

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) A INSETICIDAS: MONITORAMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORFENAPIR.

por

PAOLO AUGUSTUS FREITAS SILVA

(Sob Orientação do Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE)

RESUMO

*Tuta absoluta* (Meyrick) é uma das principais pragas do cultivo de tomate em todo o mundo. No Brasil, surtos populacionais desta praga em lavouras de tomateiro podem ocasionar até 100% de perdas devido às injúrias. O uso sistemático de inseticidas ainda é a principal tática de controle no combate a essa praga no Brasil, entretanto, o grande número de pulverizações associado ao uso indiscriminado destes produtos levam populações brasileiras a evoluírem resistência, contribuindo para falhas de controle repetidas desses produtos em campo. O objetivo deste trabalho foi averiguar o *status* atual da suscetibilidade da traça-do-tomateiro aos inseticidas: cloridrato de cartape e clorfenapir; caracterizar geneticamente a resistência a clorfenapir; determinar o perfil de resistência cruzada a clorfenapir e investigar se o mecanismo metabólico poderia estar envolvido na resistência a clorfenapir. As razões de resistência encontradas variaram de 2,29 a 537,09 vezes para cloridrato de cartape e 2,00 a 315,45 vezes para clorfenapir. A caracterização genética indicou que a resistência de *T. absoluta* a clorfenapir foi autossomal, completamente dominante e poligênica. Os resultados dos ensaios de resistência cruzada com os inseticidas abamectina, cipermetrina, clorantraniliprole, espinetoram, fenpiroximato, indoxacarbe, metoxifenoazida sugeriram que o provável mecanismo envolvido na resistência da traça-do-tomateiro a clorfenapir é o metabólico. Os ensaios enzimáticos indicam que as monoxigenases parecem desempenhar um papel

fundamental na evolução da resistência a clorfenapir. O uso desse conhecimento pode representar um grande passo dentro do manejo integrado de pragas para esta espécie, contribuindo para uma maior vida útil dos produtos envolvidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resistência, herança, monoxigenases.

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) A INSETICIDAS: MONITORAMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORFENAPIR.

by

PAOLO AUGUSTUS FREITAS SILVA

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

ABSTRACT

*Tuta absoluta* (Meyrick) is one of the main pests of tomato cultivation around the world. In Brazil, population outbreaks of this pest in tomato crops can cause up to 100% of losses due to injuries. The systematic use of insecticides is still the main control tactic to combat this pest in Brazil, however, the large number of sprays associated with the indiscriminate use of these products lead Brazilian populations to evolve resistance contributing to repeated control failures of these products in the field. The objective of this study was to investigate the current status of tomato moth susceptibility to insecticides: cartap hydrochloride and chlorfenapyr; genetically characterize resistance to chlorfenapyr; to determine the cross-resistance profile of chlorfenapyr and to investigate whether the metabolic mechanism could be involved in resistance to chlorfenapyr. Resistance ratios ranged from 2.29 to 537.09 times for cartap hydrochloride and 2.00 to 315.45 fold for chlorfenapyr. The genetic characterization suggested that the resistance of *T. absoluta* to chlorfenapyr was autossomal, completely dominant and polygenic. The results of the cross-resistance tests with the insecticides abamectin, cypermethrin, chlorantraniliprole, spinetoram, fenpyroximate, indoxacarb, methoxyfenozide indicate that the probable mechanism involved in the resistance of tomato moth to chlorfenapyr is metabolic. Enzyme assays indicate that monooxygenases appear to play a key role in the development of resistance to chlorfenapyr. The

use of this knowledge can represent a great step in integrated pest management for this species, contributing to a longer useful life of the products involved.

**KEY WORDS:** Resistance, inheritance, monooxygenases.

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) A INSETICIDAS: MONITORAMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORFENAPIR.

por

PAOLO AUGUSTUS FREITAS SILVA

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

Fevereiro – 2019

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) A INSETICIDAS: MONITORAMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORFENAPIR.

por

PAOLO AUGUSTUS FREITAS SILVA

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Paulo Geovani Silva Martins – PNPd/CAPES/FACEPE

Liliane Marques da Silva – PNPd/CAPES

SUSCETIBILIDADE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) A INSETICIDAS: MONITORAMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORFENAPIR.

por

PAOLO AUGUSTUS FREITAS SILVA

Orientador: \_\_\_\_\_  
Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
José Vargas de Oliveira – UFRPE

\_\_\_\_\_  
Liliane Marques da Silva – PNP/CAPE

\_\_\_\_\_  
Paulo Geovani Silva Martins – PNP/CAPE FACEPE

\_\_\_\_\_  
Wellington Marques da Silva – UNIBRA

## SUMÁRIO

Página

### CAPÍTULOS

1	INTRODUÇÃO .....	1
	Importância, origem e dispersão da traça-do-tomateiro.....	1
	Características gerais e bioecológicas da traça-do-tomateiro .....	1
	Manejo e relatos de resistência da traça-do-tomateiro .....	2
	Resistência e mecanismos envolvidos na resistência da traça-do-tomateiro a inseticidas.....	4
	Falhas dos produtos utilizados no controle da traça-do-tomateiro no Brasil .....	6
	REFERÊNCIAS.....	7
2	RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>Tuta absoluta</i> AOS INSETICIDAS CARTAPE E CLORFENAPIR .....	11
	RESUMO .....	12
	ABSTRACT.....	13
	INTRODUÇÃO .....	14
	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
	AGRADECIMENTOS.....	21
	REFERÊNCIAS.....	21



3	RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)	
	A CLORFENAPIR: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, PERFIL DE RESISTÊNCIA CRUZADA E METABOLISMO .....	28
	RESUMO .....	29
	ABSTRACT .....	30
	INTRODUÇÃO .....	32
	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
	RESULTADOS .....	42
	DISCUSSÃO .....	45
	REFERÊNCIAS .....	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

#### **Importância origem e dispersão da traça-do-tomateiro**

Originária da parte central do Chile, a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), encontra-se difundida em diversos países e é considerada uma praga devastadora da cultura do tomateiro devido a potencialidade dos seus danos (Urbaneja *et al.* 2009, Desneux *et al.* 2010, Kılıç 2010, Seplyarsky *et al.* 2010, Desneux *et al.* 2011, Guillemaud *et al.* 2015, EPPO 2019). A primeira ocorrência desta praga no Brasil ocorreu ao final da década de 70 no litoral paranaense, já a partir de 1980, sua ocorrência foi relatada nos estados de São Paulo e Bahia, estando no final da década de 80 presente em todas as áreas produtoras de tomate do país (Morais & Normanha Filho 1982, Muszinski *et al.* 1982, França 1993). No entanto, apenas na década de 90, a traça-do-tomateiro atingiu o *status* de praga importante em cultivos de tomate pelo Brasil (Picanço *et al.* 1998).

Apesar da preferência pelo tomateiro, a *T. absoluta* pode atacar outras solanáceas de importância econômica como a batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*S. muricatum* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Torres *et al.* 2001, Desneux *et al.* 2010) bem como em solanáceas não cultivadas e espécies selvagens (EPPO 2018).

#### **Características gerais e bioecológicas da traça-do-tomateiro**

Na fase adulta, a mariposa de *T. absoluta* possui uma coloração cinza-prateada e em média 10 mm de envergadura podendo uma única fêmea depositar cerca de 260 ovos que podem ser alocados superficialmente em folhas, hastes, flores e frutos (Imenes *et al.* 1990, Pratissoli *et al.* 2003). Durante

a fase imatura, as larvas passam por quatro ínstares de desenvolvimento e chegam a medir 9 mm. Devido ao seu hábito alimentar e consumo do mesofilo foliar formam galerias, o que reduz a capacidade fotossintética do tomateiro, prejudicando o desenvolvimento e comprometendo a qualidade do produto final. A depender das condições ambientais, o ciclo completo da *T. absoluta* varia de 26 a 75 dias, sobretudo nas temperaturas extremas de 34,6° e 14°C, respectivamente. Contudo, a temperatura ótima de desenvolvimento é de 30°C o que permite a sua ocorrência durante todo o ciclo da cultura, podendo destruir completamente as folhas do tomateiro e causar perdas de até 100% (Bogorni *et al.* 2003, Desneux *et al.* 2011, Martins *et al.* 2016). Além das folhas, também pode danificar o caule e frutos tornando-os impróprios para comercialização, além de facilitar a contaminação por patógenos (Coelho & França 1987, Picanço *et al.* 1997).

### **Manejo e relatos de resistência da traça-do-tomateiro a inseticidas**

O controle da traça-do-tomateiro é fortemente dependente da aplicação de inseticidas e isso ocorre devido a ameaça imediata a produção em consonância com a carência de alternativas para o manejo (Desneux *et al.* 2006, Campos *et al.* 2017). No Brasil, visando a redução de perdas, são necessárias de três a quatro pulverizações semanais culminando em um uso intensivo e inadequado dos inseticidas, tornando o monitoramento e o manejo da resistência extremamente importantes a fim de evitar o desenvolvimento da resistência nessa espécie (Guedes & Picanço 2012, Teixeira & Andaloro 2013). Resistência de *T. absoluta* a inseticidas, como o cartape, já foi relatada em países como Chile, Argentina e Brasil, o que levou neste último ao registro e utilização de novas moléculas como o clorfenapir, entre outros (Salazar & Araya 1997, Siqueira *et al.* 2001a, 2003, Lietti *et al.* 2005, Guedes & Siqueira 2012, Guedes & Picanço 2012). Atualmente, 113 produtos são recomendados para o controle de *T. absoluta* e se enquadram nos grupos das avermectinas, benzoilureias, piretroides, tretranotriterpenoides, diamidas do ácido fitálico, tiocarbamatos,

diacilhidrazinas, antranilamidas, oxadiazinas, milbemicinas, metilcarbamatos de oxima, análogos do pirazol, éter difenlicos e espinosinas além dos biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Agrofit 2019).

Dentre os inseticidas indicados para o controle de *T. absoluta* está o cartape que pertence ao grupo químico das nereistoxinas (IRAC 2019). As nereistoxinas possuem efeito inseticida e ocorre naturalmente no verme marinho *Lumbrineris heteropoda* (Marenzeller, 1879) sendo este o principal composto dos inseticidas cartape e bensultape (Uber 1934; Okaichi & Hashimoto 1962; Sakay 1969; Richter, Otto & Mengs 1989). O cartape é um pró-inseticida que é convertido metabolicamente no corpo do inseto para nereistoxina competindo com acetilcolina para bloquear o sinal mediado pelos receptores nicotínicos da acetilcolina (Sakai 1967; Sakai & Sato 1972; Sattelle *et al.* 1985). O cloridrato de cartape é classificado como antagonista da acetilcolina e compete com seus receptores, inibindo o movimento dos íons  $K^+$  e  $Na^+$ , o que ocasiona a interrupção o impulso nervoso acarretando a morte do inseto por paralisia.

Já o clorfenapir é um pró-inseticida, não tendo ação tóxica na sua forma original. Em contato com as células do inseto, é ativado por meio da ação das monooxigenases microssomais dependentes do citocromo P450. Após a ativação, clorfenapir se deposita nas mitocôndrias (interna e externamente) expulsando o  $H^+$  das mesmas. Por não acumular prótons suficientes no espaço intermembranar da mitocôndria, ocorre a paralisação da fosforilização oxidativa, e, dessa forma, o difosfato de adenosina (ADP) não é convertido em trifosfato de adenosina (ATP). Sem ATP, as células param de funcionar, o que leva insetos à morte. (Black *et al.* 1994, Hunt & Treacy 1998, Dekeyser 2005, IRAC 2019).

## **Resistência e mecanismos envolvidos na resistência da traça-do-tomateiro a inseticidas**

A resistência a inseticidas caracteriza-se pela habilidade herdada de um organismo em tolerar doses de um determinado xenobiótico que antes seriam letais para a maioria dos indivíduos da sua espécie, levando a uma alteração na sua frequência genética (Who 1957, Croft & Van De Baan 1988). Segundo o Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC), resistência pode ser definida como sucessivas falhas de controle em campo quando utilizada a dose recomendada pelo fabricante. A resistência é pré-adaptativa, evoluindo com a pressão de seleção sobre as populações de insetos. Em decorrência da evolução da resistência de pragas a pesticidas, há um aumento no número de pulverizações e nas doses utilizadas culminando com a substituição do produto que, geralmente, possui maior toxicidade e preço, comprometendo assim, os aspectos ecológicos, econômicos e sociais preconizados pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Croft 1990, Denholm & Rowland 1992). Os inseticidas são específicos quanto ao seu modo de ação, contudo existem mecanismos que permitem conferir altos níveis de resistência (Roush & McKenzie 1987, Hemingway 2000, Hemingway *et al.* 2004, Silva *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015b).

Os mecanismos pelos quais os insetos sobrevivem aos inseticidas envolvem a redução da penetração, diminuição da sensibilidade no sítio de ação e destoxificação enzimática, no entanto, estes podem agir tanto de forma isolada como em conjunto e dessa forma conferir altos níveis de resistência a várias classes de inseticidas (Hemingway 2000, Hemingway *et al.* 2004). No mecanismo de resistência metabólica em insetos, três sistemas enzimáticos merecem destaque: esterases, glutatona *S*-transferases e monoxigenases e, na maioria dos casos de resistência são capazes de reduzir a toxicidade a inseticidas e é possível observar ou detectar alterações na quantidade dessas enzimas quando esta é comparada a homólogos mais sensíveis (Brown & Brogdon 1987, Hemingway 1989, 1995).

Apesar de relatarem respostas homogêneas de populações brasileiras de *T. absoluta* frente a diamidas, Campos *et al.* (2015a) ainda mencionaram uma fraca correlação das CL<sub>50</sub> apresentadas com a atividade de monoxigenase dependente de citocromo P450, sugerindo a via metabólica como potencial para evoluir a resistência da traça-do-tomateiro aos inseticidas testados. Campos *et al.* (2015b) sugerem que a resistência de populações brasileiras de traça-do-tomateiro a espinosinas esteja relacionada ao mecanismo enzimático, pois a atividade de  $\beta$ -esterase apresentou correlação com as CL<sub>50</sub> dos inseticidas espinosade e espinetoram. Já Silva *et al.* (2015) associaram a resistência de *T. absoluta* a piretroides a uma mutação do canal de sódio. No entanto os mesmos autores ressaltam uma forte contribuição da monoxigenase dependente do citocromo P450 e glutathione *S*-transferase na evolução da resistência de populações brasileiras da traça-do-tomateiro, recomendando, inclusive, a não utilização de piretroides para o manejo desta praga. Campos *et al.* (2014a) caracterizaram geneticamente a resistência de populações brasileiras ao inseticida espinosade e concluíram que esta resistência não está ligada ao sexo, ou seja, é autosomal, configurando-se também como monogênica e recessiva. Além disso, os mesmos autores ainda chegaram à conclusão que a resistência a espinosinas é instável, indicando um provável custo adaptativo associado. Custos de *fitness* podem ocorrer em indivíduos resistentes, onde foram relatados em outros insetos da ordem Lepidoptera e influenciando no estabelecimento dessa resistência em campo na ausência da pressão de seleção com um determinado inseticida (Gassmann *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2014). Nesse contexto, estudos genéticos e de custo adaptativo associado à evolução da resistência, se fazem

necessários para o conhecimento da influência desse fenômeno nos parâmetros biológicos da traça-do-tomateiro, além do estabelecimento de um manejo da resistência consistente e eficaz.

### **Falhas dos produtos utilizados no controle da traça-do-tomateiro no Brasil**

Falhas de controle têm sido relatadas por produtores em campos comerciais de tomate. No Brasil, Silva *et al.* (2011) relataram resistência de *T. absoluta* superior a 220 vezes a inseticidas inibidores da síntese de quitina e 27,5 vezes ao inseticida indoxacarbe, enquanto que Siqueira *et al.* (2001a), Siqueira *et al.* (2001b) e Siqueira *et al.* (2003) detectaram resistência em campo aos inseticidas abamectina, cartape, metamidafós e permetrina o que demonstra que a resistência aos produtos recomendados para o seu controle é uma realidade.

Embora o desenvolvimento de resistência da *T. absoluta*, aos inseticidas utilizados para o seu controle, seja uma realidade, são escassas as informações a respeito da caracterização dessa resistência aos inseticidas cartape e clorfenapir. Estudos recentes têm demonstrado a importância do mecanismo metabólico na evolução da resistência em *T. absoluta* a outros inseticidas, e, dessa forma, levantou-se a hipótese que a resistência, se houver, aos inseticidas cartape e clorfenapir é metabólica configurando essa resistência como autosomal, recessiva e monogênica. Dessa forma, essas informações associadas ao monitoramento da resistência tornam-se indispensáveis e servem de subsídio para montagem e implementação de um manejo da resistência. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é: (i) Determinar o *status* atual da suscetibilidade da traça-do-tomateiro aos inseticidas cartape e clorfenapir; (ii) Selecionar a(s) população(s) que apresente(m) sobrevivência superior a 20% a dose de rótulo; (iii) Realizar estudos de herança genética e definir se está ligada ao sexo ou é autosomal, poligênica ou monogênica e configura-se como dominante ou recessiva; (iv) Determinar e quantificar as atividades das enzimas envolvidas, com a finalidade de investigar se o mecanismo

utilizado para destoxificação é bioquímico. A obtenção destes dados pode colaborar para um controle eficiente dessa praga em campo, mitigando a evolução da resistência de forma aplicada.

### Literatura Citada

- Agrofit. 2019.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em 19 de janeiro de 2019.
- Bogorni, P.C., R.A.D. Silva & G.S. Carvalho. 2003.** Consumo de mesofilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cienc. Rural 33: 07-11.
- Branco, M.C., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. Hortic. Bras. 19: 60-63.
- Brown, T.M. & W.G. Brogdon. 1987.** Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. Annu. Rev. Entomol. 32: 145-162.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015a.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. Pest Manag. Sci. 71: 537-544.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015b.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Pest Sci. 88: 405-412.
- Campos, M.R., A. Biondi, A. Adiga, R.N.C. Guedes & N. Desneux. 2017.** From the Western Palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. J. Pest Sci. 90:787-796.
- Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, W.M. Silva, T.B.M. Silva, V.R.F. Silva, R.N.C. Guedes & H.A.A. Siqueira. 2014.** Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. PLOS ONE 9: e103235.
- Croft, B.A. 1990.** Management of pesticide resistance in arthropod pests, p. 149-168. In Managing Resistance to Agrochemicals. Washington, American Chemical Society, 496p.
- Croft, B.A. & H.E. Van De Baan. 1988.** Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. Exp. Appl. Acarol. 4: 277-300.
- Denholm, I. & M.W. Rowland. 1992.** Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. Annu. Rev. Entomol. 37: 91-112.
- Desneux, N., A. Decourtye & J.-M. Delpuech. 2006.** The Sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu. Rev. Entomol. 52: 81-106.



- Desneux, N., M. 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. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D. Catalán 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.
- EPPO. 2019.** EPPO Global Database. Acesso em 02 de janeiro de 2019.
- Gassmann, A.J., Y. Carrière & B.E. Tabashnik. 2008.** Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 147-163.
- Gontijo, P.C., M.C. Picanco, 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. & H. 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.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bull.* 42: 211-216.
- Guillemaud, T., A. Blin, I. Le Goff, N. Desneux, M. Reyes, E. Tabone, A. Tsagkarakou, L. Niño & E. Lombaert. 2015.** The tomato borer, *Tuta absoluta*, invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile. *Sci. Rep.* 5: 8371.
- Hemingway, J. 1989.** A note on simple biochemical methods for resistance detection and their field application in Sri Lanka. *J. Pestic. Sci.* 27: 281-285.
- Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1009-1015.
- 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.
- Hemingway, J., G.J. Small, S. Lindsay, F.H. Collins. 1995.** Combined use of biochemical, immunological and molecular assays for infection, species identification and resistance detection in field populations of *Anopheles* (Diptera: Culicidae), p.31-50. In S.S.B. Media (ed.), *The Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches*. London, Chapman and Hall, 519p.
- IRAC. 2019.** Comitê de ação à resistência a inseticidas. Acesso em 20 de janeiro de 2019.
- Kılıç, T. 2010.** First record of *Tuta absoluta* in Turkey. *Phytoparasitica* 38: 243-244.

- 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.
- Lu, Y., K. Wu, Y. Jiang, Y. Guo & N. Desneux. 2012.** Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature* 487: 362-365.
- Martins, J.C., M.C. Picanço, L. Bacci, R.N.C. Guedes, P.A. Santana, D.O. Ferreira & M. Chediak. 2016.** Life table determination of thermal requirements of the tomato borer *Tuta absoluta*. *J. Pest Sci.* 89: 897-908.
- Okaichi, T., Y. Hashimoto. 1962.** The structure of nereistoxin. *Agric. Biol. Chem.* 26: 224-227.
- 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 Prot.* 17: 447-452.
- Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.N. Ferreira, Á.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2014.** Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104: 88-96.
- Richter, R.; D. Otto; H. J. Mengs. 1989.** Insecticide compounds, acting on the acetylcholine receptor of the insect nervous system, p.157-195. In G. Haug & H. Hoffmann (eds.), *Chemistry of Plant Protection: Degradation of Pesticides, Desiccation and Defoliation, ACh-Receptors as Targets*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 256p.
- Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Sakai, M. 1969.** Nereistoxin and cartap; their mode of action as insecticides. *Rev. Pl. Prot. Res.* 2: 17-28.
- Sakai, M.; Y. Sato. 1972.** Metabolic conversion of the nereistoxin related compounds into nereistoxin as a factor of their insecticidal action, p. 455-467. In A. S. Tahori (ed), *Proceedings of the Second International IUPAC Congress of Pesticide Chemistry, Vol. I: Insecticides*. London, Gordon and Breach Science Publishers, 566p.
- Sakai, M. 1967.** Studies on the insecticidal action of nereistoxin, 4-N,Ndimethylamino-1,2-dithiolane. V. Blocking action on the cockroach ganglion. *Botyu-Kagaku* 32: 21-33.
- Salazar, E. & J. Araya. 1997.** Detección de resistencia a insecticidas em la polilla del tomate. *Simiente* 67: 8-22
- Sattelle, D. B.; I. D. Harrow, J. A. David, M. Pelhate, J. J. Callec, J. I. Gepner, L. M. Hall. 1985.** Nereistoxin: actions on a CNS acetylcholine receptor/ion channel in the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 118: 37-52.
- Seplyarsky, V., M. Weiss & A. Haberman. 2010.** *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), a new invasive species in Israel. *Phytoparasitica* 38: 445-446.

- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.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*. *J. Pest Sci.* 67: 913-920.
- Silva, J.E., C.P.O. Assis, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016a.** Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J. Econ. Entomol.* 109: 2190-2195.
- Silva, T.B.M., W.M. Silva, M.R. Campos, J.E. Silva, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016b.** Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Prot.* 79: 80-86.
- Silva, W.M., M. Berger, C. Bass, V.Q. Balbino, M.H.P. Amaral, M.R. Campos & H.A.A. Siqueira. 2015.** Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. *Pest. Biochem. Physiol.* 122: 8-14.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2001a.** 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. 2003.** 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. 2001b.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manage.* 47: 247-251.
- Teixeira, L.A. & J.T. Andaloro. 2013.** Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pest. Biochem. Physiol.* 106: 76-78.
- 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.
- Uber, N. S. 1934.** Nereistoxin, einen giftigen Bestandteil von *Lumbriconereis heteropoda* Marenz (Eunicidae). *J. Pharm. Soc. Jap.* 54: 648-652.
- 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.

## CAPÍTULO 2

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) AOS INSETICIDAS CLORIDRATO DE CARTAPE E CLORFENAPIR<sup>1</sup>

PAOLO A. F. SILVA<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia – Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois irmãos,  
52171-900, Recife, PE, Brasil.

---

<sup>1</sup>Silva, P.AF, Resistência de populações brasileiras de *Tuta absoluta* aos inseticidas cloridrato de cartape e clorfenapir. Artigo a ser submetido.

RESUMO - A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), é uma das pragas mais importantes no cultivo de tomate em todo o mundo. O uso de inseticidas ainda é a principal tática de controle contra essa praga no Brasil, contudo, o número excessivo de pulverizações semanais e o uso indiscriminado de inseticidas levam populações brasileiras a evoluírem à resistência e, como consequência, ocorrem falhas de controle no campo. Nosso objetivo foi realizar um levantamento da suscetibilidade aos inseticidas cloridrato de cartape e clorfenapir com a finalidade de determinar o *status* atual da resistência da traça-do-tomateiro frente a esses inseticidas. Bioensaios de concentração resposta estimaram valores de  $CL_{50}$  que variaram entre as populações de 3,01 a 1617,90 mg i.a./L para cloridrato de cartape 0,18 a 56,65 mg i.a./L para clorfenapir. As razões de resistência variaram entre as populações sendo 2,29 a 537,09 vezes para cloridrato de cartape e 2,00 a 315,45 vezes para clorfenapir. Os resultados obtidos nesse estudo, demonstram que a utilização a longo prazo de cartape e clorfenapir passa a ter sérias consequências para o manejo químico de *T. absoluta* em cultivos de tomateiro. Embora esses dois inseticidas estejam em uso há muitos anos no controle da traça-do-tomateiro, a escassez de informações dificulta a extensão da vida útil desses produtos. Diante dos nossos resultados, medidas proativas precisam ser tomadas para que não haja o agravamento da resistência a esses dois inseticidas, o que pode tornar estes produtos totalmente ineficazes no futuro.

PALAVRAS-CHAVE: Manejo integrado de pragas, controle químico, traça-do-tomateiro

MONITORING OF RESISTENCE OF BRASILIAN POPULATIONS OF *Tuta absoluta*  
(MEYRICK) TO CARTAP HYDROCHLORIDE AND CHLORFENAPYR.

ABSTRACT – The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), is one of the most important pests in tomato growing around the world. The use of insecticides is still the main control tactic against this pest in Brazil, however, the excessive number of weekly sprays and the indiscriminate use of insecticides lead Brazilian populations to evolve to resistance and, as a consequence, there are control failures in the field. Our objective was to carry out a survey of the susceptibility to the insecticides cartap hydrochloride and chlorfenapyr in order to determine the current status of the resistance of the tomato moth exposure to these insecticides. Concentration response bioassays estimated LC<sub>50</sub> values that ranged from 3.01 to 1617.90 mg i.a./L for cartape hydrochloride 0.18 to 56.65 mg i.a./L for chlorfenapyr. Resistance ratios ranged from 2.29 to 537.09 times for cartape hydrochloride and 2.00 to 315.45 fold for chlorfenapyr. The results obtained in this study demonstrated that the long-term use of cartap hydrochloride and chlorfenapyr starts to have serious consequences for the management of *T. absoluta* in tomato crops. Although these two insecticides have been in use for many years in the control of tomato moth, the scarcity of information makes it difficult to extend the lifespan of these products. In light of our results, proactive measures need to be taken so that there is no worsening of resistance to these two insecticides which may render these products totally ineffective in the future.

KEY WORDS: Insect pest management, chemical control, tomato leafminer

## Introdução

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), originária da parte central do Chile é uma das principais pragas da cultura do tomate na América do Sul desde a década de 50 devido às injúrias que podem levar a perdas totais. Contudo, a partir de 2006, tornou-se ameaça mundial após a sua invasão a Europa, se difundido, *a posteriori*, para os continentes da África e Ásia (Desneux *et al.* 2010, Kılıç 2010, Seplyarsky *et al.* 2010, Desneux *et al.* 2011, Guillemaud *et al.* 2015, Campos *et al.* 2017) No Brasil, a traça-do-tomateiro atingiu o *status* de praga importante em cultivos de tomate somente na década de 90 e o seu controle é dependente da aplicação de inseticidas sendo necessário para redução das perdas, de três a quatro pulverizações semanais (Picanço *et al.* 1998, Guedes & Picanço 2012, Teixeira & Andaloro 2013, Campos *et al.* 2017). O uso de inseticidas traz consequências prejudiciais a artrópodes benéficos e a difusão da traça-do-tomateiro para a região Afro-euroasiática levou ao aumento do uso desses produtos para o controle desta praga (Desneux *et al.* 2006, Lu *et al.* 2012) o que pode agravar a problemática da resistência, bem como dificultar o estabelecimento de programas de manejo integrado do tomateiro.

A resistência de insetos a pesticidas é uma das principais preocupações para a Entomologia Aplicada, e o uso indiscriminado das moléculas inseticidas tem contribuído para o aumento de populações resistentes da traça-do-tomateiro a vários grupos químicos como: avermectinas piretroides, organofosforados, nereistoxinas, reguladores de crescimento e mais recentemente espinosinas e diamidas (Branco *et al.* 2001, Siqueira *et al.* 2001a, Siqueira *et al.* 2001b, Siqueira *et al.* 2003, Silva *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015b, Silva *et al.* 2016a). Atualmente, 113 produtos são indicados para o controle de *T. absoluta* no Brasil e o cloridrato de cartape e clorfenapir ainda estão entre os inseticidas recomendados para a contenção dos surtos da traça-do-tomateiro em campo (Agrofit 2019). O cartape pertence ao grupo químico das nereistoxinas (IRAC 2019). As nereistoxinas possuem efeito inseticida e ocorre naturalmente no verme marinho *Lumbrineris*

*heteropoda* sendo este o principal composto do inseticida cartape (Uber 1934; Okaichi & Hashimoto 1962; Sakay 1969; Richter, Otto & Mengs 1989). O cartape é um pró-inseticida que é convertido metabolicamente no corpo do inseto para nereistoxina competindo com acetilcolina para bloquear o sinal mediado pelos receptores nicotínicos da acetilcolina (Sakai 1967; Sakai & Sato 1972; Sattelle *et al.* 1985). Em síntese, o cloridrato de cartape é classificado como antagonista da acetilcolina e compete com seus receptores, inibindo o movimento dos íons  $K^+$  e  $Na^+$ , o que ocasiona a interrupção o impulso nervoso acarretando a morte do inseto por paralisia.

O clorfenapir também é um pró-inseticida, ou seja, não tem ação tóxica na sua forma original. Classificado como desacoplador do íon de  $H^+$  na fosforilação oxidativa, esta molécula é ativada por meio da ação das monoxigenases microssomais dependentes do citocromo P450 quando entra em contato com as células do inseto. Após a ativação, o clorfenapir se deposita nas mitocôndrias (interna e externamente) expulsando o  $H^+$  das mesmas inibindo a transformação de ADP em ATP o que impede as funções vitais do inseto causando sua morte (IRAC 2018). Relatos de falhas de controle pelos produtores locais, associados a pesquisas anteriores que demonstram que a *T. absoluta* pode desenvolver resistência aos mais variados grupos químicos (Siqueira *et al.* 2001a, Siqueira *et al.* 2001b, Siqueira *et al.* 2003, Lietti *et al.* 2005, Gontijo *et al.* 2013, Silva *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015b, Silva *et al.* 2016a) nos conduziu-se a hipótese de que as populações brasileiras de traça-do-tomateiro estariam resistentes aos inseticidas cartape e clorfenapir, utilizados para o controle desta praga, uma vez que o cloridrato de cartape foi um dos primeiros inseticidas recomendados para o controle de *T. absoluta* e o clorfenapir vem sendo utilizado desde os anos 2000 (Guedes & Picanço 2012).

Embora o desenvolvimento da resistência de *T. absoluta* aos inseticidas utilizados para o seu controle seja uma realidade, existem poucas informações de resistência de *T. absoluta* a clorfenapir e cloridrato de cartape, sobretudo no Brasil. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi averiguar se



as populações brasileiras de traça-do-tomateiro estariam resistentes aos princípios ativos: cloridrato de cartape e clorfenapir, utilizados há muitos anos em cultivos de tomate. Neste cenário, essas informações podem ser cruciais para elucidarmos o *status* atual da resistência de *T. absoluta* a esses inseticidas e, dessa forma, contribuir, de forma proativa, para um manejo da resistência eficiente evitando a perda precoce dessas moléculas.

### **Material e Métodos**

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Interações Inseto-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizadas 12 populações de *T. absoluta* para este estudo. As populações foram provenientes das regiões do Sudeste (Mogi-mirim/SP), Sul (Pelotas/RS), Centro-oeste (Brasília/DF) e Nordeste (América Dourada/BA, Gameleira I e II/BA, João dourado I e III/BA, Garaciaba/CE, Bezerros/PE, Lagoa Grande/PE, Pesqueira/PE). Os bioensaios foram acondicionados em câmaras de germinação do tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ , com fotofase de 12 horas.

**Criação do Inseto em Laboratório.** As populações foram coletadas através da retirada de folhas infestadas, as quais foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório. As folhas, contendo larvas de traça-do-tomateiro, foram alocadas em gaiolas de madeira e tela de organza de 40 x 40 x 40 cm de dimensão. As populações em fase larval foram alimentadas com folhas de tomateiro da cultivar “Santa Clara” semeada e mantida em casa de vegetação sem tratamento com inseticidas e os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10%.

**Monitoramento da Resistência com a Dose Recomendada.** As doses recomendadas pelo fabricante, 1250mg/L e 120mg/L, foram utilizadas para a detecção da resistência das populações de

*T. absoluta* aos inseticidas: cloridrato de cartape (Cartap BR 500<sup>®</sup>) Iharabras, Paulínia, SP, Brasil e clorfenapir (Pirate 240 SC<sup>®</sup>) BASF SA, São Paulo, SP, Brasil, respectivamente.

**Bioensaios de Concentração-Resposta.** Para os bioensaios de concentração/resposta foram utilizadas de sete a onze concentrações seriadas, baseadas em testes preliminares para cada população. Os folíolos de tomate da cultivar “Santa Clara” foram imersos nas concentrações pré-definidas de cada inseticida, e o controle foi composto por água. Em todos os tratamentos, inclusive o controle, foi utilizado o adjuvante Triton X-100 na concentração de 0,01%. As folhas foram colocadas para secar por 1 hora; em seguida foram acondicionadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro por 2 cm de altura. Em cada placa foram colocadas 10 a 12 larvas de 2<sup>o</sup> ínstar. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com duas repetições. As placas de Petri foram colocadas em BOD (T: 25 ± 2 °C, UR 75 ± 5 %; 12 h C :12 h E). Após 48 horas foi avaliada a mortalidade. Os insetos que, ao serem tocados com um pincel de cerdas macias nº0, não apresentaram mobilidade de, pelo menos, metade do comprimento do seu corpo, foram considerados mortos. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit utilizando o programa POLO PLUS (LeOra Software 2005). As razões de toxicidade e seus respectivos intervalos de confiança a 95% foram calculados utilizando o software supracitado.

## **Resultados e Discussão**

**Dosagem Recomendada.** Para o inseticida cloridrato de cartape, as populações apresentaram variação de 31,61±3,46 a 97,92±2,07% na mortalidade com exceção da população de Guaraciaba, que apresentou 100% de mortalidade quando exposta a concentração de 1250mg de cartape/L (Tabela 1). A dose recomendada de cloridrato de cartape apresentou baixa eficácia (mortalidade <80%) para as populações de Gameleira II (31,61±3,46), Lagoa grande (47,92±5,44), João Dourado III (49,54±5,54), Brasília (50,22±8,21), João durado I (51,55±4,30), América dourada (52,67±5,77),

Gameleira I (54,81±7,93) e Bezerros (64,61±6,32). As demais populações: Guaraciaba, Pelotas e Pesqueira foram controladas pela dose de rótulo de cloridrato de cartape (mortalidade <80%).

As populações, expostas a dose recomendada de clorfenapir, apresentaram mortalidade variando de 55,78±4,79 a 100% (Tabela 2). A dose recomendada de clorfenapir apresentou baixa eficácia para as populações de Gameleira II (55,78±4,79) e Mogi-mirim (74,00±2,67). As populações: América Dourada (81,80±6,02), João Dourado III (85,67±3,94), Gameleira I (89,38±3,75) e João Dourado I (90,01±3,53) mostraram-se sensíveis a dose de rótulo de clorfenapir, bem como Bezerros, Guaraciaba, Pelotas, Lagoa grande, Pesqueira e Brasília que apresentaram mortalidade de 100%. Algumas das populações testadas apresentaram altos níveis de resistência para cloridrato de cartape e clorfenapir, sobretudo quando expostas a dose recomendada. Falhas de controle em populações do Brasil já foram sugeridas por Silva *et al.* (2016b), para os mesmos inseticidas, devido a inclusão da dose recomendada pelo fabricante no intervalo de confiança da CL<sub>80</sub> encontrada no estudo.

**Bioensaios.** Os resultados dos ensaios de concentração-mortalidade das populações de *T. absoluta* ajustaram-se ao modelo de Probit para os inseticidas clorfenapir e cloridrato de cartape ( $\chi^2$  não significativo,  $P > 0,05$ ). A população de Pelotas foi a mais suscetível tanto para cloridrato de cartape quanto para clorfenapir com CL<sub>50</sub> de 3,01 e 0,18 mg i.a./L respectivamente (Tabela 3 e 4). Silva *et al.* (2016b) encontraram valores de CL<sub>50</sub> de 93,1 e 0,62 mg i.a./L para os inseticidas cloridrato e cartape e clorfenapir, respectivamente, utilizando a população de Pelotas, também, como referência em seu estudo. É provável que a manutenção dessa população, em laboratório, sem pressão de seleção, tenha contribuído para o aumento da suscetibilidade aos dois produtos, sobretudo cloridrato de cartape com uma redução acentuada da sua tolerância a esse composto. Siqueira *et al.* (2001a) encontraram populações ainda mais sensíveis a cloridrato de cartape quando comparadas as

populações utilizadas nesse estudo, porém não foram encontrados valores tão preocupantes de CL<sub>50</sub> como ocorreu neste estudo.

As respostas das populações testadas foram heterogêneas para ambos os inseticidas. Os valores de CL<sub>50</sub>, para cloridrato de cartape e clorfenapir, entre todas as populações de *T. absoluta* variaram de 3,01 a 1617,90 e 0,18 a 56,65 mg i.a./L, respectivamente. Os valores de CL<sub>95</sub> variaram de 25,32 a 8733,40 e 1,89 a 1856,71 mg i.a./L para cloridrato de cartape e clorfenapir, respectivamente.

As inclinações das curvas de concentração-mortalidade variaram de 1,16 (Brasília) a 2,82 (Guaraciaba) para cloridrato de cartape e 1,08 (Bezerros e Mogi-mirim) a 2,81 (João Dourado I) para o inseticida clorfenapir. As razões de resistência para cloridrato de cartape variaram de 2,29 a 537,09 vezes entre as populações de João Dourado I e Gameleira II, respectivamente, enquanto que para clorfenapir variaram de 2,00 a 315,45 vezes entre as populações de Bezerros e Mogi-mirim, respectivamente.

Para cloridrato de cartape, embora todas as populações tenham apresentado razões de resistência significantes (IC 95%), pode-se ressaltar as populações de América Dourada, Lagoa Grande e Gameleira II com razões de resistência de 112,36; 171,88 e 537,09 vezes respectivamente. Siqueira *et al.* (2001a) e Silva *et al.* (2016b), testando suscetibilidade de populações brasileiras de traça-do-tomateiro a cloridrato de cartape encontraram baixas razões de resistência, contudo as baixas razões de resistência encontradas por Siqueira *et al.* (2001a), que foram mais elevadas do que as encontradas por Silva *et al.* (2016b), podem ser atribuídas a alta suscetibilidade das populações do seu estudo, sobretudo a população considerada padrão de suscetibilidade. Em contrapartida, maiores razões de resistência teriam sido encontradas se, de fato, houvesse uma população padrão de suscetibilidade no estudo de Silva *et al.* 2016 e no presente estudo. Contudo, as informações contidas aqui demonstram um cenário preocupante quanto a utilização de cloridrato de cartape no

controle de *T. absoluta* e que medidas proativas precisam ser adotadas para que não haja o agravamento dessa problemática.

Já para clorfenapir, razões de resistência significantes foram encontradas entre todas as populações testadas, contudo as populações de Gameleira I e Mogi-mirim merecem maior destaque com razões de resistência de 263,90 e 315,45 vezes, respectivamente. Embora o clorfenapir venha sendo utilizado no Brasil desde os anos 2000, Silva *et al.* (2016b) encontraram valores muito abaixo dos que foram encontrados aqui, o que sugeria que as populações utilizadas estariam sensíveis a este inseticida. Contudo, devido a baixa eficácia dos outros inseticidas utilizados para o controle da traça-do-tomateiro, houve um aumento na utilização do clorfenapir o que pode ter contribuído para a redução da suscetibilidade das populações utilizadas no presente estudo. Relatos de falhas de controle no controle da traça-do-tomateiro tem sido cada vez mais recorrentes nos últimos anos e níveis de resistência preocupantes tem sido detectadas aos mais variados grupos químicos, tais como: avermectinas, piretroides, organofosforados, nereistoxinas, reguladores de crescimento e mais recentemente espinosinas e diamidas (Branco *et al.* 2001, Siqueira *et al.* 2001a, Siqueira *et al.* 2001b, Siqueira *et al.* 2003, Silva *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015b, Silva *et al.* 2016a, Silva *et al.* 2016b). Contudo, pouca importância tem sido dada a evolução da resistência de *T. absoluta* aos inseticidas empregados para o seu controle, sobretudo cloridrato de cartape e clorfenapir.

Diante dos resultados obtidos, se alguma medida proativa não for tomada, a resistência a esses dois inseticidas tende a agravar e os produtos podem tornar-se totalmente ineficazes no futuro. Além disso, outros estudos do ponto de vista genético e metabólico podem ser úteis para o esclarecimento de como essa resistência se comporta em campo, e, dessa forma, desenvolver um manejo da resistência eficaz para que esse fenômeno seja retardado ou até mesmo revertido.

## Agradecimentos

Esta pesquisa foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## Literatura Citada

- Agrofit. 2019.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em 19 de janeiro de 2019.
- Branco, M.C., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. *Hortic. Bras.* 19: 60-63.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015a.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *J. Pest Sci.* 71: 537-544.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015b.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* 88: 405-412.
- Campos, M.R., A. Biondi, A. Adiga, R.N.C. Guedes & N. Desneux. 2017.** From the Western Palearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. *J. Pest Sci.* 90: 787-796.
- Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, W.M. Silva, T.B.M. Silva, V.R.F. Silva, R.N.C. Guedes & H.A.A. Siqueira. 2014.** Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLOS ONE* 9(8): e103235.
- Desneux, N., A. Decourtye & J.-M. Delpuech. 2006.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Desneux, N., M. 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. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D. Catalán 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.
- Gontijo, P.C., M.C. Picanco, 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. EPPO Bull. 42: 211-216.
- IRAC. 2019.** Comitê de ação à resistência a inseticidas. Acesso em 20 de janeiro de 2019.
- Kılıç, T. 2010.** First record of *Tuta absoluta* in Turkey. Phytoparasitica 38: 243-244.
- 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.
- Lu, Y., K. Wu, Y. Jiang, Y. Guo & N. Desneux. 2012.** Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. Nature 487: 362-365.
- Okaichi, T., Y. Hashimoto. 1962.** The structure of nereistoxin. Agric. Biol. Chem. 26: 224-227.
- 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 Prot. 17: 447-452.
- Richter, R.; D. Otto; H. J. Mengs. 1989.** Insecticide compounds, acting on the acetylcholine receptor of the insect nervous system, p.157-195. In G. Haug & H. Hoffmann (eds.), Chemistry of Plant Protection: Degradation of Pesticides, Desiccation and Defoliation, ACh-Receptors as Targets. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 256p.
- Sakai, M. 1969.** Nereistoxin and cartap; their mode of action as insecticides. Rev.. Plant Prot. Res. 2: 17-28.
- Sakai, M.; Y. Sato. 1972.** Metabolic conversion of the nereistoxin related compounds into nereistoxin as a factor of their insecticidal action, p. 455-467. In A.S. Tahori (ed), Proceedings of the Second International IUPAC Congress of Pesticide Chemistry, Vol. I: Insecticides. London, Gordon and Breach Science Publishers, 566p.
- Sakai, M. 1967.** Studies on the insecticidal action of nereistoxin, 4-N,Ndimethylamino-1,2-dithiolane. V. Blocking action on the cockroach ganglion. Botyu-Kagaku 32: 21-33.
- Sattelle, D. B.; I. D. Harrow, J. A. David, M. Pelhate, J. J. Callec, J. I. Gepner, L. M. Hall. 1985.** Nereistoxin: actions on a CNS acetylcholine receptor/ion channel in the cockroach *Periplaneta americana*. J. Exp. Biol. 118: 37-52.
- Seplyarsky, V., M. Weiss & A. Haberman. 2010.** *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), a new invasive species in Israel. Phytoparasitica 38: 445-446.
- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.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*. J. Pest Sci. 67: 913-920.

- Silva, J.E., C.P.O. Assis, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016a.** Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J. Econ. Entomol.* 109: 2190-2195.
- Silva, T.B.M., W.M. Silva, M.R. Campos, J.E. Silva, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016b.** Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Prot.* 79: 80-86.
- Silva, W.M., M. Berger, C. Bass, V.Q. Balbino, M.H.P. Amaral, M.R. Campos & H.A.A. Siqueira. 2015.** Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. *Pest. Biochem. Physiol.* 122: 8-14.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2001a.** 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. 2003.** 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. 2001b.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manage.* 47: 247-251
- Uber, N. S. 1934.** Nereistoxin, einen giftigen Bestandteil von *Lumbriconereis heteropoda* Marenz (Eunicidae). *J. Pharm. Soc. Jap.* 54: 648-652.



Tabela 1. Mortalidade no segundo ínstar larval de *Tuta absoluta* a dose recomendada de cloridrato de cartape

Região	População	Mortalidade (%) $\pm$ EP
Sudeste	Mogi-mirim	100
Sul	Pelotas	97,92 $\pm$ 2,07
Centro-oeste	Brasília	50,22 $\pm$ 8,21
Nordeste	João Dourado I	51,55 $\pm$ 4,30
	João Dourado III	49,54 $\pm$ 5,54
	Gameleira I	54,81 $\pm$ 7,93
	Gameleira II	31,61 $\pm$ 3,46
	Pesqueira	88,08 $\pm$ 3,68
	Lagoa grande	47,92 $\pm$ 5,44
	América dourada	52,67 $\pm$ 5,77
	Guaraciaba	100
	Bezerros	64,61 $\pm$ 6,32

Tabela 2. Mortalidade no segundo ínstar larval de *Tuta absoluta* a dose recomendada de clorfenapir

Região	População	Mortalidade (%) $\pm$ EP
Sudeste	Mogi-mirim	74,00 $\pm$ 2,67
Sul	Pelotas	100
Centro-oeste	Brasília	100
Nordeste	João Dourado I	90,01 $\pm$ 3,53
	João Dourado III	85,67 $\pm$ 3,94
	Gameleira I	89,38 $\pm$ 3,75
	Gameleira II	55,78 $\pm$ 4,79
	Pesqueira	100
	Lagoa grande	100
	América dourada	81,80 $\pm$ 6,02
	Guaraciaba	100
	Bezerros	100

Tabela 3. Resistência no segundo ínstar larval de *Tuta absoluta* a cloridrato de cartape. Temperatura: 25 ± 1°C; U.R. 65 ± 5% e 12

h fotofase.

População	N <sup>a</sup>	Slope ± SE <sup>b</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	CL <sub>95</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup> (GL) <sup>d</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>e</sup>
Pelotas	344	1,78±0,27	3,01(1,85-4,16)	25,32(17,40-46,46)	2,23 (7)	1,0(0,58-1,73)
João dourado I	339	1,57±0,15	6,90(5,31-8,82)	76,85 (51,07-135,00)	6,11 (7)	2,29(1,44-3,64)*
Brasília	367	1,16±0,13	11,61(7,29-16,72)	302,82(179,72-648,86)	3,58(7)	3,85(2,19-6,77)*
Bezerros	353	1,44±0,17	48,84(26,84-75,27)	675,87(396,71-1572,53)	7,21(7)	16,22(9,25-28,41)*
Pesqueira	348	1,71±0,17	49,77(35,69-67,19)	454,37(603,70-3113,25)	8,03(7)	16,52(10,47-26,08)*
Guaraciaba	248	2,82±0,42	86,98(64,36- 110,64)	581,62(384,13- 1181,23)	1,68 (6)	28,88(18,09-46,10)*
Gameleira I	367	2,06±0,23	127,05(85,02-176,79)	796,39(504,55-1706,24)	11,59 (8)	42,18(26,60-66,86)*
João Dourado III	355	1,46±0,16	196,14(140,45-264,56)	2624,43(1605,02-5412,20)	3,03(7)	65,11(39,54-107,22)*
Mogi mirim	252	1,47±0,17	271,41(204,6- 372,13)	3579,65(1984,40-8793,58)	3,87 (5)	90,10(55,32-146,74)*
América Dourada	369	1,68±0,15	338,46(267,77-425,32)	3217,74(2200-5364,71)	3,85(7)	112,36 (71,53-176,49)*
Lagoa Grande	361	1,77±0,31	517,76(276,58-753,37)	4404,22(2895,02-9260,01)	3,30(7)	171,88(93,89-314,67)*
Gameleira II	269	2,25±0,23	1617,90(1317,21-1990,18)	8733,40(6232,50-14055)	4,67(5)	537,09(346,36-832,85)*

<sup>a</sup>Número de larvas. <sup>b</sup> erro padrão. <sup>c</sup> mg a.i/L e limites de confiança a 95%. <sup>d</sup>Qui-quadrado e grau de liberdade. RR é a razão de toxicidade calculada

pelo método de Robertson *et al.* (2017). \* Razão de resistência significante quando o limite de confiança não inclui o número 1.

Tabela 4. Resistência no segundo ínstar larval de *Tuta absoluta* a clorfenapir. Temperatura: 25 ± 1°C; U.R. 65 ± 5% e 12 h

fotofase.

População	N <sup>a</sup>	Slope ± SE <sup>b</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	CL <sub>95</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup> (GL) <sup>d</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>e</sup>
Pelotas	402	1,61±0,13	0,18(0,14-0,22)	1,89(1,29-3,13)	5,96(7)	1,00(0,73- 1,38)
Bezerros	382	1,08±0,11	0,36(0,21- 0,59)	12,01(4,98-57,65)	12,25(7)	2,00(1,19-2,91)*
Pesqueira	360	1,68±0,27	0,44(0,24-0,63)	4,20(2,84-8,12)	0,66(7)	2,44 (1,47-4,06)*
João dourado I	362	2,81±0,41	2,28(1,71 -2,86)	8,81(6,56-14,04)	2,34(7)	12,71(9,09-17,79)*
Brasília	296	2,54±0,30	2,53(2,05-3,09)	11,24(8,19-18,05)	3,90(6)	14,09(10,40-19,10)*
América Dourada	369	1,75±0,18	2,94(2,04-4,02)	25,76(16,03-54,96)	8,36(7)	16,39(11,69-22,99)*
Lagoa Grande	290	2,14±0,23	3,55(2,82-4,40)	20,83(14,76-34,15)	1,54(8)	19,75 (14,41-27,09)*
Gameleira II	304	1,50±0,15	7,38(5,34-9,87)	92,22(59,64-168,45)	6,51(7)	41,11(28,10-60,16)*
João Dourado III	361	2,18±0,29	8,25(5,62-11,07)	46,90(33,12-78,36)	1,87(7)	45,94(30,79-68,53)*
Gameleira I	296	1,51±0,15	47,39(36,30-63,59)	578,59(339,63-1250,95)	5,69(6)	263,90(184,28-377,92)*
Mogi Mirim	303	1,08±0,16	56,65(37,27- 91,68)	1856,71(718,05- 10102,55)	5,42(6)	315,45 (192,90- 515,84)*

<sup>a</sup>Número de larvas. <sup>b</sup> erro padrão. <sup>c</sup> mg a.i/L e limite de confiança a 95%. <sup>d</sup>Qui-quadrado e grau de liberdade. RR é a razão de toxicidade calculada pelo método de Robertson *et al.* (2017). \* Razão de resistência significativa quando o limite de confiança não inclui o número 1.

### CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A  
CLORFENAPIR: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, PERFIL DE RESISTÊNCIA CRUZADA  
E METABOLISMO<sup>1</sup>

PAOLO A. F. SILVA

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia – Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois irmãos,  
52171-900, Recife, PE, Brasil.

---

<sup>1</sup>Silva, P.A.F. Resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a clorfenapir: caracterização genética, perfil de resistência cruzada e metabolismo. Artigo a ser submetido.

RESUMO - *Tuta absoluta* (Meyrick) é uma praga importante do tomateiro no Brasil e no mundo. Sua ocorrência pode estar associada a sua adaptabilidade e ao seu alto potencial reprodutivo. Por outro lado, fatores genéticos, bem como o metabolismo também podem contribuir para a evolução da resistência e ineficiência de inseticidas no controle desta praga. O objetivo deste trabalho foi: (i) caracterizar a herança da resistência à clorfenapir; (ii) determinar o perfil de resistência cruzada; (iii) averiguar a possibilidade de envolvimento enzimático pelo uso de sinergistas; (iv) determinar a atividade enzimática específica da população resistente e suscetível. Para isso: (i) após 21 ciclos de seleção, foram obtidas curvas de concentração-mortalidade para as populações parentais (BZR-Sus e MGM-Sel), progênies (F1 e F1´) obtidas dos cruzamentos recíprocos e retrocruzamento (F2); (ii) Curvas concentração-resposta foram obtidas para os inseticidas atualmente recomendados para o controle da traça-do-tomateiro; (iii) Os sinergistas TPP, DEM e PBO foram utilizados para investigar o envolvimento enzimático na resistência a clorfenapir; (iv) Substratos específicos foram utilizados para determinar a atividade específicas de monoxigenases, glutathione *S*-transferases e esterases. Os resultados indicam que a resistência de *T. absoluta* a clorfenapir é autossômica, completamente dominante e polifatorial. Além disso, nossos resultados de dominância efetiva mostram que essa resistência é funcionalmente dominante a partir de 10 mg/L de clorfenapir. Os estudos de resistência cruzada apontam que o possível mecanismo envolvido na resistência é o metabólico com provável envolvimento de monoxigenases dependentes de citocromos p450, podendo desempenhar um papel importante na evolução dessa resistência.

PALAVRAS-CHAVE: Dominância, controle químico, traça-do-tomateiro, pirroles.

RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO  
CHLORPHENAPYR: GENETIC CHARACTERIZATION AND PROFILE OF CROSS  
RESISTANCE AND METABOLISM.

ABSTRACT – *Tuta absoluta* (Meyrick) is an economically important pest in tomato plantations in Brazil and worldwide. Its occurrence may be associated with its adaptability and its high reproductive potential. On the other hand, genetic factors as well as metabolism may also contribute to the evolution of resistance and inefficiency of insecticides recommended for the control of this pest. The objective of this study was: (i) to characterize the inheritance of resistance to chlorfenapyr; (ii) determine the cross-resistance profile; (iii) to investigate the possibility of enzymatic involvement by the use of synergists; (iv) determine the specific enzymatic activity of the resistant and susceptible population. To this: (i) after 21 selection cycles, Concentration-response curves were obtained from reciprocal crosses (F1 and F1 ') and backcrossing (F2); (ii) Concentration-response curves were obtained for the insecticides currently recommended for the control of the tomato moth; (iii) TPP, DEM and PBO synergists were used to investigate the enzymatic involvement in resistance to chlorfenapyr; (iv) Specific substrates were used to determine the specific activity of monooxygenases, glutathione and esterases. The results indicate that the resistance of *T. absoluta* to chlorfenapyr is autosomal, completely dominant and monogenic. In addition, our results of effective dominance show that this resistance varies from functionally dominant and tends to be functionally recessive. Cross-resistance studies indicate that the possible mechanism involved in resistance is the metabolic so much that enzymatic assays indicate that monooxygenases seem to play an important role in the evolution of this resistance.

KEY WORDS: Dominance, chemical control, tomato moth, pyrroles

## Introdução

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é considerada uma das pragas de maior importância econômica em todo o mundo e tem ocasionado prejuízos consideráveis em cultivos de tomate no Brasil. Um dos principais problemas para o seu controle é a adaptabilidade e o seu alto potencial reprodutivo, o que permite surtos populacionais muitas vezes incontroláveis (Tropea Garzia *et al.* 2012). Dentre as medidas utilizadas no controle desta praga, o método químico ainda é o mais utilizado (Guedes & Picanço 2012). Embora aplicações sistemáticas de inseticidas sejam realizadas, muitas vezes o controle de *T. absoluta* torna-se ineficiente em campo. Um dos fatores que provavelmente está associada a essa ineficiência é a evolução da resistência. Até o presente momento foi detectada resistência da traça-do-tomateiro a 15 compostos diferentes (APRD 2019). Em trabalhos desenvolvidos no Brasil, observou-se que algumas populações de *T. absoluta* eram resistentes à vários grupos químicos como: organofosforados, piretroides, avermectinas, cartap, diamidas antranílicas e do ácido fitálico e espinosinas (Siqueira *et al.* 2001a, Silva *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015b, Silva *et al.* 2016a). Mais recentemente, níveis consideráveis de resistência ao inseticida clorfenapir também foram detectados em populações brasileiras de traça-do-tomateiro (Silva 2019 capítulo 2).

A molécula clorfenapir é um pró-inseticida e não possui ação tóxica em sua forma inicial. Contudo, após entrar nas células dos artrópodes, é convertido na sua forma ativa por ação de enzimas monoxigenases dependentes de citocromo P450 (Hunt & Treacy 1998). O clorfenapir ativado deposita-se entre as membranas da mitocôndria, expulsando os íons de H<sup>+</sup> da mesma (Black *et al.* 1994). Por não acumular prótons suficientes na região intermembranar da mitocôndria, ocorre a paralisação da fosforilação oxidativa e, dessa forma, o difosfato de adenosina (ADP) não é convertido em trifosfato de adenosina (ATP). Sem ATP, as células param de funcionar, o que leva os insetos à morte. A absorção de clorfenapir pode ocorrer por ingestão, contudo há também absorção



por contato. Em plantas, não há ação sistêmica, porém há uma excelente ação translaminar (Dekeyser 2005).

O conhecimento da genética e dos mecanismos envolvidos na resistência a pesticidas, pode ser fundamental para um manejo bem sucedido (Balasubramani *et al.* 2008). Além disso, pode fornecer subsídios para estudos ecológicos da dinâmica de resistência (Rizzieri *et al.* 1988) e contribuir de forma proativa para elaboração de um manejo de resistência mais preciso. Conhecer o perfil de resistência cruzada também é crucial para o sucesso de manejo da resistência a um determinado inseticida (Stumpf & Nauen 2001). Além disso, esse conhecimento pode servir de indicativo do mecanismo envolvido na resistência. Neste contexto, a rotação de inseticidas é de suma importância em um programa de manejo da resistência (Georghiou & Taylor 1977) e o conhecimento do perfil da resistência cruzada pode contribuir amplamente para a recomendação de produtos alternativos ao clorfenapir.

Os mecanismos pelos quais os insetos sobrevivem aos inseticidas envolvem a redução da penetração, diminuição da sensibilidade no sítio de ação e destoxificação enzimática, no entanto, estes mecanismos podem agir tanto de forma isolada como em conjunto e, dessa forma, conferir altos níveis de resistência a várias classes de inseticidas (Hemingway 2000, Hemingway *et al.* 2004). Contudo, o metabolismo por ação de esterases, glutathione *S*-transferases (GST) e monooxigenases dependentes do citocromo P450 é o mecanismo mais comum associado à resistência (Li *et al.* 2006, Bass & Field 2011) e, na maioria dos casos de resistência a inseticidas, é possível observar alterações na quantificação dessas enzimas quando esta é comparada a populações mais sensíveis (Brown & Brogdon 1987, Hemingway 1989, Hemingway 1995).

Informações a respeito desse mecanismo associado à resistência da traça-do-tomateiro a clorfenapir ainda são desconhecidas e merecem maior atenção, sobretudo quando o objetivo é prolongar a vida útil de um composto ainda considerado eficiente no controle desta praga. Além

disso, processos metabólicos podem contribuir para tornar um composto menos tóxico ou reduzir por completo a sua toxicidade sendo eliminado do corpo do inseto por excreção (Conyers *et al.* 1998). Os sinergistas, por serem inibidores enzimáticos, podem servir como indicativos dos possíveis mecanismos metabólicos envolvidos em uma determinada resistência (Philogène 1993). Entretanto, o uso de um substrato específico pode esclarecer melhor o envolvimento de uma enzima detoxificativa na resistência por envolver uma atividade específica (Khambay & Jewess 2005).

Neste contexto, a associação dessas informações pode contribuir de forma majoritária para o aumento do tempo de vida de um inseticida. Contudo, informações a respeito de como se comporta a resistência a clorfenapir genética e metabolicamente ainda são inexistentes para traça-do-tomateiro. Aqui, investigou-se o modo de herança em uma população de *T. absoluta* resistente a clorfenapir. Neste contexto, buscou-se entender se a resistência era autossomal ou ligada ao sexo; dominante ou recessiva; monogênica ou poligênica, assim como determinar uma concentração discriminatória capaz de distinguir os fenótipos suscetíveis dos resistentes para utilização prática e proativa da resistência. Investigações sobre os padrões de resistência cruzada dos inseticidas recomendados para o controle da *T. absoluta* também foram realizados e buscou-se esclarecer qual o sistema enzimático envolvido na resistência a clorfenapir entre os fenótipos suscetível (BZR-Sus) e resistente (MGM-Sel) da traça-do-tomateiro. Para isso, foram conduzidos ensaios com sinergistas, e ensaios enzimáticos utilizando substratos específicos das enzimas esterases, glutatona *S*-transferase e monoxigenases. O nível de resistência para este estudo foi de aproximadamente 100 vezes após 21 ciclos de pressão de seleção artificial com clorfenapir.

### **Material e Métodos**

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Interações Inseto-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Foram utilizadas duas populações de *T. absoluta* para este estudo. As populações foram provenientes das regiões do Sudeste (Mogi Mirim-SP) e Nordeste brasileiro (Bezerras-PE). Os bioensaios foram conduzidos em câmaras de germinação do tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ , com fotofase de 12 horas.

**Obtenção, Seleção e Manutenção das Populações.** A população suscetível BZR-Sus vinha sendo mantida em laboratório na ausência de pressão de seleção há mais de cinquenta gerações e foi tomada como população referência de suscetibilidade a clorfenapir (Silva 2019 capítulo 2). A população resistente MGM-Sel foi obtida através da seleção artificial com o inseticida clorfenapir sob condições laboratoriais, a partir de uma população coletada na cultura do tomate na cidade de Mogi Mirim, São Paulo no ano de 2016. A seleção foi iniciada utilizando o limite superior da  $CL_{30}$  (40 mg/L) obtida no bioensaio de concentração-resposta na geração F1 da população de Mogi Mirim (Silva 2019 capítulo 2). A partir daí, concentrações crescentes de clorfenapir foram utilizadas em 21 ciclos de seleção, a partir da terceira geração, a concentração de 80 mg/L foi mantida, sobretudo devido a redução na oviposição observada após a exposição ao inseticida. Os indivíduos sobreviventes a cada ciclo de seleção foram alimentados com folhas de tomate da cultivar Santa Clara para a obtenção de indivíduos resistentes. As folhas contendo larvas de traça-do-tomateiro foram colocadas em gaiolas de madeira e tela anti-afídio de 40 x 40 x 40 cm de dimensão. As folhas de tomateiro utilizadas nesse estudo foram cultivadas em casa de vegetação, sem tratamento com inseticidas, e os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10%.

**Bioensaios de Concentração-Resposta.** Para os bioensaios de concentração-resposta foi utilizada de sete a quatorze concentrações seriadas, baseadas em testes preliminares para cada população. Os folíolos de tomate da cultivar Santa Clara foram imersos nas concentrações pré-definidas em ensaios preliminares de clorfenapir e o controle foi composto por água + adjuvante. Em todos os tratamentos, inclusive o controle, foi utilizado o adjuvante Triton X-100 na concentração de 0,01%. Após o

tratamento, as folhas foram colocadas para secar e posteriormente foram acondicionadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro por 2 cm de altura. Em cada placa foram colocadas 10 a 12 larvas de 2º ínstar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições. As placas de Petri foram colocadas em câmaras BOD (T  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $65 \pm 5\%$ ; 12h C :12h E). A mortalidade foi avaliada após 48 horas e os insetos foram considerados mortos quando não apresentaram mobilidade de pelo menos metade do comprimento do seu corpo ao ser tocados com um pincel de cerdas macias. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit utilizando o programa POLO PLUS (LeOra Software 2005). As razões de toxicidade e seus respectivos limites de confiança a 95% foram calculados utilizando o mesmo *software* supracitado.

**Herança da Resistência a Clorfenapir.** Inicialmente, a resistência de *T. absoluta* à clorfenapir foi caracterizada através de bioensaios de concentração-resposta utilizando de sete a dez concentrações de clorfenapir para as populações BZR-Sus e MGM-Sel. Os dados de mortalidade para as duas linhagens foram submetidos à análise de Probit através do programa POLO-PLUS.

Para o estudo da herança da resistência, larvas de 4º ínstar das linhagens suscetível e resistente foram sexadas e mantidas separadamente em gaiolas de acrílico e alimentadas com folhas de tomate da variedade Santa Clara até a fase de pupa. Após a emergência, cruzamentos recíprocos entre 50 casais (MGM-Sel ♀ x BZR-Sus ♂ e MGM-Sel ♂ x BZR-Sus ♀) foram realizados em gaiolas separadas para o acasalamento, definidas como progênies F1 e F1', respectivamente. Larvas destes cruzamentos foram submetidas a bioensaios de concentração-resposta a clorfenapir para estimativa dos valores de CL<sub>50</sub>. A possibilidade da resistência a clorfenapir ser autossomal foi verificada em teste de igualdade por comparação dos resultados obtidos nos cruzamentos recíprocos. O grau médio de dominância da resistência foi calculado utilizando os valores obtidos de CL<sub>50</sub> das progênies F1 e F1' e as CL<sub>50</sub> das linhagens parentais, utilizando a fórmula adaptada de Stone (1968):

$$D = \frac{2 * \text{Log}(CL50F1) - \text{Log}(CL50RR) - \text{Log}(CL50SS)}{\text{Log}(CL50RR) - \text{Log}(CL50SS)}$$

A variância da dominância foi calculada pela fórmula adaptada de Lehmann (1966):

$$\text{Var}(D) = \frac{4}{(\text{Log}CL50ss - \text{Log}CL50RR)^2} \cdot \left[ \frac{1}{(\text{slope da F1})^2} + \frac{(\text{Log} CL50F1 - \text{Log}CL50ss)^2}{(\text{Log} CL50RR - \text{Log}CL50ss)^2} \cdot \frac{1}{(\text{slope da RR})^2} \right. \\ \left. + \frac{(\text{Log} CL50F1 - \text{Log}CL50RR)^2}{(\text{Log} CL50RR - \text{Log}CL50ss)^2} \cdot \frac{1}{(\text{slope da ss})^2} \right]$$

O número de genes envolvidos na resistência foi estimado por retrocruzamentos da progênie F1<sub>Agrupado</sub> (30 machos e 30 fêmeas virgens) com o parental suscetível (30 machos e 30 fêmeas virgens), aquele mais distinto da própria F1<sub>agrupado</sub> (Tsukamoto 1983, Roush & Daly 1990). Para avaliar se a herança da resistência de *T. absoluta* a clorfenapir era monogênica ou poligênica, bioensaio de concentração-resposta foi realizado utilizando a progênie F2 obtida do retrocruzamento. Os resultados foram comparados por teste direto entre os dados de mortalidade observados e esperados do retrocruzamento. A mortalidade esperada do retrocruzamento para cada concentração foi calculada pela formula adaptada de Tabashnik (1991):

$$\text{Mortalidade esperada} = 0,5 * \{(\%)mortalidade_{F1 \text{ na dose } x} + (\%) mortalidade_{\text{parental distinto na dose } x}\}$$

Sendo a mortalidade da F1 e do parental calculados na mesma concentração (Preisler *et al.* 1990, Tabashnik 1991, Tabashnik *et al.* 1992).

O número mínimo de genes que influenciam a resistência foi obtido através da formula adaptada de Lande (1981):

$$\text{Número de genes} = \frac{(\text{Log}CL50RR - \text{Log}CL50ss)^2}{8 \cdot \left[ 2 \cdot \frac{1}{(\text{Slope do retrocruzamento})^2} - 2 \cdot \frac{1}{(\text{Slope do F1pooled})^2} - 2 \cdot \frac{1}{(\text{Slope do ss})^2} + 2 \cdot \frac{1}{(\text{Slope do RR})^2} \right]}$$

### **Dominância em Função da Concentração e Determinação da Concentração Discriminatória**

**Aplicada.** Neste estudo, dez a doze larvas de segundo ínstar, por repetição e por concentração de clorfenapir, foram utilizadas das populações de BZR-Sus, MGM-Sel e do F1<sub>agrupado</sub>. Cinco concentrações foram determinadas 0,1; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5 e 5 mg de clorfenapir de acordo com os bioensaios prévios. Os bioensaios foram conduzidos utilizando os mesmos procedimentos usados nos ensaios concentração-mortalidade descritos anteriormente. O controle foi apenas água + adjuvante e a mortalidade foi avaliada 48 h após a exposição das larvas ao inseticida.

**Perfil de Resistência Cruzada.** Para este experimento foram utilizados os mesmos métodos de bioensaio descritos anteriormente. Os inseticidas utilizados para estabelecer o perfil de resistência cruzada com clorfenapir foram abamectina, clorantroliprole, espinetoram, indoxacarbe, metoxifenoazida e cipermetrina. Estes inseticidas foram utilizados por serem recomendados para o controle de *T. absoluta* pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Agrofit 2019). O acaricida fenpiroximato, embora não seja recomendado para traça-do-tomateiro, também foi utilizado por pertencer ao grupo dos inibidores de transporte de elétrons do complexo mitocondrial I com o objetivo de investigar uma possível resistência cruzada por possuírem modos de ação próximos.

**Ensaio de Sinergismo.** Nesse experimento foram utilizados os inibidores enzimáticos dietil maleato (DEM), butóxido de piperonila (PBO) e trifetil fosfato (TEP). Larvas de segundo ínstar das populações BZR-Sus e MGM-Sel foram previamente tratadas topicamente (0,2 µL/larva) com concentrações de 0,05; 0,05 e 0,1 mg/mL de DEM, PBO e TEP, respectivamente, antes de expor as larvas ao clorfenapir. Os tratamentos foram: apenas clorfenapir, clorfenapir + DEM, clorfenapir + PBO e clorfenapir + TEP. Os métodos de bioensaios utilizados foram os mesmos descritos

anteriormente. Todos os sinergistas utilizados foram dissolvidos em acetona e o controle foi composto por água+ adjuvante + sinergista.

**Extração de Amostras para Análise Enzimática.** Para o ensaio enzimático de esterases e glutathione *S*-transferases, 20 larvas de 3<sup>o</sup> ínstar foram coletadas e transferidas para tubos de microcentrífuga em triplicata para cada população. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL tampão fosfato (0,02 M, pH 7,2) para esterases e tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5) para glutathione *S*-transferases usando o homogeneizador *Potter-Elvehjem*. Os homogenados foram centrifugados (Eppendorf 5810R, Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburg, Germany) a 15.000 g e 4°C por 15 min. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -20 °C. Para os ensaios de monoxigenases dependentes do citocromo P450, as amostras foram homogeneizadas em 500 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) + glicerol a 20%. Em seguida os homogenados foram centrifugados a 15.000g e 4 C° por 20 min. A quantificação de proteína foi determinada pelo método do ácido binciconinico usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985).

**Ensaio de Esterase.** A atividade de esterases foi medida pelo método adaptado de Van Asperen (1962). Soluções estoques (250 mM) dos substratos  $\alpha$ -naftil acetato e  $\beta$ -naftil acetato foram preparados em acetona. Para cada reação, 2 µL do estoque de  $\alpha$ -naftil acetato, 10 µL de amostra diluída em 1:100 e 188 µL de tampão fosfato de sódio (0,02 M, pH 7,2) foram utilizados por poço da microplaca. O mesmo procedimento foi utilizado para análise de esterase utilizando  $\beta$ -naftill acetato como substrato. As amostras foram incubadas a 30°C por 15 min e foi parada utilizando 33,2 µL de FAST Blue B 0,3% em 3,5% de SDS. A Absorbância foi lida a 600 e 555nm em leitora de microplaca (Synergy H1, Multi-Moder, BioTek<sup>®</sup>, USA) para  $\alpha$ -naftil e  $\beta$ -naftill, respectivamente. Cada amostra foi analisada em triplicata totalizando nove repetições. A curva padrão foi preparada

para  $\alpha$ -naphthol e  $\beta$ -naphthol. A atividade de esterase foi expressa em mMol naftol x min<sup>-1</sup> x mg de proteína<sup>-1</sup>.

**Ensaio de Glutathione S-transferase.** A atividade de conjugação de glutathione reduzida foi determinada usando o substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) que, na presença de glutathione S-transferase forma 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (Habig *et al.* 1974). A solução de CDNB (150 mM) foi preparada em etanol e a glutathione reduzida (10 mM) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,5). Para cada reação, 138  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,5), 10  $\mu$ L de amostra 1:1, e 150  $\mu$ L de glutathione reduzida (10 mM) foram misturados e incubados em banho Maria a 30°C por 5 min. Em seguida 2  $\mu$ L de CDNB (150 mM) foi adicionado à reação. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione foi imediatamente lida a 340 nm usando a leitora de placa (Synergy H1, Multi-Moder, BioTek®, USA). A reação foi analisada por cinco minutos com intervalos de leitura de 15 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata totalizando nove repetições. Os dados de absorvância foram analisados em função do tempo de reação após a adição de CDNB. A inclinação da reta (absorvância/min) foi transformada usando o coeficiente de extinção do CDNB (9.6 mM<sup>-1</sup> .cm<sup>-1</sup>), sendo expressa em concentração ( $\mu$ moles de GS-DNB/min/mg de proteína).

**Ensaio de Monooxigenases Dependentes do Citocromo P450 (O-desmetilase).** A atividade de citocromo P450 foi determinada pela utilização do substrato p-nitroanisol (O<sub>2</sub>N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-CH<sub>3</sub>) que produz nitrofenol. A reação foi iniciada misturando 178,8  $\mu$ L de tampão fosfato (0,1M, pH 7,5) + glicerol a 20%, 56,2  $\mu$ L de amostra diluída 1:20, 2,5  $\mu$ L de p-nitroanisole (150 mM em etanol) e 12,5  $\mu$ L de NADPH reduzida (9,6 mM) em cada poço da microplaca e nessa ordem. A mistura foi incubada por 15 min a 37°C com 10  $\mu$ L de HCl (1M) adicionados ao final da incubação para parar a reação. Cada amostra foi analisada em triplicata. A atividade de citocromo P450 por amostra foi determinada com base na curva padrão para p-nitrofenol e expressa em pMol p-nitrofenol x min<sup>-1</sup> x mg de proteína<sup>-1</sup>.



**Análise Estatística.** Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos a análise de Probit utilizando o programa POLO Plus (LeOra-Software 2005) obtendo-se a partir daí suas respectivas  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e limites de confiança a 95% de probabilidade, bem como o coeficiente angular das curvas e erros padrões. O teste de igualdade para comparar as progênes F1 e F1' foi realizado com o auxílio do mesmo *software*. As mortalidades observadas nos tratamentos inseticidas foram corrigidas pela mortalidade do controle pelo método de Abbott (1925). As razões de resistência também foram calculadas utilizando o *software* POLO Plus e considerados significativas quando o limite de confiança a 95% não incluiu o valor 1,0 (Robertson et al. 2017). A dominância estimada ou dominância relativa do *fitness* ( $h$ ) foi calculada pela fórmula adaptada de Bourguet (2000):

$$h = \frac{\text{Desempenho relativo}_{F1\text{polled}} - \text{Desempenho relativo}_{BEZ-SUS}}{\text{Desempenho relativo}_{MOGI-SEL} - \text{Desempenho relativo}_{BEZ-SUS}}$$

onde:

$$\text{Desempenho relativo}_{BEZ-SUS} = \frac{100 - \text{mortalidade em uma determinada concentração}_{BEZ-SUS}}{100}$$

$$\text{Desempenho relativo}_{F1\text{polled}} = \frac{100 - \text{mortalidade em uma determinada concentração}_{F1\text{polled}}}{100}$$

$$\text{Desempenho relativo}_{MOGI-SEL} = \frac{100 - \text{mortalidade em uma determinada concentração}_{MOGI-SEL}}{100}$$

Os valores de  $h$  podem variar de 0 a 1, onde 1 indica dominância completa, 0,5 indica codominância e 0 indica recessividade completa. Para estimar se a herança da resistência de *T. absoluta* a clorfenapir era monofatorial ou polifatorial, as respostas esperadas e observadas da progênie F2 foram comparados através do teste do  $\chi^2$ .

Diferenças entre as médias de atividade de esterases, glutiona *S*-transferases e monooxigenases dependentes de citocromo P450 entre as populações suscetível (BZR-Sus) e

resistente (MGM-Sel) foram submetidas à análise de variância utilizando *software* estatístico (SAS Institute 2001)

## Resultados

**Herança da Resistência a Clorfenapir.** As  $CL_{50}$  estimadas para as populações BZR-Sus e MGM-Sel foram de 0,098 e 9,46 mg/L de clorfenapir, respectivamente (Tabela 1). A razão de resistência, baseada na  $CL_{50}$ , foi de 96,60 vezes. A hipótese de igualdade das respostas a clorfenapir para as progênies F1 e F1' obtidas a partir dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens BZR-Sus e MGM-Sel não foi rejeitada ( $\chi^2 = 5,04$ ; GL= 2;  $P > 0,05$ ) (Tabela 1). Os limites de confiança das  $CL_{50}$  sobrepuseram. Contudo, a igualdade dos coeficientes angulares estimados para as progênies F1 e F1' foi rejeitada ( $\chi^2 = 3,86$ ; GL= 1;  $P = 0,049$ ). Estes resultados, sobretudo a sobreposição dos limites de confiança das  $CL_{50}$  das progênies híbridas permitem concluir que a resistência de *T. absoluta* à clorfenapir é autossomal, ou seja, não existe efeito maternal (Uyenoyama 1986, Roush & Daly 1990).

A resposta à clorfenapir das progênies recíprocas foi mais próxima da população MGM-Sel, o que indica que a resistência de *T. absoluta* à clorfenapir é dominante. Os graus médios de dominância (D) obtidos foram de 0,51 para F1 (MGM-Sel ♀ x BZR-Sus ♂) e de 0,64 para F1' (MGM-Sel ♂ x BZR-Sus ♀). O F1 agrupado apresentou grau médio de dominância de  $0,57 \pm 0,56$ ; portanto, com intervalo de confiança a 95% variando de (0,01 – 1,13), o que permite concluir que a resistência de *T. absoluta* à clorfenapir varia de incompleta a completamente dominante (Tabela 1 e Fig. 1).

O modo de herança poligênico para a resistência de *T. absoluta* à clorfenapir foi confirmado mediante a análise pelo teste de  $\chi^2$  das mortalidades esperadas e observadas do retrocruzamentos da progênie F1<sub>Agrupado</sub> com o parental suscetível. As mortalidades observadas nos retrocruzamentos não foram significativamente diferentes das mortalidades esperadas ( $\chi^2 < 3,84$ ; GL=1;  $P > 0,05$ ), exceto para as concentrações de 0,049; 0,391 mg/L de clorfenapir (Tabela 2 e Fig. 1). O número efetivo de genes ( $nE$ ) foi de  $0,34 \pm 0,15$ , sugerindo um modelo monofatorial.

### **Dominância em Função da Concentração e Determinação da Concentração Discriminatória**

**Aplicada.** A dominância efetiva calculada ( $h$ ) mostrou ser dependente da dose utilizada (Tabela 3). Na menor dose, correspondente a 0,1 mg/L de clorfenapir, a resistência foi considerada funcionalmente dominante ( $h = 1$ ). Entretanto, na maior dose utilizada deste inseticida, correspondente a 5 mg/L, a resistência tendeu ser funcionalmente recessiva com o aumento das doses ( $h = 0,72$ ). A dose de 2,5 mg/L de clorfenapir pode ser utilizada como discriminatória uma vez que ela foi capaz de separar o fenótipo suscetível dos heterozigotos e resistentes a clorfenapir.

**Perfil de Resistência Cruzada.** A possibilidade de resistência cruzada foi observada quando se comparou as populações BZR-Sus e MGM-Sel (Tabela 4). Abamectina apresentou uma razão de toxicidade de 18,33 vezes, constatando resistência cruzada de clorfenapir com este inseticida. Já a cipermetrina apresentou baixa razão de toxicidade, mas altos valores de  $CL_{50}$  para ambas populações (45,5 e 78,39mg/L para BZR-Sus e MGM-Sel, respectivamente). Este resultado pode ter ocorrido devido a estabilidade da resistência de *T. absoluta* a este inseticida. Clorantraniliprole, espinetoram, indoxacarbe e metoxifenoazida apresentaram baixas razões de toxicidade (2,48; 4,05; 3,55; 1,54 vezes, respectivamente) e baixos valores de  $CL_{50}$  para ambas populações. O inseticida clorfenapir apresentou uma razão de toxicidade de 72,03 vezes quando se comparou a população BZR-Sus e MGM-Sel. Já o fenpiroximato apresentou um sensível aumento da  $CL_{50}$  da população MGM-Sel (20,01mg/L) em relação a população BZR-Sel (12,99 mg/L).

**Ensaio de Sinergismo.** Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios com os sinergistas DEM, PBO e TPP para as populações BZR-Sus e MGM-Sel de *T. absoluta*, assumiram o modelo de Probit ( $P > 0,05$ ). A  $CL_{50}$  da população suscetível (BZR-Sus) foi de 0,08 mg, enquanto para a população resistente (MGM-Sel) foi de 7,01 mg de clorfenapir/L. As  $CL_{50}$  obtidas para a população BZR-Sel utilizando os sinergistas PBO, TPP e DEM + clorfenapir foram de 0,35; 0,31 e 0,21 mg de clorfenapir/L, respectivamente. Logo, as razões de sinergismo foram 0,24; 0,27 e 0,39 vezes para o

PBO, TPP e DEM, respectivamente (Tabela 5). Embora tenha sido observado antagonismo na presença dos sinergistas PBO, TPP e DEM com o aumento da  $CL_{50}$  em 4,37; 3,87 e 2,62 vezes em relação a BZR-Sus este não foi significativo com base nos seus limites de confiança. Para a população MGM-Sel, as  $CL_{50}$  estimadas foram de 6,88; 5,18; e 7,56 mg de clorfenapir/L para o PBO, TPP e DEM, respectivamente. As razões de sinergismo foram de 1,02 vezes para PBO, 1,35 vezes para TPP e 0,93 vezes para o DEM. Por outro lado, não foi observado sinergismo significativo para PBO e TPP. Para o DEM houve antagonismo, embora este também não tenha sido significativo com base nos limites de confiança obtidos (Tabela 5).

**Análise Enzimática.** A atividade de  $\alpha$ -esterase para as populações de BZR-Sus e MGM-Sel foi de  $0,087 \pm 0,010$  e  $0,082 \pm 0,005$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente. Já para  $\beta$ -esterase, a atividade foi de  $0,47 \pm 0,16$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para a população BZR-Sus e  $0,34 \pm 0,02$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para a população MGM-Sel (Figura 2). Embora diferenças numéricas tenham sido encontradas, não houve diferença significativa na atividade tanto de  $\alpha$  quanto de  $\beta$ -esterases entre as populações suscetível e resistente de *T. absoluta*. (Anova, GL =1,  $P > 0,477$ ) e (Anova, GL=1,  $P < 0,144$ ). A atividade de glutathiona S-transferases foi de  $0,019 \pm 0,0008$  e  $0,019 \pm 0,0007$  mMol/min/mg de proteína para as populações de BZR-Sus e MGM-Sel, respectivamente (Figura 2). Contudo, diferenças significativas não foram encontradas (Anova, GL=1,  $P > 0,952$ ). Para monooxigenases diferenças significativas foram encontradas quando se comparou as populações sensível e resistente de traça-do-tomateiro (Anova, GL=1,  $P < 0,0001$ ). Os valores para BZR-Sus foi de  $0,06 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. Já para a população MGM-Sel a atividade de monooxigenases foi de  $0,01 \pm 0,001$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (Fig. 2).

## Discussão

Clorfenapir é um inseticida/acaricida muito utilizado no controle de pragas agrícolas, incluindo a *T. absoluta* (Agrofit 2019). No entanto, seu uso recente em excesso levou populações de traça-do-tomateiro a níveis preocupantes de resistência aqui relatados (Silva 2019 capítulo 2). Outros casos de resistência a clorfenapir foram relatados nas espécies *Spodoptera litura* (Fabricius) (Ahmad & Mehmood 2015), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Gunning & Moores 2002, Ahmad *et al.* 2003), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Zhi 2004), *Tetranychus urticae* (Koch) (Uesugi 2002, Van Leeuwen *et al.* 2005) e *Oxycarenus hyalinipennis* (Costa) (Ullah *et al.* 2016). Contudo, a genética da resistência a clorfenapir foi estudada apenas para as três últimas espécies supracitadas (Uesugi 2002, Van Leeuwen *et al.* 2004, Zhi 2004, Ullah *et al.* 2016, Lima Neto & Siqueira 2017). No entanto, estas são as primeiras informações a respeito do modo de herança, metabolismo e perfil de resistência cruzada à clorfenapir em *T. absoluta*.

A resistência de *T. absoluta* variou de incompletamente a totalmente dominante. Isto está baseado nos valores próximos de  $CL_{50}$  dos heterozigotos e do parental resistente (MGM-Sel) bem como nos limites de confiança da dominância [0,01-1,13] que incluiu o valor 1,0 (Robertson *et al.* 2007). Contudo, a hipótese de igualdade foi rejeitada quando comparadas as curvas do  $F1_{Agrupado}$  com MGM-Sel. Esta plasticidade da dominância da resistência a clorfenapir tem sido observada em outros casos como em população de *T. urticae* (completamente dominante), dominância incompleta em *O. hyalinipennis* (Uesugi 2002, Ullah *et al.* 2016). Não obstante, a resistência ao clorfenapir em outra população de *T. urticae* foi incompletamente recessiva (Van Leeuwen *et al.* 2004). Adicionalmente, este é o primeiro de caso de resistência dominante em *T. absoluta*, diferindo do padrão de dominância encontrado em populações brasileiras de *T. absoluta* frente a outros inseticidas como espinosinas e diamidas (Campos *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016). Ullah *et al.* (2016) afirmaram que diferentes

padrões genéticos da resistência a um inseticida específico podem ocorrer por discrepâncias nas histórias de seleção, origem geográfica das espécies, mecanismos de desintoxicação e as espécies examinadas. Além disso, o nível de dominância não pode ser considerado um parâmetro fixo para uma espécie específica. Sobretudo, devido à influência das condições ambientais e a genética sobre os níveis de dominância (Bourguet *et al.* 2000). Com base na dominância efetiva, se sugere pelo menos 5mg clorfenapir/L como dose diagnóstica para diagnóstico da resistência em populações de campo.

A resistência de *T. absoluta* a clorfenapir foi autosômica, sugerindo que o fator associado a esta esteja em outro cromossomo que não os sexuais, isto é, machos e fêmeas contribuem para a evolução da resistência de *T. absoluta* a clorfenapir. Esta hipótese foi confirmada pela igualdade das curvas entre as progênies F1 e F1' e conseqüentemente a sobreposição dos limites de confiança das CL50 de ambas. Resistência em populações de traça-do-tomateiro a espinosinas e diamidas foram igualmente autossômicas (Campos *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016), bem como em outras espécies resistentes a clorfenapir (Uesugi 2002, Ullah *et al.* 2016). A menor inclinação da linha do retrocruzamento (F<sub>2</sub>) com relação aos parentais BZR-Sus e F<sub>1</sub>, bem como o número mínimo de genes ( $n_E \geq 0,34$ ). Lande (1981) sugeriram que a resistência de *T. absoluta* a clorfenapir é influenciada por um ou poucos genes. No entanto, este padrão não ficou claro no teste direto (Tabashnik 1991), onde observamos que as mortalidades esperadas sugeriram um modelo polifatorial que não diferiu das mortalidades observadas na maioria das concentrações. Estas inconsistências estão usualmente associadas a seleções em laboratório, gerando resistências poligênicas (Oppenoorth 1984). No entanto, divergências na herança da resistência a clorfenapir foram relatadas em *T. urticae*, na qual ambas heranças monogênicas e poligênicas foram encontradas em diferentes populações de *T. urticae* (Uesugi 2002, Van Leeuwen *et al.* 2004) e poligenica em *O. hyalinipennis* mais recentemente (Ullah *et al.* 2016).

Perfis de resistências cruzadas (proteção a mais de um inseticida através de um mecanismo único) são ferramentas valiosas não somente na identificação de mecanismos de resistência conhecidos, mas também na determinação do espectro de resistência cruzada quando um novo mecanismo de resistência é identificado (Scott, 1990). Desta forma, é possível identificar outros inseticidas que possam ser utilizados em manejo de resistência a um grupo químico ou molécula. Embora tenham sido significantes, as resistências cruzadas (RR50) para cipermetrina, clorantraniliprole, espinetoram e indoxacarbe não sugerem uma associação com um mecanismo de resistência em comum (RR50 menores que 5x). Portanto, os demais e metoxifenoazida podem ser usados em rotação com clorfenapir. Populações brasileiras e de outros países apresentam graus elevados de resistência a piretroides (Silva et al 2012, Haddi et al 2012), assim não se recomenda a inclusão da cipermetrina neste caso, uma vez que as CL<sub>50</sub> de ambas populações foram altas. A resistência cruzada de clorfenapir com abamectina ficou em evidência neste estudo, sugerindo a presença de mecanismos em comum aos dois grupos químicos. Nicastro *et al.* (2013) também indicaram possível resistência cruzada entre o clorfenapir e abamectina no controle de *T. urticae* corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Desta forma, não é recomendado o uso de abamectina após o uso de clorfenapir para o controle de *T. absoluta*.

O sinergismo de clorfenapir em *T. absoluta* (MGM-Sel) revelou pouca evidência de metabolismo, o esperado aumento de toxicidade pelos sinergistas não diferiu do tratamento sem sinergista, nem mesmo evidência de antagonismo. Contrariamente, antagonismo da toxicidade de clorfenapir na população suscetível (BZR-Sus) ocorreu com todos os sinergistas avaliados. Isto ocasionou a redução das razões de resistência em 4,5x; 5,2x e 2,4x para PBO, TPP e DEM, respectivamente. Isto sugere que monooxigenases de função mista (MFO) não estão sendo inibidas em MGM-Sel por que possivelmente não são expressas ou há uma redução drástica desta. Van Leeuwen *et al.* (2004) e Ullah *et al.* (2016), sugeriram o envolvimento de esterases na resistência de

*T. urticae* e *O. hyalinipennis* a clorfenapir, mas neste último foi observado um antagonismo por PBO na população resistente, sugerindo diminuição na ativação (MFOs) (Van Leeuwen *et al.* 2004, Raghavendra *et al.* 2011) e aumento na destoxificação (Esterase) magnificando a resistência, padrão diferente dos resultados aqui encontrado. Para que a haja toxicidade de clorfenapir é preciso a sua ativação por monoxigenases de funções mistas (Black *et al.* 1994). A diminuição da ativação do clorfenapir na população BZR-Sus e inalteração de sua toxicidade em MGM-Sel está em acordo com as respostas de MFOs e, portanto, reforça a hipótese de que MGM-Sel reduz a expressão destas, diminuindo a ativação do clorfenapir e consequentemente sua toxicidade. No entanto, não fica descartada um provável envolvimento de esterases na resistência a clorfenapir, pois a resistência cruzada com abamectina pode sugerir a presença de carboxilesterases agindo como sequestrantes (Clark *et al.* 1992). Houve respectivamente um leve sinergismo e antagonismo em MGM-Sel e BZR-Sus, evidenciando possível efeito sequestrante. Nesse contexto, *T. absoluta*, como alternativa para sua sobrevivência, provavelmente evitou a produção de monoxigenases impedindo a ativação do produto, sequestrando-o e posteriormente, excretando-o ainda inativado do seu organismo.

Em face dos problemas de resistência, estratégias preventivas são necessárias para prolongar a eficácia dos inseticidas utilizados no controle da *T. absoluta*. A caracterização da resistência de *T. absoluta* a clorfenapir podem fornecer subsídios para um manejo de resistência mais eficiente. Neste ensejo, práticas como o monitoramento da resistência que podem auxiliar na manutenção da suscetibilidade a clorfenapir, bem como a rotação com produtos que não apresentem resistência cruzada, contribuirão para o manejo mais consciente da traça-do-tomateiro. No entanto, o mecanismo de resistência a clorfenapir em *T. absoluta* ainda é uma incógnita, necessitando de investigação para elucidar o processo fisiológico que ocasiona a resistência a clorfenapir nesta praga.



## Literatura Citada

- Agosin, M. 1985.** Role of microsomal oxidations in insecticide degradation, p. 647–712. In G.A. Kerkut & L.I. Gilbert (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. New York. Pergamon, 8200p.
- Agrofit. 2019.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em 19 de janeiro de 2019.
- Ahmad, M. & R. Mehmood. 2015.** Monitoring of resistance to new chemistry insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *J. Econ. Entomol.* 108: 1279-1288.
- Ahmad, M., M.I. Arif & Z. Ahmad. 2003.** Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop Prot.* 22: 539-544.
- 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.
- Balmert, N.J., S.S.C. Rund, J.P. Ghazi, P. Zhou & G.E. Duffield. 2014.** Time-of-day specific changes in metabolic detoxification and insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.* 64: 30-39.
- Bass, C. & L.M. Field. 2011.** Gene amplification and insecticide resistance. *J. Pest Sci.* 67: 886-890.
- Black, B.C., R.M. Hollingworth, K.I. Ahammadsahib, C.D. Kukel & S. Donovan. 1994.** Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles. *Pest. Biochem. Physiol.* 50: 115-128.
- Bourguet, D., A. Genissel & M. Raymond. 2000.** Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93: 1588–1595.
- Brown, T.M. & W.G. Brogdon. 1987.** Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 145-162.
- Wilkinson, C.F. & L.B. Brattsten. 1972.** Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. *Drug Metab. Rev.* 1: 153-227.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015b.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* 88: 405-412.
- Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, W.M. Silva, T.B.M. Silva, V.R.F. Silva, R.N.C. Guedes & H.A.A. Siqueira. 2014.** Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLoS ONE* 9:e:xxx

- Clark, J.M., J.A. Argentine, H. Lin, X.Y. Gao. 1992.** Mechanisms of abamectin resistance in the colorado potato beetle American chemical society. Washington, DC. p.247-263 (Simpósio).
- Conyers, C.M., A.D. MacNicoll & N.R. Price. 1998.** Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorous insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis*, (Coleoptera: Silvernidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 435-448.
- Dekeyser, M.A. 2005.** Acaricide mode of action. J. Pest Sci. 61: 103-110.
- Georghiou, G.P. 1983.** Management of resistance in arthropods, p. 769–792. In T. Saito & G.P. Georghiou (eds.), Pest resistance to pesticides. New York, Plenum, 810p.
- Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319-323.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bull. 42: 211-216.
- Gunning, R. & G. Moores. 2002.** Chlorfenapyr resistance in *Helicoverpa armigera* in Australia, Brighton, Conference of pests and diseases, 6p. (Conference paper)
- 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.
- Heckel, D.G., L.J. Gahan, Y.-B. Liu & B.E. Tabashnik. 1999.** Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences 96: 8373.
- Hodgson, E. 1985.** Microsomal mono-oxygenases. Insect.. Biochem. Physiol. 11: 225-321.
- Hunt, D.A. & M.F. Treacy. 1998.** Pyrrole Insecticides: A new class of agriculturally important insecticides functioning as uncouplers of oxidative phosphorylation, p. 138-151. In I. Ishaaya & D. Degheele (eds.), Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanisms and Application. Berlin, Narosa publishing house, 289p.
- Hemingway, J. 1989.** A note on simple biochemical methods for resistance detection and their field application in Sri Lanka. Pestic. Sci. 27: 281-285.
- Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 1009-1015.
- 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.

- Hemingway, J., G.J. Small, S. Lindsay, F.H. Collins. 1995.** Combined use of biochemical, immunological and molecular assays for infection, species identification and resistance detection in field populations of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). In S.S.B. Media (eds.), *The Ecology of Agricultural Pests: Bio-chemical Approaches*. London, Chapman and Hall, Xp.
- Khambay, B.P.S. & P.J. Jewess. 2005.** Pyrethroids. 1-29. In L.I. Gilbert & S.S. Gill., *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Pergamon. 3300p.
- Lande, R. 1981.** The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541.
- Lehmann, E.L. 1966.** Testing statistical hypotheses. New York, Wiley. 369p.
- LeOra Software 2005.** Polo Plus computer program, version By LeOra Software.
- Li, X., M.A. Schuler & M.R. Berenbaum. 2006.** Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 231-253.
- Lima Neto, J.E. & H.A.A. Siqueira. 2017.** Selection of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorfenapyr resistance: heritability and the number of genes involved. *Rev. Caatinga* 30: 1067-1072.
- Matsumura, F. 1985.** Toxicology of insecticides. New York, Plenum Press. 598p.
- Nicastro R.L., M.E. Sato, V. Arthur & M.Z. Silva. 2013.** Chlorfenapyr resistance in the spider mite *Tetranychus urticae*: stability, cross-resistance and monitoring of resistance. *Phytoparasitica* 41:503–513
- Oppenoorth, F.J. 1984.** Biochemistry of insecticide resistance. *Pest. Biochem. Physiol.* 22: 187-193.
- Philogène, B.J.R. 1993.** Insecticide synergists: Role, importance, and perspectives AU - B-Bernard, Claude. *J. Toxicol. Environ. Health* 38: 199-223.
- Preisler, H.K., M.A. Hoy & J.L. Robertson. 1990.** Statistical analysis of modes of inheritance for pesticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 83: 1649-1655.
- Raffa, K.F. & T.M. Priester. 1985.** Synergists as research tools and control agents in agriculture. *J. Agric. Entomol.* 2: 27-45.
- Raghavendra, K., T.K. Barik, P. Sharma, R.M. Bhatt, H.C. Srivastava, U. Sreehari & A.P. Dash. 2011.** Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malar. J.* 10: 16-16.
- Rizzieri, D.A., T.J. Dennehy & T.J. Glover. 1988.** Genetic analysis of dicofol resistance in two populations of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from New York apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 81: 1271-1276.

- Roush, R.T. & J.F.W. Plapp. 1982.** Biochemical Genetics of Resistance to Aryl Carbamate Insecticides in the Predaceous Mite, *Metaseiulus occidentalis*. J. Econ. Entomol. 75: 304-307.
- Roush, R.T. & J.C. Daly. 1990.** The role of population genetics in resistance research and management. In R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.) Pesticide Resistance in Arthropods. Boston. Springer. 352p.
- Scott, J.G. 1991.** Insecticide resistance in insects, p. 663-677. In D. Pimentel (ed.), Handbook of pest management in agriculture. Boca Raton, CRC Press.784p
- Silva, J.E., C.P.O. Assis, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016.** Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. J. Econ. Entomol. 109: 2190-2195.
- Silva, P.A.F. 2019.** Suscetibilidade de *Tuta absoluta* (Meyrick) a inseticidas: monitoramento e caracterização da resistência ao clorfenapir. Tese de Doutorado, UFRPE, 61p.
- Silva, W.M., M. Berger, C. Bass, V.Q. Balbino, M.H.P. Amaral, M.R. Campos & H.A.A. Siqueira. 2015.** Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. Pest. Biochem. Physiol. 122: 8-14.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2001a.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agr. Forest Entomol. 2: 147-153.
- Stone, B.F. 1968.** A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. Bull. World Health Organ. 38: 325-326.
- Stumpf, N. & R. Nauen. 2001.** Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 94: 1577-1583.
- Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. J. Econ. Entomol. 84: 703-712.
- Tabashnik, B.E., J.M. Schwartz, N. Finson & M.W. Johnson. 1992.** Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entom. 85: 1046-1055.
- Tropea Garzia, G., G. Siscaro, A. Biondi & L. Zappalà. 2012.** *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. EPPO Bulletin 42: 205-210.
- Tsukamoto, M. 1983.** Methods of genetic analysis of insecticide resistance, p. 71-98. In G.P. Georgiou & T. Saito (eds.), Pest resistance to pesticides. New york. Plenum, 810p.
- Uesugi, R. 2002.** Genetic basis of resistances to chlorfenapyr and etoxazole in the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 95: 1267-1274.

- Ullah, S., R.M. Shah & S.A. Shad. 2016.** Genetics, realized heritability and possible mechanism of chlorfenapyr resistance in *Oxycarenum hyalinipennis* (Lygaeidae: Hemiptera). *Pest. Biochem. Physiol.* 133: 91-96.
- Uyenoyama, M.K. 1986.** Pleiotropy and the evolution of genetic systems conferring resistance to pesticides, p. 207-221. In N.R. Council [eds.], *Pesticide resistance: strategies and tactics for management*. Washington, National Academy Press, 472p.
- Van Leeuwen, T., V. Stillatus & L. Tirry. 2004.** Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Exp. App. Acarol.* 32: 249.
- Van Leeuwen, T., S. Van Pottelberge & L. Tirry. 2005.** Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *J. Pest Sci.* 61: 499-507.
- Zhi, Z.G. 2004.** The Study on genetics of chlorfenapyr resistance in *Plutella Xylostella*. Dissertação de mestrado, Agricultural University of Hebei.

Tabela 1. Toxicidade de clorfenapir para as populações suscetível (S), Resistente (R), cruzamento recíproco F1 (♂ S x ♀ R), cruzamento recíproco F1' (♂ R x ♀ S) e retrocruzamento (F1 Agrupado x S) de *Tuta absoluta*.

População/ progênie <sup>1</sup>	N	$\chi^2$ (GL)	Slope $\pm$ EP	CL <sub>50</sub> (LC <sub>95%</sub> ) <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (LC <sub>95%</sub> ) <sup>3</sup>	DD <sub>50</sub> $\pm$ SE <sup>4</sup>
BZR-Sus	139	7,02 (5)	1,33 $\pm$ 0,25	0,098 (0,02-0,21)	1,00 (0,43– 2,32)	-
MGM-Sel	143	1,05 (5)	2,30 $\pm$ 0,44	9,46 (5,59-13,52)	96,60 (48,05– 194,21)*	-
♀R x ♂S (F <sub>1</sub> )	114	10,80 (12)	1,18 $\pm$ 0,19	3,05 (1,68-6,26)	31,13 (13,33– 72,69)*	0,51 $\pm$ 0,38
♀S x ♂R (F <sub>1</sub> ')	160	2,26(12)	1,85 $\pm$ 0,30	4,13 (2,63-6,47)	42,20 (20,68– 86,11)*	0,64 $\pm$ 0,34
F <sub>1</sub> Agrupado	215	3,09(10)	1,57 $\pm$ 0,18	3,57 (2,53-5,13)	36,43 (18,72– 70,89)*	0,57 $\pm$ 0,28
F <sub>1</sub> Agrupado x BZR-Sus	140	4,39 (12)	0,95 $\pm$ 0,14	0,57 (0,28-1,07)	5,79 (2,43 – 13,80)*	-

<sup>1</sup>As progênes resultaram do cruzamento recíproco e retrocruzamento; <sup>2</sup>CL – Concentração letal (mg de clorfenapir/L); <sup>3</sup>Razão de resistência: razão entre CL<sub>50</sub> estimada entre a população resistente e suscetível, e os limites de confiança de 95% da CL<sub>50</sub> foram estimados utilizando Robertson *et al.* (2017). \* Razão de resistência significativa quando o limite de confiança<sub>95%</sub> não inclui o valor 1.0; <sup>4</sup>Grau de dominância (D = -1 quando completamente recessiva e D = 1 quando completamente dominante). n, número de insetos testados, GL – Graus de liberdade, EP – Erro padrão, e  $\chi^2$ , teste de Qui-quadrado.

Tabela 2. Teste direto de herança monofatorial da resistência a clorfenapir para *Tuta absoluta*, comparando as mortalidades observada e esperada do retrocruzamento (F1 Agrupado X BZR-Sus).

Concentração (mg/L)	Mortalidade observada (%)	Mortalidade esperada(%)	$\chi^2$
0,024	10	8,45	0,28 <sup>ns</sup>
0,049	10	18,42	3,85*
0,098	20	28,93	2,77 <sup>ns</sup>
0,195	40	29,94	3,38 <sup>ns</sup>
0,391	50	35,61	5,82*
0,78	50	54,87	0,43 <sup>ns</sup>
1,56	70	62,50	0,90 <sup>ns</sup>
3,125	70	72,50	0,09 <sup>ns</sup>
6,25	80	77,50	0,08 <sup>ns</sup>
12,5	90	90,00	- <sup>ns</sup>
25	90	96,67	0,46 <sup>ns</sup>
50	100	100,00	- <sup>ns</sup>
100	100	100,00	- <sup>ns</sup>
200	100	100,00	- <sup>ns</sup>
<b>Total</b>	-	-	<b>18,05<sup>*</sup></b>

<sup>ns</sup> não significativo \*significativo a 5% de probabilidade baseado no teste de Qui-quadrado.

Tabela 3. Dominância efetiva para as populações suscetível (BZR-Sus), resistente (MGM-Sel) e progênie F1<sub>Agrupado</sub> de *Tuta absoluta* submetidas a diferentes concentrações de clorfenapir.

Concentração (mg/L)	População/ Progênie <sup>1</sup>	n	Mortalidade (%)	Desempenho <sup>2</sup>	<i>h</i> <sup>3</sup>
0,1	BZR-Sus	32	16,04	0,84	1,00
	F1 Agrupado	30	0,00	1,00	
	MGM-Sel	32	0,00	1,00	
0,3	BZR-Sus	33	40,05	0,60	0,75
	F1 Agrupado	33	9,09	0,90	
	MGM-Sel	36	0,00	1,00	
0,6	BZR-Sus	38	53,77	0,46	0,57
	F1 Agrupado	31	22,58	0,77	
	MGM-Sel	31	0,00	1,00	
1,2	BZR-Sus	33	90,61	0,09	0,75
	F1 Agrupado	30	26,66	0,73	
	MGM-Sel	32	6,25	0,94	
2,5	BZR-Sus	31	96,67	0,03	0,73
	F1 Agrupado	30	43,33	0,57	
	MGM-Sel	31	22,58	0,77	
5	BZR-Sus	30	100	0,00	0,72
	F1 Agrupado	31	51,61	0,48	
	MGM-Sel	33	33,33	0,67	

<sup>1</sup>BZR-Sus e MGM-Sel são as populações suscetíveis e resistentes, respectivamente; F1<sub>Agrupado</sub> corresponde a soma dos heterozigotos F1+F1' obtidos do cruzamento recíproco entre os parentais. <sup>2</sup>Desempenho em relação a taxa de sobrevivência entre suscetível (BZR-Sus), progênie F1<sub>Agrupado</sub>, e população resistente (MGM-Sel). <sup>3</sup>Os valores de *h* variam entre 0 (completamente recessivo) e 1 (completamente dominante). A resistência é codominante ou aditiva se o valor de *h* é 0,5, incompletamente recessiva se é entre  $0 < h < 0,5$ , e incompletamente dominante se é  $0,5 < h < 1$ .



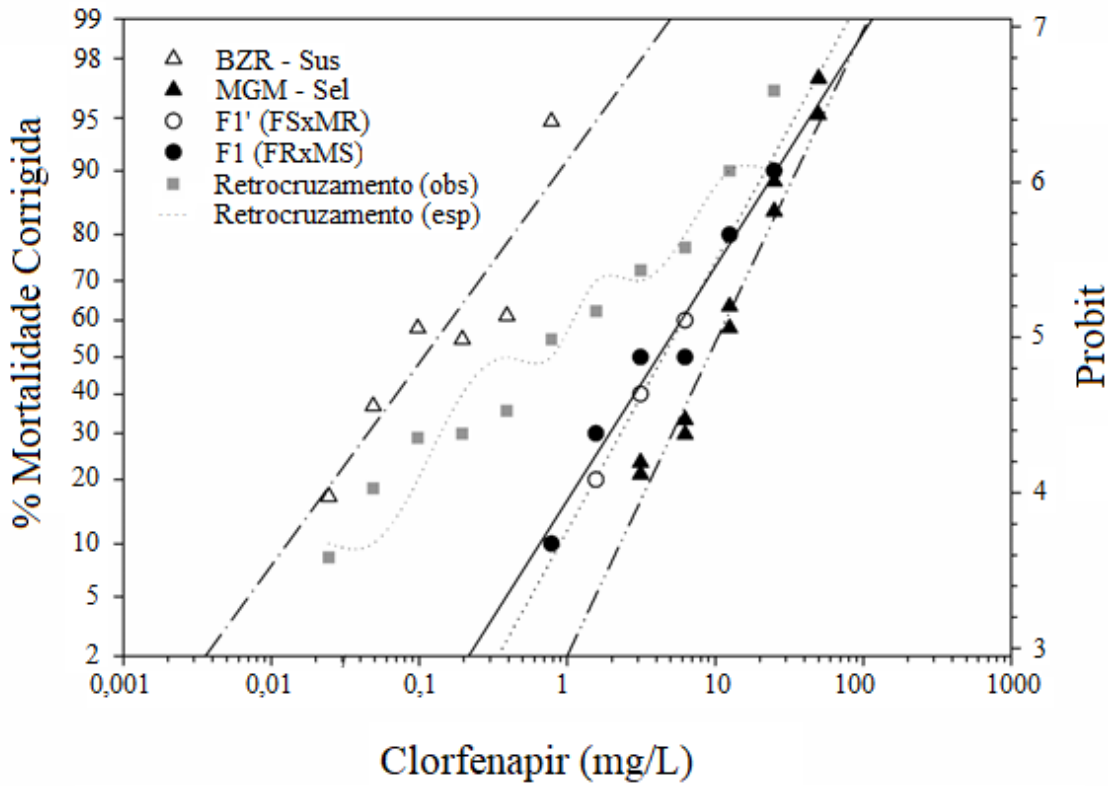


Figura 1.

Curva de concentração-mortalidade ao inseticida clorfenapir para as populações de *Tuta absoluta* suscetível (BZR-Sus), resistente (MGM-Sel), progênies F1 e F1' ( $\text{♀R} \times \text{♂S}$  e  $\text{♀S} \times \text{♂R}$ ) e mortalidades esperadas e observadas no retrocruzamento ( $\text{F1}_{\text{Agrupado}} \times \text{BZR-Sus}$ ).

Tabela 4. Perfil de resistência cruzada a clorfenapir entre população suscetível (BZR-Sus), resistente (MGM-Sel) de *Tuta absoluta*.

Inseticidas	População	N <sup>a</sup>	Slope ± SE <sup>b</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	CL <sub>95</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup> (gl) <sup>d</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>e</sup>
Abamectina	BZR-Sus	180	2,88±0,51	0,009 (0,007- 0,012)	0,04 (0,03-0,07)	1,75(4)	18,33
	MGM-Sel	271	3,47±0,49	0,18 (0,15- 0,22)	0,53 (0,40- 0,83)	0,44(7)	(13,21- 25,44)*
Cipermetrina	BZR-Sus	306	2,29±0,26	45,05 (35,73- 56,50)	234,13 (164,72-390,45)	5,81(8)	1,74 (1,26-
	MGM-Sel	307	2,19±0,23	78,39 (62,16-98,44)	440,36 ( 309,58-725,38)	1,98(8)	2,40)*
Clorantraniliprole	BZR-Sus	168	2,23±0,35	0,03 (0,02 -0,04)	0,19 (0,12-0,38)	3,64(5)	2,48 (1,50-
	MGM-Sel	165	1,66±0,24	0,08(0,04-0,15)	0,83 (0,38-4,76)	9,99 (6)	4,09)*
Clorfenapir	BZR-Sus	144	1,68±0,31	0,15(0,08-0,23)	1,46 (0,82-4,25)	3,53(5)	72,03
	MGM-Sel	234	2,56±0,33	11,01(8,53-13,89)	48,40 (34,56-80,91)	1,95(6)	(42,26- 122,77)*
Espinetoram	BZR-Sus	167	1,93±0,32	0,03 (0,01 to 0,05)	0,20 (0,09-1,56)	7,57(5)	4,05 (1,70-
	MGM-Sel	160	2,04±0,70	0,12 (0,02-0,20)	0,74 (0,40-7,49)	3,88(6)	9,63)*
Fenpiroximato	BZR-Sus	140	1,23±0,27	12,99 (4,14-25,16)	279,34 (122,35- 1632,97)	3,07(5)	1,54 (0,59-
	MGM-Sel	140	1,07±0,16	20,01 (11,62- 35,03)	685,21(269,09- 3339,08)	4,41(5)	4,04)
Indoxacarbe	BZR-Sus	295	2,18±0,37	0,06 (0,04-0,08)	0,33 (0,22-0,64)	2,35(8)	3,55 (2,09-
	MGM-Sel	241	1,95±0,28	0,20 (0,14- 0,28)	1,44 (0,95-2,77)	2,78(6)	6,02)*
Metoxifenoziata	BZR-Sus	320	1,01±0,11	3,73 (2,50-5,36)	156,65 (81,19-409,09)	6,82(8)	1,54 (0,81-
	MGM-Sel	249	1,91±0,41	2,42 (1,09-3,63)	17,51 (11,45-41,51)	2,35(5)	2,96)

<sup>a</sup> Número total de insetos usados, <sup>b</sup> Inclinações das curvas e erro padrão, <sup>c</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água, <sup>d</sup> χ<sup>2</sup> teste de qui-quadrado e grau de liberdade. <sup>e</sup> Razão de resistência: razão das estimativas da CL<sub>50</sub> entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson et al. (2017) e limite de confiança a 95% das estimativas da CL<sub>50</sub>. \* RR<sub>50</sub> significativa se o limite de confiança não incluir o valor 1,0.

Tabela 5. Sinergismo de clorfenapir em populações suscetível (BZR-Sus) e resistente (MGM-Sel) de *Tuta absoluta*.

População	Tratamento	N <sup>a</sup>	Slope ± EP <sup>b</sup>	LC <sub>50</sub> (LC95%) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup> GL <sup>d</sup>	SR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>e</sup>
BZR-Sus	Clorfenapir	143	1,41±0,24	0,08(0,03-0,16)	8,28 (5)	1,0 (0,55– 1,82)
	+ PBO	125	1,43±0,23	0,35(0,19- 0,79)	6,43 (5)	0,24 (0,13– 0,43)
	+ TPP	125	1,72±0,26	0,31(0,21- 0,45)	1,05 (5)	0,27 (0,15– 0,47)
	+ DEM	127	1,54±0,25	0,21(0,12 - 0,36)	5,32 (5)	0,39 (0,22– 0,70)
MGM-Sel	Clorfenapir	120	2,29±0,36	7,01(5,26- 9,62)	2,11(6)	1,0 (0,66– 1,51)
	+ PBO	95	2,11±0,37	6,88(4,90- 10,14)	2,13(4)	1,02 (0,65– 1,60)
	+ TPP	105	1,90±0,31	5,18(3,46-7,50)	3,00(5)	1,35 (0,84– 2,18)
	+ DEM	92	2,38±0,43	7,56(4,38- 14,57)	4,92(4)	0,93 (0,60– 1,43)

<sup>a</sup> Número total de insetos usados. <sup>b</sup> Inclinações das curvas e erro padrão. <sup>c</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água. <sup>d</sup> χ<sup>2</sup> teste de qui-quadrado e grau de liberdade. <sup>e</sup> Razão de resistência: razão das estimativas da CL<sub>50</sub> entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson et al. (2017) e limite de confiança a 95% das estimativas da CL<sub>50</sub>. \* RR<sub>50</sub> significante se o limite de confiança não incluir o valor 1,0.

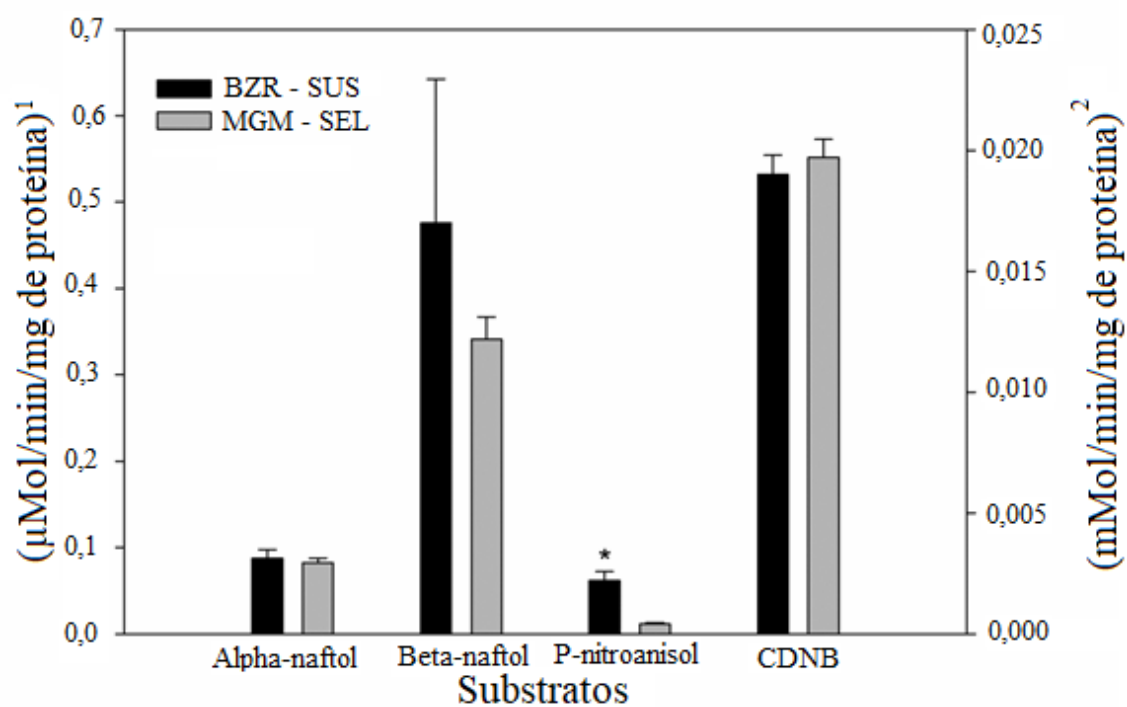


Figura 2. Atividade enzimática em populações de *Tuta absoluta*.

<sup>1</sup>Escala referente a atividade dos produtos de esterases ( $\alpha$ - naftil e  $\beta$ -naftil) e monoxigenases (P-nitrofenol); <sup>2</sup> Escala referente a atividade dos produtos de glutionas (GS-DNB)

## CAPÍTULO 4

### COSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência à inseticida pode ser considerada um benefício para pragas agrícolas. Contudo, em muitas espécies, este fenômeno pode ser custoso em relação a outras características da história de vida. Neste contexto, é possível que a resistência não evolua de forma exacerbada devido a esses custos associados. Até o presente momento, a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*, desenvolveu resistência a 15 compostos diferentes.

Embora o clorfenapir seja utilizado no controle da traça-do-tomateiro desde os anos 2000, poucos estudos têm sido direcionados para impedir a perda precoce deste composto. O modo de herança autossomal, dominante e monogênico encontrado nesse estudo, pode contribuir de forma proativa no manejo dessa resistência, sobretudo se for utilizada a dose discriminatória aqui sugerida.

A utilização da dose discriminatória pode contribuir, de forma eficaz, para a detecção da resistência, especialmente por necessitar de menos insetos e menor dispêndio de tempo do que uma curva concentração-resposta. Os resultados obtidos permitem de certa forma, um manejo da resistência mais preciso nas áreas afetadas. Por outro lado, a compreensão do mecanismo metabólico envolvido na resistência a inseticidas não pode ser ignorado, uma vez que este pode contribuir amplamente na resistência a outros compostos em campo.

Estudos envolvendo o proteoma devem ser realizados no futuro. O proteoma trata-se um conjunto de proteínas de um organismo sintetizadas em um determinado momento ou em uma dada situação, e, a exposição a inseticidas, por exemplo, pode desencadear ajustes de expressão gênica, que, de maneira inevitável, culminam com alterações no proteoma do organismo envolvido podendo contribuir na resistência. A utilização da técnica de proteômica pode obter informações completas

sobre o que acontece na resistência a um determinado inseticida, sobretudo se o estudo envolver populações de fenótipos distintos (RR x SS) podendo, assim, contribuir na identificação de possíveis mecanismos envolvidos na resistência de *T. absoluta* a clorfenapir.