

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
INSETICIDAS: STATUS E MECANISMOS

por

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA

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

RESUMO

A traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma das pragas de maior importância para a tomaticultura do Brasil. O seu controle é realizado principalmente por frequentes aplicações de inseticidas que causam falhas de controle em campo, geralmente associadas ao desenvolvimento de populações resistentes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o status da resistência a inseticidas e caracterizá-la em populações de *T. absoluta*. A variação de resistência entre as populações foi de 3,3; 21,2; 4,6; 6,4; 6,2; 3,1 e 11,7 vezes para indoxacarbe, metaflumizone, clorfenapir, cartape, abamectina, clorpirifós e metamidofós, respectivamente. Os valores de CL₈₀ para cartape, clorpirifós e metamidofós estavam acima da dose de campo recomendada, sugerindo falhas de controle em campo. A variação nas respostas das populações de *T. absoluta* ao metaflumizone sugere cautela, pois não está claro se trata de uma resposta natural ou resistência cruzada, relacionada ao uso prévio do indoxacarbe, apesar da inobservância de correlação entre ambos. A atividade de enzimas detoxificativas variou entre as populações e nas associações com os inseticidas, porém é preliminar afirmar que o metabolismo está associado à resistência a estes produtos. A toxicidade de clorpirifós não correlacionou com aquela de metamidofós, sugerindo que a *T. absoluta* apresenta fatores diferenciados na defesa aos organofosforados. A resistência a organofosforados em *T. absoluta* parece estar associada ao

metabolismo detoxificativo e alteração de sítio alvo. A razão de inibição entre os extremos das populações foi de 4,71-vezes, diferindo estatisticamente e, portanto evidenciando o envolvimento de AchE insensíveis a organofosforados em *T. absoluta*. Estes resultados compõe um estudo de caracterização bioquímica de resistência à inseticidas para *T. absoluta* no Brasil, dando subsídio à utilização do controle químico de forma mais eficiente contra esta praga.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-do-tomateiro, controle químico, suscetibilidade, resistência múltipla, resistência cruzada, metabolismo detoxificativo.

RESISTANCE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) THE
INSECTICIDES: STATUS AND MECHANISMS

by

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA

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

ABSTRACT

The *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is one of the most troublesome pests of tomatoes in Brazil. Its control is mainly done by frequent applications of insecticides that cause control failures in the field, usually associated with the development of resistant populations. Furthermore, the use of new insecticides depends on the natural response of these populations and the history of resistance. Therefore, the aim of this study was to determine the status of insecticide resistance and to characterize it in populations of *T. absoluta*. The resistance variation among populations was 3.3, 21.2, 4.6, 6.4, 6.2, 3.1 and 11.7 times for indoxacarb, metaflumizone, chlorfenapyr, cartap, abamectin, chlorpyrifos and methamidophos, respectively. The LC₈₀ values for cartap, chlorpyrifos and methamidophos were above the recommended dose, confirming control failures observed in the field. The variation in the responses of *T. absoluta* populations to metaflumizone suggests caution, because it is unclear whether this is a natural response or cross-resistance exists with indoxacarb due to its previous use, despite absence of correlation between both. The activity of detoxificative enzymes varied among populations and associations with insecticides, but it is preliminary to state if the metabolism is associated with resistance to insecticides. The toxicity of chlorpyrifos did not correlate with that of methamidophos, suggesting that *T. absoluta* presents different factors in surviving to these

organophosphates. The resistance of *T. absoluta* to organophosphates seems to be associated with both detoxificative metabolism and the target site alteration. The inhibition ratio between the extremes of the populations was 4.71-times, differing significantly and thus demonstrating the involvement of AChE insensitive to organophosphates in *T. absoluta*. These results comprise the first study of biochemical characterization of insecticide resistance in the tomato leafminer in Brazil, providing subsidy to the use of chemical control more efficiently against this pest.

KEY WORDS: Tomato leafminer, chemical control, susceptibility, multiple resistance, cross-resistance, detoxificative metabolism.

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
INSETICIDAS: STATUS E MECANISMOS

por

TADEU BARBOSA MARTINS 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 - 2014

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
INSETICIDAS: STATUS E MECANISMOS

por

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Raul Narciso Carvalho Guedes – UFV

RECIFE - PE

Fevereiro - 2014

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
INSETICIDAS: STATUS E MECANISMOS

por

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA

Orientador:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Examinadores:

Leandro Bacci - UFS

Maria Alice Varjal de Melo Santos - FIOCRUZ

Alberto Belo Esteves Filho - UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tadeu José Martins Silva e Josefa Barbosa das Neves Silva, pela vida, e por investirem em minha educação, que é o bem mais valioso que podem deixar para um filho.

Aos meus familiares, em especial a minha irmã Maria do Carmo Barbosa Martins Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar os meus passos fazendo com que eu alcance todos os objetivos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e a todos os professores e funcionários que fazem o Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pela amizade e competente orientação durante o mestrado e doutorado, aumentando meu ciclo de possibilidades profissionais.

A todos os amigos conquistados durante minha trajetória acadêmica, em especial, agradeço a Ricardo Lopes, Eduardo Barros, Maria Cleoneide, Carla Patrícia, Nicolle Ribeiro, Robério Neves, Wagner Melo, Meire Castro, Paolo Augustus, Mateus Campos, Andresa Batista, Lílian Ribeiro, Jefferson Silva e Wellington Marques.

À Dra. Cristina Schetino, pela orientação na graduação e por me direcionar para o meio científico.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
<i>T. absoluta</i>	02
Aspectos bioecológicos e taxonômicos de <i>T. absoluta</i>	03
Danos ocasionados por <i>T. absoluta</i>	04
Manejo da <i>T. absoluta</i>	05
Resistência de insetos a inseticidas	07
Mecanismos de resistência de insetos a inseticidas	08
Resistência de <i>T. absoluta</i> a inseticidas	10
LITERATURA CITADA.....	11
2 RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)	
A INSETICIDAS: STATUS E METABOLISMO DETOXIFICATIVO.	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO	32
AGRADECIMENTOS	37

	LITERATURA CITADA	37
3	RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)	
	A ORGANOFOSFORADOS: MAGNITUDE E MECANISMOS.	48
	RESUMO.....	49
	ABSTRACT.....	50
	INTRODUÇÃO	51
	MATERIAL E MÉTODOS	53
	RESULTADOS.....	60
	DISCUSSÃO	64
	AGRADECIMENTOS	67
	LITERATURA CITADA	67

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) teve sua produção global duplicada nos últimos 20 anos, ocupando o segundo lugar entre as solanáceas mais produzidas no mundo, sendo superada apenas pela batata *S. tuberosum* (L.) (Fontes & Silva 2002). No Brasil, destaca-se como atividade agrícola de grande importância econômica e social, gerando mais de 250 mil empregos em todo o país de forma direta no campo e nas diversas fases de sua cadeia produtiva (Hora *et al.* 2004). O Brasil ocupa lugar de destaque e está entre os oito maiores produtores de tomate do mundo, com China, Índia e Estados Unidos nas três primeiras posições, respectivamente (FAOSTAT 2012).

A tomaticultura brasileira no ano de 2012 ocupava o terceiro lugar em produtividade no mundo com 62 t/ha, distribuídas numa área de 64,9 mil ha e uma produção superior a 4 milhões de toneladas, sendo a região Sudeste a maior produtora, seguida do Centro-Oeste (IBGE 2012). O Sudeste é responsável por 37,74% do total produzido no país, sendo o Estado de São Paulo o principal produtor, com 19% desta produção. O Estado de Goiás destaca-se como o maior produtor do país, responsável por 32,5% da produção nacional. O estado de Pernambuco é o terceiro maior produtor do Nordeste com uma participação de 2,5% na produção nacional ficando atrás da Bahia e do Ceará com uma produção de 7,4% e 2,8%, respectivamente (IBGE 2012).

Os frutos de tomate são conhecidos por ser um alimento rico em ácidos orgânicos, potássio, vitaminas A, B, C e E, licopeno, bem como um eficiente anti-oxidante (Bacci 2006). O tomate possui ainda funções que podem ser administradas para prevenção e diminuição dos efeitos de

24 certas doenças, como na prevenção de câncer no estômago, no pulmão, nas vias respiratórias e
25 doenças cardíacas (Fontes & Silva 2002).

26 Dentre os problemas enfrentados pelos tomaticultores, os de caráter fitossanitário, e mais
27 especificamente os entomológicos são em geral preocupantes (Souza & Reis 2003). Em geral, as
28 pragas-chave que estão associadas à cultura do tomateiro causando redução de qualidade e
29 produtividade são *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée), *Helicoverpa zea* (Boddie), *Bemisia tabaci*
30 biótipo B (Gennadius), *Frankliniella schultzei* (Trybom) e *Tuta absoluta* (Meyrick), destacando-
31 se esta última, como uma das mais importantes (Michereff *et al.* 2000, Leite *et al.* 2001).

32

33 ***Tuta absoluta***

34 A traça-do-tomateiro, nativa e amplamente distribuída na América do Sul, foi inicialmente
35 descrita como *Phthorimaea absoluta* (Meyrick), transferida mais tarde para o gênero
36 *Gnorimoschema* (Clarke), em seguida para *Scrobipalpula* (Povolny), *Scrobipalpuloides* (Povolny)
37 e, finalmente revisto e alterado para *Tuta* (Povolny). Esta praga tem como principal hospedeiro o
38 tomateiro, porém também pode ocorrer na cultura da batata *S. tuberosum* (L.) e pimentão *S.*
39 *muricatum* (Ait.) (EPPO 2009, Desneux *et al.* 2010).

40 O primeiro relato da ocorrência de *T. absoluta* se deu em 1917 em Huancayo, Peru (Vargas
41 1970). Esta praga foi inicialmente detectada no Brasil, o maior produtor de tomate da América do
42 Sul, no final de 1979, na cidade de Morretes, Estado do Paraná (Muszinski *et al.* 1982). Em 1980,
43 sua presença foi constatada no município de Jaboticabal, São Paulo, ganhando aí *status* oficial de
44 praga após a coleta de exemplares. Em 1981, já aparecia também no Vale do Submédio São
45 Francisco, no município de Juazeiro-BA, espalhando-se rapidamente por todo o país durante a
46 década de 1980, muito provavelmente devido ao contínuo intercâmbio regional entre produtores e
47 consumidores (Souza & Reis 1992, França 1993). Com relação às infestações em casa de

48 vegetação no Brasil, as mesmas só ocorreram em meados da década de 1990, portanto bem depois
49 dos cultivos realizados em campo aberto, cultivos estes que compreendem a maior parte da
50 tomaticultura na América do Sul (Villas Bôas & França 1996).

51 A presença de *T. absoluta* foi confirmada no final de 2006 no norte da província de
52 Castellón de La Plana, Espanha Oriental (Urbaneja *et al.* 2007). Desde então, entrou e espalhou-se
53 rapidamente por todo o Sul da Europa (Urbaneja *et al.* 2008), Norte da África e em todo o
54 Mediterrâneo (EPPO 2005, FERA 2009), causando sérios danos à cultura do tomateiro (Urbaneja
55 *et al.* 2008). Em 2009, a presença de *T. absoluta* foi confirmada na Itália, França, Malta, Reino
56 Unido, Grécia, Suíça, Portugal, Marrocos, Argélia, Tunísia, Líbia e Albânia (EPPO 2009). Diante
57 de todos estes registros, *T. absoluta* tornou-se nestes últimos anos uma praga de distribuição
58 mundial.

59

60 **Aspectos bioecológicos de *T. absoluta***

61 Quando há alimento disponível, *T. absoluta* apresenta alto potencial reprodutivo e pode
62 desenvolver entre 10 e 12 gerações por ano em regiões de clima tropical como a América do Sul.
63 O ciclo biológico desta praga é em torno de 30 dias, dependendo das variações ambientais,
64 podendo haver sobreposição de gerações nas fases de desenvolvimento (Barrientos *et al.* 1998,
65 Desneux *et al.* 2010). A duração dos vários estágios de crescimento de *T. absoluta* é de
66 aproximadamente 4,8 dias para a incubação dos ovos e 13 dias para o desenvolvimento da larva
67 na temperatura de 22,8°C. (Coelho & França 1987, Haji *et al.* 1988, Imenes *et al.* 1990). O
68 período de pupa e adulto completa-se em 10 e 7,5 dias à temperatura média de 22,8°C,
69 respectivamente (Coelho & França 1987).

70 Os ovos são depositados preferencialmente nas folhas do terço apical e mediano do
71 tomateiro de forma isolada ou em menores grupos (Torres *et al.* 2001, Pratisoli *et al.* 2003). Os

72 ovos são pequenos (0,38 mm de comprimento por 0,22 mm de largura), cilíndricos e inicialmente
73 apresentam coloração branco-brilhante ou amarelo-claro, evoluindo quando próximos à eclosão,
74 para a coloração marrom ou avermelhada (EPPO 2006).

75 A lagarta da *T. absoluta* passa por quatro *instares*, sendo estes identificados em função do
76 comprimento do corpo e largura da cápsula cefálica que variam para o primeiro ínstar de 0,4-0,6
77 mm e 0,16-0,18 mm; para o segundo ínstar de 0,6-6,0 mm e 0,22-0,28 mm; para o terceiro ínstar
78 de 6,0-7,0 mm e 0,34-0,40 mm e para o quarto ínstar 7,0-8,0 mm e 0,52-0,60 mm
79 respectivamente. A coloração das lagartas varia do amarelo-claro ao pardo-escuro. Ao alimentar-
80 se da planta tornam-se esverdeadas, verde-escuras ou rosadas (Haji *et al.* 1988, Imenes *et al.*
81 1990, Bacci 2006). As pupas podem ser observadas tanto nos folíolos, envolvidas por um casulo,
82 quanto dentro de galerias, nos frutos e/ou no solo. A coloração varia no início de verde a marrom-
83 escuro, e quando próximo à eclosão é marrom-escuro (Coelho & França 1987, Haji *et al.* 1988,
84 Imenes *et al.* 1990). A traça-do-tomateiro, na sua forma adulta, é um microlepidóptero de cor
85 cinza-prateada, asas franjadas, com manchas negras localizadas sobre as asas anteriores. Suas asas
86 medem 10 mm de envergadura e 6 mm de comprimento. Fêmeas, quando bem alimentadas
87 realizam postura de 262 ovos num período de 8,5 dias (Imenes *et al.* 1990).

88

89 **Danos ocasionados por *T. absoluta***

90 No Brasil, a traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, é considerada uma das mais importantes pragas
91 desta cultura (Picanço *et al.* 1995, Barrientos *et al.* 1998, Gilardón *et al.* 2001), pois chega a
92 causar sérias perdas à tomaticultura, que variam entre 40 e 100% (Oliveira *et al.* 2009). Esta
93 praga traz prejuízos aos produtores, que não obtém os lucros esperados, além de aumento no custo
94 de produção. Estes prejuízos também são observados nas indústrias, que recebem uma quantidade

95 de tomate inferior a sua capacidade de processamento bem como prejuízo aos consumidores, que
96 pagam um preço maior para adquirir os produtos *in natura* e processados (Giustolin *et al.* 2001).

97 Um exemplo dos problemas causados por *T. absoluta* ocorreu no submédio do Vale do São
98 Francisco na safra de 1989, onde as perdas chegaram a 50% e nenhuma lavoura de tomate ficou
99 livre desta praga. Mesmo com a utilização de duas pulverizações semanais, perdeu-se 40% da
100 safra (Espinoza 1991). A produção estimada para 1989, nos 14.000 ha plantados, era de 600.000
101 toneladas, com uma média de aproximadamente 45 t/ha. Contudo, as médias foram de cerca de 20
102 t/ha. Isso comprometeu o funcionamento das indústrias de extração e processamento de polpa que
103 passaram a trabalhar com uma quantidade bem menor do que sua capacidade. Por conseguinte,
104 três das cinco indústrias de processamento de tomate, fecharam (Haji 1992).

105 Quando as infestações de *T. absoluta* ocorrem precocemente em campos de tomate há o
106 comprometimento do ciclo de desenvolvimento da cultura, pois estes insetos atacam gemas,
107 brotos terminais, frutos e folhas, nas quais fazem galerias transparentes. Quando a injúria é
108 efetuada no caule, afetam o desenvolvimento da planta (Picanço *et al.* 2007). Nos frutos, as
109 lagartas formam galerias que servem de entrada para patógenos ocasionando infecções
110 secundárias, danificando os frutos e provocando perdas severas (Coelho & França 1987). Nas
111 folhas, as lagartas alimentam-se do mesófilo, deixando a epiderme intacta, criando as minas que
112 acabam por necrosar e, por conseguinte reduzem o potencial de fotossíntese da planta (Oliveira *et*
113 *al.* 2009).

114

115 **Manejo da *T. absoluta***

116 A utilização de táticas que tenham como objetivo o controle de *T. absoluta* envolvem o
117 uso de armadilhas iscadas com feromônios, o desenvolvimento de cultivares resistentes de tomate,
118 o controle biológico e o controle químico, sendo este último método o mais utilizado.

119 Vários inseticidas já foram registrados para o controle de *T. absoluta* pelo Ministério da
120 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tais como, abamectina, indoxacarbe, cartape e
121 clorfenapir (AGROFIT 2011). Metaflumizone, que embora não seja registrado para o controle de
122 *T. absoluta* no Brasil, já é utilizado em diversos outros países (Roditakis *et al.* 2012). Abamectina
123 é um inseticida do grupo 6 das avermectinas de acordo com a classificação Internacional de Modo
124 de Ação de Inseticidas (IRAC 2012). Atua como agonista do ácido gama-aminobutírico (GABA,
125 que é um neurotransmissor inibitório) ligando-se aos receptores deste e aumentando a
126 permeabilidade da membrana para o íon cloro e causando mal funcionamento do sistema neuronal
127 e muscular (Lasota & Dybas 1991, Fisher & Mrozik 1992). Indoxacarbe é um pró-inseticida do
128 grupo químico das oxadiazinas (MOA grupo 22A), e o inseticida metaflumizone pertence ao
129 grupo químico semicarbazone (MOA grupo 22B). Ambos são bloqueadores dos canais de sódio
130 dependentes da voltagem de acordo com a classificação IRAC MoA, sendo que o diferencial
131 destes inseticidas é que o primeiro precisa ser ativado metabolicamente por enzimas (esterases)
132 enquanto que o segundo não (Lahm *et al.* 2000, Takagi *et al.* 2007). Clorfenapir é um pró-
133 inseticida, não tendo ação tóxica na sua forma original. Em contato com as células do inseto, é
134 ativado por meio da ação das monooxigenases microssomais dependentes do citocromo P₄₅₀.
135 Após a ativação, clorfenapir se deposita nas mitocôndrias (interna e externamente) expulsando o
136 H⁺ das mesmas. Cartape é um inseticida pertencente ao grupo químico das nereistoxinas que age
137 nos receptores sinápticos, mais especificamente nos receptores nicotínicos da acetilcolina,
138 atuando como antagonistas da acetilcolina, competindo com seus receptores, tendo como
139 consequência a inibição do movimento dos íons K⁺ e Na⁺, interrompendo o impulso nervoso e
140 levando o inseto à morte por paralisia (IRAC 2012).

141 Desde a introdução de *T. absoluta* no Brasil em 1979, no que se refere às práticas adotadas
142 para minimizar as perdas dessa praga à cultura do tomateiro, o controle químico tem sido o

143 principal método adotado contra este inseto. Isto vem sendo ilustrado pelo aumento repentino no
144 uso de inseticidas nos campos de tomate, onde se passou, em casos extremos, de 10 aplicações
145 para mais de 30 aplicações por período de cultivo (Latorraca 2008). Além das preocupações
146 ambientais e de segurança humana em torno desses procedimentos, o custo de produção do tomate
147 mais do que triplicou com a introdução de *T. absoluta*. Dentre as consequências da utilização
148 indiscriminada de inseticidas, está o aparecimento de populações resistentes de insetos.

149

150 **Resistência de insetos a inseticidas**

151 A resistência a inseticidas é uma característica pré-adaptativa, sendo afetada por diferentes
152 fatores genéticos tais como alterações no genótipo do indivíduo e suas interações, fatores
153 bioecológicos relacionados à praga alvo e por fatores operacionais relativos a utilização do produto
154 químico (Roush & McKenzie 1987). A resistência é definida como o desenvolvimento da
155 capacidade, em uma linhagem de insetos, de tolerar doses de agentes tóxicos que seriam letais
156 para a maioria dos indivíduos normais numa população da mesma espécie (WHO 1957, WHO
157 1960, Georghiou & Taylor 1977).

158 O primeiro caso de resistência no mundo foi relatado para o piolho de São José
159 *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock) (Hemiptera: Diaspididae) ao enxofre Melander (1914).
160 Desde então, os casos de resistência a inseticidas e acaricidas sintéticos estão aumentando em
161 todo o mundo, constituindo um grande problema de controle de pragas. Isto é agravante pelo fato
162 de existirem mais de 7740 relatos de resistência a 331 compostos tóxicos, envolvendo cerca de
163 600 espécies de artrópodes resistentes a um ou mais produtos (Whalon *et al.* 2008, 2011).

164 Dentre as consequências da resistência a inseticidas pode-se citar o maior número de
165 aplicações, aumento da dosagem do produto, e substituição por outro produto, geralmente de
166 maior toxicidade e preço, gerando problemas de ordem ecológica, econômica e toxicológica,

167 comprometendo assim os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Croft 1990, Denholm
168 & Rowland, 1992).

169

170 **Mecanismos de resistência de insetos a inseticidas**

171 De forma geral, os mecanismos envolvidos com a resistência de insetos a inseticidas são
172 divididos em três categorias: a) redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto; b)
173 redução da sensibilidade no sítio de ação do inseticida pelo sistema nervoso; e c) detoxificação ou
174 metabolização do inseticida por enzimas (Hemingway 2000). Em sua grande parte, a resistência
175 de artrópodes a inseticidas tem sido explicada por alteração do sítio de ação pelo sistema nervoso
176 bem como alterações da diversidade ou quantidade de enzimas através da detoxificação ou
177 metabolização e em menor parte pela redução na penetração pela cutícula do inseto. Sabe-se que a
178 insensibilidade do sítio-alvo pode produzir resistência cruzada a grupos químicos que apresentam
179 modo de ação relacionado (Bregues *et al.* 2003). Entretanto, o metabolismo pode atuar na
180 detoxificação de diferentes classes de inseticidas e/ou acaricidas (Khot *et al.* 2008). Isto porque a
181 participação de sistemas enzimáticos, tais como esterases, glutathione-S-transferase (GST),
182 monooxigenases de função mista (MFO) (ex., Citocromo P₄₅₀) podem utilizar como substratos
183 produtos sintéticos de diferentes grupos químicos (Plapp Jr & Wang 1983).

184 As esterases são enzimas de grande importância envolvidas principalmente na
185 detoxificação de organofosforados e carbamatos tendo sido relatada em várias espécies de
186 artrópodes, incluindo mosquitos, pulgões e baratas (Karunaratne *et al.* 1995, Conyers *et al.* 1998).
187 Estas enzimas estão envolvidas no desligamento do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas
188 pela hidrólise da acetilcolina (ACh) liberada a partir do terminal pré-sináptico, tornando-se um
189 alvo eficaz para inseticidas organofosforados e carbamatos. A alteração da acetilcolinesterase
190 (AChE), conferindo insensibilidade, é um mecanismo importante para o desenvolvimento de

191 resistência por insetos, como por exemplo em *Aphis gossypii* (Glover) (Andrews *et al.* 2004, Pan
192 *et al.* 2010).

193 As GSTs pertencem a uma família de enzimas, cuja principal função é a de catalisar a
194 conjugação de uma diversa gama de compostos eletrófilos com glutatona. Em insetos, estudos
195 sugerem que as GSTs desempenham um papel importante na resistência a várias classes de
196 inseticidas, incluindo organofosforados (Syvanen *et al.* 1996, Abel *et al.* 2004). Relatos de
197 resistência devido ao aumento da atividade de GST foram observados para estes inseticidas em
198 *Plutella xylostella* (Linnaeus) e *Musca domestica* (Linnaeus) (Huang *et al.* 1998, Kristensen
199 2005).

200 As monooxigenases dependentes de citocromo P₄₅₀ também faz parte de um importante
201 sistema metabólico envolvido na desintoxicação de xenobióticos, incluindo inseticidas. Relatos do
202 aumento da atividade de citocromo P₄₅₀ associado com a resistência aos inseticidas piretróides e
203 neonicotinóide foram documentados em insetos, tais como *Culex pipiens pallens* (Caguillett)
204 (Shen *et al.* 2003), *Blattella germanica* (Linnaeus) (Pridgeon *et al.* 2003), *P. xylostella* (Bautista
205 *et al.* 2009), *B. tabaci* (Karunker *et al.* 2008) e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Zhu *et al.* 2010).
206 As monooxigenases são importantes ativadoras dos inseticidas organofosforados, bem como
207 podem estar envolvidas na sua resistência (Maitra *et al.* 2000). Sato *et al.* (2007) relataram que o
208 aumento do metabolismo oxidativo de citocromo P₄₅₀ ocasionava resistência ao ácaro *Amblyseius*
209 *womersley* (Schicha).

210

211 **Resistência de *T. absoluta* a inseticidas**

212 Alguns dos compostos recomendados para o controle de *T. absoluta*, aparentemente, não
213 tem fornecido o efeito desejado (Thomazini 2001). Entre as possíveis razões para esta baixa
214 eficácia pode estar o desenvolvimento de populações resistentes a esses produtos. Relatos de

215 perda de eficácia e detecção de resistência a inseticidas em populações de *T. absoluta* em países
216 como Chile, Argentina e Brasil favoreceram o registro de uma ampla gama de substâncias ativas
217 no controle desta praga (Salazar & Araya 1997, Lietti *et al.* 2005, Silva *et al.* 2011). Os
218 inseticidas inicialmente disponíveis para o controle de *T. absoluta* até 1990 eram os
219 organofosforados (ex. metamidofos), cartape, abamectina e piretróides (ex. deltametrina e
220 permetrina) (Salazar & Araya 1997, Siqueira *et al.* 2000a, Salazar & Araya 2001, Lietti *et al.*
221 2005). Inicialmente ocorreram relatos de resistência de *T. absoluta* a organofosforados e
222 piretróides no Chile, seguidos por registros adicionais no Brasil e Argentina (Salazar & Araya
223 1997, 2001, Siqueira *et al.* 2000a, 2000b, 2001, Lietti *et al.* 2005). Como forma de resolver esta
224 problemática, surgiu a necessidade do registro de novos inseticidas para o controle dessa praga, o
225 que incluiu as diamidas, clorfenapir, espinosinas, indoxacarbe e os reguladores de crescimento de
226 insetos, entre outros (AGROFIT 2011).

227 Para implementar um efetivo programa de manejo da resistência de *T. absoluta* a
228 inseticidas, são necessárias informações sobre o nível, e as características da resistência (Denholm
229 *et al.* 2002). Diante da importância da cultura do tomateiro para o Brasil, dos poucos casos de
230 resistências registrados para esta espécie e do uso continuado e excessivo de inseticidas para seu
231 controle, há uma necessidade urgente de um amplo levantamento e de caracterização da
232 resistência a inseticidas em *T. absoluta* visando obter-se o maior número de informações possível
233 sobre esse problema.

234 O presente estudo tem como hipótese central que a resistência em populações de *T.*
235 *absoluta* tem aumentada para a grande maioria dos inseticidas ao longo de várias gerações devido
236 à forte pressão de seleção exercida por eles. Além disso, a resistência de *T. absoluta* a inseticidas
237 está associada a mecanismos metabólicos de detoxificação por enzimas.

238 Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: (i) - determinar o grau de resistência
239 das populações de *T. absoluta* através de curvas de concentração-mortalidade para diferentes
240 classes de inseticidas e (ii) - determinar os mecanismos de resistência a inseticidas em populações
241 de *T. absoluta*. A obtenção destas informações é de relevante importância para o manejo da
242 resistência a *T. absoluta* em tomateiro. Para verificar esses objetivos, foram feitos bioensaios em
243 laboratório com populações de *T. absoluta* de diversas localidades do Brasil, utilizando classes
244 representativas de inseticidas para seu controle.

245

246

Literatura Citada

247 **Abel, E.L., T.K. Bammler & D.L. Eaton. 2004.** Biotransformation of methyl parathion by
248 glutathione-S-transferases. *Toxicol. Sci.* 79: 224-232.

249 **Andrews, M.C., A. Callaghan, L.M. Field, M.S. Williamson & G.D. Moores. 2004.**
250 Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid,
251 *Aphis gossypii*. *Insect Mol. Biol.* 13: 555-561.

252 **AGROFIT. 2011.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária, e
253 Abastecimento. Disponível em
254 <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>, acessado em
255 24/01/2014.

256 **Bacci, L. 2006.** Fatores determinantes do ataque de *Tuta absoluta* ao tomateiro. Universidade
257 Federal de Viçosa, Viçosa, 133p. (Tese)

258 **Barrientos, Z.R., H.J. Apablaza, S.A. Norero & P.P. Estay. 1998.** Temperatura base y
259 constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:
260 Gelechiidae). *Ciênc. Investig. Agrária* 25: 133-137.

261 **Bautista, M.A., T. Miyata, K. Miura & T. Tanaka. 2009.** RNA interference-mediated
262 knockdown of a cytochrome P₄₅₀, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*,
263 reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 38-46.

264 **Bregues, C, N.J. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet, S. Manguin,**
265 **J.C. Morgan & J. Hemingway. 2003.** Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti*
266 is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet.*
267 *Entomol.* 17: 87-94.

268 **Coelho, M.C.F. & F.H. França. 1987.** Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto
269 da traça-do-tomateiro. *Pesq. Agrop. Bras.* 22: 129-135.

- 270 **Conyers, C.M., A.D. Macnicoll & N.R. Price. 1998.** Purification and characterisation of an
271 esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the saw-toothed grain
272 beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28:
273 435-448.
- 274 **Croft, B.A. 1990.** Management of pesticide resistance in arthropod pests, p. 149-168. In M.B.
275 Green, W.K. Moberg & H.M. Lebaron (eds.), *Managing resistance to agrochemicals:*
276 *fundamental and practical approaches to combating resistance.* Washington. Am. Chem. Soc.
277 498p.
- 278 **Denholm, I., & M.W. Rowland. 1992.** Tactics for managing pesticide resistance in arthropods:
279 theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 91-112.
- 280 **Denholm, I., G. J. Devine & M. S. Williamson. 2002.** Insecticide Resistance on the Move.
281 *Science.* 297: 2222-2223.
- 282 **Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-**
283 **Vazquez, J.G. Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C.**
284 **Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops
285 by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest*
286 *Sci.* 83: 197-215.
- 287 **EPPO. 2005.** European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Tuta absoluta.* Bulletin
288 OEPP/EPPO Bulletin 35: 434-435.
- 289 **EPPO. 2006.** European and Mediterranean Plant Protection Organization. Dados: sheets on
290 quarantine pests. *Tuta absoluta* document. Disponível em
291 <http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Tuta_absoluta/DSGNORAB.pdf>, acessado
292 em 10/02/14.
- 293 **EPPO. 2009.** European and Mediterranean Plant Protection Organization. Dados: EPPO
294 Reporting Service, N°. 12, Disponível em
295 <<http://archives.eppo.org/EPPOReporting/2009/Rse-0912.pdf>>, acessado em 19/01/14.
- 296 **Espinoza, W. 1991.** Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco. Brasília
297 - DF, 301p.
- 298 **FAOSTAT. 2012.** Statistical Database. Food and Agricultural Organization. Food and
299 Agriculture Organization of the United Nations, Roma. Disponível em
300 <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>, acessado em 18/01/14.
- 301 **FERA. 2009.** The Food and Environment Research Agency Fera confirms the first outbreak in
302 the UK of *Tuta absoluta* – the SouthAmerican tomato moth. Disponível em
303 <<http://www.fera.defra.gov.uk/showNews.cfm?id=402>>, acessado em 15/12/13.
- 304 **Fisher, M.H. & H. Mrozik. 1992.** The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annu. Rev.*
305 *Pharmacol.* 32: 537-553

- 306 **Fontes, P.C.R. & D.J.H. Silva. 2002.** Produção de tomate de mesa. Viçosa, Aprenda Fácil, 196p.
- 307 **França, F.H. 1993.** For how long will we be able to survive with the tomato leafminer? Horticult.
308 Bras. 11: 6-10.
- 309 **Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of
310 insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319-323.
- 311 **Gilardón, E., M. Pocovi, C. Hernández & A. Olsen. 2001.** Papel dos tricomas glandulares da
312 folha do tomateiro na oviposição de *Tuta absoluta*. Pesq. Agropec. Bras. 36: 585-588.
- 313 **Giustolin, T.A., J.D. Vendramim, S.B. Alves, S.A. Vieira & R.M. Pereira. 2001.** Susceptibility
314 of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to
315 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Appl. Entomol. 125: 551-556.
- 316 **Haji, F. N. P. 1992.** Histórico e situação atual da traça-dotomateiro nos perímetros irrigados do
317 submédio São Francisco. p. 57-59. In SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3. Águas
318 de Lindóia, SP. Anais. Águas de Lindóia: EMBRAPA-CNPDA.
- 319 **Haji, F.N.P., C.A.V. Oliveira, M.S. Amorim Neto & J.G.S. Batista. 1988.** Flutuação
320 populacional da traça-do-tomateiro no submédio São Francisco. Pesq. Agrop. Bras. 23: 7-14.
- 321 **Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of
322 insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 1009-1015.
- 323 **Hora, R. C.R. Goto & J.U.T. & Brandão Filho. 2004.** O lugar especial da produção de
324 hortaliças no agronegócio. p. 322-323. In FNP (Ed.). Agrianual: Anuário da agricultura
325 brasileira. São Paulo. 496 p.
- 326 **Huang, H.S., N.T. Hu, Y.E. Yao, C.Y. Wu, S.W. Chiang, & C.N. Sun. 1998.** Molecular
327 cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide
328 resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 28:
329 651-658.
- 330 **IBGE. 2012.** Levantamento sistemático da produção agrícola, tomate: produção e área.
331 Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>, acessado em 02/08/13.
- 332 **Imenes, S.D.L., M.A.U. Fernandes, T.B. Campos & A.P. Takematsu. 1990.** Aspectos
333 biológicos e comportamentais da traça-do-tomateiro *Scropipalpula absoluta* (Meyrick),
334 (Lepidoptera: Gelechiidae). Arq. Inst. Biol. 57: 63-68.
- 335 **IRAC. 2012.** Esquema de classificação. Disponível em: <http://www.irc-online.org>, acessado em
336 12/01/12.
- 337 **Karunaratne, S. P., J. Hemingway, K. G. Jayawardena, V. Dassanayaka & A. Vaughan.**
338 **1995.** Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from
339 insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. J. Biol. Chem. 270:
340 31124-31128.

- 341 **Karunker, I., J. Benting, B. Lueke, T. Ponge, R. Nauen, E. Roidakis, J. Vontas, K. Gorman,**
342 **I. Denholm & S. Morin. 2008.** Over-expression of cytochrome P₄₅₀ CYP6CM1 is associated
343 with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:
344 Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 634-644.
- 345 **Khot, A.C., G. Bingham, L.M. Field & G.D. Moores. 2008.** A novel assay reveals the blockade
346 of esterases by piperonyl butoxide. *Pest Manag. Sci.* 64: 1139-1142.
- 347 **Kristensen, M. 2005.** Glutathione S-Transferase and Insecticide Resistance in Laboratory Strains
348 and Field Populations of *Musca domestica*. *J. Econ. Entomol.* 98: 1341-1348.
- 349 **Lahm, G.P., S.F. McCann, C.R. Harrison, T.M. Stevenson & R. Shapiro. 2000.** Evolution of
350 the sodium channel blocking insecticides: the discovery of indoxacarb, in *Agrochemical*
351 *Discovery*. American Chemical Society, Washington, D.C. 774: 20-34
- 352 **Lasota, J.A. & R.A. Dybas. 1991.** Avermectins, a novel class of compounds: implications for
353 use in arthropod pest control. *Annu. Ver. Entomol.* 36: 91-117.
- 354 **Latorraca A., G.J.G Marques, Sousa K.V. & N.S. Fornés. 2008.** Agrotóxicos utilizados na
355 produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. *Com. Ciências*
356 *Saúde.* 19: 365-374.
- 357 **Leite, G.L.D., M. Picanço, R.N.C. Guedes & J.C. Zanuncio. 2001.** Role of plant age in the
358 resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. glabratum to the tomato leafminer *Tuta absoluta*
359 (Lepidoptera: Gelechiidae). *Sci. Hortic.* 89: 103-113.
- 360 **Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine
361 populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34:
362 113-119.
- 363 **Maitra, S., S.M. Dombrowski, M. Basu, O. Raustol, L.C. Waters & R. Ganguly. 2000.**
364 Factors on the third chromosome affect the level of Cyp6a2 and Cyp6a8 expression in
365 *Drosophila melanogaster*. *Gene* 248: 147-156.
- 366 **Melander, A.L. 1914.** Can insects become resistant to sprays? *J. Econ. Entomol.* 7: 167-173.
- 367 **Michereff-Filho, M. E.F.Vilela, A.B. Attygalle, J. Meinwald, A. Svatos & G.N. Jham. 2000.**
368 Field trapping of tomato moth, *Tuta absoluta* with pheromone traps. *J. Chem. Ecol.* 26: 875-
369 881.
- 370 **Muszinski, T., I.M. Lavendowski & L.M.A. Maschio. 1982.** Constatação de *Scrobipalpula*
371 *absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon*
372 *esculentum* Mill.) no litoral do Paraná. *An. Soc. Entomol. Bras.* 11: 291-292.
- 373 **Oliveira, F.A., D.J.H. Silva, G.L.D. Leite, G.N. Jham & M.C. Picanço. 2009.** Resistance of 57
374 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta*
375 *absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Sci. Hortic.* 119: 182-187.

- 376 **Pan, Y., Q. Shang, K. Fang, K., J. Zhang, & J. Xi. 2010.** Down-regulated transcriptional level
377 of *Ace1* combined with mutations in *Ace1* and *Ace2* of *Aphis gossypii* are related with
378 omethoate resistance. *Chem. Biol. Interact.* 188: 553-557.
- 379 **Picanço, M.C., D.J.H. Silva, G.L.D. Leite, A.C. Mata & G.N. Jham. 1995.** Intensidade de
380 ataque de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) ao dossel de
381 três espécie de tomateiro. *Pesq. Agrop. Bras.* 30: 429-433.
- 382 **Picanço, M.C., L. Bacci, A.L.B. Crespo, M.M.M. Miranda & J.C. Martins. 2007.** Effect of
383 integrated pest management practices on tomato *Lycopersicon esculentum*, production and
384 preservation of natural enemies of pests. *Agric. For. Entomol.* 9: 201-212.
- 385 **Plapp Jr., F.W. & T.C. Wang. 1983.** Genetic origins of insecticide resistance, p. 47-70. In G.P.
386 Georghiou & T. Saito (eds.), *Pest resistance to pesticides*. New York: Plenum Press, 809p.
- 387 **Pratissoli, D., J.R.P. Parra, O.A. Fernandes, R.C. Oliveira, H.B. Zago & F.F. Perreira. 2003.**
388 Oviposition pattern of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), on
389 tomato under different population densities of adults in greenhouse. *Agrociência.* 19: 11-15.
- 390 **Pridgeon, J.W., L. Zhang & N. Liu. 2003.** Overexpression of CYP4G19 associated with a
391 pyrethroid-resistant strain of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Gene* 314: 157-
392 163.
- 393 **Roditakis, E., C.Skarmoutsou, M. Staurakaki. 2012.** Toxicity of insecticides to populations of
394 tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. *Pest Manag. Sci.* 69: 834-840
- 395 **Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance.
396 *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- 397 **Salazar, E.S. & J.E. Araya. 1997.** Detección de resistencia a inseticidas em la polilla del tomate.
398 *Simiente.* 67: 8-22.
- 399 **Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a
400 inseticidas en Arica. *Agric. téc.* 61: 429-435.
- 401 **Sato, M.E., T. Tanaka & T. Miyata. 2007.** A cytochrome P₄₅₀ gene involved in methidathion
402 resistance in *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*
403 88: 337-345.
- 404 **Shen, B., H. Dong, H. Tian, L. Ma, X. Li, G. Wu & C. Zhu. 2003.** Cytochrome P₄₅₀ genes
405 expressed in the deltamethrin-susceptible and -resistant strains of *Culex pipiens pallens*.
406 *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 19-26.
- 407 **Silva, G.A, M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.**
408 Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato
409 pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manag. Sci.* 67: 913-920.
- 410 **Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000a.** Insecticide resistance in populations
411 of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.

- 412 **Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000b.** Cartap resistance and synergism in
413 populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Appl. Entomol. 124: 233-238.
- 414 **Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhães. 2001.** Abamectin
415 resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:
416 Gelechiidae). Int. J. Pest Manage. 47: 247-251.
- 417 **Souza, J. C. & P.R. Reis. 2003.** Principais pragas de tomate para mesa: biologia, dano e controle.
418 Infor. Agropec. 24: 79-92.
- 419 **Souza, J.C. & P.R. Reis. 1992.** Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia,
420 prejuízos e controle. EPAMIG, Belo Horizonte, Brasil, 14 p. (Boletim Técnico 38).
- 421 **Syvanen, M., Z. Zhou, J. Wharton, V. Goldsbury & A. Clark. 1996.** Heterogeneity of the
422 glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the
423 housefly. J. Mol. Evol. 43: 236-240.
- 424 **Takagi, K., H. Hamaguchi, T. Nishimatsu & T. Konno. 2007.** Discovery of metaflumizone, a
425 novel semicarbazone insecticide. Vet. Parasitol. 150:177-181
- 426 **Thomazini, A. P. B. W., J. D. Vendramin, R. Brunherotto & M. T. R. Lopes. 2001.** Efeito de
427 genótipos de tomateiro sobre a biologia e oviposição de *Tuta absoluta* (Meyrick)
428 (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotrop. Entomol. 30: 283-288
- 429 **Torres, J. B., C.A. Faria, W. S. Evangelista Jr. & D. Pratissoli. 2001.** Within-plant distribution
430 of the *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) leafminer immatures in processing
431 tomatoes, with notes on plant phenology. Int. J. Pest Manag. 45: 173-178.
- 432 **Urbaneja, A., R. Vercher, V. Navarro, J.L. Porcuna & F.García-Mari. 2007.** La polilla del
433 tomate, *Tuta absoluta*. Phytoma Esp. 194: 16-24.
- 434 **Urbaneja, A., H. Monton & O. Molla. 2008.** Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as
435 prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. J. Appl. Entomol. 133: 292-296.
- 436 **Vargas, H. 1970.** Observations about the biology and natural enemies of the tomato moth,
437 *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Idesia 1: 75-110.
- 438 **Villas Bôas, G.L. & F.H. França. 1996.** Use of the parasitoid *Trichogramma pretiosum* in the
439 control of the tomato moth in tomato protected cultivation. Hortic. Bras. 14: 223-225.
- 440 **Whalon, M.E., D. Mota-Sanchez & R.M. Hollingworth. 2008.** Analysis of global pesticide
441 resistance in arthropods, p. 5-31. In M.E. Whalon, D. Mota-Sanchez & R.M. Hollingworth
442 (eds.), Global pesticide resistance in arthropods. Cambridge, CAB International, 208p.
- 443 **Whalon, M.E., D. Mota-Sanchez, R.M. Hollingworth & L. Duynslager. 2011.** Arthropod
444 pesticide resistance database. Disponível em <<http://www.pesticideresistance.org/search/1>>,
445 acessado em 20/08/2011.

- 446 **WHO. 1957.** Expert committee on insecticides: seventh report. Geneva, Technical Report Series
447 125, 31p.
- 448 **WHO. 1960.** Insecticide resistance and vector control. Geneva, Technical Report Series 191, 98p.
- 449 **Zhu, F., R. Parthasarathya, H. Bai, K. Woithe, M. Kausmann, R. Nauen, D.A. Harrison &**
450 **S.R. Palli. 2010.** A brain-specific cytochrome P₄₅₀ responsible for the majority of
451 deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. Proc. Natl. Acad. Sci.
452 U. S. A. 107: 8557-8562.
- 453

454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A INSETICIDAS: STATUS E METABOLISMO DESTOXIFICATIVO¹

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA², WELLINGTON M. DA SILVA², MATEUS R. DE CAMPOS²,
JEFFERSON E. DA SILVA², ANDRESA B. DE OLIVEIRA² E HERBERT ÁLVARO ABREU DE SIQUEIRA²

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

¹Silva, T.B.M., Siqueira, H.Á.A., Campos, M.R., Silva, J.E., Silva, W.M., Oliveira, A.B.
Resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a inseticidas: status e
metabolismo detoxificativo. A ser submetido para Pesticide Biochemistry and Physiology.

480 RESUMO – A Traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), é uma das mais importantes pragas
481 do tomate no Brasil. Apesar da busca intensiva de métodos alternativos para controle desta praga,
482 o uso de inseticidas, muitas vezes indiscriminado, ainda é a principal tática empregada no controle
483 da *T. absoluta* no país. Porém, o uso do controle químico tem gerado resistência, frequentemente
484 associada às falhas de controle. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar a
485 ocorrência de resistência a inseticidas em populações de *T. absoluta*. As razões de resistência
486 variaram de 3,3; 21,2; 4,6; 6,4; 6,2 vezes para indoxacarbe, metaflumizone, clorfenapir, cartape e
487 abamectina, respectivamente. Os limites de confiança da CL₈₀ para cartape compreenderam a dose
488 recomendada para aplicação em campo, sugerindo falhas de controle. Embora maior variabilidade
489 nas respostas das populações de *T. absoluta* tenha sido observada para metaflumizone, nossos
490 resultados não permitem afirmar a existência de resistência cruzada com indoxacarbe, visto a falta de
491 correlação para ambos. A resistência de *T. absoluta* aos inseticidas avaliados neste estudo foi
492 incipiente, embora tenha sido detectada uma tendência de alteração de respostas para o
493 metaflumizone, porém alguns inseticidas apresentam toxicidades reduzidas e metaflumizone no
494 Brasil, sugerindo uma melhor avaliação para excluir a possibilidade de resistência cruzada. A
495 atividade das enzimas de detoxificação de xenobióticos significativamente entre as populações e
496 inseticidas. Glutathione-S-transferases e monooxigenases dependentes de citocromo P₄₅₀ parecem
497 ser os sistemas enzimáticos mais importantes na resistência aos inseticidas avaliados, contudo
498 experimentos adicionais utilizando sinergistas devem ser conduzidos para esclarecer melhor o
499 envolvimento do mecanismo metabólico na resistência a estes produtos.

500

501 PALAVRAS-CHAVE: Traça-do-tomateiro, metaflumizone, suscetibilidade, atividade enzimática,
502 resistência-cruzada.

503

504 RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO
505 INSECTICIDES: STATUS AND DETOXIFICATIVE METABOLISM

506
507 ABSTRACT – The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), is a key pest of tomato in Brazil.
508 Despite intensive search for alternative methods to control this pest, the use of insecticides, often
509 indiscriminate, is still the primary tactic employed in the control of *T. absoluta* in Brazil.
510 However, such abuse of chemical control has generated resistance, often associated with control
511 failures. The objective of this work was to identify and characterize the occurrence of resistance in
512 populations of *T. absoluta* to insecticides. The resistance ratios ranged from 3.3, 21.2, 4.6, 6.4,
513 6.2-fold for indoxacarb, metaflumizone, chlorfenapyr, cartap, and abamectin, respectively. The
514 confidential limits of the CL₈₀ for cartap bracketed the recommended dose, explaining the control
515 failures observed in the field. Although *T. absoluta* populations have shown greater variability in
516 the responses to the insecticide metaflumizone, is early to claim that cross-resistance exists with
517 indoxacarb, because correlation lacked between both. The resistance of *T. absoluta* to insecticides
518 evaluated in this study were incipient but some insecticides have reduced toxicities and
519 metaflumizone, not yet registered for use, presents a wide range of toxicity, suggesting better
520 evaluation to exclude possible cross-resistance. Enzyme activities varied significantly among
521 populations and susceptibility to insecticides. Glutathione-S-transferases and cytochrome P₄₅₀-
522 dependent monooxygenases seem to be the most important enzyme systems playing a role in the
523 resistance to insecticides here evaluated, however additional experiments should be conducted to
524 clarify the involvement of metabolism of resistance to these products.

525
526 KEY WORDS: Tomato leafminer, metaflumizone, susceptibility, enzymatic activity, cross-
527 resistance.

Introdução

528
529 A cadeia produtiva brasileira do tomate *Lycopersicon esculentum* (Miller) vem sofrendo
530 importantes transformações nos últimos anos, governadas por sua forte modernização tecnológica,
531 aumento da produtividade, industrialização em larga escala bem como pela maior demanda de
532 alimentos preparados nas diversas formas (Camargo *et al.* 2006).

533 O custo de produção do tomate está diretamente relacionado com a ocorrência de pragas,
534 por causarem redução da produtividade e qualidade, podendo inclusive comprometer o retorno
535 econômico da cultura. Desta forma, as pragas representam um dos principais problemas
536 enfrentados pelos produtores de tomate. A presença da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*
537 (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), foi constatada na Europa em 2006, e tem se tornado um
538 problema crescente em todo o mundo, tendo se disseminado rapidamente por todo Sul da Europa,
539 Norte da África e em todo Mediterrâneo, configurando-se nos últimos como uma praga de
540 importância mundial (Desneux *et al.* 2010, 2011, Guedes & Picanço 2012). Esta praga foi
541 detectada no Brasil, o maior produtor de tomate da América do Sul, no final de 1979 se tornando
542 posteriormente praga-chave do tomateiro no Brasil por causar sérios prejuízos à tomaticultura,
543 onde as perdas ocasionadas por ela variam entre 40 e 100% (Muszinski *et al.* 1982). As lagartas
544 podem atacar qualquer fase do ciclo vegetativo do tomate, causando minas nas folhas além de
545 penetrar nos frutos e caules, comprometendo o valor de mercado (Desneux *et al.* 2010). Desde a
546 introdução de *T. absoluta* no Brasil, o controle químico tem sido tradicionalmente o principal
547 método adotado para minimizar as perdas ocasionadas por essa praga à cultura do tomateiro,
548 porém os riscos de evolução da resistência devido à adoção desta prática existem e têm sido
549 demonstrados em alguns estudos (Siqueira *et al.* 2000a, 2000b, Silva *et al.* 2011).

550 No Brasil, o primeiro caso de resistência de *T. absoluta* no campo foi detectado por
551 Siqueira *et al.* (2000b) aos inseticidas abamectina, cartape, metamidofós e permetrina. Mais

552 recentemente, Silva *et al.* (2011) encontraram níveis elevados de resistência aos inibidores da
553 síntese de quitina (> 100 vezes) para populações da praga em alguns estados do Brasil. A
554 exposição prévia à inseticidas tradicionalmente utilizados no controle de determinada praga pode
555 conferir resistência a inseticidas recentemente introduzidos através de resistência cruzada por
556 seleção de enzimas de detoxificação específicas que podem atuar em outros inseticidas (Sayyed *et*
557 *al.* 2008), reduzindo a eficácia destes novos produtos. De acordo com Shang *et al.* (2012), o
558 aumento ou a redução da atividade enzimática pode estar relacionada com a resistência de insetos
559 a inseticidas.

560 Estudos de monitoramento da resistência para determinar a resposta de populações de
561 praga a determinado produto químico são ideais para um programa de manejo da resistência. O
562 registro de resistência de *T. absoluta* a inseticidas ainda é incipiente além de que as características
563 da resistência foram pouco exploradas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo
564 verificar o *status* da resistência de *T. absoluta* a inseticidas, bem como detectar e quantificar os
565 prováveis mecanismos bioquímicos de resistência para os principais inseticidas utilizados para seu
566 controle no Brasil. Estes resultados irão ajudar a promover o controle eficiente dessa praga e terão
567 implicações importantes no sucesso do manejo da resistência de *T. absoluta*.

568

569

Material e Métodos

570 A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interações Insetos - Tóxicos (LIIT) da Área
571 de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco
572 (UFRPE), Recife-PE, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2013.

573 **Obtenção, Manutenção e Criação dos Insetos.** As populações de *T. absoluta* utilizadas nos
574 bioensaios foram coletadas de diversas regiões produtoras de tomate do Brasil e enviadas para o
575 LIIT, sendo mantidas em gaiolas de organza e madeira de 40 x 40 x 40 cm de dimensão sob

576 umidade relativa (U.R.) de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h. As criações foram compostas por três
577 gaiolas, uma foi utilizada para oviposição dos adultos, outra para alimentação de lagartas com
578 folhas de tomateiro do cultivar “Santa Clara”, cultivadas em casa de vegetação sem tratamento
579 com inseticidas e a última para emergência dos adultos. Folhas de tomate imersas em água através
580 dos pecíolos foram utilizadas como substrato para oviposição, sendo transferidas diariamente para
581 novas gaiolas onde permaneceram até eclosão das lagartas. As pupas foram transferidas para
582 novas gaiolas, permanecendo até a emergência dos adultos. Para a alimentação dos adultos, foi
583 utilizado chumaços de algodão embebidos em solução açucarada à base de mel diluído em água
584 destilada (~10%).

585 **Ensaio de Suscetibilidade de *T. absoluta* aos Inseticidas.** Na realização dos ensaios para
586 estimar as curvas de concentração-mortalidade foram utilizados os inseticidas formulados
587 clorfenapir (Pirate[®] 240 SC; BASF S.A, São Paulo, SP, Brasil), metaflumizone (Em registro;
588 BASF S.A, São Paulo, SP, Brasil), abamectina (Vertimec[®] 18 CE; Syngenta Proteção de Cultivos
589 Ltda, São Paulo, SP, Brasil), cartape (Cartape BR[®] 500 SP; Iharabras, Paulínia, SP, Brasil) e
590 indoxacarbe (Rumo[®] 300 WG; DuPont Brasil, Barueri, SP, Brasil), para as diferentes populações
591 de *T. absoluta*, sendo todos fornecidos pelas respectivas companhias.

592 Para realização dos bioensaios foram utilizados folíolos de tomate do cultivar “Santa
593 Clara”. Todos os bioensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia de imersão de
594 folhas, onde as concentrações (em mg de i.a./L de água) definidas foram preparadas a partir da
595 diluição do produto comercial em água destilada mais espalhante adesivo Triton-X-100.

596 Inicialmente, foram feitos bioensaios preliminares de forma a serem obtidas mortalidades
597 do inseto entre 0 e 100%, e em seguida determinadas as concentrações (sete a oito). Para a
598 realização dos bioensaios, os folíolos de tomate foram higienizados em solução à base de
599 hipoclorito de sódio a 5%. Após a higienização dos folíolos em água corrente, eles foram imersos

600 horizontalmente por um minuto em solução contida no interior de um Becker. Cada Becker
601 continha uma concentração de um inseticida testado. Água destilada acrescida de Triton-X-100
602 (espalhante adesivo) foi utilizada como tratamento controle. Para a retirada do excesso de calda,
603 os folíolos foram mantidos sobre papel toalha à temperatura ambiente até secagem completa e, em
604 seguida, transferidos para placas de Petri (80 x 15 mm), contendo papéis-filtro pulverizados
605 previamente com água destilada. Cada placa de Petri contendo um folíolo tratado recebeu 10
606 lagartas de *T. absoluta* de 2º instar. Após a transferência das lagartas, as placas de Petri foram
607 devidamente fechadas e mantidas em câmara climatizada (BOD), regulada para temperatura
608 média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h. A avaliação da mortalidade e do número
609 total de insetos foi realizada 48 horas após a imposição dos tratamentos. O critério de mortalidade
610 foi baseado na locomoção, onde as lagartas que foram incapazes de caminhar pelo menos uma
611 distância equivalente ao comprimento do corpo foram consideradas mortas.

612 **Preparação das amostras para ensaios enzimáticos.** Para avaliar a atividade das esterases,
613 GSTs e monooxigenases, enzimas ligadas à detoxificação de xenobióticos, aproximadamente 30
614 lagartas do 3º instar foram avaliadas por população. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas
615 de 10 indivíduos/microtubo utilizando diferentes tampões em função do grupo de enzimas. Na
616 extração de enzimas foram utilizados 200 μL de tampão fosfato de sódio (0,02 M, pH 7,2) em
617 gelo. Para glutathione-S-transferase, o processamento das amostras foi semelhante ao descrito para
618 esterase, diferindo apenas no tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), utilizando o
619 homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogenatos foram centrifugados (Eppendorf 5810R) a
620 15000 g e 4°C durante 15 minutos, em seguida foram recolhidos e armazenados a -80°C . Para os
621 ensaios da monooxigenase dependente do citocromo P_{450} , as amostras foram homogeneizadas em
622 500 μL de tampão fosfato sódio (0,1 M, pH 7,5) e o sobrenadante ultracentrifugado (Beckman
623 Coulter Optima L-80K) a 100.000 g para a obtenção dos microsomas, os quais foram

624 ressuspensos em fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) + glicerol a 2% (Wright *et al.* 2000). A
625 quantificação de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico usando albumina
626 de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985).

627 **Ensaio para quantificação das Esterases.** A atividade das esterases foi medida pelo método de
628 van Asperen (1962) adaptado. A solução estoque (250 mM) dos substratos α -naftil acetato e β -
629 naftil acetato foram preparados em acetona. Para reação, foi usada 2 μ L do substrato α -naftil
630 acetato, 10 μ L de amostra, que havia sido diluído para 1:100 e 188 μ L de tampão fosfato de sódio
631 por poço na micro placa. O procedimento foi repetido para análise das esterases usando o
632 substrato β -naftil acetato, onde, as amostras foram diluídas para 1:10. As amostras foram
633 incubadas em 30°C por 15 minutos. A reação foi parada usando 33,2 μ L de FAST Blue B a 0,3%.
634 A absorbância foi lida em 595 nm na leitora de micro placa (Elx800, BioTek[®], Winooski, VT,
635 USA). Cada amostra foi analisada em triplicata, as medidas estavam compreendidas no total de
636 nove repetições. A curva padrão foi preparada com α -naphthol e β -naphthol. A atividade das
637 esterases foi expressa como μ mol naftol x min^{-1} x mg de proteína⁻¹.

638 **Ensaio para quantificação de Glutathione-S-Transferase.** O substrato CDNB (1-cloro-2,4-
639 dinitrobenzeno) foi utilizado para determinar a atividade de conjugação de glutathione reduzida a
640 este substrato sob a influência da enzima glutathione-S-transferase formando 2,4-dinitrofenil-S-
641 glutathione (Habig *et al.* 1974). Uma solução de CDNB (150 mM) foi preparada em álcool etílico e
642 a glutathione reduzida (10 mM) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5). Para a
643 reação, 138 μ L de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), 10 μ L de amostra contendo 1 mg de
644 proteína, 150 μ L de glutathione reduzida (10 mM) foram utilizados. A pré-mistura foi incubada em
645 banho-maria a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, 2 μ L de CDNB (150 mM) foram adicionados
646 à reação. Imediatamente, a formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione foi medida utilizando um
647 biofotômetro a 340 nm. A reação foi analisada por 5 minutos com intervalos de leitura de 30

648 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata, e as medidas compostas de um total de nove
649 repetições. Os dados de absorvâncias foram analisadas em função do tempo de reação após a
650 adição do CDNB. A inclinação da reta (absorvância/min) foi transformada em unidade de
651 concentração nmol de GS-DNB/min/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de
652 CDNB ($9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

653 **Ensaio para quantificação da Monooxigenase Dependente do Citocromo P₄₅₀ (N-**
654 **desalquilação).** O substrato 4-cloro-*N*-metilanilina foi utilizado para determinar a atividade de *N*-
655 desalquilação através da monooxigenase dependente de citocromo P₄₅₀. Utilizou-se 50 µL de
656 tampão fosfato de sódio com Tween 20 a 2% (0,1M, pH 7,5), 25 µL da amostra, 25 µL 4-cloro-*N*-
657 metilanilina (4- CNMA) a 7,5 mM diluído em etanol a 20% v/v, 25 µL de NADPH reduzido (9,6
658 mM). A reação foi processada por 16 min a temperatura de 37 °C e parada através da adição de
659 187,5 µL de *p*-dimetilaminobenzaldeído a 233,33 mM, diluído em 3.0 N de ácido sulfúrico. Os
660 microtubos contendo a reação de parada foram centrifugados por 15 min a 10000 g a 4 °C. A
661 atividade por amostra foi obtida da equação linear estimada para a absorvância em função da
662 curva padrão de 4- cloroanilina que foi relatada em $\eta\text{Mol 4-cloroanilina} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.
663 ¹.

664 **Ensaio para quantificação de monooxigenase dependente do Citocromo P₄₅₀ (O-**
665 **desalquilação).** A atividade de *O*-desalquilação através da monooxigenase dependente do
666 citocromo P₄₅₀ foi determinada através do método que utiliza o substrato *p*-nitroanisole ($\text{O}_2\text{N}-$
667 $\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}_3$), produzindo *p*-nitrofenol. Dessa forma, na presença de *p*-nitroanisole a atividade
668 da enzima monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ pode ser medida (Rose & Brindley
669 1985). A reação de atividade da monooxigenase depende do citocromo P₄₅₀ foi determinada
670 misturando 178,8 µL do tampão fosfato de sódio de ressuspensão (0,1 M, pH 7,5); 56,2 mL de
671 amostra; 2,5 µL *p*-nitroanisole (150 mM em etanol) e 12,5 µL de NADPH reduzido (9,6 mM) em

672 cada poço, nesta ordem. A mistura foi incubada durante 15 minutos a 37 °C. Em seguida, 10 µL
673 de HCl (1 M) foi adicionado a mistura para interromper a reação. A mistura foi centrifugada a
674 14000 g durante 10 minutos, e 200 µL de sobrenadante foram transferidos para os poços da placa
675 de microtitulação para ser lido a 405 nm no leitor de micro placas. As amostras foram analisadas
676 em triplicata, e as medidas no total foram compostas de nove repetições. Atividade da
677 monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ por amostra foi determinada com base na curva
678 padrão de *p*-nitrofenol em nMol *p*-nitrofenol x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

679 **Análises Estatísticas.** Os bioensaios que apresentaram mortalidades no tratamento controle
680 superiores a 10% foram descartados e aqueles em que se conseguiu ajuste do modelo de probit
681 foram repetidos pelo menos mais uma vez. Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de
682 concentração-mortalidade após correção pelo tratamento controle (Abbott 1925) foram
683 submetidos à análise de probit com $P > 0,05$ (Finney 1971) através do programa estatístico
684 PoloPlus (LeOra Software 2005). As respostas das populações de *T. absoluta* testadas nos
685 bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas
686 e estimativas dos valores de CL₅₀ e CL₈₀ para os cinco inseticidas testados. As razões de
687 resistência (RR) foram calculadas pelo teste de razão letal e consideradas significativas quando o
688 intervalo de confiança (IC) a 95% não incluiu o valor um, conforme proposto por Robertson &
689 Preisler (1992). Para cada inseticida, a população que apresentou a menor CL₅₀ foi utilizada como
690 padrão de suscetibilidade em relação às demais. As médias de atividade de esterase,
691 monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ e glutathione-S-transferase foram analisadas e
692 testadas usando o programa SAS (SAS Institute 2001). As premissas da análise de variância
693 (ANOVA) foram testadas usando PROC UNIVARIATE. As médias foram submetidas à análise
694 de variância (PROC ANOVA) e teste de Tukey (HSD) $P < 0,05$ para verificar diferenças entre as
695 populações. Os dados das atividades enzimáticas das oito populações de *T. absoluta* e os valores

696 de CL₅₀ das populações para cada inseticida foram utilizados para análises de correlação de
697 Pearson (r), com $P < 0,05$ (PROC CORR) (SAS Institute 2001).

698

699

Resultados

700 Os resultados de concentração-mortalidade obtidos no presente estudo assumiram o modelo
701 de Probit ($P > 0,05$). A população de Iraquara apresentou a menor CL₅₀ para indoxacarbe,
702 metaflumizone e abamectina (Tabelas 1, 2 e 5), enquanto que a população de Pelotas foi a que
703 apresentou a menor CL₅₀ para os inseticidas clorfenapir e cartape (Tabelas 3 e 4). Desta forma,
704 estas populações foram utilizadas como referências de suscetibilidade aos respectivos inseticidas.

705 A concentração estimada de indoxacarbe que ocasionou 50% de mortalidade (CL₅₀) de cada
706 população de *T. absoluta* variou de 0,86 (Iraquara, BA) a 2,89 (Pelotas, RS) mg i.a./L. Desta
707 forma, os valores de razão de resistência variaram de 1,6 (Guaraciaba do Norte, CE) a 3,3-vezes
708 (Pelotas, RS). Os valores de CL₈₀ variaram de 1,56 (Iraquara, BA) a 12,13 mg i.a./L (Pelotas, RS)
709 e a dose recomendada de indoxacarbe (48 mg i.a./L) não se interpôs aos intervalos de confiança
710 das CL₈₀s de qualquer população (Tabela 1), e as populações estariam ainda suscetíveis ao
711 inseticida quando tratadas com esta dose. Com exceção das populações de Tianguá e Paulínia, as
712 demais populações apresentaram razão de resistência significativa para indoxacarbe, por não
713 compreender o valor 1,0 nos intervalos de confiança das razões (Tabela 1). Os coeficientes
714 angulares das curvas variaram de 1,33 (Pelotas, RS) a 3,25 (Iraquara, BA) para o inseticida
715 indoxacarbe (Tabela 1).

716 A concentração estimada de metaflumizone que ocasionou 50% de mortalidade (CL₅₀) de
717 cada população de *T. absoluta* variou de 0,35 (Iraquara, BA) a 7,44 (Paulínia, SP) mg ia/L. Desta
718 forma, os valores de razão de resistência variaram de 2,5 (Sumaré, SP) a 21,2-vezes (Paulínia,
719 SP). Os valores de CL₈₀ variaram de 2,23 (Sumaré, SP) a 26,71 mg i.a./L (Guaraciaba do Norte,

720 CE) e a dose recomendada de indoxacarbe (240 mg i.a./L) não se interpôs aos intervalos de
721 confiança das CL_{80} s de qualquer população (Tabela 2), e as populações estariam ainda suscetíveis
722 a este inseticida quando tratadas com esta dose. Todas as populações apresentaram razão de
723 resistência significativa para metaflumizone, por não compreender o valor 1,0 nos intervalos de
724 confiança das razões (Tabela 2). Os coeficientes angulares das curvas variaram de 1,00 (Iraquara,
725 BA) a 2,07 (Sumaré, SP) para o inseticida metaflumizone (Tabela 2).

726 A concentração estimada de clorfenapir que ocasionou 50% de mortalidade (CL_{50}) de cada
727 população de *T. absoluta* variou de 0,62 (Pelotas-RS) a 2,83 (Paulínia, SP) mg i.a./L. Desta
728 forma, os valores de razão de resistência variaram de 1,4 (Iraquara, BA) a 4,6-vezes (Paulínia,
729 SP). Os valores de CL_{80} variaram de 1,17 (Pelotas, RS) a 10,91 mg i.a./L (Guaraciaba do Norte,
730 CE) e a dose recomendada de clorfenapir (60 mg i.a./L) não se interpôs aos intervalos de
731 confiança das CL_{80} s de qualquer população (Tabela 3), e as populações estariam ainda suscetíveis
732 a este inseticida quando tratadas com esta dose. Todas as populações apresentaram razão de
733 resistência significativa para clorfenapir, por não compreender o valor 1,0 nos intervalos de
734 confiança das razões (Tabela 3). Os coeficientes angulares das curvas variaram de 1,35
735 (Guaraciaba do Norte, CE) a 4,33 (Iraquara, BA) para o inseticida clorfenapir (Tabela 3).

736 A concentração estimada de cartape que ocasionou 50% de mortalidade (CL_{50}) de cada
737 população de *T. absoluta* variou de 93,11 (Pelotas, RS) a 589,75 (Anápolis, GO) mg i.a./L. Desta
738 forma, os valores de razão de resistência variaram de 1,5 (Paulínia, SP) a 6,4 vezes (Anápolis,
739 GO). Os valores de CL_{80} variaram de 201,03 (Pelotas, RS) a 1379,3 mg i.a./L (Guaraciaba do
740 Norte, CE) e a dose recomendada de cartape (1250 mg i.a./L) se interpôs aos intervalos de
741 confiança das CL_{80} s das populações de Tianguá, Guaraciaba do Norte e Anápolis (Tabela 4).
742 Todas as populações apresentaram razão de resistência significativa para cartape, por não
743 compreender o valor 1,0 nos intervalos de confiança das razões (Tabela 4). Os coeficientes

744 angulares das curvas variaram de 1,82 (Tianguá, CE) a 2,85 (Venda Nova, ES) para o inseticida
745 cartape (Tabela 4).

746 A concentração estimada de abamectina que ocasionou 50% de mortalidade (CL₅₀) de cada
747 população de *T. absoluta* variou de 0,54 (Iraquara, BA) a 3,38 (Tianguá, CE) mg i.a./L. Desta
748 forma, os valores de razão de resistência variaram de 2,0 (Venda Nova, ES) a 6,2 vezes (Tianguá,
749 CE). Os valores de CL₈₀ variaram de 1,68 (Anápolis, GO) a 8,72 mg i.a./L (Tianguá, CE) e a dose
750 recomendada de abamectina (18 mg i.a./L) não se interpôs aos intervalos de confiança das CL₈₀s
751 de qualquer população (Tabela 5), e as populações estariam ainda suscetíveis a este inseticida
752 quando tratadas com esta dose. Todas as populações apresentaram razão de resistência
753 significativa para abamectina, por não compreender o valor 1,0 nos intervalos de confiança das
754 razões (Tabela 5). Os coeficientes angulares das curvas variaram de 1,56 (Iraquara, BA) a 2,66
755 (Anápolis, GO) para o inseticida abamectina (Tabela 5).

756 As atividades de esterase diferiram entre as populações de *T. absoluta* com o substrato α -
757 naftil acetato e β -naftil acetato (Tabela 6). As atividades de α -esterase variaram de $1,06 \pm 0,08$
758 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Pelotas, RS) a $2,22 \pm 0,10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Iraquara, BA).
759 Uma variação de apenas 2,09 vezes na atividade α -esterase foi observada dentre as populações. A
760 atividade de β -esterase variou de $0,98 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Guaraciaba do Norte, CE)
761 a $1,39 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Sumaré, SP). Para o substrato β - naftil acetato houve uma
762 variação de apenas 1,41 vezes. Diferenças significativas também foram observadas na atividade de
763 conjugação de glutationa-S-transferase entre as populações de *T. absoluta*. As atividades variaram
764 de $24,83 \pm 1,31 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Tianguá, CE) a $77,67 \pm 1,97 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína
765 (Pelotas, RS). Uma variação de 3,12 vezes na atividade de glutaciona-S-transferase foi observada
766 dentre as populações (Tabela 6).

767 Quanto ao metabolismo oxidativo, diferenças significativas na atividade de monooxigenases
768 dependentes de citocromo P₄₅₀ foram encontradas entre as populações de *T. absoluta*. A atividade
769 de *N*-desalquilação variou de $1,03 \pm 0,13$ η mol/min/mg de proteína (Paulínia, SP) a $5,86 \pm 0,17$
770 η mol/min/mg de proteína (Anápolis, GO), com uma variação de 5,68 vezes na atividade dentre as
771 populações de *T. absoluta* (Tabela 6). A atividade de *O*-desalquilação variou de $4,26 \pm 0,43$
772 η mol/min/mg de proteína (Guaraciaba do Norte, CE) a $17,33 \pm 1,24$ η mol/min/mg de proteína
773 (Venda Nova, ES), com uma variação de 4,06 vezes na atividade dentre as populações de *T.*
774 *absoluta* (Tabela 6).

775 Correlação significativa foi observada entre as CL₅₀s das populações de *T. absoluta* para os
776 inseticidas abamectina e metaflumizone ($r = 0,315$; $P = 0,006$; $N = 8$) e abamectina e clorfenapir (r
777 $= 0,243$; $P = 0,039$; $N = 8$) (Tabela 7). Para cartape, correlações significativas foram observadas
778 com o inseticida clorfenapir ($r = 0,396$; $P = 0,0006$; $N = 8$) e com indoxacarbe ($r = -0,239$; $P =$
779 $0,042$; $N = 8$) (Tabela 7), enquanto que para clorfenapir, correlações significantes foram
780 observadas com indoxacarbe ($r = -0,308$; $P = 0,008$; $N = 8$) e metaflumizone ($r = 0,911$; $P = <$
781 0001 ; $N = 8$) (Tabela 7).

782 As correlações entre as CL₅₀ e a atividade das enzimas medidas pelos substratos, podem dar
783 algum indicativo da resistência ser conferida pelo aumento do metabolismo (Feyereisen 1999).
784 Para facilitar a interpretação da magnitude dos coeficientes de correlação, o presente trabalho
785 adotou a classificação sugerida por Cohen (1988), a qual segue: $r = 0,10$ até $0,29$ (correlação
786 fraca); $r = 0,30$ até $0,49$ (correlação moderada); $r = 0,50$ até $1,0$ (correlação forte). Correlação
787 significativa e moderada ($r = -0,621$; $P = < 0001$; $N = 72$) foi observada entre a atividade de
788 esterase frente ao substrato α -naftil acetato e as CL₅₀s das populações de *T. absoluta* para o
789 inseticida indoxacarbe (Tabela 7). Enquanto que esterases que metabolizaram β -naftil acetato

790 correlacionaram significativamente com os inseticidas metaflumizone ($r = -0,388$; $P = 0,0007$; $N =$
791 72) e clorfenapir ($r = -0,320$; $P = 0,006$; $N = 72$) (Tabela 7).

792 Correlações moderada a alta foram significativamente observadas entre a atividade de
793 conjugação por glutathione-S-transferase e as CL_{50} s das populações de *T. absoluta* para abamectina
794 ($r = 0,820$; $P < 0001$; $N = 72$) e indoxacarbe ($r = 0,607$; $P < 0001$; $N = 72$) (Tabela 7).

795 A atividade de *N*-desalquilação por monooxigenases dependentes de citocromo P450 usando o
796 substrato 4-cloro-*N*-metilanilina correlacionou com as CL_{50} s das populações de *T. absoluta* para
797 indoxacarbe ($r = 0,459$; $P < 0001$; $N = 72$), abamectina ($r = -0,345$; $P = 0,002$; $N = 72$) e cartape
798 ($r = 0,409$; $P = 0,0004$; $N = 72$) (Tabela 7). Enquanto que a atividade de *O*-desalquilação por estas
799 enzimas usando o substrato *p*-nitroanisole correlacionou com as CL_{50} s das populações de *T.*
800 *absoluta* para metaflumizone ($r = -0,647$; $P < 0001$; $N = 72$), clorfenapir ($r = -0,597$; $P < 0.0001$;
801 $N = 72$) e abamectina ($r = -0,347$; $P = 0,002$; $N = 72$) (Tabela 7).

802

803

Discussão

804 A *T. absoluta* tem mostrado grande plasticidade genética ao longo de seus 35 anos de
805 introdução no Brasil, evoluindo para resistência com relativa facilidade às diversas classes de
806 inseticidas que foram consecutivamente registradas para seu controle. Ao final dos anos 90, os
807 primeiros casos de resistência às classes prevalecentes (organofosforados, piretroides, análogo de
808 nereistoxinas e avermectinas) foram relatados no Brasil (Siqueira *et al.* 2000b). Neste estudo,
809 populações de *T. absoluta* mostraram baixos graus relativos de resistência a indoxacarbe,
810 clorfenapir, cartape e abamectina, apesar de que algumas populações apresentaram valores de
811 CL_{80} próximos ou acima das doses recomendadas em rótulo. Curiosamente, os valores de razão de
812 resistência das populações de *T. absoluta* a metaflumizone foram maiores com relação aos demais
813 inseticidas. Como não há uso autorizado deste produto no Brasil, tais valores devem refletir as

814 respostas naturais das populações. Silva *et al.* (2011) relataram resistência moderada (27,5 vezes)
815 de *T. absoluta* a indoxacarbe, e as diferenças com este estudo refletem os padrões de uso de
816 inseticidas nas diferentes áreas de cultivo e/ou diversidade genética intra e interpopulacional que
817 pode explicar a variabilidade observada nestes resultados. Variações nestes graus irão sempre
818 existir ano a ano em função de vários fatores que interferem em tais resultados. A sucessão de
819 moléculas para o controle de *T. absoluta* podem ter contribuído para alterações nos padrões
820 prevacentes de resistência desta praga. O uso de diamidas mais recentemente tem
821 provavelmente contribuído para alterações neste panorama da resistência de *T. absoluta* no Brasil
822 por causa da alta suscetibilidade das populações (Campos 2013). Além disso, a ausência de
823 populações padrão de suscetibilidade ou de valores de linha básica de suscetibilidade torna pouco
824 esclarecedor quanto as populações de *T. absoluta* têm evoluído para resistência aos inseticidas.
825 Contudo, cada vez mais, maior amplitude de resistências a inseticidas vem sendo relatada ao
826 longo dos anos para *T. absoluta* e novos casos de resistência são esperados (Guedes & Siqueira
827 2012).

828 A variabilidade nas respostas ao inseticida indoxacarbe tem sido relatada por Silva *et al.*
829 (2011) em populações do Brasil (27 vezes), por Roditakis *et al.* (2012a) em populações da Grécia
830 (10 vezes) e por Roditakis *et al.* (2012b) em populações da Itália (12 vezes). Adicionalmente,
831 falhas potenciais de controle também foram observadas por Silva *et al.* (2011). Resultados
832 diferentes foram detectados no presente estudo, onde as razões de resistência encontradas para
833 indoxacarbe foram relativamente baixas e semelhantes entre si. Contrariamente, as populações de
834 *T. absoluta* responderam de forma mais heterogênea ao metaflumizone quando comparado aos
835 demais inseticidas, e particularmente ao indoxacarbe, uma vez que ambos agem como
836 bloqueadores de canais de sódio (Lahm *et al.* 2000, Takagi *et al.* 2007). Resultados diferentes
837 foram encontrados em populações de *T. absoluta* na Europa com razões de resistência de no

838 máximo cinco vezes para metaflumizone (Roditakis *et al.* 2012a). Entretanto, as populações
839 europeias apresentaram valores de CL₅₀ acima de 30 mg de i.a./L de água quando comparadas
840 com as populações brasileiras (máximo de 7,44 mg de i.a./L de água). Os valores de CL₈₀
841 encontrados neste trabalho foram inferiores à dose recomendada a campo em outros países, que é
842 240 mg de i.a./L de água, para as populações de *T. absoluta*. Embora metaflumizone não seja
843 utilizado no Brasil, uma das possíveis razões para que a evolução da resistência estivesse
844 ocorrendo, seria a seleção prévia das populações com indoxacarbe (resistência cruzada),
845 entretanto esta hipótese não procede por que não se observou correlação significativa entre
846 ambos. Desta forma, como sugerido anteriormente, tais resultados refletem variação natural das
847 populações. A ausência de resistência cruzada entre metaflumizone e indoxacarbe aqui observada
848 também foi relatada por Khakame *et al.* (2013) em *Plutella xylostella* (Linnaeus), embora eles não
849 tenham encontrado alta variabilidade entre as populações testadas para metaflumizone, que foi
850 inferior a cinco vezes. Diante dos resultados observados no presente trabalho e visto as
851 perspectivas da introdução de metaflumizone no Brasil para o controle de *T. absoluta*, tais
852 populações devem ser monitoradas para evitar possíveis falhas de controle em curto prazo após
853 liberação comercial.

854 As razões de resistência para clorfenapir, encontrados no presente estudo foram baixas e
855 sugerem que estes resultados estão associados à variabilidade natural das populações. Che *et al.*
856 (2012) também não encontraram valores elevados de razão de resistência para clorfenapir em
857 *Spodoptera exigua* (Hübner). Nenhuma das populações de *T. absoluta* apresentaram CL₈₀s acima
858 da dose recomendada em rótulo (60 mg de i.a./L de água) para este inseticida. Diante disto, este
859 produto pode se apresentar como uma boa alternativa no controle de *T. absoluta*, desde que
860 observadas as recomendações do fabricante. No entanto, uma forte correlação com metaflumizone
861 foi observada, o que poderia explicar a alta variação das respostas das populações a este

862 inseticida, mas uma avaliação mais criteriosa deve ser conduzida para avaliar tal relação não
863 esperada.

864 Graus de resistência significativos foram observados para as populações de *T. absoluta* para
865 o inseticida cartape embora moderados. Siqueira *et al.* (2000a) observaram valores acima de 20
866 vezes para populações da traça-do-tomateiro. No entanto, populações de Guaraciaba do Norte,
867 Tianguá e Anápolis apresentaram valores de CL₈₀, cujos limites de confiança compreenderam a
868 dose recomendada pelo fabricante (1250 mg de i.a./L de água), sugerindo que falhas de controle já
869 sejam um problema potencial em campo nestas áreas.

870 Abamectina tem sido usado para o controle de populações de *T. absoluta* no Brasil (Guedes
871 & Picanço 2012) desde sua autorização em 1991, particularmente devido a sua alta toxicidade e
872 espectro de ação a insetos e ácaros. Apesar disso, as razões de resistência para as populações
873 avaliadas foram consideradas baixas, o que pode estar associado ao padrão de uso de inseticidas
874 nas áreas avaliadas e aspectos associados com resistência a abamectina em insetos como a sua
875 instabilidade ligada a custos adaptativos (Roush & McKenzie 1987, Nicastro *et al.* 2010, Sato *et*
876 *al* 2005). Resultados semelhantes também foram observados por Siqueira *et al.* (2001), Lietti *et*
877 *al.* (2005) e Roidakis *et al.* (2012a), onde a máxima razão de resistência encontrada pelos autores
878 foi de 9,4; 3,5 e 4 vezes, respectivamente. Embora abamectina seja um inseticida amplamente
879 utilizado no controle de *T. absoluta*, este ainda se apresenta como uma opção interessante no
880 controle desta praga, visto que nenhum dos valores de CL₈₀ encontrados no presente trabalho
881 estão acima da dosagem recomendada para campo (18 mg de i.a./L de água).

882 Os mecanismos bioquímicos de resistência de *T. absoluta* a inseticidas ainda estão por ser
883 esclarecidos. As correlações entre as CL_{50s} e a atividade das enzimas medidas pelos substratos,
884 podem dar algum indicativo da resistência ser conferida pelo aumento do metabolismo
885 (Feyereisen 1999). O inseticida indoxacarbe apresentou forte correlação negativa com esterase

886 quando utilizado o substrato α -naftil acetato, correlação positiva moderada e forte com as
887 monooxigenases microssomais dependentes do citocromo P₄₅₀ utilizando o substrato 4-cloro-
888 metilanilina e DCNB, respectivamente. Indoxacarbe, um pró-inseticida, é ativado por esterases,
889 tendo como consequência a diminuição dos valores das CL₅₀s. Trabalhos realizados por Ahmad *et*
890 *al.* (2002), Shono *et al.* (2004), Ahmad & Hollingworth (2004) e Sayyed & Wright (2006),
891 mostraram ser as esterases as enzimas responsáveis pela resistência ao indoxacarbe.
892 Aparentemente, monooxigenases e glutathione-S-transferase estejam desempenhando papel de
893 detoxificação a indoxacarbe em populações de *T. absoluta*, mas o uso de sinergistas pode auxiliar
894 no esclarecimento destes resultados.

895 Os resultados reportados neste trabalho mostram, embora fraca, correlação significativa
896 positiva entre as CL₅₀s para abamectina e clorfenapir, bem como uma correlação negativa
897 moderada entre atividade enzimática e CL₅₀ para ambos, para monooxigenases quando utilizado
898 o substrato *p*-nitroanisole. Nicastro *et al.* (2013), também encontraram resistência cruzada entre
899 abamectina e clorfenapir para o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Koch). Pelo menos para *T.*
900 *absoluta*, uma das possíveis causas de resistência cruzada entre estes inseticidas poderia estar
901 relacionada à ativação pelas monooxigenases microssomais dependentes do citocromo P₄₅₀.
902 Entretanto, não se conseguiu explicar claramente de que forma estas enzimas estão atuando com
903 abamectina. Nesse contexto, a resistência associada entre clorfenapir e abamectina precisa ser
904 mais estudada a fim de esclarecer este assunto.

905 Os inseticidas clorfenapir e metaflumizone apresentaram correlação negativa moderada e
906 forte para o substrato β - naftil acetato, e as monooxigenases microssomais dependentes do
907 citocromo P₄₅₀ utilizando o substrato *p*-nitroanisole, respectivamente. Clorfenapir é um pró-
908 inseticida, que é ativado por monooxigenases (Hunt & Treacy 1998). Já para o caso de
909 metaflumizone não foi encontrado explicação plausível para estes resultados e experimentos

910 adicionais através da utilização de sinergistas bem como ferramentas moleculares podem vir a
911 esclarecer estes dados. Diante dos resultados observados no presente trabalho e visto as
912 perspectivas da introdução de metaflumizone no Brasil para o controle de *T. absoluta*, tais
913 populações devem ser monitoradas para evitar possíveis falhas de controle em curto prazo após
914 liberação comercial.

915

916

Agradecimentos

917 Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco que possibilitou a
918 realização desta pesquisa, a CAPES pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor e ao
919 Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC- BR) pelo apoio financeiro ao
920 presente trabalho.

921

922

Literatura Citada

923 **Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an inseticide. J. Econ. Entomol.
924 18: 265–267.

925 **Ahmad, M., & R. M. Hollingworth. 2004.** Synergism of insecticides provides evidence of
926 metabolic mechanisms of resistance in the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana*
927 (Lepidoptera: Tortricidae). Pest Manag. Sci. 60: 465-473.

928 **Ahmad, M., M. Hollingworth & J. C. Wise. 2002.** Broad spectrum insecticide resistance in
929 oblique banded leaf roller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) from
930 Michigan. Pest Manag. Sci. 58: 834-838.

931 **Camargo, F.P., H.S. Alves, W.P. Camargo Filho & N.J. Vilela. 2006.** Cadeia produtiva do
932 tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas.
933 Inform. Econ. 36: 7-20.

934 **Campos, M.R. 2013.** Resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a
935 diamidas e espinosinas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 130p. (Tese)

936 **Che, W., T. Shi, Y. Wu & Y. Yang. 2012.** Insecticide resistance status of field populations of
937 *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. J. Econ. Entomol. 106: 1855-1862.

- 938 **Cohen, Jacob. 1988.** Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ,
939 Erlbaum.
- 940 **Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-**
941 **Vazquez, J.G. Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C.**
942 **Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops
943 by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. J. Pest
944 Science 83: 197–215.
- 945 **Desneux, N., M. G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American
946 tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new
947 threat to tomato world production. J. Pest Sci. 84: 403-408.
- 948 **Feyereisen, R. 1999.** Insect P450 Enzymes. Annu. Rev. Entomol. 44: 507-533.
- 949 **Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis. London: Cambridge University. 333p.
- 950 **Guedes, R. N. C. & M. C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America:
951 pest status, management and insecticide resistance. E.P.P.O. Bulletin 42: 211-216.
- 952 **Guedes, R. N. C. & H. A. A. Siqueira. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide
953 resistance and control failure. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science,
954 Nutrition and Natural Resources 7: 1-7.
- 955 **Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974.** Glutathione-S-transferases: the first step in
956 mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139.
- 957 **Hunt, D.A., M.F. Treacy. 1998.** Pyrrole insecticides: A new class of agriculturally important
958 insecticides functioning as uncouplers of oxidative phosphorylation, p. 138-151. In Ishaaya, I.,
959 D. Degheele, (ed.). Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanism and Application.
960 Berlin, Springer-Verlag, 289p.
- 961 **Khakame, S.K., X. Wang & Y. Wu. 2013.** Baseline toxicity of metaflumizone and lack of cross
962 resistance between indoxacarb and metaflumizone in diamondback moth (Lepidoptera:
963 Plutellidae). J. Econ. Entomol. 106: 1423-1429.
- 964 **Lahm, G.P., S.F. McCann, C.R. Harrison, T.M. Stevenson & R. Shapiro. 2000.** Evolution of
965 the sodium channel blocking insecticides: the discovery of indoxacarb, in Agrochemical
966 Discovery. American Chemical Society, Washington, D.C. 774: 20–34
- 967 **LeOra Software. 2005.** PoloPlus, POLO for Windows, LeOra Software, Petaluma, CA.
968 Disponível em <[http:// www.LeOraSoftware.com](http://www.LeOraSoftware.com)>, acessado em 10/05/13.
- 969 **Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine
970 populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotrop. Entomol. 34:
971 113-119.

- 972 **Muszinski, T., I.M. Lavendowski & L.M.A. Maschio. 1982.** Constatação de *Scrobipalpula*
973 *absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon*
974 *esculentum* Mill.) no litoral do Paraná. An. Soc. Entomol. Bras. 11: 291-292.
- 975 **Nicastro,R.L., M. E. Sato & M.Z. da Silva. 2010.** Milbemectin resistance in *Tetranychus*
976 *urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. Exp.
977 Appl. Acarol. 50: 231–241.
- 978 **Nicastro, R. L., M.E. Sato, A. Valter, M.Z. Silva. 2013.** Chlorfenapyr resistance in the spider
979 mite *Tetranychus urticae*: stability, cross-resistance and monitoring of
980 resistance. Phytoparasitica 41: 503-513
- 981 **Robertson, J.L., & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide Bioassays with Arthropods. 1st ed. CRC,
982 Press, Boca Raton, FL, 127 p.
- 983 **Roditakis, E., C.Skarmoutsou, M. Staurakaki. 2012a.** Toxicity of insecticides to populations of
984 tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. Pest Manag. Sci. 69: 834–840
- 985 **Roditakis, E., C. Skarmoutsou, M. Staurakaki, M. del Rosario Martínez-Aguirre, L. García-**
986 **Vidal, P. Bielza, K. Haddi, C. Rapisarda, J.-L. Rison, A. Bassi, and L. A. Teixeira. 2012b.**
987 Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick)
988 to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method. Pest Manag. Sci. 69:
989 217–227.
- 990 **Rose, R.L. & W.A. Brindley. 1985.** An evaluation of the role of oxidative enzymes in Colorado
991 potato beetle resistance to carbamate insecticides. Pestic. Biochem. Physiol. 23: 74-84.
- 992 **Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance.
993 Annu. Rev. Entomol. 32: 361-380.
- 994 **SAS Institute 2001.** SAS user’s guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer
995 program, version By SAS Institute.
- 996 **Sayyed, A.H., & D.J. Wright. 2006.** Genetics and evidence for an esterase-associated
997 mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth
998 (Lepidoptera: Plutellidae). Pest Manag. Sci. 62: 1045-1051.
- 999 **Sayyed, A.H, S. Saeed, M. Noor-ul-ane & N. Crickmore. 2008.** Genetic, biochemical, and
1000 physiological characterization of spinosad resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera:
1001 Plutellidae). J. Econ. Entomol. 101:1658-1666.
- 1002 **Sato, M.E., M.Z. da Silva, A. Raga & M.F. Souza Filho. 2005.** Abamectin resistance in
1003 *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of
1004 resistance. Neotrop. Entomol. 34: 991-998.
- 1005 **Shang, Q., Y. Pan, K. Fang, X. Jinghui & J. Brennan. 2012.** Biochemical characterization of
1006 acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of
1007 *Aphis gossypii* Glover. Crop Prot. 31: 15-20.

- 1008 **Shono, T., L. Zang, & J. G. Scott. 2004.** Indoxacarb resistance in the house fly *Musca*
1009 *domestica*. Pestic. Biochem. Phys. 80: 106-112.
- 1010 **Silva, G.A, M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.**
1011 Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato
1012 pinworm, *Tuta absoluta*. Pest. Manag. Sci. 67: 913–920.
- 1013 **Siqueira, H. A. A., R. N. C. Guedes & M. C. Picanço. 2000a.** Cartap resistance and synergism
1014 in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Appl. Entomol. 124: 233-238.
- 1015 **Siqueira, H. Á. A., R. N. C. Guedes, & M. C. Picanço. 2000b.** Insecticide resistance in
1016 populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- 1017 **Siqueira, H. A. A., R. N. C. Guedes, D. B. Fragoso & L. C. Magalhaes. 2001.** Abamectin
1018 resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:
1019 Gelechiidae). Int. J. Pest Manage. 47: 247-251.
- 1020 **Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano,**
1021 **E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using
1022 Bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.
- 1023 **Takagi, K., H. Hamaguchi, T. Nishimatsu & T. Konno. 2007.** Discovery of metaflumizone, a
1024 novel semicarbazone insecticide. Vet. Parasitol. 150:177–181
- 1025 **van Asperen, K. 1962.** A study of house fly esterases by means of a sensitive colorimetric
1026 method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.
- 1027 **Wright, R. J., M.E. Scharf, L.J. Meinke, X. Zhou, B.D. Siegfried & L.D. Chandler. 2000.**
1028 Larval susceptibility of an insecticide-resistant Western Corn Rootworm (Coleoptera:
1029 Chrysomelidae) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification
1030 enzymes, and field performance. J. Econ. Entomol. 93: 7-13.
1031

1032 Tabela 1. Toxicidade relativa de indoxacarbe para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
 1033

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Iraquara – BA	279	5	3,25 \pm 0,46	0,86 (0,68 – 1,03)	1,56 (1,29 – 2,00)	0,40	---
Tianguá-CE	248	4	2,04 \pm 0,21	0,92 (0,75 – 1,11)	1,85 (1,53 – 2,35)	2,45	1,1 (0,8 – 1,4)
Paulínia-SP	260	5	1,95 \pm 0,31	1,35 (0,87 – 1,80)	3,63 (2,77 – 5,11)	2,83	1,6 (1,0 – 2,3)
Guaraciaba do Norte-CE	284	5	2,49 \pm 0,26	1,40 (1,01 – 1,85)	3,04 (2,28 – 4,54)	6,42	1,6 (1,2 – 2,2) *
Sumaré – SP	277	5	1,55 \pm 0,17	1,62 (1,18-2,11)	5,66 (4,24 – 8,20)	0,58	1,9 (1,3 – 2,7) *
Anápolis - GO	269	5	2,30 \pm 0,24	1,82 (1,47 – 2,23)	4,24 (3,38 – 5,69)	3,44	2,1 (1,6 – 2,8) *
Venda Nova - ES	278	5	1,76 \pm 0,18	2,26 (1,79 – 2,86)	6,78 (5,13 – 9,77)	2,93	2,6 (1,9 – 3,6) *
Pelotas – RS	270	5	1,33 \pm 0,15	2,89 (2,07 – 3,80)	12,13 (8,55 – 19,67)	3,74	3,3 (2,3 – 4,8) *

1034 ^a Número total de larvas utilizadas.

1035 ^b Grau de liberdade.

1036 ^c Erro padrão.

1037 ^d Miligramas de ingrediente ativo por Litro de água.

1038 ^e Qui-quadrado.

1039 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
 1040 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. *Razão de resistência significativa para indoxacarbe, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1041

1042 Tabela 2. Toxicidade relativa de metaflumizone para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
1043

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Iraquara – BA	280	5	1,00 \pm 0,15	0,35 (0,10 – 0,64)	2,42 (1,42 – 5,40)	5,41	---
Sumaré – SP	280	5	2,07 \pm 0,37	0,87 (0,41 – 1,39)	2,23 (1,40 – 3,54)	3,10	2,5 (1,1 – 5,6) *
Pelotas – RS	259	5	2,04 \pm 0,33	2,59 (1,51 – 3,69)	6,70 (4,83 – 9,55)	1,39	7,4 (3,6 – 15,1) *
Anápolis - GO	320	6	1,35 \pm 0,13	2,92 (2,22 – 3,84)	12,21 (8,64 – 19,35)	5,19	8,3 (4,8 – 14,4) *
Tianguá - CE	278	5	2,06 \pm 0,26	3,44 (2,54 – 4,42)	8,82 (6,85 – 12,11)	4,14	9,8 (5,2 – 18,6) *
Venda Nova - ES	276	5	1,67 \pm 0,19	4,60 (3,42 – 5,92)	14,71 (11,22 – 20,79)	3,90	13,1 (6,9 – 24,8) *
Guaraciaba do Norte-CE	264	5	1,49 \pm 0,17	7,25 (5,44 – 9,51)	26,71 (19,39 – 41,18)	1,45	20,7 (10,9 – 39,2) *
Paulínia - SP	244	4	1,82 \pm 0,22	7,44 (5,68 – 9,43)	21,63 (16,59 – 30,86)	2,76	21,2 (11,3 – 39,8) *

1044 ^a Número total de larvas utilizadas.

1045 ^b Grau de liberdade.

1046 ^c Erro padrão.

1047 ^d Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

1048 ^e Qui-quadrado.

1049 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
1050 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para metaflumizone, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1051

1052 Tabela 3. Toxicidade relativa de clorfenapir para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
1053

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Pelotas - RS	283	5	3,00 \pm 0,51	0,62 (0,45 – 0,76)	1,17 (0,96 – 1,54)	1,64	---
Iraquara-BA	280	5	4,33 \pm 0,61	0,88 (0,74 – 1,01)	1,38 (1,19 – 1,71)	0,39	1,4 (1,1 – 1,9) *
Sumaré-SP	285	5	3,91 \pm 0,563	0,91 (0,76 – 1,08)	1,50 (1,27 – 1,89)	1,18	1,5 (1,1 – 2,0) *
Tianguá - CE	277	5	3,09 \pm 0,60	1,59 (1,07 – 2,00)	2,98 (2,42 – 3,87)	0,95	2,6 (1,8 – 3,8) *
Venda Nova - ES	259	5	1,90 \pm 0,21	1,65 (1,12 – 2,29)	4,56 (3,20 – 7,68)	5,76	2,7 (1,9 – 3,8) *
Anápolis - GO	280	5	2,68 \pm 0,29	1,80 (1,49 – 2,16)	3,71 (3,02 – 4,83)	1,24	2,9 (2,2 – 4,0) *
Guaraciaba do Norte- CE	259	5	1,35 \pm 0,16	2,59 (1,87 – 3,50)	10,91 (7,57 – 18,18)	3,04	4,2 (2,8 – 6,3) *
Paulínia - SP	457	6	1,68 \pm 0,15	2,83 (2,22 – 3,54)	8,94 (6,95 – 12,21)	3,19	4,6 (3,3 – 6,5) *

1054 ^a Número total de larvas utilizadas.

1055 ^b Grau de liberdade.

1056 ^c Erro padrão.

1057 ^d Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

1058 ^e Qui-quadrado.

1059 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
1060 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para clorfenapir, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.
1061

1062 Tabela 4. Toxicidade relativa de cartape para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
1063

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Pelotas-SP	277	5	2,51 \pm 0,39	93,11 (64,83 – 121,12)	201,03 (155,92 – 274,43)	0,71	---
Paulínia-SP	284	5	2,43 \pm 0,27	142,4 (114,85 – 173,05)	316,00 (255,31 – 416,29)	3,21	1,5 (1,1 – 2,2) *
Iraquara-BA	265	5	2,25 \pm 0,25	173,65 (137,25 – 214,16)	410,25 (327,54 – 545,79)	0,95	1,9 (1,3 – 2,7) *
Venda Nova - ES	274	5	2,85 \pm 0,52	227,26 (155,62 – 288,15)	447,91 (358,66 – 595,90)	4,62	2,5 (1,6 – 3,7) *
Sumaré-SP	285	5	1,95 \pm 0,19	314,71 (251,65 – 389,82)	848,72 (664,21 – 1160,32)	2,65	3,4 (2,3 – 4,9) *
Tianguá-CE	240	4	1,82 \pm 0,21	359,48 (284,24 – 461,93)	1039,79 (763,40 – 1607,60)	0,71	3,8 (2,6 – 5,6) *
Guaraciaba do Norte-CE	322	5	2,25 \pm 0,36	581,96 (421,29 – 736,91)	1379,33 (1082,60 – 1952,75)	3,66	6,3 (4,2 – 9,4) *
Anápolis - GO	279	5	2,28 \pm 0,22	589,75 (421,88 – 846,56)	1377,71 (944,43 – 2503,51)	8,03	6,4 (4,4 – 9,1) *

1064 ^a Número total de larvas utilizadas.

1065 ^b Grau de liberdade.

1066 ^c Erro padrão.

1067 ^d Miligramas de ingrediente ativo por Litro de água.

1068 ^e Qui-quadrado.

1069 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
1070 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para cartape, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1071

1072 Tabela 5. Toxicidade relativa de abamectina para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
 1073

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Iraquara-BA	282	5	1,56 \pm 0,24	0,54 (0,30 – 0,78)	1,87 (1,38 – 2,64)	2,07	---
Anápolis - GO	280	5	2,66 \pm 0,41	0,81 (0,57 – 1,04)	1,68 (1,32 – 2,25)	1,24	1,5 (0,9 – 2,5)
Venda Nova - ES	278	5	1,92 \pm 0,22	1,07 (0,81 – 1,34)	2,91 (2,28 – 3,99)	1,02	2,0 (1,2 – 3,3) *
Guaraciaba do Norte-CE	308	6	1,67 \pm 0,17	1,22 (0,93 – 1,57)	3,90 (2,98 – 5,46)	1,39	2,3 (1,3 – 3,8) *
Sumaré-SP	264	5	1,92 \pm 0,23	1,27 (0,77 – 1,84)	3,50 (2,40 – 6,10)	6,96	2,4 (1,4 – 4,0) *
Pelotas-RS	267	5	1,96 \pm 0,23	1,64 (1,21 – 2,11)	4,41 (3,40 – 6,08)	0,74	3,0 (1,8 – 5,1) *
Paulínia-SP	271	5	2,30 \pm 0,31	2,29 (1,64 – 2,97)	5,31 (4,10 – 7,29)	0,75	4,2 (2,5 – 7,2) *
Tianguá-CE	244	5	2,04 \pm 0,21	3,38 (1,81 – 5,10)	8,72 (5,78 – 16,06)	6,29	6,2 (3,6 – 10,8) *

1074 ^a Número total de larvas utilizadas.

1075 ^b Grau de liberdade.

1076 ^c Erro padrão.

1077 ^d Miligramas de ingrediente ativo por Litro de água.

1078 ^e Qui-quadrado.

1079 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
 1080 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para abamectina, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1081

1082 Tabela 6. Média (\pm erro padrão, n=30) de atividade metabólica das enzimas em populações de *Tuta absoluta*.
 1083

População	Esterase		Glutathione-S-Transferase	Monooxigenases	
	α -naftil acetato ^a	β -naftil acetato ^a	CDNB ^a	N-desalquilação ^b	O-desalquilação ^b
Pelotas – RS	1,06 \pm 0,08 e	1,11 \pm 0,08 bc	77,67 \pm 1,97 a	4,98 \pm 0,39 ab	13,25 \pm 1,27 ab
Anápolis - GO	1,67 \pm 0,07 bcd	1,22 \pm 0,04 ab	76,56 \pm 1,10 a	5,86 \pm 0,17 a	16,81 \pm 0,83 a
Sumaré – SP	1,50 \pm 0,05 cd	1,39 \pm 0,07 a	68,61 \pm 2,24 b	2,28 \pm 0,23 d	12,12 \pm 1,14 b
Paulínia – SP	1,64 \pm 0,04 cd	1,08 \pm 0,05 bc	54,97 \pm 0,20 c	1,03 \pm 0,13 e	4,90 \pm 0,83 c
Guaraciaba do Norte – CE	1,47 \pm 0,07 d	0,98 \pm 0,02 c	71,29 \pm 1,81 ab	4,43 \pm 0,30 bc	4,26 \pm 0,43 c
Venda nova – ES	1,83 \pm 0,14 bc	1,28 \pm 0,04 ab	71,25 \pm 2,09 ab	4,48 \pm 0,30 b	17,33 \pm 1,24 a
Tianguá – CE	2,01 \pm 0,06 ab	1,19 \pm 0,04 abc	24,83 \pm 1,31 d	3,29 \pm 0,12 dc	12,25 \pm 1,10 b
Iraquara – BA	2,22 \pm 0,10 a	1,13 \pm 0,04 bc	65,00 \pm 1,54 b	3,15 \pm 0,29 d	17,15 \pm 0,93 a

1084 *As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a $P < 0,05$.

1085 ^a μ mol/min/mg de proteína.

1086 ^b η mol/min/mg de proteína.

1087

1088 Tabela 7. Correlação de Pearson entre as CL₅₀s das populações de *Tuta absoluta* para os inseticidas e atividade enzimática.

Fator	Abamectina	Cartape	Clorfenapir	Indoxacarbe	Metaflumizone	
Inseticidas	Abamectina					
	Cartape	r = -0,141 ^{ns}				
	Clorfenapir	r = 0,243*	r = 0,396**			
	Indoxacarbe	r = -0,223 ^{ns}	r = -0,239*	r = -0,308**		
	Metaflumizone	r = 0,315**	r = 0,203 ^{ns}	r = 0,911***	r = -0,003 ^{ns}	
Enzimas	α-Esterase	r = 0,007 ^{ns}	r = 0,018 ^{ns}	r = 0,035 ^{ns}	r = -0,621***	r = -0,186 ^{ns}
	β-Esterase	r = -0,069 ^{ns}	r = -0,043 ^{ns}	r = -0,320**	r = 0,093 ^{ns}	r = -0,388**
	GSTransferase	r = 0,820***	r = 0,057 ^{ns}	r = -0,182 ^{ns}	r = 0,607***	r = -0,098 ^{ns}
	N-desalquilase	r = -0,345**	r = 0,409**	r = -0,202 ^{ns}	r = 0,459***	r = -0,120 ^{ns}
	O- desalquilase	r = -0,347**	r = -0,120 ^{ns}	r = -0,597***	r = 0,189 ^{ns}	r = -0,647***

1089 ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade.

1090 **P* < 0,05.

1091 ***P* < 0,01.

1092 ****P* < 0,001.

1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A ORGANOFOSFORADOS: MAGNITUDE E MECANISMOS¹

TADEU BARBOSA MARTINS SILVA², WELLINGTONS M. DA SILVA², MATEUS R. DE CAMPOS²,
JEFFERSON E. DA SILVA², ANDRESA B. DE OLIVEIRA² E HERBERT ÁLVARO ABREU DE SIQUEIRA²

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

¹Silva, T.B.M., W.M. Silva, M.R. Campos, J.E. Silva, A.B. Oliveira & H.Á.A. Siqueira.
Resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a organofosforados:
magnitude e mecanismos. A ser submetido para Annals of Applied Biology.

1119 RESUMO – A traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), tornou-se uma grande ameaça à
1120 produção mundial de tomate após a invasão dos continentes Europeu, Africano e Asiático. Na
1121 América do Sul já apresentava problemas com resistência a varios inseticidas, incluindo os
1122 organofosforados. Neste estudo, objetivou-se determinar o atual *status* da resistência ao
1123 clorpirifós e ao metamidofós, organofosforados muito utilizados na tomaticultura, bem como
1124 identificar possíveis mecanismos de resistência. Ensaios para a quantificação de atividade
1125 enzimática foram conduzidos, para avaliar o metabolismo destoxificativo, e a insensibilidade do
1126 sítio alvo ligados a estes compostos. As populações de *T. absoluta* em geral foram suscetíveis à
1127 dose recomendada de metamidofós e menos suscetíveis à dose de clorpirifós. Os graus de
1128 resistência variaram em até 3,1 vezes para clorpirifós, e até 11,7 vezes para metamidofós. As
1129 atividades enzimáticas foram significativamente diferentes entres as populações, sendo as
1130 esterases e monooxigenases mais importantes para a resistência a clorpirifós e glutationala-S-
1131 transferases para metamidofós. Não foi observada correlação entre os dois inseticidas, sugerindo
1132 que pelo menos dois mecanismos estejam atuando isoladamente para a resistência.
1133 Aparentemente, o outro mecanismo envolve a alteração de sítio alvo (AchE) que pode estar
1134 atuando na sobrevivência ao metamidofós. Diferença de aproximadamente 5,0 vezes foi
1135 observada entre os dois extremos de suscetibilidade para metamidofós. Estes extremos
1136 apresentaram suscetibilidades invertidas para clorpirifós, sugerindo menor envolvimento de
1137 alteração do sítio alvo na resistência a este inseticida. Desta forma, a existência de resistência
1138 múltipla em populações de *T. absoluta* não está descartada.

1139

1140 PALAVRAS-CHAVE: Metabolismo, insensibilidade de sítio alvo, resistência cruzada, traça do
1141 tomateiro.

1142 RESISTANCE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO
1143 ORGANOPHOSPHATES: MAGNITUDE AND MECHANISMS

1144
1145 ABSTRACT – The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), has become a major threat to
1146 global tomato production after invasion of Europe , Africa and Asia . In South America, it already
1147 had problems with resistance to several insecticides, including organophosphates. In this study,
1148 we aimed to determine the current status of resistance to chlorpyrifos and methamidophos,
1149 organophosphorus hitherto widely used in tomato production, and to identify possible
1150 mechanisms of resistance to them. Bioassays of susceptibility and enzymatic activity were
1151 conducted not only to determine the detoxificative metabolism but also to evaluate the
1152 insensitivity of the target site. The populations of *T. absoluta* in general were susceptible to
1153 recomended dose of methamidophos and less susceptible to dose of chlorpyrifos. The degree of
1154 resistance varied up to 3.1-fold for chlorpyrifos, while they varied up to 11.7 times for
1155 methamidophos. The enzymatic activities were significantly different between populations, where
1156 esterases and monooxygenases most important for resistance to chlorpyrifos and glutathione - S -
1157 transferases for methamidophos. No correlation between the two insecticides was observed,
1158 suggesting that at least two mechanisms are involved in isolation for resistance. Apparently, the
1159 other mechanism involves the alteration of target site (AChE) that may be acting on survival to
1160 methamidophos. Difference of about 5.0 times was observed between the two extremes of
1161 susceptibility to methamidophos. These extremes presented inverted to chlorpyrifos, suggesting
1162 less involvement of alteration of the target site resistance to this insecticide susceptibilities. Thus,
1163 the existence of multiple resistances in populations of *T. absoluta* is not discarded.

1164
1165 KEY WORDS: Metabolism, target site insensitivity, cross-resistance, tomato leafminer.

Introdução

1166
1167 A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), constitui um
1168 sério problema à produção de tomate e tem sido uma das principais causas de perdas de produção
1169 desta cultura na América do Sul desde 1960 e cresceu em importância com a sua dispersão mais
1170 tarde na região, culminando com a sua detecção no Brasil em 1979 (Miranda *et al.* 1998).
1171 Recentemente, foi encontrada na Europa, na África e no Oriente Médio, voltando a provocar forte
1172 preocupação nos países de introdução e entre alguns dos principais órgãos de proteção de plantas,
1173 como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização
1174 Europeia de Proteção de Plantas (EPPO) (Desneux *et al.* 2010, Zlof & Suffert 2012). Uma grande
1175 preocupação após a introdução ou invasão de uma espécie praga em novo ambiente é o seu
1176 controle imediato, para reduzir sua capacidade de causar danos econômicos. Nestes casos, a opção
1177 mais usual é a utilização do controle químico. No entanto, sem informações sobre genótipos
1178 introduzidos que confirmam resistências a inseticidas, bem como as características dos fenótipos
1179 produzidos, o uso de inseticidas pode agravar o processo de estabelecimento da praga invasora
1180 (Guedes & Picanço 2012).

1181 Vários genes associados à resistência têm sido identificados como contribuidores para os
1182 principais mecanismos de resistência a inseticidas, tais como: aumento de detoxificação de
1183 inseticidas e insensibilidade do sítio alvo (French-Constant *et al.* 2004, Hemingway *et al.* 2004).
1184 O aumento de detoxificação de inseticidas pode ser mediado por atividades acrescidas de enzimas
1185 metabólicas, tais como monooxigenases dependentes do citocromo P₄₅₀, esterases e glutathione-S-
1186 transferases (Li *et al.* 2007). Estudos prévios têm relatado que estas enzimas podem atuar em
1187 conjunto no sentido de promover a resistência de alguns insetos a inseticidas, dentre eles,
1188 organofosforados (OFs) (Ahmad & Hollingworth 2004, Ahmad & McCaffery 1991, Shang *et al.*
1189 2012). Além do mecanismo metabólico, a alteração do sítio alvo por redução da sensibilidade da

1190 acetilcolinesterase (AChE) também é um importante mecanismo no desenvolvimento de
1191 resistência aos inseticidas organofosforados (Shang *et al.* 2012).

1192 O controle de *T. absoluta* tem sido essencialmente dependente da aplicação de inseticidas
1193 de largo espectro, como os organofosforados, particularmente na América do Sul, onde mais de
1194 30 aplicações eram comuns para o seu controle (Guedes & Picanço 2012). O uso de
1195 organofosforados para o controle de *T. absoluta* tem ocorrido desde a introdução da praga no
1196 Brasil no início dos anos de 1980. Vários organofosforados foram utilizados em sucessão desde
1197 então, mas metamidofós talvez tenha sido o mais utilizado até recentemente quando foi banido no
1198 país (ANVISA 2012). No entanto, o clorpirifós, outro organofosforado, ainda usado para controle
1199 de outras pragas de tomateiro, invariavelmente expõe também a *T. absoluta*, exercendo pressão de
1200 seleção sobre as populações, que evoluem para resistência. Tais produtos têm sido utilizados em
1201 geral quando outros falham no controle de pragas ou pelo custo mais baixo que eles apresentam, e
1202 com isso as queixas de falhas de controle por esta classe de inseticidas tem sido esporádicas.
1203 Apesar disso, o uso indiscriminado destes inseticidas concorre para a evolução de resistência de
1204 pragas, e a traça-do-tomateiro ilustra este problema como em trabalhos relatados por Salazar &
1205 Araya (1997, 2001), Siqueira *et al.* (2000) e Lietti *et al.* (2005).

1206 Embora os organofosforados tenham sido utilizados por mais de 30 anos e a resistência de
1207 *T. absoluta* tenha sido observada, as bases fisiológicas envolvidas nesta resistência ainda são
1208 desconhecidas. A investigação destas bases é importante para determinar o conjunto de fatores e
1209 possivelmente genes que as populações de uma região ou país estejam carregando bem como para
1210 o refinamento de programas efetivo de manejo desta praga. Assim, o objetivo deste trabalho foi
1211 determinar o status da resistência de populações de *T. absoluta* a organofosforados e o
1212 envolvimento do metabolismo detoxificativo e insensibilidade de AchE na resistência.

1213

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interações Insetos - Tóxicos (LIIT) da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2013.

Obtenção, Manutenção e Criação dos Insetos. As populações de *T. absoluta* utilizadas nos bioensaios foram coletadas de diversas regiões produtoras de tomate do Brasil e enviadas para o LIIT, sendo mantidas em gaiolas de organza e madeira de 40 x 40 x 40 cm, 25 ± 1°C, umidade relativa (U.R.) de 70 ± 5% e fotofase de 12 h. As criações foram compostas por três gaiolas, uma foi utilizada para oviposição dos adultos, outra para alimentação de lagartas com folhas de tomateiro da cultivar “Santa Clara” cultivada em casa de vegetação sem tratamento com inseticidas e a última para emergência dos adultos. Folhas de tomate imersas em água através dos pecíolos foram utilizadas como substrato para oviposição, e transferidas diariamente para novas gaiolas, onde permaneceram até eclosão das lagartas. As pupas foram transferidas para novas gaiolas, permanecendo até a emergência dos adultos. Para a alimentação dos adultos, foram utilizados chumaços de algodão embebidos em solução açucarada à base de mel, diluído em água destilada (~10%).

Ensaio de Suscetibilidade de *T. absoluta* aos Inseticidas. Na realização dos bioensaios para estimar as curvas de concentração-mortalidade foram utilizados os inseticidas formulados metamidofós (Tamaron[®]BR; Bayer CropScience Ltda, Belford Roxo, RJ, Brasil) e clorpirifós (Lorsban[®]480BR; Dow AgroScience Industrial Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), obtidos em mercado local para avaliação das diferentes populações de *T. absoluta*.

Para realização dos bioensaios foram utilizados folíolos de tomate do cultivar “Santa Clara”. Todos os bioensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia de imersão de folhas onde as concentrações (em mg de i.a/L de água) definidas foram preparadas, a partir da diluição

1238 do produto comercial em água destilada mais espalhante adesivo Triton-X-100. Bioensaios
1239 preliminares foram inicialmente feitos de forma a obter mortalidades do inseto entre 0 e 100%, e
1240 em seguida determinar as concentrações (sete a oito) para estimativa das curvas de concentração-
1241 resposta. Folíolos de tomate foram higienizados em solução à base de hipoclorito de sódio a 5%.
1242 Após a higienização dos folíolos em água corrente, eles foram imersos horizontalmente por um
1243 minuto em cada concentração contida em Becker. Água destilada acrescida de Triton-X-100
1244 (espalhante adesivo) foi utilizada como controle. Os folíolos foram mantidos sobre papel toalha à
1245 temperatura ambiente até secagem completa e, em seguida, transferidos para placas de Petri (80 x
1246 15 mm), contendo papéis-filtro umedecidos previamente com água destilada. Cada placa de Petri
1247 contendo um folíolo tratado recebeu 10 lagartas de *T. absoluta* de 2º instar e repetida mais duas
1248 vezes. O bioensaio foi repetido mais uma vez em momento posterior. Após a transferência das
1249 lagartas, as placas de Petri foram devidamente fechadas e mantidas em câmara climatizada
1250 (BOD), regulada para temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h. A avaliação
1251 da mortalidade e do número total de insetos foi realizada 48 horas após a imposição dos
1252 tratamentos. O critério de mortalidade foi baseado na locomoção, onde as lagartas que foram
1253 incapazes de caminhar pelo menos uma distância equivalente ao comprimento do corpo foram
1254 consideradas mortas.

1255 **Dose de Rótulo.** Para a realização dos bioensaios, os folíolos de tomate do cultivar “Santa Clara”
1256 foram higienizados, tratados e avaliados, conforme descrito anteriormente. Cada Becker conteve a
1257 dose recomendada do inseticida clorpirifós (720 mg de i.a/L de água) e metamidofós (600 mg de
1258 i.a/L de água). Água destilada acrescida de Triton-X-100 (espalhante adesivo) foi utilizada como
1259 tratamento controle. Cada placa de Petri contendo um folíolo tratado recebeu 10 lagartas de *T.*
1260 *absoluta* de 2º instar e cinco replicatas. O bioensaio foi repetido mais uma vez no tempo.

1261 **Extração de Enzimas.** Para avaliar a atividade de esterase, 10 lagartas de *T. absoluta* de terceiro
1262 instar foram coletadas e transferidas para tubos de microcentrífuga em triplicata. Este
1263 procedimento de coleta e transferência de lagartas para o tubo de microcentrífuga foi feito para
1264 cada população. Na extração de enzimas foram utilizados 200 μ L de tampão fosfato de sódio
1265 (0,02 M, pH 7,2) em gelo. Para glutathiona-S-transferase, o processamento das amostras foi
1266 semelhante ao descrito para esterase, diferindo apenas no tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH
1267 7,5), utilizando o homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogenatos foram centrifugados
1268 (Eppendorf 5810R) a 15000 g e 4°C durante 15 minutos, em seguida foram recolhidos e
1269 armazenados a -80°C. Para os ensaios da monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀, as
1270 amostras foram homogeneizadas em 500 μ L de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) e o
1271 sobrenadante ultracentrifugado (Beckman Coulter Optima L-80K) a 100000 g para a obtenção dos
1272 microsossomos, os quais foram ressuspensos em fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) + glicerol a 2%
1273 (Wright *et al.* 2000). A quantificação de proteína foi determinada pelo método do ácido
1274 bicinonínico usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Smith *et al.* 1985).

1275 **Ensaio de Esterase.** A atividade de esterase foi medida pelo método de van Asperen (1962)
1276 adaptado. A solução estoque (250 mM) dos substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato foi
1277 preparada em acetona. Para reação, utilizou-se 2 μ L do substrato α -naftil acetato, 10 μ L de
1278 amostra, que havia sido diluído para 1:100 e 188 μ L de tampão fosfato de sódio por poço na
1279 micro placa. O procedimento foi repetido para análise de esterase usando o substrato β -naftil
1280 acetato. Entretanto, as amostras foram diluídas para 1:10 e incubadas em 30°C por 15 minutos. A
1281 reação foi parada usando 33,2 μ L de FAST Blue B a 0,3% e a absorbância lida em 595 nm na
1282 leitora de micro placa (Elx800, BioTek[®], Winooski, VT, USA). Cada amostra foi analisada em
1283 triplicata e as medidas estavam compreendidas no total de nove repetições. A curva padrão foi

1284 preparada com α -naphthol e β -naphthol. A atividade de esterase foi expressa como $\mu\text{mol naftol} \times$
1285 $\text{min}^{-1} \times \text{mg de prote\u00edna}^{-1}$.

1286 **Ensaio de Glutathione-S-Transferase.** O substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) foi
1287 utilizado para determinar a atividade de conjugação de glutathione reduzida a este substrato sob a
1288 influência da enzima glutathione-S-transferase, formando 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (Habig *et*
1289 *al.* 1974). Uma solução de CDNB (150 mM) foi preparada em álcool etílico e a glutathione
1290 reduzida (10 mM) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5). Para a reação, 138
1291 μL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), 10 μl de amostra contendo 1 mg de prote\u00edna, 150
1292 μL de glutathione reduzida (10 mM) foram utilizados. A pr\u00e9-mistura foi incubada em banho-maria
1293 a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, 2 μL de CDNB (150 mM) foram adicionados \u00e0 reação.
1294 Imediatamente, a forma\u00e7\u00e3o de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione foi medida utilizando um
1295 biofot\u00f4metro a 340 nm. A rea\u00e7\u00e3o foi analisada por cinco minutos com intervalos de leitura de 30
1296 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata, e as medidas compostas de um total de nove
1297 repeti\u00e7\u00f5es. Os dados de absorb\u00e2ncias foram analisadas em fun\u00e7\u00e3o do tempo de rea\u00e7\u00e3o ap\u00f3s a
1298 adi\u00e7\u00e3o do CDNB. A inclina\u00e7\u00e3o da reta (absorb\u00e2ncia/min) foi transformada em unidade de
1299 concentra\u00e7\u00e3o nmol de GS-DNB/min/mg de prote\u00edna, utilizando o coeficiente de extin\u00e7\u00e3o de
1300 CDNB ($9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

1301 **Ensaio de Monooxigenase Dependente do Citocromo P₄₅₀ (N-desalquila\u00e7\u00e3o).** O substrato 4-
1302 cloro-N-metilanilina foi utilizado para determinar a atividade de N-desalquila\u00e7\u00e3o atrav\u00e9s da
1303 monooxigenase dependente de citocromo P₄₅₀. Utilizou-se 50 μL de tamp\u00e3o fosfato de s\u00f3dio com
1304 Tween 20 a 2% (0,1M, pH 7,5), 25 μL da amostra, 25 μL 4-cloro-N-metilanilina (4- CNMA) a 7,5
1305 mM dilu\u00eddo em etanol a 20% v/v, 25 μL de NADPH reduzido (9,6 mM). A rea\u00e7\u00e3o foi processada
1306 por 16 min \u00e0 temperatura de 37 °C e parada atrav\u00e9s da adi\u00e7\u00e3o de 187,5 μL de p-
1307 dimetilaminobenzalde\u00eddo a 233,33 mM, dilu\u00eddo em 3.0 N de \u00e1cido sulf\u00fabrico). Os microtubos

1308 contendo a reação de parada foram centrifugados por 15 min a 10000 g a 4 °C. A atividade por
1309 amostra foi obtida da equação linear estimada para a absorbância em função da curva padrão de 4-
1310 cloroanilina que foi relatada em $\eta\text{Mol 4-cloroanilina} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

1311 **Ensaio de monooxigenase dependente do Citocromo P₄₅₀ (O-desalquilação).** A atividade de
1312 O-desalquilação através da monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ foi determinada através
1313 do método que utiliza o substrato *p*-nitroanisole (O₂N-C₆H₄-O-CH₃), produzindo *p*-nitrofenol.
1314 Dessa forma, na presença de *p*-nitroanisole a atividade da enzima monooxigenase dependente do
1315 citocromo P₄₅₀ pôde ser medida (Rose & Brindley 1985). A reação de atividade da
1316 monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ foi determinada misturando 178,8 µL do tampão
1317 fosfato de sódio de ressuspensão (0,1 M, pH 7,5); 56,2 mL de amostra; 2,5 µL *p*-nitroanisole (150
1318 mM em etanol) e 12,5 µl de NADPH reduzido (9,6 mM) em cada poço, nesta ordem. A mistura
1319 foi incubada durante 15 minutos a 37 °C. Em seguida, 10 µL de HCl (1 M) foi adicionado a
1320 mistura para interromper a reação. A mistura foi centrifugada a 14000 g durante 10 minutos, e
1321 200 µL de sobrenadante foram transferidos para os poços da placa de microtitulação para ser lido
1322 a 405 nm no leitor de micro placas. As amostras foram analisadas em triplicata, e as medidas no
1323 total foram compostas de nove repetições. Atividade da monooxigenase dependente do citocromo
1324 P₄₅₀ por amostra foi determinada com base na curva padrão de *p*-nitrofenol em nMol *p*-nitrofenol
1325 $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

1326 **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Nativo.** Proteínas de oito populações foram separadas
1327 em gel nativo descontínuo de poliacrilamida a 8% em sistema formado por tampão Tris-glicina
1328 (50 mM). Em 10 µL da amostra de cada população (com 10 µg de proteínas totais) foram
1329 adicionados 10 µL de azul de bromofenol (20% m/v de sacarose, 0,1% azul de bromofenol em
1330 tampão Tris-glicina com 50 mM, pH 8,3). O gel foi carregado com as amostras diluídas na
1331 solução de azul de bromofenol e a eletroforese foi realizada a 100V por aproximadamente 1,5h a

1332 4°C. Para visualizar as bandas de esterase, o gel foi incubado em tampão fosfato de sódio (0,02 M,
1333 pH 7.0) com 2% v/v de 50 mM de β - naftil acetato por 15 min. Para visualizar a bandas de
1334 esterase do gel, foi adicionado 40 mg de Fast Blue, posteriormente o gel foi colocado no agitador
1335 orbital (TS-2000A VDRL SHAKER) até as bandas aparecerem. Para descorar o gel foi
1336 adicionado no recipiente 50 ml de ácido acético a 5%. Foram preparados quatros geis, onde um
1337 deles não foi incubado com inibidor, sendo que os outros geis foram pré- incubados com 1 mM
1338 dos inibidores trifetil fosfato (TPP - 93%, Sigma, Milwaukee, WI, EUA), butóxido de piperonila
1339 (PBO - 90%, Sigma, Milwaukee, WI, EUA) e Eserina (Sigma, Milwaukee, WI, EUA) (Hodgson
1340 1999).

1341 **Atividade de acetilcolinesterase (AChE).** A determinação da atividade de AChE foi baseada no
1342 método de Ellman *et al.* (1961), através da hidrólise do análogo iodeto de acetiltiocolina (ATChI).
1343 Para o ensaio de AChE foram utilizados os homogeneizados de 20 larvas de terceiro instar de *T.*
1344 *absoluta*. As larvas de cada população foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,5),
1345 contendo triton X-100 (0,1%). Os homogenatos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 min a
1346 4°C, e o sobrenadante foi usado para medir a atividade da AChE. Em cada teste a reação da
1347 mistura consistiu de 160 μ l de tampão fosfato (0,1M, pH 7,5), 10 μ l de DTNB (5,5-ditio-bis 2-
1348 ácido nitrobenzoico, 0.48 mM final) e 25 μ l de iodeto de acetiltiocolina (1,2 mM final). A reação
1349 foi incubada por 60 minutos em banho-maria à temperatura de 25 C°. A atividade de AChE foi
1350 determinada na leitora de placa (Elx800, BioTek®) a 405 nm. O coeficiente de extinção 1,36 x
1351 10⁴ cm reportado por Ellman *et al.* (1961), foi usado para calcular atividade em μ M/min/ μ g de
1352 proteína.

1353 **Ensaio de inibição de AChE.** Para determinar a concentração que inibe 100% da atividade de
1354 AChE foram utilizados os homogeneizados da população mais resistente e mais suscetível a OFs.
1355 Para este ensaio de inibição, uma reação de 100 μ l, contendo 10 μ l da enzima, 89 μ l de tampão

1356 fosfato (0,1M; pH 7,5) e 1 µl de várias concentrações do inseticida paraoxon (1,95 µM a 500 µM)
1357 foi pré-incubada por 20 minutos em banho-maria (25°C). Posteriormente foram adicionados 70 µl
1358 de tampão fosfato e 10 µl de DTNB (ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico, 0.48 mM final) e 25 µl
1359 iodeto de acetiltiocolina (1,2 mM final). A reação foi incubada por 60 minutos em banho-maria a
1360 uma temperatura de 25 C°. O ensaio de inibição da AChE foi determinado na leitora de placa
1361 (Elx800, BioTek®) a 405 nm. A atividade residual foi calculada comparando a atividade de
1362 AChE na ausência do inseticida usando a seguinte fórmula $(A_{405} \text{ controle} - A_{405} \text{ inibidor}) / (A_{405}$
1363 $\text{controle} \times 100)$.

1364 **Análises Estatísticas.** Os bioensaios que apresentaram mortalidades no tratamento controle
1365 superiores a 10% foram descartados e aqueles em que se conseguiu ajuste do modelo de probit
1366 foram repetidos pelo menos mais uma vez. Os dados obtidos dos bioensaios de concentração-
1367 mortalidade após correção pelo tratamento controle (Abbott 1925) foram submetidos à análise de
1368 probit com $P > 0,05$ (Finney 1971), através do programa estatístico PoloPlus (LeOra Software
1369 2005). As respostas das populações de *T. absoluta* testadas nos bioensaios de concentração-
1370 mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimativas das CL₅₀s e
1371 CL₈₀s para os dois inseticidas testados. As razões de resistência foram calculadas pelo teste de
1372 razão letal e consideradas significativas quando o intervalo de confiança (IC) a 95% não incluiu o
1373 valor um, conforme proposto por Robertson & Preisler (1992). Para cada inseticida, a população
1374 que apresentou a menor CL₅₀ foi utilizada como padrão de suscetibilidade em relação às demais.
1375 Quando os limites inferiores dos intervalos de confiança da CL₈₀ de cada população de *T.*
1376 *absoluta* foi maior que a concentração recomendada pelos fabricantes dos inseticidas, estes foram
1377 considerados ineficientes no controle desta praga. A presente metodologia foi estabelecida devido
1378 ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomendar que um dado
1379 produto é eficiente quando a mortalidade ocasionada pela praga é igual ou superior a 80%. As

1380 médias de atividade de esterase, monooxigenase dependente do citocromo P₄₅₀ e glutiona-S-
1381 transferase foram analisadas e testadas usando o programa SAS (SAS Institute 2001). As
1382 premissas da análise de variância (ANOVA) foram testadas usando PROC UNIVARIATE. As
1383 médias foram submetidas à análise de variância (PROC ANOVA) e teste de Tukey (HSD) $P <$
1384 0,05 para verificar diferenças entre as populações. Os dados das atividades enzimáticas das oito
1385 populações de *T. absoluta* e os valores das CL₅₀s das populações para cada inseticida foram
1386 utilizados para análises de correlação de Pearson (r), com $P < 0,05$ (PROC CORR) (SAS Institute
1387 2001). As concentrações de paraoxon necessárias para inibir 50% da atividade da AChE (I₅₀) para
1388 cada população foi calculada usando o procedimento PROC PROBIT do SAS.

1389

1390

Resultados

1391 A dose recomendada pelo fabricante do inseticida clorpirifós apresentou falha de controle para
1392 as populações de *T. absoluta* de Venda Nova, Tianguá e Iraquara, por apresentarem mortalidade
1393 significativamente menor que 80% devido a concentração recomendada não pertencer ao
1394 intervalo de confiança da CL₈₀ do inseticida para cada população (Tabela 1, Fig. 1). Da mesma
1395 forma, a dose recomendada de metamidofós não teve efeito satisfatório de controle para as
1396 populações de Iraquara e Pelotas (Tabela 2, Fig. 1).

1397 Os dados de concentração-mortalidade obtidos no presente estudo assumiram o modelo de
1398 Probit ($P > 0,05$). A população de Guaraciaba do Norte apresentou a menor CL₅₀ para clorpirifós
1399 enquanto que a população de Tianguá foi a que apresentou a menor CL₅₀ para o inseticida
1400 metamidofós (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Desta forma, estas populações foram tomadas
1401 como referências de suscetibilidade aos respectivos inseticidas. A concentração estimada de
1402 clorpirifós que ocasionou 50% de mortalidade (CL₅₀) de cada população de *T. absoluta* variou de
1403 164,5 (Guaraciaba do Norte, CE) a 509,1 (Iraquara, BA) mg i.a./L. Desta forma, os valores de

1404 razão de resistência variaram de 1,1 (Pelotas, RS) a 3,1 vezes (Iraquara, BA). Os valores de CL₈₀
1405 variaram de 376,1 (Paulínia, SP) a 1180,7 mg i.a./L (Iraquara, BA) e a dose recomendada de
1406 clorpirifós (720 mg i.a./L) foi menor que a CL₈₀ da população de Iraquara (Tabela 1). Com
1407 exceção das populações de Pelotas e Paulínia, as demais populações apresentaram razão de
1408 resistência significativa para clorpirifós, por não compreender o valor 1,0 nos intervalos de
1409 confiança das razões (Tabela 1). Os coeficientes angulares das curvas variaram de 2,03 (Pelotas,
1410 RS) a 3,66 (Paulínia, SP) para o inseticida clorpirifós (Tabela 1).

1411 A concentração estimada de metamidofós que ocasionou 50% de mortalidade (CL₅₀) de cada
1412 população de *T. absoluta* variou de 64,1 (Tianguá, CE) a 747,4 (Pelotas, RS) mg i.a./L. Desta
1413 forma, os valores de razão de resistência variaram de 1,4- (Paulínia, SP) a 11,7-vezes (Pelotas,
1414 RS). Os valores de CL₈₀ variaram de 108,0 (Tianguá, CE) a 1239,3 (Pelotas, RS) mg i.a./L e a
1415 dose recomendada de metamidofós (600 mg i.a./L) foi menor que as CL₈₀s estimadas para as
1416 populações de Iraquara e Pelotas (Tabela 2). Todas as populações de *T. absoluta* apresentaram
1417 razão de resistência significativa para metamidofós, por não compreender o valor 1,0 nos
1418 intervalos de confiança das razões (Tabela 2). Os coeficientes angulares das curvas variaram de
1419 2,65 (Venda Nova, ES) a 3,82 (Pelotas, RS) para o inseticida metamidofós (Tabela 2).

1420 As atividades de esterase diferiram entre as populações de *T. absoluta* com o substrato α -
1421 naftil acetato e β -naftil acetato (Tabela 3). As atividades de α -esterase variaram de $1,06 \pm 0,08$
1422 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Pelotas, RS) a $2,22 \pm 0,10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Iraquara, BA).
1423 Uma variação de apenas 2,09 vezes na atividade α -esterase foi observada entre as populações. A
1424 atividade de β -esterase variou de $0,98 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Guaraciaba do Norte, CE)
1425 a $1,39 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Sumaré, SP). Para o substrato β - naftil acetato houve uma
1426 variação de apenas 1,41 vezes. Diferenças significativas também foram observadas na atividade de

1427 conjugação de glutathiona-S-transferase entre as populações de *T. absoluta*. Os valores variaram de
1428 $24,83 \pm 1,31$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Tianguá, CE) a $77,67 \pm 1,97$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína
1429 (Pelotas, RS). Uma variação de 3,12 vezes na atividade de glutathiona-S-transferase foi observada
1430 dentre as populações (Tabela 3).

1431 Quanto ao metabolismo oxidativo, diferenças significativas na atividade de monooxigenases
1432 dependentes de citocromo P₄₅₀ foram encontradas entre as populações de *T. absoluta*. A atividade
1433 de N-desalquilação variou de $1,03 \pm 0,13$ $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Paulínia, SP) a $5,86 \pm 0,17$
1434 $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Anápolis, GO), com uma variação de 5,68 vezes na atividade entre as
1435 populações de *T. absoluta* (Tabela 3). A atividade de O-desalquilação variou de $4,26 \pm 0,43$
1436 $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Guaraciaba do Norte, CE) a $17,33 \pm 1,24$ $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína
1437 (Venda Nova, ES), com uma variação de 4,06 vezes na atividade entre as populações de *T.*
1438 *absoluta* (Tabela 3).

1439 Não se observou correlação significativa entre as CL₅₀s das populações de *T. absoluta* para os
1440 inseticidas clorpirifós e metamidofós ($r = -0,111$; $P = 0,352$; $N = 8$). Para classificação da
1441 magnitude dos coeficientes de correlação, adotou-se o modelo sugerido por Cohen (1988), o qual
1442 segue: $r = 0,10$ até $0,29$ (correlação fraca); $r = 0,30$ até $0,49$ (correlação moderada); $r = 0,50$ até $1,0$
1443 (correlação forte). Os valores de CL₅₀ das populações de *T. absoluta* para clorpirifós apresentaram
1444 correlação positiva forte com a atividade de esterase para o substrato α -naftil acetato ($r = 0,726$; P
1445 $< 0,0001$; $N = 72$) e correlação negativa fraca para metamidofós ($r = -0,29$, $P = 0,012$; $N = 72$). Os
1446 valores de CL₅₀ das populações de *T. absoluta* para clorpirifós mostraram correlação positiva fraca
1447 com a atividade de esterase quando foi utilizado o substrato β -naftil acetato ($r = 0,285$; $P = 0,015$;
1448 $N = 72$). As atividades de GST apresentaram correlação positiva moderada com os valores de CL₅₀
1449 para metamidofós ($r = 0,44$; $P = 0,0001$; $N = 72$) e correlação negativa moderada com os valores

1450 de CL₅₀ para clorpirifós ($r = -0.436$; $P = 0,0001$; $N = 72$) das populações de *T. absoluta*. Os valores
1451 de CL₅₀ das populações de *T. absoluta* para metamidofós apresentaram correlação positiva
1452 moderada com as atividades de monooxigenases dependentes do citocromo P₄₅₀ utilizando o
1453 substrato 4-cloro-*N*-metilanilina ($r = 0,312$; $P = 0,007$; $N = 72$). Os valores de CL₅₀ das populações
1454 de *T. absoluta* para clorpirifós apresentaram correlação positiva forte ($r = 0,52$; $P = <0,0001$; $N =$
1455 72) com as atividades de monooxigenases dependentes do citocromo P₄₅₀ utilizando o substrato *p*-
1456 nitroanisole, quando comparado com os valores de CL₅₀ das populações de *T. absoluta* para
1457 metamidofós, que apresentaram correlação positiva fraca ($r = 0,28$; $P = 0,01$; $N = 72$).

1458 O gel nativo de esterase revelou a presença de cinco isoformas nas populações de *T. absoluta*,
1459 que foram designadas de E1 a E5 (Fig. 2A). Entretanto, apenas as populações de Anápolis (ANP),
1460 Tianguá (TIN) e Paulínia (PLN) apresentaram as cinco, enquanto que as populações de Pelotas
1461 (PLT), Sumaré (SUM), Guaraciaba do Norte (GCB), Iraquara (IRA) e Venda Nova (VDN)
1462 apresentaram apenas o padrão de bandas E4 e E5 (Fig. 2A). Os geis nativos de esterase foram pré-
1463 incubados com os inibidores trifenil fosfato (TTP) (Fig. 2B), butóxido de piperonila (PBO) (Fig.
1464 2C) e Eserina (Fig. 2D). As bandas E4 e E5 foram inibidas pelo TTP, as bandas E1 a E3 foram
1465 parcialmente inibidas (Fig. 2B). Enquanto no inibidor butóxido de piperonila (PBO) não ocorreu
1466 inibição aparente das isoformas de esterase de *T. absoluta* (Fig. 2C). Através do inibidor Eserina
1467 apenas as isoformas E4 e E5 foram inibidas em todas as populações. As isoformas E1 e E2 foram
1468 inibidas totalmente na população de TIN, enquanto, as isoformas E1 a E3 foram parcialmente
1469 inibidas nas populações de ANP e PLN (Fig. 2D).

1470 A inibição da AChE diferiu significativamente entre a população suscetível e resistente de *T.*
1471 *absoluta* (Fig. 3). A população resistente de PLT apresentou menor sensibilidade à inibição de
1472 AChE por paraoxon do que a população suscetível de TIN (Fig. 3). Baseado nos valores de I₅₀, a

1473 população de PLT mostrou 4,71 vezes menos sensibilidade para o inibidor do que a população de
1474 TIN (Fig. 3).

1475

1476

Discussão

1477 As populações de *T. absoluta* responderam de forma semelhante para o inseticida clorpirifós
1478 com RR muito baixas que atingiram valores de no máximo 3,10 vezes. Estes resultados são
1479 semelhantes aos observados em populações europeias de *T. absoluta* (Roditakis *et al.* 2012), cuja
1480 razão de resistência foi de até 4,0 vezes. Entretanto, a dose de clorpirifós recomendada pelo
1481 fabricante apresentou falha de controle para a população de Iraquara. É possível que as
1482 populações testadas no presente estudo já exibissem elevada tolerância ao clorpirifós, e o fato de
1483 não ter sido adotada uma população padrão de suscetibilidade, o nível de resistência tenha sido
1484 subestimado, não favorecendo a detecção de elevados níveis de resistência ao clorpirifós nas
1485 populações investigadas.

1486 A variação de respostas das populações de *T. absoluta* para metamidofós foi mais ampla
1487 (11,7 vezes) do que para o clorpirifós, sendo a população de Pelotas a mais resistente para o
1488 inseticida metamidofós. Curiosamente, esta população foi mais suscetível para clorpirifós,
1489 sugerindo que diferentes mecanismos de resistência possam existir nestas populações. Os valores
1490 de razão de resistência em *T. absoluta* tem sido relativamente baixo para metamidofós, mesmo em
1491 estudos iniciais, ex. 4,2 vezes (Siqueira *et al.* (2000), 3,9 vezes (Salazar & Araya 1997) e <1,0
1492 vezes (Lietti *et al.* 2005), em todos estes por ausência de padrão comparativo de suscetibilidade.
1493 Apesar destes valores, a maioria das populações está resistente e certos níveis já podem ocasionar
1494 danos econômicos (falhas de controle) nas doses recomendadas pelos fabricantes de clorpirifós e
1495 metamidofós. Em 2012, o metamidofós foi definitivamente banido do Brasil (ANVISA 2012), o
1496 que poderá contribuir com a diminuição dos problemas de resistência no país. Porém, isto

1497 somente ocorrerá se outros organofosforados, como clorpirifós, descontinuar o uso em culturas de
1498 tomate, particularmente para o controle de outras pragas.

1499 Um dos aspectos não avaliado em populações de *T. absoluta* foi o mecanismo de
1500 resistência a organofosforados, apesar da longa data em uso. Tais inseticidas atuam inibindo a
1501 atividade da AChE, através da fosforilação da enzima (Grupo 1B, classificação Internacional de
1502 Modo de Ação de Inseticidas) (IRAC 2012), resultando no acúmulo do neurotransmissor
1503 acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), impedindo a interrupção da propagação do
1504 impulso elétrico (Perry *et al.* 1997). Embora estes inseticidas apresentem o mesmo modo de ação,
1505 não foi observada correlação significativa entre os valores de CL₅₀ para ambos. Isto sugere que
1506 diferentes mecanismos podem estar associados à resistência para clorpirifós e/ou metamidofós
1507 (enzimas detoxificativas e insensibilidade da AchE). Estudos têm relatado que o aumento por
1508 detoxificação provoca resistência por metabolismo e envolve diferentes enzimas, incluindo
1509 monooxigenases dependente do citocromo P₄₅₀, carboxilesterases e esterases (Ishaaya & Casida
1510 1980, Scott 1999, Huang *et al.* 2006, Chen *et al.* 2008), e ambas têm muitas isoenzimas com uma
1511 ampla gama de substratos. Se um inseticida seleciona isoenzimas específicas, que possam atuar
1512 em diferentes compostos, espera-se que a resistência cruzada possa ocorrer. Esta hipótese parece
1513 não ser o caso neste estudo, e sim a existência de resistência múltipla, explicando desta forma a
1514 falta de correlação entre clorpirifós e metamidofós.

1515 Os resultados de atividade enzimática sugerem que a detoxificação metabólica pode estar
1516 envolvida na resistência ao clorpirifós em populações de *T. absoluta*, e esterases (α -naftil acetato)
1517 bem como monooxigenases dependentes de citocromo P₄₅₀ (*O*-desmetilase) podem ter um papel
1518 importante neste aspecto, uma vez que uma forte correlação com valores de CL₅₀ para este
1519 inseticida foi observada. Além disso, atividade de esterase em gel foi inibida quando o
1520 trifenilfosfato (TPP) foi utilizado, sugerindo o envolvimento de esterases gerais no metabolismo de

1521 inseticidas. Siegfried *et al.* (1990) relataram que aumento dos níveis de monooxigenases bem
1522 como hidrólise aumentada do clorpirifós estavam associados com resistência a este inseticida em
1523 *Blattella germanica* (L). Outros estudos mostraram que a hidrólise por esterases é um mecanismo
1524 importante no metabolismo de clorpirifós, conferindo resistência a este em insetos (Ahmad &
1525 Hollingworth, 2004; Rossiter *et al.* 2001), mas não exclui também o envolvimento de
1526 monooxigenases dependentes de citocromo P₄₅₀ (Xu *et al.* 2013). Contrariamente, a resistência a
1527 metamidofós correlacionou moderada e fracamente com as glutaciona-S-transferases e
1528 monooxigenases (*N*-desalquilação), respectivamente, sugerindo que o metabolismo tenha um
1529 papel secundário na detoxificação de metamidofós, e que a alteração do sítio alvo (AChE alterada)
1530 seja o mecanismo mais provável na resistência de *T. absoluta*. A inibição de esterase em gel por
1531 eserina parece também sustentar esta hipótese.

1532 Ensaio de inibição da AChE conduzidos com paraoxon demonstraram que a população
1533 mais resistente (Pelotas) apresentou atividade de AChE maior do que a população mais sensível a
1534 metamidofós (RI₅₀ de aproximadamente 5,0 vezes). Este mecanismo parece ser mais importante
1535 para metamidofós do que clorpirifós, uma vez que as populações de Pelotas e Tianguá foram
1536 respectivamente uma das mais sensíveis e resistentes ao clorpirifós, o que reforça a provável
1537 ausência ou reduzida resistência cruzada. Clorpirifós é um pró-inseticida que necessita de ativação
1538 por monooxigenases, no entanto pode também ser metabolizado por *O*-desalquilases o que explica
1539 a correlação observada com a atividade frente a *p*-nitroanisole. Em geral, as populações
1540 apresentaram menor mortalidade à dose reconhecida de clorpirifós do que metamidofós, desta
1541 forma, o metabolismo poderia estar diminuindo a concentração de clorpirifós que chega no sítio
1542 alvo, e a insensibilidade estaria contribuindo em parte pela menor mortalidade a este. Alguns
1543 estudos têm sugerido a ocorrência de ambos mecanismos na sobrevivência de *Rhyzopertha*
1544 *dominica* (Fabricius) (Guedes *et al.* 1997, Siegfried *et al.* 1990) a inseticidas organofosforados.

1545 Enzimas como esterasas e glutatona-S-transferases parecem exercer um papel importante
1546 na resistência a clorpirifós e metamidofós, respectivamente. Monooxigenases dependentes de
1547 citocromo P₄₅₀ parecem exercer um papel secundário na resistência de *T. absoluta* a
1548 organofosforados. No entanto, diferentes formas destas enzimas parecem exercer papel isolado
1549 frente a estes inseticidas. Além disso, a alteração de sítio alvo (AChE alterada) também está
1550 associada à resistência de *T. absoluta* a organofosforados, mais particularmente a metamidofós.
1551 Contudo, é necessário realizar uma abordagem mais detalhada dos mecanismos que estão
1552 envolvidos na resistência de *T. absoluta* através de técnicas bioquímicas e/ou moleculares que
1553 identifiquem possíveis aumentos de expressão enzimática e/ou mutações nos genes de AChE destes
1554 insetos. Através destes procedimentos será possível determinar a contribuição relativa de cada fator
1555 envolvido na resistência de *T. absoluta* a estes inseticidas.

1556

1557 **Agradecimentos**

1558 À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) que possibilitou a realização desta
1559 pesquisa, CAPES pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor e ao Comitê Brasileiro de
1560 Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC- BR) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste
1561 trabalho.

1562

1563 **Literatura Citada**

1564 **Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol.
1565 18: 265 – 267.

1566 **Ahmad, M. & A.R. McCaffery. 1991.** Elucidation of detoxication mechanisms involved in
1567 resistance to insecticides in the third instar larvae of a field-selected strain of *Helicoverpa*
1568 *armigera* with the use of synergists. Pestic. Biochem. Physiol. 41:41–52.

- 1569 **Ahmad, M. & R.M. Hollingworth. 2004.** Synergism of insecticides provides evidence of
1570 metabolic mechanisms of resistance in the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana*
1571 (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Manag. Sci.* 60: 465-473.
- 1572 **ANVISA. 2012.** Agrotóxico metamidofós será banido do mercado nacional Disponível em
1573 <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/1gA>>, acessado em 16/02/12.
- 1574 **Chen, Q., Q.A. Jin, Z.Q. Peng, C. Tang & H.B. Wen. 2008.** Analysis of the susceptibility of
1575 *Spodoptera litura* (Fabricius) to abamectin. *Chin. Agric. Sci. Bull.* 24:361–364.
- 1576 **Cohen, Jacob. 1988.** Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ,
1577 Erlbaum.
- 1578 **Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-Vazquez,**
1579 **J.G. Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T.**
1580 **Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta*
1581 *absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83:
1582 197–215.
- 1583 **Ellman, G.L., K.D. Courtney, V. Jr Andres & R.M. Featherstone. 1961.** A new and rapid
1584 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88–95.
- 1585 **French-Constant, R.H., P.J. Daborn & G. Le Goff. 2004.** The genetics and genomics of
1586 insecticide resistance. *Trends Genet.* 20: 163–170.
- 1587 **Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London: Cambridge University, 333p.
- 1588 **Guedes, R. N. C. & M. C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America:
1589 pest status, management and insecticide resistance. *E.P.P.O. Bulletin.* 42: 211-216.
- 1590 **Guedes, R. N. C., S. Kambhampati, B.A. Dover & K.Y. Zhu. 1997.** Biochemical mechanisms
1591 of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* populations from the United States
1592 and Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 87: 581-586.
- 1593 **Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974.** Glutathione S-transferases: the first step in
1594 mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- 1595 **Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of
1596 insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 34: 653–665.
- 1597 **Hodgson, E. 1999.** Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in
1598 synergism of pesticides and pesticide action. *Toxicol Ind. Health.* 15: 6–11.
- 1599 **Huang, S.J., J.F. Xu & Z.J. Han. 2006.** Baseline toxicity data of insecticides against the
1600 common cutworm *Spodoptera litura* (Fabricius) and a comparison of resistance monitoring
1601 methods. *Int. J. Pest Manag.* 52: 209–213.
- 1602 **IRAC. 2012.** Esquema de classificação. Disponível em: <http://www.irc-online.org>, acessado em
1603 12/01/12.

- 1604 **Ishaaya, I. & J.E. Casida. 1980.** Properties and toxicological significance of esterases
1605 hydrolyzing permethrin and cypermethrin in *Trichoplusia ni* larval gut and integument. Pestic.
1606 Biochem. Physiol. 14: 178–184.
- 1607 **LeOra Software. 2005.** PoloPlus, POLO for Windows, LeOra Software, Petaluma, CA.
1608 Disponível em <[http:// www.LeOraSoftware.com](http://www.LeOraSoftware.com)>, acessado em 18/08/13.
- 1609 **Li, X., M.A. Schuler & M.R. Berenbaum. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance
1610 to synthetic and natural xenobiotics. Annu. Rev. Entomol. 52: 231-253.
- 1611 **Lietti, M. M. M., E. Botto, and R. A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine
1612 populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotrop. Entomol. 34:
1613 113-119.
- 1614 **Miranda, M.M.M., M.C. Picanço, J.C. Zanuncio & R.N.C. Guedes. 1998.** Ecological life table
1615 of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Biocontrol Sci. Technol. 8: 597–606.
- 1616 **Perry, A.S, I. Yamamoto, I. Ishaaya & R.Y. Perry. 1997.** Insecticides in Agriculture and
1617 Environment: Retrospects and Prospects. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 1618 **Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods. 1st ed. CRC, Press,
1619 Boca Raton, FL, 127 p.
- 1620 **Roditakis, E., C. Skarmoutsou & M. Staurakaki. 2012.** Toxicity of insecticides to populations
1621 of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. Pest Manag. Sci. 69: 834–840.
- 1622 **Rose, R.L. & W.A. Brindley. 1985.** An evaluation of the role of oxidative enzymes in Colorado
1623 potato beetle resistance to carbamate insecticides. Pestic. Biochem. Physiol. 23: 74-84.
- 1624 **Rossiter, L. C., R. V. Gunning, & H.A. Rose. 2001.** The Use of Polyacrylamide Gel
1625 Electrophoresis for the Investigation and Detection of Fenitrothion and Chlorpyrifos-Methyl
1626 Resistance in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). Pestic. Biochem. Physiol.
1627 69: 27–34.
- 1628 **Salazar, E.R. & J.E. Araya. 1997.** Detection of insecticide resistance in the tomato moth.
1629 Simiente 67: 8-22.
- 1630 **Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Response of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick), to
1631 insecticides in Arica, Chile. Agricultura Técnica 61: 429-435.
- 1632 **SAS Institute 2001.** SAS user’s guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer
1633 program, version by SAS Institute.
- 1634 **Scott, J.G. 1999.** Cytochromes P₄₅₀ and insecticide resistance. Insect. Biochem. Mol. Biol.
1635 29:757–777.
- 1636 **Shang, Q., Y. Pan, K. Fang, X. Jinghui & J. Brennan. 2012.** Biochemical characterization of
1637 acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of
1638 *Aphis gossypii* Glover. Crop Prot. 31: 15-20.

- 1639 **Siegfried, B. D., J. G. Scott, R. T. Roush & B. C. Zeichner. 1990.** Biochemistry and genetics of
1640 chlorpyrifos resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L). Pestic. Biochem.
1641 Physiol. 30: 110-121.
- 1642 **Siqueira, H. A. A., R. N. C. Guedes, & M. C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in
1643 populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- 1644 **Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano,**
1645 **E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using
1646 Bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.
- 1647 **van Asperen, K. 1962.** A study of house fly esterases by means of a sensitive colorimetric
1648 method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.
- 1649 **Wright, R. J., M.E. Scharf, L.J. Meinke, X.Zhou, B.D. Siegfried & L.D. Chandler. 2000.**
1650 Larval susceptibility of an insecticide-resistant Western Corn Rootworm (Coleoptera:
1651 Chrysomelidae) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification
1652 enzymes, and field performance. J. Econ. Entomol. 93: 7-13.
- 1653 **Xu, L., M. Wu & Z. Han. 2013.** Biochemical and molecular characterization and cross-
1654 resistance in field and laboratory chlorpyrifos-resistant strains of *Laodelphax striatellus*
1655 (Hemiptera: Delphacidae) from eastern China. Pest Manag. Sci. DOI 10.1002/ps.3657.
- 1656 **Zlof, V. & M. Suffert. 2012.** Report of the EPP/FAO/IOBC/NEPPO Joint International
1657 Symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin
1658 42: 203–204.
- 1659

1660 Tabela 1. Toxicidade relativa de clorpirifós para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
1661

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Guaraciaba do Norte-CE	290	5	2,10 \pm 0,19	164,5 (122,5 – 220,2)	413,6 (300,1 – 648,5)	5,61	---
Pelotas – RS	266	5	2,03 \pm 0,31	173,6 (114,0 – 234,6)	449,7 (337,4 – 641,0)	4,62	1,1 (0,7 – 1,6)
Paulínia-SP	240	6	3,66 \pm 0,44	221,8 (184,9 – 264,4)	376,1 (312,1 – 480,2)	4,23	1,3 (1,0 – 1,8)
Anápolis – GO	276	5	2,14 \pm 0,26	273,4 (204,9 – 348,3)	675,2 (526,3 – 923,5)	1,72	1,7 (1,2 – 2,3)*
Sumaré – SP	278	5	2,61 \pm 0,26	333,6 (276,9 – 403,0)	700,6 (565,4 – 924,8)	3,19	2,0 (1,5 – 2,7)*
Venda Nova – ES	273	5	2,37 \pm 0,24	362,9 (298,1 – 446,8)	821,8 (645,0 – 1134,1)	3,70	2,2 (1,7 – 2,9)*
Tianguá-CE	292	6	2,62 \pm 0,28	435,4 (342,5 – 560,0)	910,4 (690,6 – 1362,6)	6,14	2,6 (2,0 – 3,5)*
Iraquara – BA	273	5	2,30 \pm 0,22	509,1 (416,9 – 623,3)	1180,7 (935,6 – 1593,5)	2,29	3,1 (2,3 – 4,1)*

1662 ^a Número total de larvas utilizadas.

1663 ^b Grau de liberdade.

1664 ^c Erro padrão.

1665 ^d Miligramas de ingrediente ativo por Litro de água.

1666 ^e Qui-quadrado.

1667 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
1668 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para clorpirifós, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1669

1670 Tabela 2. Toxicidade relativa de metamidofós para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R.: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.
1671

População	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC95%) ^d	CL ₈₀ (IC95%) ^d	χ^2 ^e	RR ₅₀ (IC95%) ^f
Tianguá-CE	286	6	3,71 \pm 0,57	64,1 (51,0 – 76,9)	108,0 (90,0 – 137,2)	0,32	---
Paulínia-SP	309	5	3,17 \pm 0,44	91,6 (64,8 – 117,2)	168,5 (131,8 - 235,4)	5,06	1,4 (1,1 – 1,9)*
Venda Nova – ES	236	5	2,65 \pm 0,28	118,9 (96,9 – 144,5)	246,4 (199,2 – 323,5)	2,08	1,9 (1,4 – 2,5)*
Guaraciaba do Norte-CE	284	5	3,09 \pm 0,52	150,6 (114,1 – 183,9)	281,6 (230,3 – 372,5)	6,42	2,3 (1,7 – 3,2)*
Sumaré – SP	240	4	3,00 \pm 0,33	153,4 (127,9 – 183,1)	292,4 (240,3 – 378,3)	3,54	2,4 (1,8 – 3,1)*
Anápolis – GO	250	4	2,85 \pm 0,34	224,0 (183,8 – 268,1)	441,1 (362,9 – 570,3)	1,09	3,5 (2,7 – 4,6)*
Iraquara – BA	288	5	3,10 \pm 0,32	490,2 (414,5 – 579,8)	915,4 (1017,2 – 1163,8)	1,05	7,6 (5,9 – 9,9)*
Pelotas – RS	285	5	3,82 \pm 0,53	747,4 (617,8 – 884,0)	1239,3 (1039,7 – 1568,5)	4,07	11,7 (9,0 – 15,2)*

1672 ^a Número total de larvas utilizadas.

1673 ^b Grau de liberdade.

1674 ^c Erro padrão.

1675 ^d Miligramas de ingrediente ativo por Litro de água.

1676 ^e Qui-quadrado.

1677 ^f Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e intervalo de
1678 confiança a 95% das estimativas da CL₅₀. * Razão de resistência significativa para metamidofós, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

1679

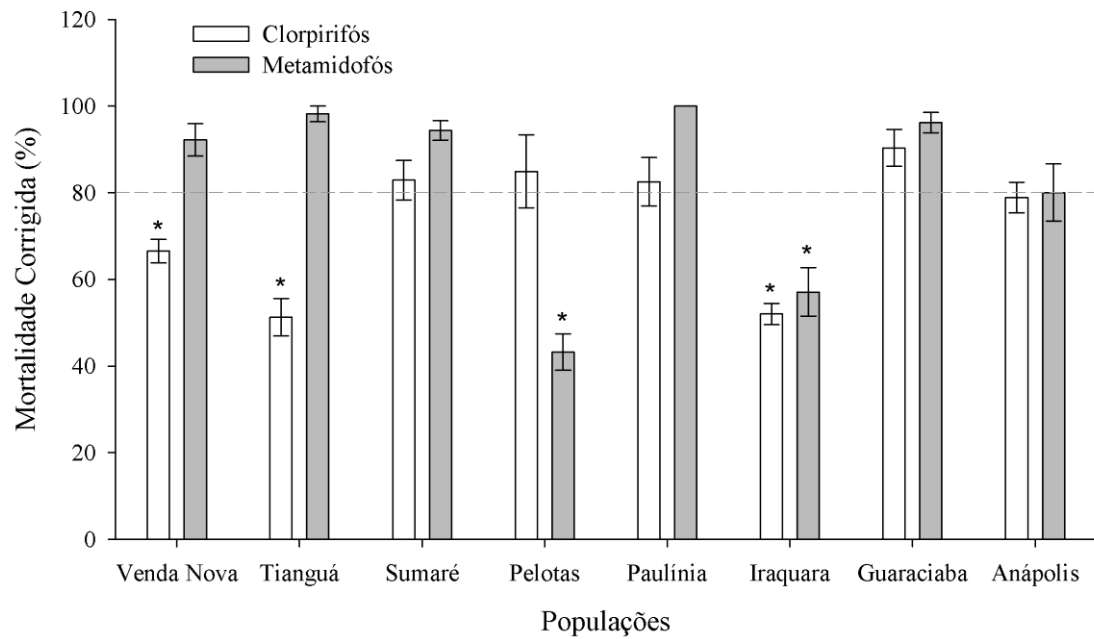
1680 Tabela 3. Média (\pm erro padrão, n=30) de atividade metabólica das enzimas em populações de *Tuta absoluta*.
 1681

População	Esterase		Glutathiona-S-Transferase	Monooxigenases	
	α -naftil acetato ^a	β -naftil acetato ^a	CDNB ^a	N-desalquilação ^b	O-desalquilação ^b
Pelotas – RS	1,06 \pm 0,08 e	1,11 \pm 0,08 bc	77,67 \pm 1,97 a	4,98 \pm 0,39 ab	13,25 \pm 1,27 ab
Anápolis - GO	1,67 \pm 0,07 bcd	1,22 \pm 0,04 ab	76,56 \pm 1,10 a	5,86 \pm 0,17 a	16,81 \pm 0,83 a
Sumaré – SP	1,50 \pm 0,05 cd	1,39 \pm 0,07 a	68,61 \pm 2,24 b	2,28 \pm 0,23 d	12,12 \pm 1,14 b
Paulínia – SP	1,64 \pm 0,04 cd	1,08 \pm 0,05 bc	54,97 \pm 0,20 c	1,03 \pm 0,13 e	4,90 \pm 0,83 c
Guaraciaba do Norte – CE	1,47 \pm 0,07 d	0,98 \pm 0,02 c	71,29 \pm 1,81 ab	4,43 \pm 0,30 bc	4,26 \pm 0,43 c
Venda nova – ES	1,83 \pm 0,14 bc	1,28 \pm 0,04 ab	71,25 \pm 2,09 ab	4,48 \pm 0,30 b	17,33 \pm 1,24 a
Tianguá – CE	2,01 \pm 0,06 ab	1,19 \pm 0,04 abc	24,83 \pm 1,31 d	3,29 \pm 0,12 dc	12,25 \pm 1,10 b
Iraquara – BA	2,22 \pm 0,10 a	1,13 \pm 0,04 bc	65,00 \pm 1,54 b	3,15 \pm 0,29 d	17,15 \pm 0,93 a

1682 *As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a $P < 0,05$.

1683 ^a μ mol/min/mg de proteína.

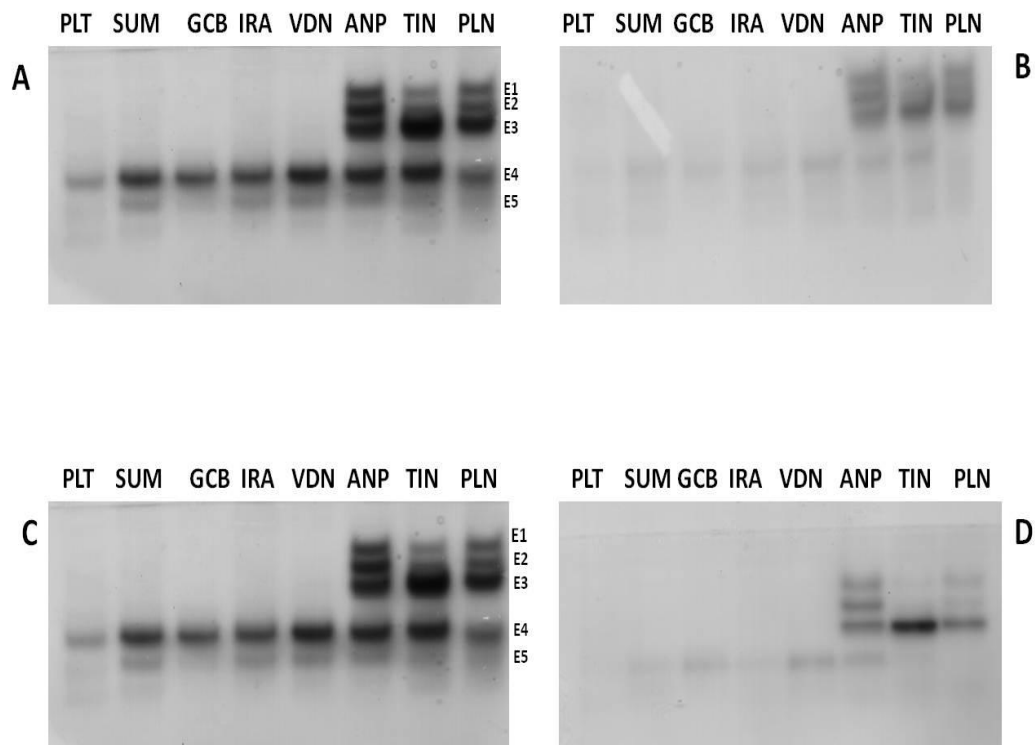
1684 ^b η mol/min/mg de proteína.



1686

1687 Figura 1. Mortalidade (%) de oito populações de *Tuta absoluta* (Lepidoptera:
 1688 Gelechiidae) causadas por dois inseticidas organofosforados. *Mortalidade
 1689 significativamente menor que 80%.

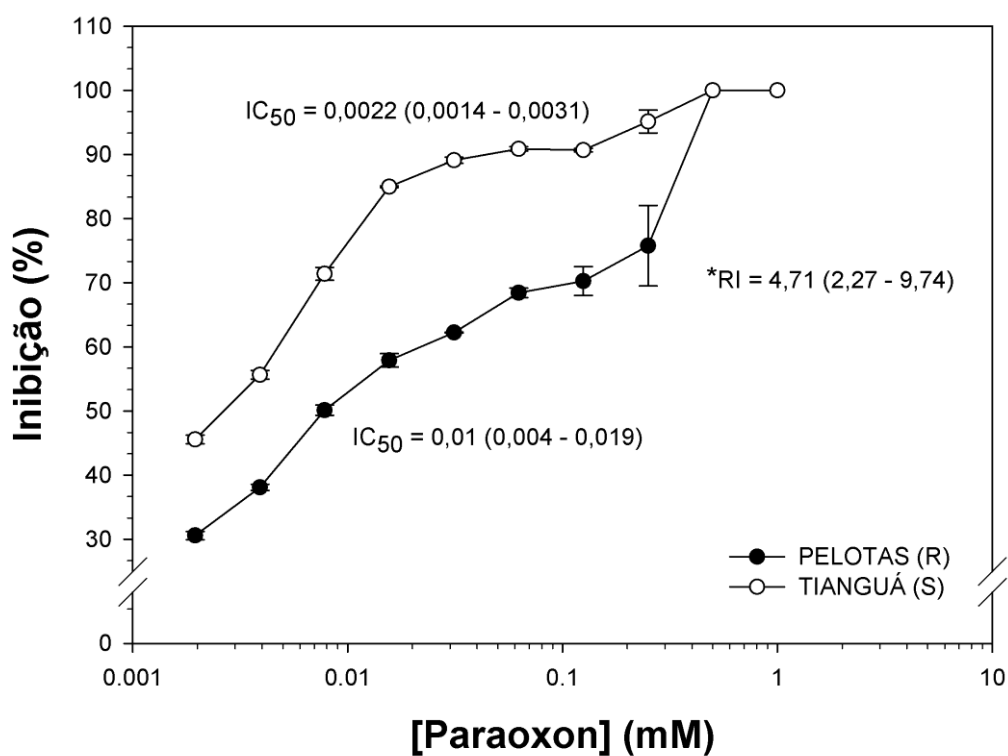
1690



1691

1692 Figura 2. Gel de Poliacrilamida Nativo (8%) do perfil de isoenzimas de esterase de oito
 1693 populações de *Tuta absoluta*. (A) sem inibidor, (B) inibidor TTP, (C) inibidor PBO, (D)
 1694 inibidor Eserina.

1695



1696

1697 Figura 3. Inibição da AChE de uma população suscetível e resistente de *Tuta absoluta*
 1698 por paraoxon. Cada ponto representa a média de duas determinações. As barras verticais
 1699 indicam o erro padrão das médias. * Razão de inibição: razão das estimativas da I_{50}
 1700 entre a população resistente e suscetível a metamidofós, calculada através do método de
 1701 Robertson & Preisler (1992) e intervalo de confiança a 95% das estimativas da RI_{50} .