suscetível, calculado pelo método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de confiança a 95% das CL₅₀ e CL₉₉. * Razão de resistência significante a espinetoram, já que o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0.

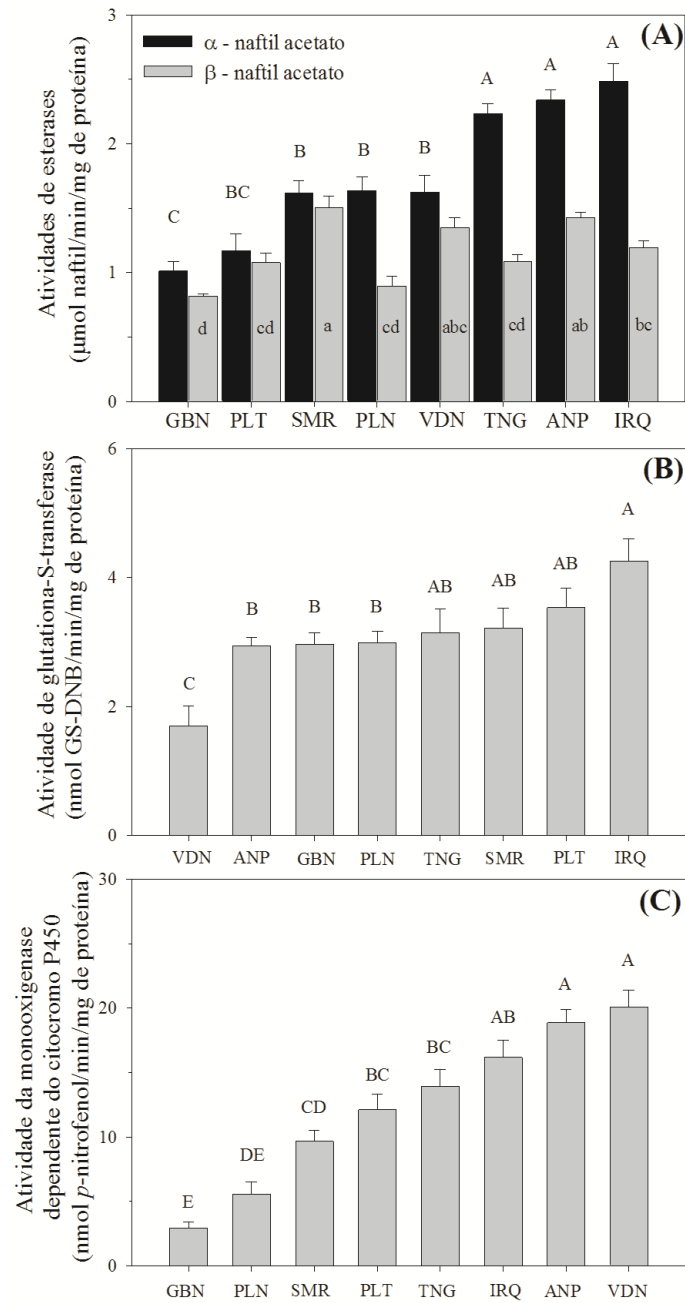


Figura 1. Atividade de esterase (α -naftil acetato [barra preta] e β -naftil acetato [barra cinza]) (A), atividade de glutatona-S-transferase (B), e atividade de monooxigenase dependente do citocromo P450 (C) de oito populações de *Tuta absoluta*. Médias seguidas pela mesma letra na barra de mesma cor não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

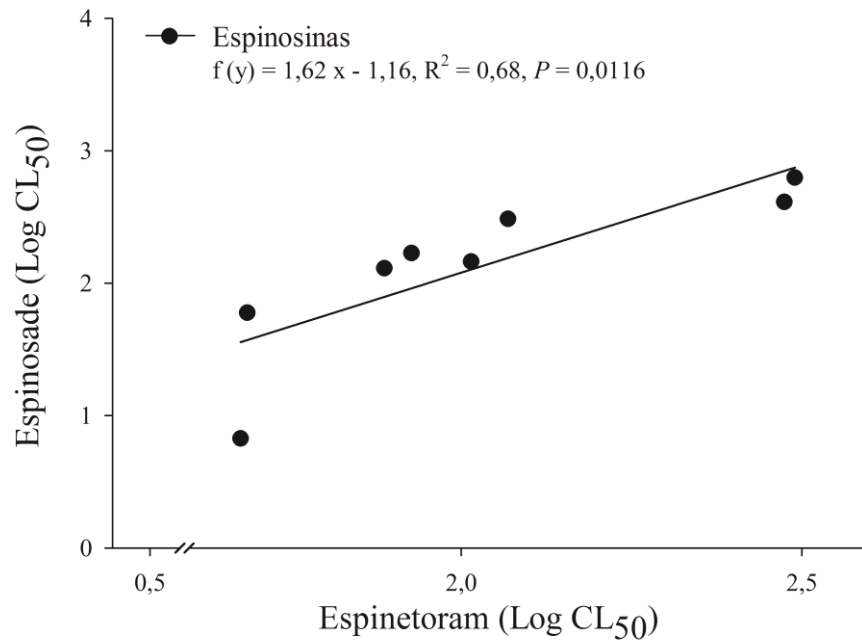


Figura 2. Correlação de Pearson entre a suscetibilidade de populações de *Tuta absoluta* a espinosade e espineteram.

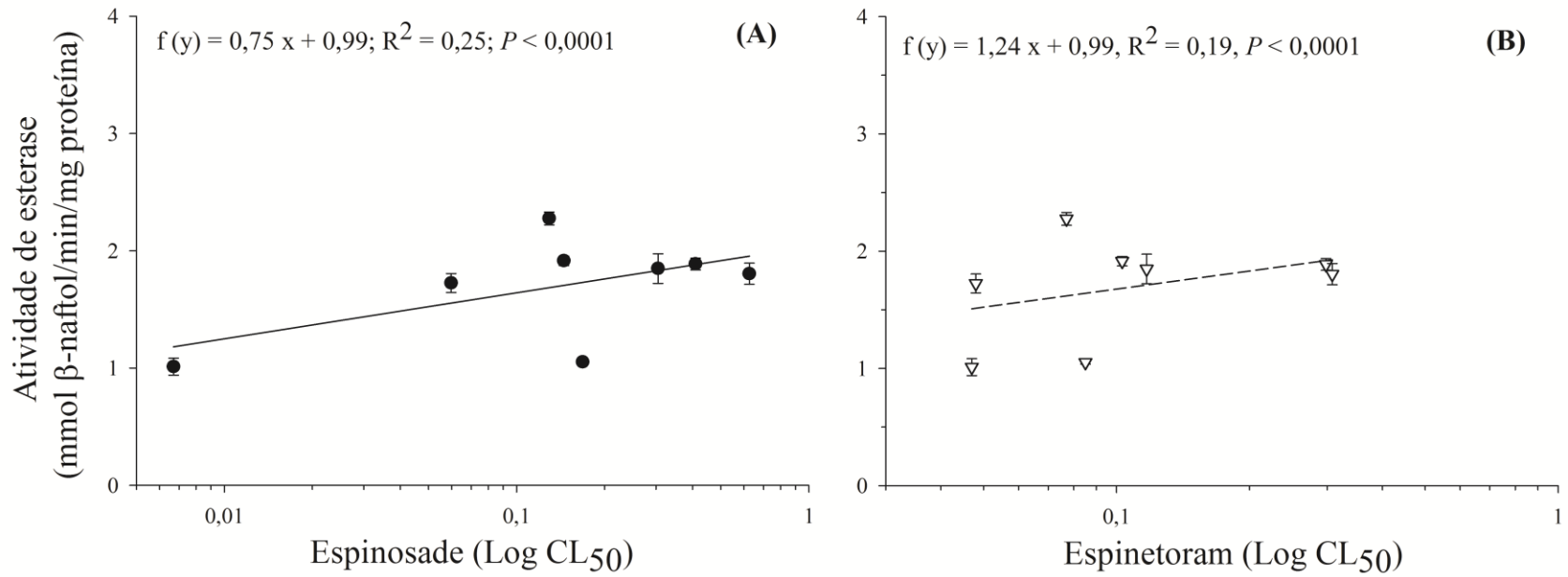


Figura 3. Linhas de regressão entre atividade de esterases e suscetibilidades de populações de *Tuta absoluta* a espinosinas.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A ESPINOSADE E RESISTÊNCIA CRUZADA¹

Mateus R. Campos², Agna R.S. Rodrigues², Tadeu B. M. Silva², Wellington M. Silva², Vitória
R. F. Silva², Herbert A. A. Siqueira²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE, Brasil.

¹Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, T.B. Silva, W.M. Silva, V.R.F. Silva & H.A.A. Siqueira. Genetic characterization of resistance of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad and cross-resistance. A ser submetido a PLoS ONE.

RESUMO – A detecção da resistência a inseticida levou à introdução de novos inseticidas no controle de *T. absoluta*. Resistência a espinosade foi encontrada no trabalho anterior de linha base de suscetibilidade de *T. absoluta*. Após a exposição de traça-do-tomateiro por sete gerações, foi observada a mais alta resistência de *T. absoluta* a espinosade (> 300 mil vezes). Dessa forma, foi realizado o estudo da herança genética e do número de genes, bem como estudos da estabilidade da resistência, dominância, herdabilidade, resistência cruzada entre as espinosinas e outras classes de inseticidas além do, acompanhamento das atividades das enzimas esterase e monooxigenase do citocromo P450 ao longo das gerações de seleção. Da primeira a sétima geração, a população selecionada em concentrações crescentes de espinosade apresentou alta herdabilidade (0,71). A análise da herança genética indicou que a resistência a espinosade na população selecionada é autossomal e incompletamente recessiva, e está associada a um gene. A razão média de mudança na ausência a inseticida foi negativa (-0,51), portanto, a população selecionada apresentou redução da resistência quando não foi mais exposta ao inseticida espinosade. A atividade de esterase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 reduziu ao longo das gerações. A população selecionada a espinosade apresentou resistência cruzada com espinetoram, outra espinosina. Entretanto, esta mesma população não apresentou resistência cruzada com outros inseticidas, incluindo inseticidas que também atuam nos receptores nicotínicos da acetilcolina. O aumento da resistência da população de traça-do-tomateiro a espinosade pode evoluir rapidamente quando a exposição é contínua e intensa. A resistência da *T. absoluta* a espinosade não é estável e o mecanismo metabólico não está associado à alta resistência.

PALAVRAS CHAVES: Herança genética; manejo da resistência; traça-do-tomateiro; alteração do sítio alvo

GENETIC CHARACTERIZATION OF RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK)
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO SPINOSAD AND CROSS-RESISTANCE

ABSTRACT – The resistance detected to insecticide took the introduction of new insecticides in the control to *T. absoluta*. Baseline of susceptibility of *T. absoluta* new insecticides was found resistance to spinosad. After exposition of population tomato pinworm, for seven generation, insecticide was observed the highest resistance *T. absoluta* to spinosad (> 300,000 times). Thus was realized study of inheritance genetic and genes number, as well as study of stability of resistance, dominance, heritability, cross-resistance between spinosyns and in others class of insecticides and enzymatic activity of esterase and monooxygenase cytochrome P450-dependent enzymes. At first the seventh generation of the selected population increasing concentrations of spinosad showed high heritability. Inheritance genetic analysed indicated that resistance to spinosad in the selected population was associated one gene, incompletely recessive and autossomal. In the absence of pressure of selection the average ratio of change in the absence to insecticide was negative (RM = -0,51). Therefore, the selected population decreased resistance when there was not more exposed to the insecticide spinosad. Esterase and monooxygenase cytochrome P450-dependent enzymatic activity was reduced over the generations. The selected populations of spinosad showed cross-resistance with spinetoram, another spinosyn. However, did not show cross-resistance with others insecticide, including insecticides that also act on the nicotinic acetylcholine receptors. The resistance increase of populations of tomato pinworm to spinosad can evolve quickly when exposition are intensive and continuous. However, the resistance of *T. absoluta* to spinosad is unstable and the metabolic mechanism is not associated with high resistance.

KEY WORDS: Inheritance genetic; resistance management; tomato pinworm, target site alteration.

Introdução

A invasiva traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), foi introduzida no início dos anos 80 no Sul do Brasil e causou grandes prejuízos na tomaticultura brasileira (Picanço *et al.* 1998). A traça-do-tomateiro ficou restrita à América do Sul até o final de 2006, quando foi detectada no Leste da Espanha, tornando-se grande ameaça para a produção de mundial tomate (Urbaneja *et al.* 2007). Em 2007, a *T. absoluta* espalhou-se para diversas localizações geográficas na Espanha, e nos anos seguintes foi encontrada nas principais áreas da Costa do Mediterrâneo, causando sérios níveis de prejuízo na produção de tomate. Em menos de sete anos a *T. absoluta* alcançou grandes distâncias geográficas e hoje está presente nos países da Europa, Norte da África e Oriente Médio (Germain *et al.* 2009, Desneux *et al.* 2010). Diante da rápida dispersão da *T. absoluta* na América do Sul e na Afro-Eurásia, existe grande probabilidade da entrada da traça-do-tomateiro nos países Orientais, como a China e a Índia, que são hoje os maiores produtores de tomate do mundo. Isto pode ocorrer principalmente se medidas fitossanitárias não forem adotadas de maneira rápida e preventiva (Desneux *et al.* 2011).

A traça-do-tomateiro usualmente causa perdas de produtividade de 80 a 100%, diminuindo a qualidade dos frutos no campo e em casas de vegetação (Desneux *et al.* 2010). As intensas aplicações de inseticida para o controle de *T. absoluta* ao longo de três décadas na América do Sul levou ao desenvolvimento de populações com resistência aos inseticidas: metamidofós, permetrina, cartape, abamectina e reguladores de crescimento (Siqueira *et al.* 2000b, 2000a, Salazar & Araya 2001, Siqueira *et al.* 2001, Lietti *et al.* 2005, Silva *et al.* 2011). Em monitoramentos mais recentes foi detectada resistência das populações de *T. absoluta* ao espinosade (Campos *et al.* Capítulo 3).

O espinosade (que pertence ao grupo das espinosinas) é composto de uma mistura de espinosina A (componente principal) e D (componente minoritário), que são produtos naturais derivados de família única das lactonas macrocíclicas (Salgado *et al.* 1998). As espinosinas são metabólitos secundários produzidos durante a fermentação do actinomiceto de solo *Sacharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao 1990). O espinosade é usado também na saúde pública e em animais com aplicações em baixas concentrações (Puinean *et al.* 2013). Embora apresente alta atividade contra espécies-praga, possui grande margem de segurança para mamíferos, aves e peixes e apresenta de baixa a moderada toxicidade para insetos não-alvo (Thompson *et al.* 2000, Campos *et al.* 2011), fato que o torna importante para a agricultura, sendo recomendado inclusive para cultivos orgânicos (Racke 2006).

A toxicidade de espinosade em insetos está associada à excitação neural generalizada ao interagir de forma única com receptores nicotínicos da acetilcolina (Salgado *et al.* 1998, Watson *et al.* 2010), além de atuar nos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) (Salgado *et al.* 1998), o que o torna uma excelente opção para o manejo de resistência a outras moléculas inseticidas. No entanto, por sua alta seletividade e falhas de controle por outras moléculas, produtores tendem a aumentar a frequência de uso de espinosade, aumentando o risco de desenvolvimento de resistência (Zhao *et al.* 2002). Apesar de quase uma década de uso do espinosade no controle de populações de *T. absoluta* na cultura do tomateiro, falhas de controle ainda não foram relatadas.

A falta de informações sobre a resposta das populações de *T. absoluta* a novos inseticidas tem direcionado pesquisas sobre linha base de suscetibilidade da traça-do-tomateiro a novos inseticidas (Roditakis *et al.* 2013, Campos *et al.* Capítulo 2, Capítulo 3). Além do levantamento da resistência da traça-do-tomateiro a inseticidas, recente pesquisa tem associado a influência do

clima e do relevo das regiões na resistência de populações de *T. absoluta* a inseticidas (Gontijo *et al.* 2013). Estas informações são de extrema importância para que o manejo da resistência seja implementado de forma preventiva. Entretanto, esses tipos de trabalho têm negligenciado os detalhes e tipos de resistência da traça-do-tomateiro a inseticidas. A base de qualquer estratégia efetiva de manejo da resistência é a compreensão dos processos envolvidos na seleção para resistência (Roush & McKenzie 1987). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os fatores-chave para a taxa de evolução da resistência da *T. absoluta* a espinosade, que incluem o número e o modo de herança de genes da resistência, a sua estabilidade, herdabilidade, dominância e a existência de resistência cruzada entre as espinosinas e entre estas e outros inseticidas, além de, especialmente, apontar a concentração discriminatória, que poderá ser utilizada para monitoramento mais preciso da resistência da traça-do-tomateiro a espinosade.

Material e Métodos

Insetos. As populações de *T. absoluta* foram coletadas em lavouras comerciais e em campos experimentais no período de 2010 a 2011 em quatro regiões do Brasil e levadas para o Laboratório de Interações Inseto-Tóxico (LIIT) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife – PE). Após ter sido feito o levantamento da suscetibilidade, apenas as populações de Iraquara-BA (IRQ) e Pelotas-RS (PLT) foram utilizadas para este trabalho. As populações de *T. absoluta* foram mantidas em laboratório à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12h.

Inseticidas. O inseticida utilizado para seleção foi o Tracer (480g i.a./L suspensão concentrada, Dow AgroSciences Industrial Ltda, Franco da Rocha, SP, Brasil). Os inseticidas utilizados para o estudo de resistência cruzada foram: abamectina (18 g i.a./L concentrado emulsionável, Syngenta

Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), cartape BR (grau técnico, 97,5%, Iharabras, Paulínia, SP, Brasil), clorantniliprole (200 g i.a./L suspensão concentrada, DuPont Brasil, Paulínia, SP, Brasil), clorfenapir (240 g i.a./L suspensão concentrada, BASF S.A, São Paulo, SP, Brasil), clorpirifós (480 g i.a./L concentrado emulsionável, Dow AgroSciences Industrial Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), indoxacarbe (300 g i.a./Kg granulado dispersível, DuPont Brasil, Barueri, SP, Brasil), permetrina (384 g i.a./L concentrado emulsionável, Mairinque, SP, Brasil), espinetoram (250 g i.a./L granulado dispersível, Dow AgroSciences, Brasil, Franco da Rocha, SP, Brazil), tiametoxam (250 g i.a./Kg granulado dispersível, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Seleção de *Tuta absoluta* com espinosade. A população de Iraquara–BA (IRQ), na quarta geração, foi dividida em duas populações. A população denominada Iraquara estabilidade (IRQ–Est) não foi exposta a nenhum outro inseticida. A outra população denominada Iraquara selecionada resistente (IRQ–Sel) foi frequentemente exposta a concentrações crescentes de espinosade a cada geração, sendo que a partir da oitava geração, a população de IRQ–Sel apresentou redução na oviposição. Desse modo, a seleção de IRQ–Sel com espinosade foi mantida na concentração de 500 mg i.a./L. O número de lagartas selecionadas por geração variou entre 1500 a 2000 lagartas. A população de Pelotas–RS suscetível (PLT–Sus) foi mantida em laboratório após estudo de suscetibilidade sem exposição a inseticidas, e usada como referência de padrão de suscetibilidade ao espinosade. A média da mortalidade da população de IRQ–Sel das gerações F₂ e F₇ foi utilizada para o cálculo da herdabilidade.

Bioensaios. Os ensaios para estimar as curvas de concentração-mortalidade foram conduzidos como descrito por Campos *et al* (Capítulo 3). As soluções inseticidas foram diluídas com água + 0,01% Triton X–100 e para o controle foi utilizada apenas água destilada + 0,01% Triton X–100.

Em cada placa de Petri foram colocadas 10 lagartas de segundo instar. As placas de Petri foram colocadas em câmara de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12h. A mortalidade das lagartas foi avaliada após 48 horas de exposição ao inseticida. O critério de mortalidade baseou-se na movimentação da lagarta após leve toque com pincel macio. A lagarta que não conseguiu se mover por pelo menos a extensão do seu comprimento foi considerada morta (Tabashnik *et al.* 1990).

Extração de proteínas. A cada geração foram coletadas 10 lagartas de terceiro instar da população selecionada resistente (IRQ–Sel) em triplicata para extração e análise das atividades enzimáticas. A quantificação de proteína foi determinada através do método do ácido bicinonínico usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985). As análises de atividade enzimáticas foram conduzidas em triplicatas para cada amostra de extrato de proteínas, perfazendo um total de nove replicatas por população.

Ensaio de esterases. A metodologia utilizada para a quantificação da atividade de esterases foi adaptada de van Asperen (1962). As curvas padrões foram preparadas com α -naftol e β -naftol. A atividade de esterase foi expressa em $\text{nmol de naftol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

Ensaio de monooxigenases dependente de citocromo P450 (*O*-demetilase). A atividade de monooxigenase dependente de citocromo P450 (*O*-desmetilação) foi determinada utilizando o substrato *p*-nitroanisol ($\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}_3$) para *p*-nitrofenol pelo método de Netter & Seidel (1964). A atividade de monooxigenase dependente de citocromo P450 por amostra foi obtida da equação linear da curva padrão estimada de absorvância em função da concentração de *p*-nitrofenol e atividade determinada em $\text{nmol de } p\text{-nitrofenol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

Genética da resistência a espinosade. Os estudos da resistência ligada ao sexo ou autossomal, do grau de dominância e da dominância baseada em concentrações foram realizados por

cruzamentos recíprocos entre machos (n =35) da população de IRQ–Sel e fêmeas (n = 35) virgens da população suscetível (PLT–Sus) e vice versa. Os adultos foram dispostos em gaiolas separadas para a produção das progênes $F_1 = \text{♀ R} \times \text{♂ S}$ e $F_1' = \text{♀ S} \times \text{♂ R}$. As lagartas de segundo instar das progênes F_1 e F_1' foram usadas para estimar curvas de concentração-mortalidade.

Para verificar se a resistência é monofatorial ou polifatorial foram usados machos (n = 35) e fêmeas (n = 35) virgens da população F_1 agrupado (F_1 e F_1') que foram retrocruzados com fêmeas (n = 35) e machos virgens (n = 35) da população parental selecionada resistente (IRQ–Sel). A decisão foi tomada mediante a comparação dos resultados das curvas concentração-mortalidade exibida pelas progênes F_1 e F_1' e dos parentais resistente (IRQ–Sel) e suscetível (PLT–Sus). As progênes F_1 e F_1' apresentaram curvas de concentração-mortalidade mais próximas da população de PLT–Sus. As progênes F_1 e F_1' foram agrupadas (F_1 agrupado) formando uma única população para o retrocruzamento. Para a produção do retrocruzamento os adultos de *T. absoluta* do F_1 agrupado (F_1 e F_1') e da população de IRQ–Sel foram colocados em gaiolas de oviposição. As lagartas de segundo instar do retrocruzamento foram utilizadas para bioensaios com 11 concentrações de espinosade, e posteriormente foram feitas análises pelo teste direto para verificar se a herança é monofatorial ou polifatorial.

A dominância baseada nas concentrações foi determinada utilizando cinco concentrações (0,005; 0,05; 0,5; 5 e 10 mg i.a./L) de espinosade para a progênie do F_1 agrupado (F_1 e F_1') (n = 180), e as populações selecionada (IRQ–Sel) (n = 135) e suscetível (PLT–Sus) (n = 177). As concentrações do espinosade foram preparadas juntamente com o Triton X–100 a 0,01% e no controle foi utilizado apenas água + Triton X–100. A mortalidade das lagartas foi avaliada após 48 horas de exposição.

Estabilidade da resistência. A população de Iraquara selecionada (IRQ–Sel) a espinosade na 13ª geração foi dividida em duas populações. A população de IRQ–Sel foi mantida sob pressão de seleção com espinosade e a outra população Iraquara estabilidade (IRQ–Est) foi conduzida na ausência de pressão de seleção. A cada geração, ambas populações foram submetidas a bioensaios como descrito anteriormente, para estimar as curvas de concentração-mortalidade.

Resistência cruzada. As lagartas de segundo instar das 15ª e 16ª gerações da população de IRQ–Sel ao espinosade foram utilizadas para bioensaios toxicológicos para verificar a existência de resistência cruzada com os inseticidas: abamectina, cartape, clorantraniliprole, clorfenapir, clorpirifós, espinetoram, indoxacarbe, tiametoxam e permetrina. Os bioensaios foram conduzidos seguindo os procedimentos descritos acima.

Análises estatísticas. As avaliações da mortalidade das populações da traça-do-tomateiro nos bioensaios para: seleção, herdabilidade, estabilidade, resistência cruzada e genética da resistência foram utilizadas para obter as concentrações letais de 50% e 90% (CL₅₀ e CL₉₀). Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de Probit a $P > 0,05$ (Finney 1971), utilizando-se o programa Polo-Plus[®] (LeOra-Software 2005). As mortalidades obtidas nos tratamentos com inseticida foram corrigidas pela fórmula de Abbott (1925). As razões de resistência foram calculadas pelo teste de razão letal e consideradas significativas quando o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade não incluiu o valor 1,0 (Robertson *et al.* 2007).

Os dados das atividades de esterases e monooxigenases dependentes de citocromo P450 foram analisados no programa SAS (SAS Institute 2001), utilizando-se os procedimentos PROC UNIVARATE e GLM para checar as premissas de normalidade e homocedasticidade de variância. Em seguida, foi feita a análise de variância (PROC ANOVA) (SAS Institute 2001) e o

teste Tukey HSD $P < 0,05$ para diferenças entre as médias das populações. A correlação de Pearson ($P < 0,05$) foi realizada (PROC CORR) (SAS Institute 2001) entre as atividades enzimáticas e as CL_{50s} das gerações seguido pela análise de regressão (PROC REG) (SAS Institute 2001).

O cálculo da herdabilidade foi feito utilizando-se a fórmula $h^2 = R/S$, onde R é a resposta de seleção e S a seleção diferencial. Para estimar o aumento da resistência em 10 vezes utilizou-se a fórmula $G = R^{-1}$ (Hartl 1988, Falconer 1989). A resposta de seleção (R) foi calculada pela fórmula $R = (L_f - L_i)/n$, onde L_f e L_i são os logaritmos das CL_{50s} da segunda e sétima geração e n é o número de geração em que a população de IRQ–Sel foi selecionada. A seleção diferencial foi calculada pela fórmula $S = i \cdot \sigma_F$, onde o i é a intensidade de seleção e σ_F é a desvio padrão fenotípico. A intensidade de seleção foi estimada por p , que é a porcentagem de sobreviventes da seleção (Falconer 1989). O desvio padrão fenotípico foi estimado usando a fórmula $\sigma_F = \frac{1}{2} \cdot (\beta_i + \beta_f)^{-1}$ (Finney 1971).

O cálculo da resposta média da população de IRQ–Est entre as gerações F_{13} e F_{18} foi realizado para o estudo da estabilidade da resistência da traça-do-tomateiro a espinosade, correspondendo à razão média de mudança na ausência a inseticida (RM), mesma fórmula utilizada para o cálculo da resposta de seleção como descrita acima. A resistência não é estável se o valor da razão média de mudança na ausência a inseticida for negativa ($RM < 0$). A fórmula $G = RM^{-1}$, utilizada para estimar o número de gerações a resistência ao inseticida pode reduzir em 10 vezes também pode ser utilizada para o cálculo da razão média de mudança na ausência de inseticida pode ser calculado (Hartl 1988, Falconer 1989).

O grau de dominância da resistência foi calculado usando-se o método de Stone (1968): $D = (2 \cdot L_2 - L_1 - L_3)/(L_1 - L_3)$, onde L_1 , L_2 e L_3 são os valores dos logaritmos das CL_{50s} das

populações de IRQ–Sel, F₁ e PLT–Sus, respectivamente. Os valores da dominância podem variar de $-1 < D < +1$, se for -1 a resistência é completamente recessiva e se for +1 a resistência é completamente dominante (Stone 1968).

A herança monofatorial ou polifatorial em *T. absoluta* inicialmente foi estimada por comparação entre as inclinações das retas do F₁ agrupado (F₁ x F₁') e do retrocruzamento. No retrocruzamento do F₁ agrupado (F₁ x F₁') com a população selecionada resistente (IRQ–Sel) foram gerados indivíduos 50% RR e 50% RS. Desse modo, no teste direto é analisado se a mortalidade observada que foi estimada no retrocruzamento ajusta-se à mortalidade esperada segundo a fórmula descrita por Tabashnik *et al.* (1990). Portanto, a mortalidade na concentração $x = \frac{1}{2} \cdot (\text{mortalidade do F}_1 \text{ agrupado [IRQ–Sel x PLT–Sus]} + \text{mortalidade da população de IRQ–Sel na concentração } x$. O valor do qui-quadrado foi calculado a partir das mortalidades observadas no retrocruzamento e das mortalidades esperadas (Sokal & Rohlf 2012): $\chi^2 = F_1 - p.n/p.q.n$, onde F₁ corresponde ao número de mortos da progênie do retrocruzamento na concentração x; p corresponde à mortalidade esperada; n corresponde ao número total de indivíduos da progênie retrocruzada; e $q = 1 - p$. Se o valor de qui-quadrado calculado para cada concentração é maior que o tabelado, considerando um grau de liberdade, a hipótese é rejeitada ($P > 0,05$), e, portanto, a herança da resistência ao inseticida é monofatorial.

O número mínimo de genes efetivos foi calculado utilizando-se o método de Lande (1981): $n_E = (L_2 - L_1)/8\sigma_s^2$, onde L₂ e L₁ são logaritmos da CL₅₀ da população resistente selecionada (IRQ–Sel) e suscetível (PLT–Sus), onde σ_s^2 foi estimada pela fórmula: $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - (\sigma_{F1}^2 + \frac{1}{2} \cdot \sigma_{P1}^2 + \frac{1}{2} \cdot \sigma_{P2}^2)$, e, σ_{B2}^2 , σ_{B1}^2 , σ_{P1}^2 e σ_{P2}^2 são as variâncias fenotípicas do F₁ agrupado, do retrocruzamento (F₁ agrupado x IRQ–Sel) da população selecionada resistente (IRQ–Sel) e

população suscetível (PLT–Sus). O retrocruzamento entre o F₁ agrupado x PLT–Sus não foi feito, desse modo considerou-se $\sigma_{B2}^2 = 0$.

Resultados

Herdabilidade de *Tuta absoluta* a espinosade. O aumento crescente na concentração para selecionar a população de IRQ–Sel ocorreu até a sétima geração, que apresentou a mais alta razão de resistência: 329045,8 vezes. A população selecionada a espinosade (IRQ–Sel) apresentou alta taxa de evolução da resistência da primeira à sétima geração. Os valores das CL_{50s} da primeira e sétima geração variaram de 0,41 a 2200,00 mg i.a./L, respectivamente. Contudo, a partir da oitava geração devido à redução na oviposição, a concentração de manutenção da população de IRQ–Sel foi mantida em 500 mg i.a./L. Dessa forma, entre a oitava e a 18ª geração da população de IRQ–Sel, as razões de resistência a espinosade se mantiveram acima de 140 mil vezes. A resposta de seleção (R) entre as gerações F₁ e F₇ foi de 0,53 e a seleção diferencial (S) foi de 0,75. A herdabilidade (h^2) entre as gerações F₁ e F₇ correspondeu a 0,71 e estima-se que o aumento de 10 vezes na razão de resistência da traça-do-tomateiro a espinosade pode ocorrer após 1,88 gerações (Tabela 1).

Estabilidade da resistência. A razão média de mudança na ausência a inseticida (RM), calculada para a população de Iraquara estabilidade (IRQ–Sel) da 13ª a 18ª geração, foi negativa de -0,51, portanto, a resistência a espinosade não é estável. A redução na razão de resistência de *T. absoluta* a espinosade em 10 vezes pode ocorrer em 1,96 gerações. Após quatro gerações sem exposição ao espinosade a população de Iraquara estabilidade (IRQ–Est) apresentou redução nos valores das CL_{50s}. Na primeira geração a população de IRQ–Est apresentou redução de 5,3 vezes (CL₅₀ = 220 mg i.a./L) na CL₅₀, quando comparada com a F₁₃ da população de IRQ–Sel (CL₅₀ =

1162 mg. i.a./L). A população de IRQ–Est apresentou redução de 39,3 vezes ($CL_{50} = 43,68$ mg i.a./L) na segunda geração, quando comparada com a 14ª geração da população IRQ–Sel ($CL_{50} = 1717$ mg i.a./L). Na terceira geração a população de IRQ–Est apresentou redução no valor da $CL_{50} = 26,62$ mg i.a./L. Na quinta geração a população de IRQ–Est apresentou valor da CL_{50} de 10,45 mg i.a./L, o que em comparação com a valor da CL_{50} de 957 mg i.a./L da 18ª geração da população de IRQ–Sel representou uma redução de 91,6 vezes (Fig. 1).

Atividade enzimática da seleção. As atividades de esterases ($n = 8$, $r = -0,65$, $P < 0,0001$) e de monooxigenase dependente de citocromo P450 ($n = 8$, $r = -0,54$, $P < 0,0001$) da população de IRQ–Sel reduziram ao longo de 18 gerações (Fig. 2).

Genética da resistência a espinosade. A população de PLT–Sus apresentou a inclinação da reta (1,18) menor em comparação com a população de IRQ–Sel (1,47), o que indica que a população suscetível (PLT–Sus) é mais heterogênea (Tabela 2). Os cruzamentos recíprocos da F_1 ($\text{♀ R} \times \text{♂ S}$) e F_1' ($\text{♀ S} \times \text{♂ R}$) apresentaram valores de CL_{50} próximos de 0,258 e 0,378 mg i.a./L, respectivamente. A hipótese nula de igualdade de ambas as curvas não foi rejeitada ($\chi^2 = 3,53$, G.L. = 2, $P > 0,05$) pelo teste de igualdade conduzido no Polo-Plus[®], portanto, conclui-se que não há ligação do sexo na resistência da traça-do-tomateiro a espinosade. Os dados de mortalidade da progênie F_1 agrupado (F_1 e F_1') foram analisados em conjunto, resultando no valor de CL_{50} de 0,312 mg i.a./L. As razões de resistência das progênies F_1 , F_1' e F_1 agrupado foram de 27,3; 40,3 e 33,2 vezes, respectivamente (Tabela 2). Dessa forma, os cruzamentos recíprocos indicam que a resistência de IRQ–Sel a espinosade é autossômica (Tabela 2).

Os graus de dominância das progênies F_1 , F_1' e F_1 agrupado, calculados com os valores de CL_{50} , foram de -0,45; -0,39 e -0,42, respectivamente. Já os graus de dominância das progênies F_1 , F_1' e F_1 agrupado com os valores de CL_{90} foram de -0,52; -0,47 e -0,49, respectivamente. Os

graus de dominância calculados indicam que a dominância da população de IRQ–Sel a espinosade é incompletamente recessiva (Tabela 2).

A inclinação da reta estimada para a população do retrocruzamento (0,57) foi significativamente diferente entre as populações selecionada resistente (IRQ–Sel), suscetível (PLT–Sus), F_1 , F_1' e F_1 agrupado. Desse modo, ocorreu aumento na variação genética no retrocruzamento (Tabela 2).

O teste direto para o modo monofatorial da herança da resistência indicou que os desvios obtidos entre as mortalidades esperadas e observadas não foram significativos ($\Sigma\chi^2 = 14,88$, GL = 10) para as 11 concentrações testadas (Tabela 2 e Fig. 1). O número efetivo mínimo de genes que influencia a resistência de IRQ–Sel a espinosade foi de $n_E = 0,63$ (Tabela 3).

Dominância baseada nas concentrações. Dentre as cinco concentrações utilizadas para o cálculo da dominância baseada nas concentrações para a população de IRQ–Sel, a resistência foi funcionalmente dominante ($h = 1$) nas duas menores concentrações (0,005 e 0,05 mg i.a./L). Na concentração intermediária (0,5 mg i.a./L) a resistência foi incompletamente recessiva ($h = 0,42$), e nas duas maiores concentrações (5 e 10 mg i.a./L) a resistência foi funcionalmente recessiva ($h = 0$) (Tabela 4).

Resistência cruzada. O espinetoram apresentou aumento na razão de resistência de 4007 vezes, quando comparado como os bioensaios feitos na F_5 da população suscetível (PLT–Sus) e na F_{15} da população resistente selecionada (IRQ–Sel). O neonicotinoide tiametoxam apresentou aumento na razão de resistência 9,9 vezes entre a F_{19} da população de PLT–Sus e a F_{16} da população IRQ–Sel [($CL_{50} = 775,67$ mg i.a./L) para ($CL_{50} = 3573,35$ mg i.a./L)]. O clorfenapir apresentou aumento da CL_{50} de 0,62 para 3,8 mg i.a./L da nona geração da população de PLT–Sus a 16ª geração da população de IRQ–Sel ($RR_{50} = 6,16$). O organofosforado clorpirifós

apresentou aumento na razão de resistência de 5,5 vezes entre a primeira geração da população de PLT–Sus e a 16ª geração de IRQ–Sel. A população de IRQ–Sel apresentou aumento inferior a duas vezes na razão de resistência aos demais inseticidas: permetrina ($RR_{50} = 1,99$), abamectina ($RR_{50} = 1,73$) e cartape ($RR_{50} = 1,13$) (Tabela 5). Entretanto, dois inseticidas apresentaram redução nos valores das CL_{50s} , o clorantraniliprole redução de 9,05 para 0,42 $\mu\text{g i.a./L}$ e o indoxacarbe redução de 2,85 para 1,19 $\mu\text{g i.a./L}$ (Tabela 5).

Discussão

O levantamento da suscetibilidade de populações de *T. absoluta* em diversas regiões do Brasil a espinosinas foi realizado recentemente e foram detectadas populações resistentes ao espinosade (Campos *et al.* Capítulo 3). A alta resistência encontrada em população de *T. absoluta* direcionou a pesquisa para a seleção a espinosade. A população de traça-do-tomateiro de Iraquara–BA foi selecionada (IRQ–Sel) por sete gerações e apresentou a mais alta resistência já encontrada para *T. absoluta* a espinosade (< 300 mil vezes), o mesmo ocorrendo quando comparada com as demais classes de inseticidas. O potencial risco do desenvolvimento da resistência da *T. absoluta* a espinosade poder ser observado na estimativa da herdabilidade (Sayyed *et al.* 2000). A herdabilidade da resistência a espinosade foi estimada para a população selecionada (IRQ–Sel) em 0,71, o que indica que a resistência da traça-do-tomateiro pode desenvolver-se rapidamente. O alto valor da herdabilidade da resistência a espinosade ocorreu devido à alta variação fenotípica e à variação genética aditiva. Entretanto, na oitava geração foi observado que a oviposição reduziu drasticamente, o que levou a manter uma concentração de seleção em 500 mg i.a./L de espinosade. A redução pode estar associada ao custo adaptativo da resistência da traça-do-tomateiro a espinosade. O custo adaptativo foi investigado em

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) comparando a população suscetível e a resistente, que foi selecionada por 15 gerações a espinosade. Além da redução da sobrevivência e tempo de desenvolvimento foi observado também redução na oviposição (Wang *et al.* 2010). O custo adaptativo pode estar associado diretamente a alelos que retardam a resistência no campo (Tabashnik 1994).

O custo adaptativo da resistência a espinosade também pode ser a causa da instabilidade da resistência da *T. absoluta*. A população resistente que não foi mais exposta ao espinosade (IRQ–Est) apresentou razão média de mudança na ausência a inseticida negativa ao longo de cinco gerações. Desse modo, foi estimado que tanto o aumento quanto a redução em 10 vezes na razão de resistência a espinosade podem ocorrer em aproximadamente duas gerações. Portanto, tem-se que a resistência da traça-do-tomateiro a espinosade não é estável para o espinosade. Em outros trabalhos, a instabilidade da resistência a espinosade das populações de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) também foi associada ao custo adaptativo (Ferguson 2004, Sayyed *et al.* 2008).

A herança da resistência a espinosade pode variar de dominante a recessiva como observados para diferentes espécies-praga (Sparks *et al.* 2012). Nos resultados obtidos para a caracterização do modo herança da *T. absoluta* a espinosade, os valores das CL_{50s} das progênes F_1 e F_1' ficaram próximos da população suscetível (PLT–Sus) e, baseado nos cálculos, foi verificado que a dominância da resistência a espinosade é incompletamente recessiva. Ainda com suporte nos dados dos cruzamentos recíprocos, quando analisados os valores das CL_{50s} e as inclinações das retas das progênes F_1 e F_1' não foi observada diferença significativa entre elas, portanto, a resistência da traça-do-tomateiro a espinosade é autossomal. Na maioria das pesquisas sobre o modo de herança da resistência de diversas espécies-praga resistentes a

espinosade, esta se apresentou resistência incompletamente recessiva e autossomal (Zhao *et al.* 2002, Sparks *et al.* 2012). Portanto, a permanência de populações de *T. absoluta* suscetíveis na área de plantio de tomate é fundamental para que não ocorra a evolução da resistência a espinosade (Roush 1989).

O estudo da herança monofatorial e polifatorial da resistência pode ser feito através da comparação da inclinação da reta do retrocruzamento e dos parentais resistente e suscetível e também através do teste direto (Tabashnik 1991). A inclinação da reta do retrocruzamento foi menor em comparação com a população parental resistente (IRQ–Sel), ocorrendo aumento na variabilidade genética, o que pode ser considerado indicativo da resistência a espinosade ser monofatorial. A confirmação foi realizada através do teste direto em que todas as concentrações testadas se ajustaram ao modelo de herança monofatorial. Portanto, a herança da resistência da *T. absoluta* a espinosade é controlada por um fator. Resistência monofatorial ocasionalmente é produzida em laboratório, apenas quando a população coletada no campo foi exposta previamente a determinadas classes de inseticidas ou quando já apresentou resistência cruzada. Dessa forma, a herança monofatorial observada para a população de *T. absoluta* selecionada (IRQ–Sel) a partir da quarta geração pode ter sido reflexo da resposta de campo.

Além do conhecimento do fator que caracteriza o modo de herança da resistência a espinosade é importante conhecer a quantidade de genes que estão envolvidos na resistência ao inseticida. Portanto, no presente estudo foi observado que um gene está envolvido na resistência da *T. absoluta* a espinosade. A resistência a inseticida quando determinada por um gene pode ser atribuída, em alguns casos, ao mecanismo metabólico em que a enzima atua na destoxificação do inseticida (Georghiou 1969). No Chile a resistência das populações de *T. absoluta* a espinosade foi atribuída à enzima monooxigenase dependente do citocromo P450 (Reyes *et al.* 2012). Em

nossa pesquisa anterior, as CL_{50s} das populações brasileiras de traça-do-tomateiro resistente a espinosade apresentaram correlações com a atividade da β -esterase, indicando que poderia haver o envolvimento da esterase na destoxificação do espinosade (Campos *et al.* Capítulo 3). Entretanto, como foi observado nos resultados do presente trabalho, a atividade das enzimas esterase e monooxigenase dependente do citocromo P450 reduziu ao longo de 18 gerações em que a população de *T. absoluta* foi selecionada a espinosade (IRQ–Sel). Portanto, conclui-se que o mecanismo metabólico não está associado com a resistência da *T. absoluta* a espinosade. A resistência a espinosade conferida por um gene pode estar relacionada ao mecanismo comportamental, fisiológico e à redução da sensibilidade do sítio de ação. Entretanto, a maioria dos estudos com populações resistentes a espinosade associa a redução da sensibilidade do sítio de ação como o fator principal da resistência a esta espinosina (Sparks *et al.* 2012). Em outras pesquisas, constatou-se que mutações estão associadas a resistência de espécies-praga a espinosade, conferindo redução na sensibilidade do sítio de ação, e estas mutações, localizam-se em regiões cromossômicas que engloba 29 genes (Salgado & Saar 2004, Salgado & Sparks 2005).

O espinosade e o espinetoram apresentaram resistência cruzada, entretanto, não foi verificada resistência cruzada do espinosade a outras classes de inseticidas. Do mesmo modo, em outra pesquisa foi demonstrada resistência cruzada entre as espinosinas, mas não para outras classes de inseticidas (Watson *et al.* 2010). Desde a descoberta das espinosinas, algumas linhas de pesquisas têm atribuído a resistência cruzada entre as espinosinas, quando resistência está associada a redução da sensibilidade do sítio de ação, em um novo sítio de ação (Salgado & Sparks 2005). Nestas mesmas pesquisas, as populações resistentes a espinosinas não apresentaram resistência cruzada a outras classes de inseticidas, incluindo os neonicotinoides e

análogos de nereistoxina, que também atuam nos receptores nicotínico da acetilcolina (Orr *et al.* 2009).

A caracterização genética da resistência de *T. absoluta* a espinosade pode retardar a evolução da resistência a inseticida. O manejo da resistência a inseticida se for implementado de forma adequada pode prolongar a vida útil de prateleira do espinosade. Inicialmente, é importante utilizar ferramentas geradas no presente trabalho para que seja feito o levantamento da existência e a frequência de indivíduos resistentes na área de plantio de tomate. O levantamento da existência e a frequência de indivíduos resistentes podem ser realizados através da concentração discriminatória de 5 mg i.a./L de espinosade. Outra informação importante se refere à natureza recessiva da resistência a espinosade, que permite o uso contínuo das espinosinas no controle da traça-do-tomateiro no campo, todavia, alguns cuidados devem ser tomados. Dentro das táticas do manejo da resistência é de extrema importância a manutenção de populações de *T. absoluta* suscetíveis na área de cultivo de tomate. Tática de manejo da resistência a inseticida comumente difundida, que auxilia na redução da evolução da resistência a inseticida, é a rotação de produtos com modos de ação diferentes das espinosinas. Entretanto, mediante a pesquisa sobre a existência de resistência cruzada entre os inseticidas estudados, a rotação com produtos de diferentes modos de ação pode ser realizada de forma correta. Portanto, a melhor forma de se combater a evolução da resistência a espinosade seria alternar as espinosinas com as diamidas e as oxidiazinas. Contudo, nada impede que a rotação de modos de ação seja realizada com outras classes de inseticidas como: análogos de nereistoxina, piretróides, organofosforados, análogos do pirazol, avermectinas e neonicotinóides.

O intenso uso de inseticida para o controle da traça-do-tomateiro nos cultivos de tomate levou ao aparecimento de populações resistentes a inseticida. O presente estudo representa o primeiro

trabalho da caracterização genética da resistência de *T. absoluta* a espinosade. As informações quanto à resistência a espinosade ser recessiva, autossomal e associada a um gene são importantes para que o programa de manejo seja implementado de maneira mais eficaz no controle *T. absoluta*. As informações geradas neste trabalho podem ser usadas não apenas na América do Sul, mas também na Europa, Norte da África e Oriente Médio, uma vez que existe a probabilidade de indivíduos da traça-do-tomateiro apresentando altas frequências de resistência a espinosade terem sido introduzidos nestes países (Cifuentes *et al.* 2011). Nada obstante, mais informações sobre a resistência a espinosade são necessárias para identificar que tipo de resistência ocorre em *T. absoluta*. Assim, o manejo da resistência a inseticidas pode ser implementado com precisão, reduzindo o risco da evolução da resistência. Ademais, controles biológicos e culturais, a exemplo da eliminação de restos culturais de tomate depois da colheita e rotação de cultura, podem ajudar na mitigação da resistência (Guedes & Picanço 2012).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à fundação CAPES (Ministério da Educação) pelo suporte financeiro e bolsa de estudo ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq). Ao IRAC–BR, Dow Agrochemical CO, pelo suporte e doação das formulações de inseticidas, ao Prof. Uemerson S. da Cunha e ao Engenheiro Agrônomo Celso Ogassawara, pela coleta de material em campo

Literatura citada

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18 265-267.

- Campos, M.R., M.C. Picanço, J.C. Martins, A.C. Tomaz & R.N.C. Guedes. 2011.** Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Protect.* 30: 1535-1540.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. Capítulo 2.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. Submetido à *Pest Management Science*.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. Capítulo 3.** Resistance of Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosyns. Submetido à *Journal of Economic entomology*.
- Cifuentes, D., R. Chynoweth & P. Bielza. 2011.** Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. *Pest Manage. Sci.* 67: 1155-1162.
- Desneux, N., M.G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narvaez-Vasquez, J. Gonzalez-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83: 197-215.
- Falconer, D.S. 1989.** Introduction to quantitative genetics. 3^a ed. New York, Longman, 365p.
- Ferguson, J.S. 2004.** Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. *J. Econ. Entomol.* 97: 112-119.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis. 3^a ed. London, Cambridge University Press, 333p.
- Georghiou, G.P. 1969.** Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 26: 224-255.
- Germain, J.F., A.I. Lacordaire, C. Cocquempot, J.M. Ramel & É. Oudard. 2009.** A new tomato pest in France: *Tuta absoluta*. *PHM Revue Horticole*: 37-41.

- Gontijo, P.C., M.C. Picanço, E.J.G. Pereira, J.C. Martins, M. Chediak & R.N.C. Guedes. 2013.** Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Ann. Appl. Biol.* 162: 50-59.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPA Bulletin* 42: 211-216.
- Hartl, D.L. 1988.** A primer of population genetics. 2 ed. Sunderland, MA, Sinauer, 305p.
- Lande, R. 1981.** The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541-553.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA. computer program, version By LeOra-Software.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- Mertz, F.P. & R.C. Yao. 1990.** *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from Soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 34-39.
- Netter, K.J. & G. Seidel. 1964.** An adaptively stimulated *O*-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146: 61-65.
- Orr, N., A.J. Shaffner, K. Richey & G.D. Crouse. 2009.** Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pestic. Biochem. Physiol.* 95: 1-5.
- Picanço, M., G.L.D. Leite, R.N.C. Guedes & E.A. Silva. 1998.** Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. *Crop Protect.* 17: 447-452.
- Puinean, A.M., S.J. Lansdell, T. Collins, P. Bielza & N.S. Millar. 2013.** A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J. Neurochem.* 124: 590-601.
- Racke, K.D. 2006.** A reduced risk insecticide for organic agriculture: spinosad case study, pp. 92-108, *Crop protection products for organic agriculture*, vol. 947. American Chemical Society.
- Reyes, M., K. Rocha, L. Alarcón, M. Siegwart & B. Sauphanor. 2012.** Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102: 45-50.

- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & Savin, N.E. 2007.** Pesticide bioassays with arthropods. 2^a ed. Boca Raton, FL, CRC Press Taylor & Francis Group, 200p.
- Roditakis, E., C. Skarmoutsou, M. Staurakaki, M. del Rosario Martínez-Aguirre, L. García-Vidal, P. Bielza, K. Haddi, C. Rapisarda, J.-L. Rison, A. Bassi & L.A. Teixeira. 2013.** Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method. *Pest Manage. Sci.* 69: 217–227.
- Roush, R. & J. McKenzie. 1987.** Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Roush, R.T. 1989.** Designing resistance management programs: How can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-441.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. *Agricultura Técnica* 61: 429-435.
- Salgado, V.L. & R. Saar. 2004.** Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J. Insect Physiol.* 50: 867-879.
- Salgado, V.L. & T.C. Sparks. 2005.** 6.5 - The Spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of Action, and Resistance, pp. 137-173. In I.G. Editors-in-Chief: Lawrence, I. Kostas & S.G. Sarjeet (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam.
- Salgado, V.L., J.J. Sheets, G.B. Watson & A.L. Schmidt. 1998.** Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 103-110.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- Sayyed, A.H., J. Ferre & D.J. Wright. 2000.** Mode of inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in a diamondback moth (*Plutella xylostella*) population from Malaysia. *Pest Manage. Sci.* 56: 743-748.
- Sayyed, A.H., S. Saeed, M. Noor-ul-ane & N. Crickmore. 2008.** Genetic, Biochemical, and Physiological Characterization of Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 1658-1666.

- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.** Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manage. Sci.* 67: 913-920.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000a.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000b.** Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). *J. Appl. Entomol.* 124: 233-238.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manage.* 47: 247-251.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Sokal, R. & F. Rohlf. 2012.** *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* 4 ed. New York, W.H. Freeman and Company, 937p.
- Sparks, T.C., J.E. Dripps, G.B. Watson & D. Paroonagian. 2012.** Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102: 1-10.
- Stone, B.F. 1968.** A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. W.H.O.* 38: 325-326.
- Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *J. Econ. Entomol.* 84: 703-712.
- Tabashnik, B.E. 1994.** Evolution of Resistance to *Bacillus Thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Thompson, G.D., R. Dutton & T.C. Sparks. 2000.** Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manage. Sci.* 56: 696-702.
- Urbaneja, A., R. Vercher, V. Navarro, F. García Marí & J. Porcuna. 2007.** La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma Española* 194: 16–23.

- van Asperen, K. 1962.** A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401-416.
- Wang, D., X. Qiu, H. Wang, K. Qiao & K. Wang. 2010.** Reduced fitness associated with spinosad resistance in *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica* 38: 103-110.
- Watson, G.B., S.W. Chouinard, K.R. Cook, C. Geng, J.M. Gifford, G.D. Gustafson, J.M. Hasler, I.M. Larrinua, T.J. Letherer, J.C. Mitchell, W.L. Pak, V.L. Salgado, T.C. Sparks & G.E. Stilwell. 2010.** A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 376-384.
- Zhao, J.Z., Y.X. Li, H.L. Collins, L. Gusukuma-Minuto, R.F. Mau, G.D. Thompson & A.M. Shelto. 2002.** Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.* 95: 430-436.

Tabela 1. Estimativa da herdabilidade (h^2) da resistência da população de *Tuta absoluta* selecionada a espinosade (IRQ–Sel) (F₁ – F₇).

Inseticida	Estimativa da resposta			Estimativa da seleção diferencial							
	CL ₅₀ inicial (Log) (mg i.a./L)	CL ₅₀ final (Log) (mg i.a./L)	R	p (%)	i^*	Inclinação inicial	Inclinação final	σ_F	S	G	h^2
Espinosade	0,41 (-0,39)	2200,00 (3,34)	0,53	31,25	1,12	1,85	1,16	0,66	0,75	1,88	0,71

* i = Intensidade de seleção (Falconer 1989).

Tabela 2. Toxicidade de espinosade para populações suscetível, resistente, dos cruzamentos recíprocos F1 (♀R x ♂S) e (♀S x ♂R) e do retrocruzamento (F1 agrupado x IRQ–Sel) de *Tuta absoluta*.

Populações	G ^b	n (GL) ^b	Inclinação ± EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	RR ₅₀ (IC95%) ^e	GD ₅₀ ± EP ^f	CL ₉₀ (IC95%) ^d	RR ₉₀ (IC95%) ^e	GD ₉₀ ± EP ^f	χ ^{2g}
PLT–Sus	F ₁₆	320 (6)	1,18 ± 0,13	0,0094 (0,007 - 0,013)	1,00 (0,81 - 1,19)		0,113 (0,071 - 0,222)	1,00 (0,81 - 1,19)		5,32
IRQ–Sel	F ₁₅	238 (4)	1,47 ± 0,19	1717,3 (998,00 - 2764,00)	183122,81 (183123,17 - 182847,10)		12730,00 (6481,00 - 56151,00)	1354308,97 (1354309,17 - 1354309,25)		5,46
F ₁ = ♂ S x ♀ R	F ₁	216 (5)	1,51 ± 0,19	0,2577 (0,167 - 0,388)	27,27 (27,65 - 27,44)	-0,45 ± 0,03	1,81 (1,02 - 4,98)	15,96 (27,65 - 27,44)	-0,52 ± 0,06	5,32
F ₁ ' = ♂ R x ♀ S	F ₁	211 (5)	1,60 ± 0,19	0,3784 (0,250 - 0,588)	40,31 (40,12 - 40,29)	-0,39 ± 0,03	2,38 (1,30 - 7,16)	21,03 (20,68 - 21,37)	-0,47 ± 0,06	5,83
F ₁ agrupado	F ₁	427 (5)	1,55 ± 0,13	0,312 (0,213 - 0,457)	33,15 (33,48 - 33,25)	-0,42 ± 0,02	2,11 (1,22 - 5,32)	18,67 (18,34 - 18,94)	-0,49 ± 0,05	9,18
F ₁ agrupado x IRQ–Sel	F ₁	347 (9)	0,57 ± 0,05	18,148 (9,403 - 35,359)	1947,35 (1947,03 - 1947,66)		4314,1 (1479,10 - 18945,00)	38374,52 (38373,96 - 38375,12)		7,21

^a número de gerações das populações de *T. absoluta*

^b número de adultos testados e GL, grau de liberdade;

^c Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade;

^d Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

Razão de tolerância: razão da CL₅₀ e CL₉₀ estimada entre as populações tolerantes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson and Preisler (1992) e a razão do intervalo de confiança de a 95%. * A razão de tolerância significativa porque o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0;

^f Grau de dominância;

^g χ², teste de qui-quadrado.

Tabela 3. Teste direto de herança monogênica da resistência de *Tuta absoluta* a espinosade por comparação da mortalidade observada e esperada do retrocruzamento (F1 agrupado x IRQ–Sel).

Concentração (mg i.a./L)	Mortalidade Observada (%)	Mortalidade Esperada (%) ^a	χ^2	<i>P</i>
0,04	0,00	0,00	0,00	1,00 ^{ns}
0,08	6,90	8,62	0,11	0,74 ^{ns}
0,32	22,58	18,33	0,37	0,54 ^{ns}
1,28	25,00	37,27	2,06	0,15 ^{ns}
3,052	38,46	52,00	2,86	0,09 ^{ns}
12,207	53,33	50,00	0,13	0,72 ^{ns}
48,828	63,89	50,00	2,78	0,10 ^{ns}
195,313	66,67	50,00	3,33	0,07 ^{ns}
781,25	86,67	77,50	1,45	0,23 ^{ns}
3125	83,33	80,00	0,21	0,65 ^{ns}
12500	90,00	95,00	1,58	0,21 ^{ns}
Total			$\Sigma\chi^2 = 14,89$	0,14 ^{ns}

^{ns} Diferença não significativa para $P > 0,05$

^a Mortalidade esperada da concentração $x = 0,5$ (% mortalidade do F1 agrupado em $x +$ % mortalidade da população suscetível em x).

Tabela 4. Dominância baseada nas concentrações (h) da resistência de lagartas de segundo instar *Tuta absoluta* ao espinosade.

Concentração (mg i.a./L)	Populações ^a	n ^b	Mortalidade (%)	Desempenho ^c	h^d
0,005	IRQ–Sel	19	0,00	1,00	1,00
	PLT	29	3,45	0,97	
	F1 agrupado	30	0,00	1,00	
0,05	IRQ–Sel	25	0,00	1,00	1,00
	PLT	28	25,00	0,75	
	F1 agrupado	29	0,00	1,00	
0,5	IRQ–Sel	22	0,00	1,00	0,42
	PLT	30	100,00	0,00	
	F1 agrupado	31	58,06	0,42	
5	IRQ–Sel	21	0,00	1,00	0,00
	PLT	29	100,00	0,00	
	F1 agrupado	30	100,00	0,00	
10	IRQ–Sel	29	13,79	0,86	0,00
	PLT	31	100,00	0,00	
	F1 agrupado	30	100,00	0,00	

^a População de *T. absoluta* resistente (IRQ–Sel), suscetível (PLT) e progênie da F₁ e F₁' (♂ PLT x ♀ IRQ–Sel e ♀ PLT x ♂ IRQ–Sel) quando exposta a espinosade.

^b Número total de insetos usados.

^c Desempenho corresponde a porcentagem de sobreviventes entre as populações suscetível PLT e F1 agrupado, e a população resistente IRQ–Sel.

^d Os valores de h variam entre 0 (recessividade completa) e 1 (dominância completa). Se os valor de h corresponde a 0,5 (co-dominante ou aditivo) ou está entre $0 < h < 0,5$ (recessividade incompleta) e $0,5 < h < 1$ (dominância incompleta).

Tabela 5. Espectro de resistência cruzada a espinosade para a população IRQ–Sel de *Tuta absoluta*.

Populações Inseticidas	Geração	n ^a	χ^2 (GL) ^b	CL ₅₀ (IC95%) (mg i.a./L)	Inclinação ± EP	RR ₅₀ (IC95%)
PLT–Sus						
Espinosade	F ₁₅	320	5,32 (6)	9,40 (6,74 – 12,70)*	1,18 ± 0,13	
Espinetoram	F ₅	290	4,77 (6)	0,049 (0,032 – 0,065)	2,34 ± 0,38	
Abamectina	F ₉	267	0,74 (5)	1,64 (1,22 – 2,12)	1,96 ± 0,23	
Clorantniliprole	F ₁	279	3,44 (5)	9,05 (6,87 – 11,55)*	1,70 ± 0,19	
Cartape	F ₉	277	0,71 (5)	93,12 (64,83 – 121,13)	2,52 ± 0,39	
Clorfenapir	F ₉	283	1,64 (5)	0,62 (0,45 – 0,76)	3,00 ± 0,52	
Indoxacarbe	F ₉	270	3,75 (5)	2,85 (2,08 – 3,81)	1,34 ± 0,16	
Tiametoxam	F ₁₉	308	4,70 (5)	775,67 (567,87 – 1013,01)	1,63 ± 0,18	
Permetrina	F ₁	335	7,04 (6)	332,40 (202,89 – 518,68)	1,84 ± 0,25	
Clorpirifós	F ₁	266	4,62 (5)	173,67 (114,05 – 234,68)	2,04 ± 0,31	
IRQ–Sel						
Espinosade	F ₁₆	238	5,46 (4)	1717,30 (998,16 – 2764,20)	1,47 ± 0,19	183123,0 (183122,8 – 183123,2)
Espinetoram	F ₁₅	211	2,32 (4)	195,94 (140,94 – 261,88)	1,62 ± 0,23	4007,0 (4006,8 – 4007,2)
Abamectina	F ₁₅	282	2,15 (6)	2,85 (2,12 – 3,66)	1,66 ± 0,18	1,73 (1,57 – 1,90)
Clorantniliprole	F ₁₅	244	1,26 (5)	0,42 (0,30 – 0,55)*	1,80 ± 0,22	0,05 (0,04 – 0,06)
Cartap	F ₁₅	243	0,32 (4)	105,34 (72,22 – 164,21)	1,21 ± 0,20	1,13 (0,92 – 1,35)
Clorfenapir	F ₁₆	432	3,86 (5)	3,80 (2,94 – 4,89)	1,19 ± 0,12	6,16 (5,95 – 6,39)
Indoxacarbe	F ₁₆	313	6,64 (6)	1,19 (0,73 – 1,72)	1,68 ± 0,19	0,42 (0,23 – 0,60)
Tiametoxam	F ₁₆	212	4,40 (4)	3573,35 (2414,90 – 5147,74)	1,91 ± 0,23	9,89 (9,69 – 10,09)
Permetrina	F ₁₆	238	2,12 (5)	662,07 (497,68 – 864,87)	1,62 ± 0,19	1,99 (1,81 – 2,18)
Clorpirifós	F ₁₆	299	4,75 (5)	951,97 (758,56 – 1221,65)	1,82 ± 0,19	5,49 (5,31 – 5,67)

* Micrograma ingrediente ativo espinosade por litro (μg i.a./L)

^a número de adultos testados;

^b χ^2 teste de qui–quadrado e GL grau de liberdade.

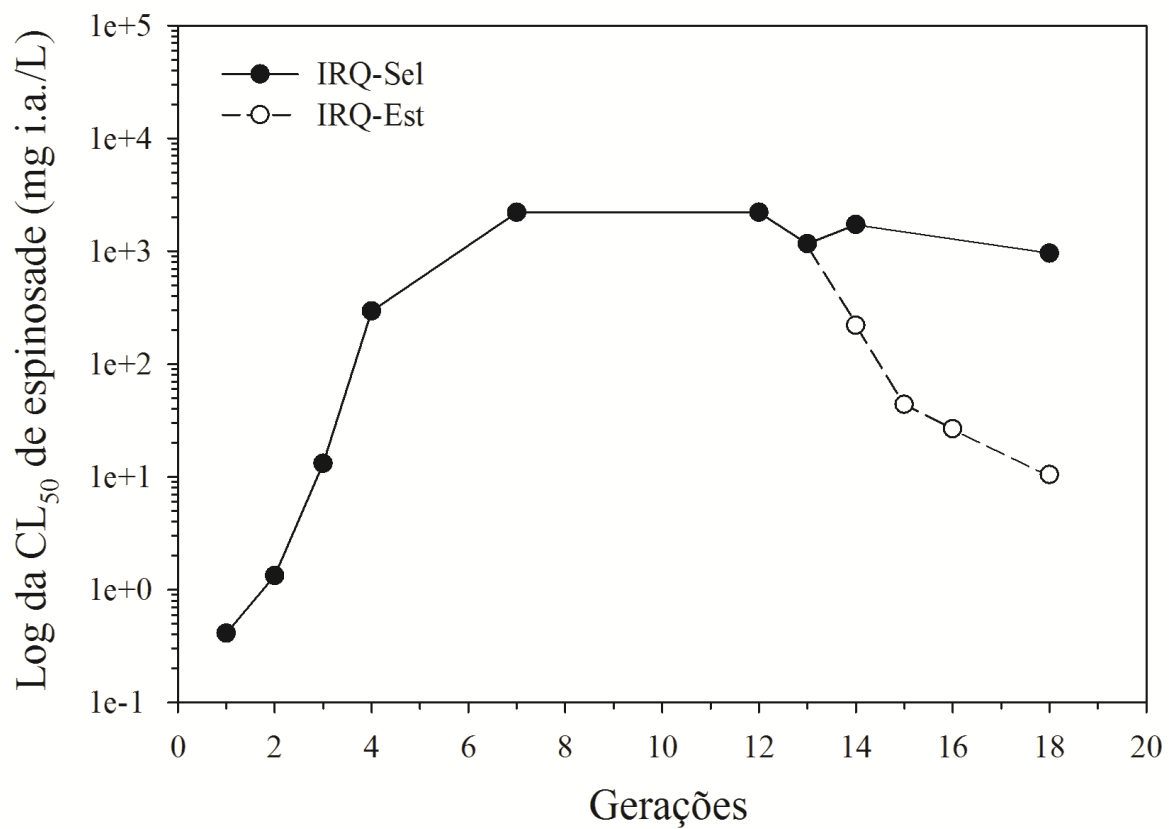


Figura 1. Seleção da população de *Tuta absoluta* de Iraquara–BA a espinosade (circulo cheio) e estabilidade da resistência sem a pressão de seleção na população de Iraquara resistente a espinosade (circulo vazio).

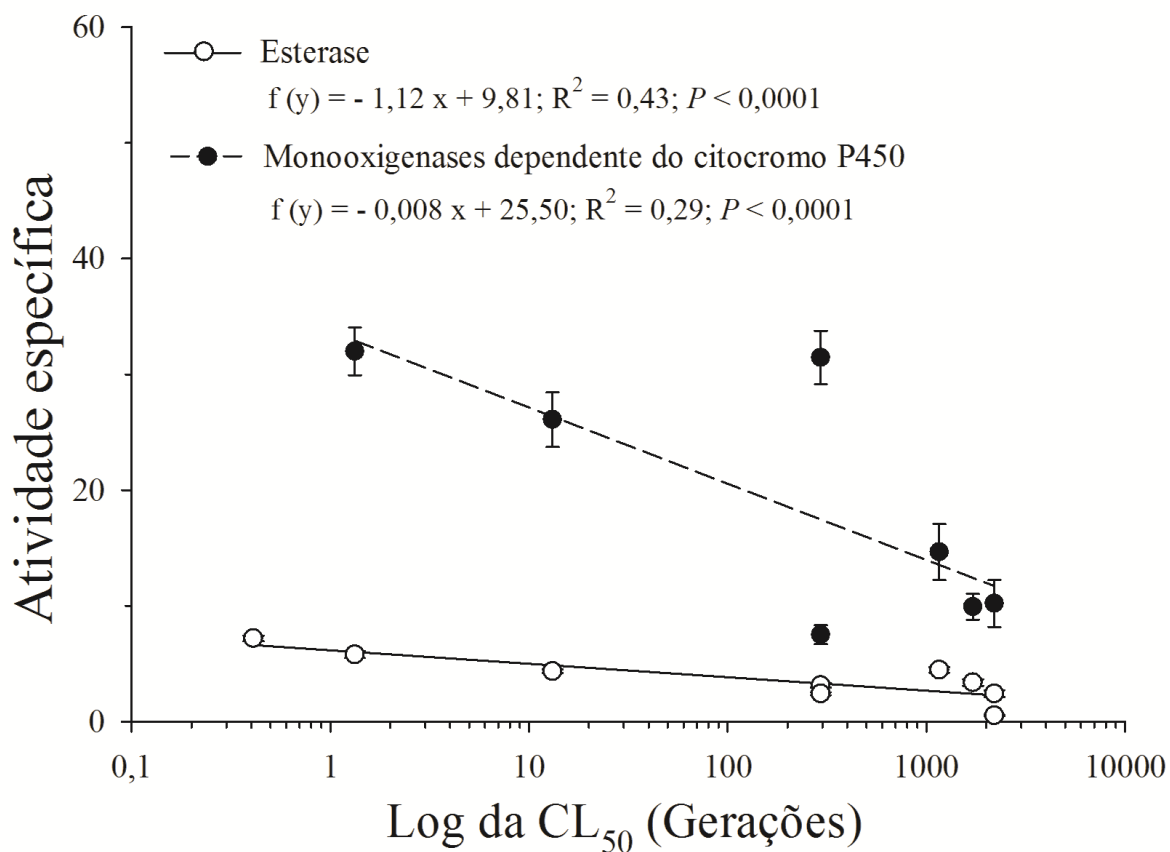


Figura 2. Regressão linear da atividade esterase ($\mu\text{mol } \alpha\text{-naftol/min/mg}$ de proteína) e monooxigenases dependentes de citocromo P450 (nmol/min/mg de proteína) o logaritmo da CL_{50} (mg i.a./L) da população de *Tuta absoluta* de Iraquara-BA (IRQ-Sel) exposta ao espinosade por 14 gerações.

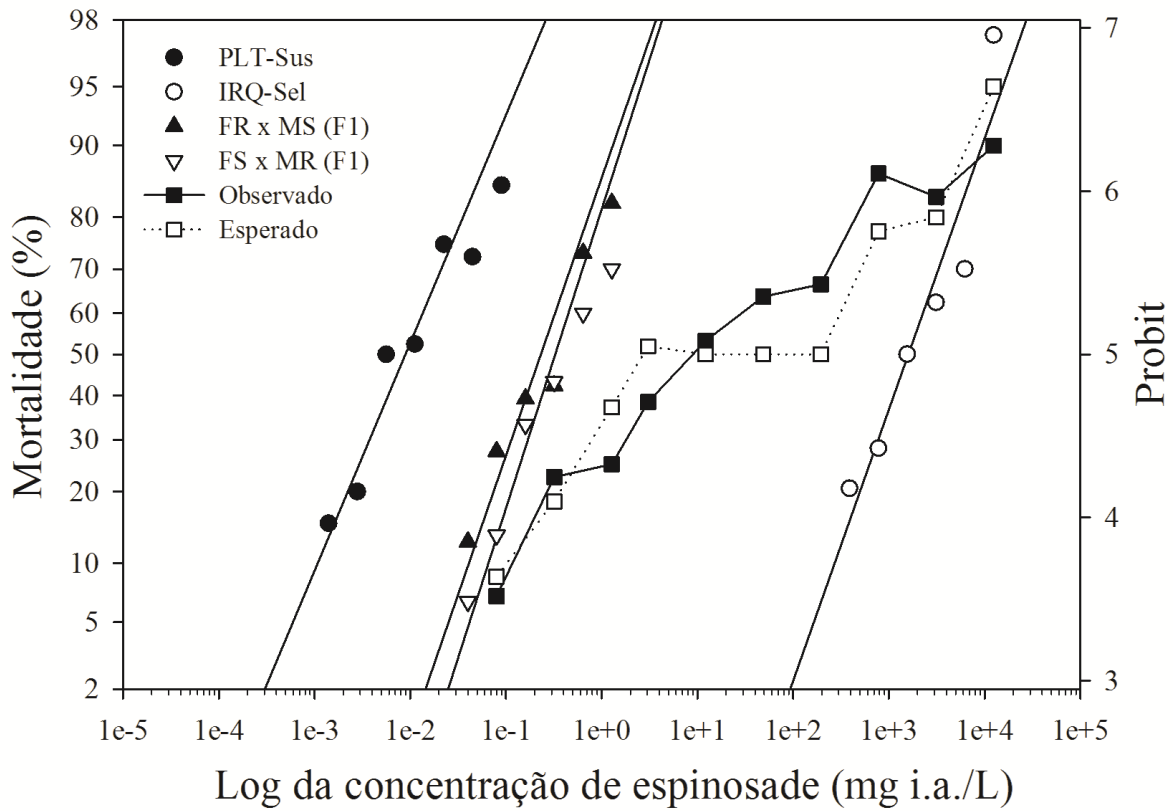


Figura 3. Curva de concentração mortalidade para população de *Tuta absoluta* resistente (IRQ-Sel), suscetível (PLT-Sus) e progênie da F1 (♀ IRQ-Sel x ♂ PLT e ♀ PLT x ♂ IRQ-Sel). Mortalidade esperada e observada do retrocruzamento (F1 x R agrupado) quando exposta a espinosade.