

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
METOXIFENOZIDA: GENÉTICA, PROVÁVEIS MECANISMOS E MONITORAMENTO

por

TEÓFILO PAULO LANGA

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

RESUMO

A produção de tomate no Brasil tem sido reduzida em parte pela traça-do-tomateiro, que pode ocasionar perdas de até 100% da produção. Seu controle é realizado basicamente com aplicação de inseticidas. Contudo, o crescente número de aplicações destes tem levado populações de *T. absoluta* a evoluir para resistência a inseticidas. Os agonistas de ecdisteroides são exemplo, cuja molécula principal é o metoxifenoza. Este inseticida pertencente à classe das diacilhidrazinas, que atua como agonista de receptores de ecdisteroides e é considerado mais efetivo que os predecessores halofenoza e tebufenoza. Um levantamento recente da suscetibilidade de *T. absoluta* a inibidores de crescimento de insetos, incluindo o metoxifenoza, revelou elevada resistência nas populações avaliadas, evidenciada pelas sucessivas falhas de controle em campo. Porém, não há informações sobre a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoza e similares quanto à genética, mecanismos, resistência cruzada etc. Desta forma, a presente pesquisa objetivou caracterizar a resistência da *T. absoluta* a metoxifenoza, identificar o perfil de resistência cruzada comparando a outros grupos químicos distintos e fazer o monitoramento com dose diagnóstica e de rótulo. Para isso, foi utilizada uma população resistente (Guaraciaba do Norte-Resistente) que na quarta geração era 2352 vezes mais resistente comparada com a suscetível (João Dorado1-Sus). A resistência da Traça-do-tomateiro a

metoxifenoazida foi incompletamente recessiva, poligênica e autossômica. A concentração de 10mg metoxifenoazida/L torna a resistência funcionalmente recessiva e pode ser usada para diagnosticar resistência em populações ferais. As razões de resistência sinergizadas ao metoxifenoazida entre GBN-Sel e JDR1-Sus foram de 279 vezes para Butóxido de piperonila (PBO); 631 vezes para Dimetil maleato (DEM), 311 vezes para S,S,S-tributilfosforotritioato (DEF) e 8,35 vezes para PBO+DEF, sugerindo envolvimento de monooxigenases na resistência. O perfil de resistência cruzada não mostrou resistência com clorantraniliprole, espinetoram, malation, metomil e clorfenapir.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-do-tomateiro, herança genética, resistência cruzada e metabólica.

RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) RESISTANCE (LEPIDOPTERA:
GELECHIIDAE) TO METHOXYPHENOZIDE: GENETICS, PROBABLE MECHANISMS AND
MONITORING

by

TEÓFILO PAULO LANGA

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

ABSTRACT

Tomato production in Brazil has been partially reduced by tomato moth, which can cause severe losses up to 100% of production. Its control is basically carried out with insecticide application. However, the increasing number of insecticide applications of these has led *T. absoluta* populations to evolve to insecticide resistance in populations. This pest has already developed resistance to most insecticides registered for its management. Ecdysteroid agonist is an example, whose main molecule is methoxyphenozide. This insecticide belongs to the diacylhydrazine chemical group, which acts as an ecdysteroid receptor agonist and is considered more effective than the predecessors halofenozide and tebufenozide. A recent survey of the susceptibility of *T. absoluta* to insect growth inhibitors, including methoxyphenozide, revealed much resistance in the evaluated populations, evidenced by successive field control failures. However, there is no information on *T. absoluta* resistance to methoxyphenozide and the like regarding genetics, mechanisms, cross-resistance etc. Thus, this work aimed to characterize the *T. absoluta* resistance to methoxyphenozide, identify the cross-resistance profile comparing to other distinct chemical groups and monitor with diagnostic and label dose. For this, a resistant population (GBN-Sel) that was 2352 times more resistant compared to the susceptible one (JDR1-

Sus) was used. Tomato Moth resistance to methoxyphenozide was incompletely recessive, polygenic and autosomal. Concentration of 10mg/L methoxyphenozide makes resistance functionally recessive and can be used to diagnose resistance in feral populations. Synergized methoxyphenozide resistance ratios between GBN-Sel and JDR1-Sus were 279 times for PBO; 631 times for DEM, 311 times for DEF and 8.35 times for PBO + DEF suggesting involvement of monooxygenases in resistance. The cross-resistance profile showed no resistance with chlorantraniliprole, spininetoram, malation, metomil and chlorfenapyr.

KEY WORDS: South American Tomato moth genetic inheritance, cross-resistance and metabolic.

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
METOXIFENOZIDA: GENÉTICA, PROVÁVEIS MECANISMOS E MONITORAMENTO

por

TEÓFILO PAULO LANGA

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

RECIFE - PE

Fevereiro – 2020

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
METOXIFENOZIDA: GENÉTICA, PROVÁVEIS MECANISMOS E MONITORAMENTO

por

TEÓFILO PAULO LANGA

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A
METOXIFENOZIDA: GENÉTICA, PROVÁVEIS MECANISMOS E MONITORAMENTO

por

TEÓFILO PAULO LANGA

Orientador:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Examinadores:

José Dijair Antonino de Souza Jr. – UFRPE

Lílian Maria da Solidade Ribeiro – PNPd/CAPES

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa em primeiro lugar a minha irmã mais nova **Paulina Dos Santos** (*in memoriam*) a minha mãe **Amélia Maria Dos Santos**, a minha AMADA esposa **Atália Matola** e a minha super ESTIMADA filha **Layanny Langa**, pelo carinho e educação incondicional, pela ternura e muito amor, além do grande companheirismos que sempre vos caracterizou no meu dia-a-dia com a esperança de um futuro melhor e risonho para todos nós.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela boa saúde na qual me permite trilhar estes caminhos cheios de desafios, tanto a nível acadêmico assim como a nível profissional.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, por ter aberto as portas que permitiram o acesso a mais aprendizado não só a nível científico como também a nível social.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco FACEPE junto com o Programa de Formação de Professores de Educação Superior de Países Africanos (ProAfri) pela concessão da minha bolsa de estudo.

Ao meu estimado orientador, Professor Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, por toda orientação, amizade, ensinamentos, estímulos, críticas, sugestões apresentadas e realizadas durante a pesquisa e a imensurável atenção que sempre se ofereceu para o meu correto encaminhamento.

Ao meu amigo Professor Dr. Simião Gabriel Balane, pela tremenda amizade e pelos conselhos repassados que contribuíram para a minha formação.

Aos professores do PPGEA, em especial: Jorge Torres, Valéria Teixeira, Paschoal Grossi, Christian Torres, José Dijair e Paulo Cristaldo.

A minha irmã Paulina dos Santos (*in memoriam*) e a minha mãe Amélia Maria Paulino, aos meus tios Paulino Lay e Carlos Jeque, aos meus irmãos Paulo Sergio, Virginia Marisa, aos meus sobrinhos Bulen Jerónimo, Wesley Paulo, Yurica Paulo, Yohance jerónimo, a minha

ESTIMADA filha Layanny Langa, minha AMADA esposa e todos membros da família que direta ou indiretamente influenciam a minha vida.

Aos meus amigos Valdemiro, Egidio, José, Amone, Benedito, Lázaro, Ester.

Aos amigos de laboratório, Daniel Perreira, Marcos de Oliveira, Marina, Maria, Kayo, Natália Bermúdez, Dr. Paulo Martins, Dra. Liliane Marques, pela amizade e pelo companheirismo dedicado todo santo dia.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	13
2 BASES DA RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A METOXIFENOZIDA E MONITORAMENTO	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS.....	39
LITERATURA CITADA.....	39
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Cultura de tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes em todo o mundo, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Dentre os maiores produtores mundiais em 2017 destacaram-se a China, Índia, EUA, Turquia, Egito, Itália, Irã, Espanha e Brasil (FAO 2018), sendo o Brasil o maior produtor da América Latina. Pelo seu nível de importância, esta hortaliça ocupa o segundo lugar entre as mais produzidas no mundo (FAO 2018). O seu grande consumo é sustentado pela grande importância nutricional na alimentação humana, podendo ser consumido na forma fresca ou processado. Nos anos de 2014 e 2016 cerca de 39,79 milhões de toneladas de tomate foram submetidas ao processamento pelas indústrias, segundo o Conselho Mundial de Tomate para Processamento – *World Processing Tomato Council*. A maior percentagem desta produção é geralmente destinada ao processamento na indústria, e uma pequena quantidade é destinada ao comércio de tomate *in natura*.

A cultura do tomate no Brasil abrange uma área colhida de 58,5 mil hectares, com uma produção estimada em torno de 3,74 milhões de toneladas e rendimento médio de 63,8 toneladas por hectare, produtividade que confere ao Brasil o terceiro lugar. O setor é responsável por mais de 250 mil empregos em todo o país. Mais de 70% da produção de tomate no Brasil é produzido nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. A região Sudeste se destaca por ser a principal produtora, seguida da região Centro-Oeste com 1.799.478 e 1.011.520 toneladas, respectivamente. O Sudeste atualmente produz o equivalente a 48% do total produzido no país, com o estado de São Paulo, sendo responsável por aproximadamente 42% desta produção. Goiás tem-se destacado como maior produtor entre os estados do Brasil, com uma produção estimada em torno de 978.258 toneladas de tomate, o que corresponde a 26% da produção nacional (IBGE 2019).

O tomateiro é também uma das poucas culturas em que os insetos praga e doenças são igualmente importantes, com cerca de 200 espécies de artrópodes já relatadas se alimentando de plantas de tomateiro. A ocorrência de pragas no tomateiro se dá durante todo o ciclo da cultura. Entretanto, devido ao hábito alimentar, órgãos atacados e natureza dos danos causados, as pragas podem assumir relevância em estágios distintos, como é o caso daquelas que atacam os frutos. O ataque de pragas é sem dúvida, um sério problema para o tomaticultor, o qual deve dispor de técnicas viáveis e eficientes de controle, garantindo assim, menores custos de produção, ganhos no aumento de produção e conseqüentemente, maior rentabilidade final (Lopes & Stripari 1998).

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917)

A traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, é uma praga economicamente importante na cultura do tomate, que se espalhou da América do Sul para a Espanha em 2006, invadindo depois uma série de outros países europeus, a África e o Oriente Médio (Desneux *et al.* 2011a). Foi inicialmente descrita como *Phthorimaea absoluta* (Meyrick), transferida mais tarde para o gênero *Gnorimoschema*, em seguida para *Scrobipalpula* (Povolny), *Scrobipalpuloides* (Povolny) e, finalmente revisto e alterado para *Tuta* (Povolny). É considerada praga chave da cultura do tomateiro devido a potencialidade dos seus danos (Urbaneja *et al.* 2009, Desneux *et al.* 2010, Desneux *et al.* 2011b, Shaltiel-Harpaz *et al.* 2015). O primeiro relato de ocorrência da traça-do-tomateiro no Brasil foi no final da década de 70 no litoral paranaense, já a partir de 1980, sua ocorrência foi observada nos estados de São Paulo e Bahia, estando no final da década de 80 presente em todas as áreas produtoras de tomate do país (Morais & Filho 1982, Muszinski *et al.* 1982, França 1993). No entanto, somente na década de 90, a traça-do-tomateiro atingiu o *status* de praga importante em cultivos de tomate pelo Brasil (Picanço *et al.* 1998).

Há cerca de uma década, *T. absoluta* chegou à Europa vindo da América do Sul e, nesse período, espalhou-se por quase toda a África e a Eurásia. Continua a ser uma ameaça significativa para a produção de tomate porque atingiu as fronteiras dos principais países produtores, exportadores e importadores de tomate, aumentando assim as probabilidades de se aproximar da introdução e subsequentes surtos, particularmente na China, México e EUA. Dada a natureza agressiva da praga e as crescentes trocas comerciais, a introdução da traça do tomate em países não afetados é uma ameaça enorme e constante (Campos *et al.* 2017, Biondi *et al.* 2018)

Bioecologia de *Tuta absoluta*

A traça-do-tomateiro é uma praga que tem a cultura do tomateiro como seu hospedeiro principal, mas pode ser encontrada também em berinjela *Solanum melongena* L., batata *Solanum tuberosum* L., pimentão *Solanum muricatum* Ait., tabaco *Nicotiana tabacum* L. (Vargas 1970, Campos 1976), bem como *Solanum nigrum* L., *Solanum eleagnifolium* Cav., *Solanum bonariense* L., *Solanum sisymbriifolium* L., *Solanum saponaceum* Dun., *Lycopersicon puberulum* Phil., *Datura ferox* L., *Datura stramonium* L. e *Nicotiana glauca* L. (Garcia & Espul 1982, Larraín 1986).

A traça-do-tomateiro apresenta quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto e depende muito das condições do meio ambiente, com um tempo de desenvolvimento médio em torno de 76,3 dias a 14 °C; 39,8 dias a 19,7 °C e 23,8 dias a 27,1 °C (Barrientos Z. *et al.* 1998). Na América do Sul, a *T. absoluta* pode apresentar de 10 a 15 gerações por ano. O tempo médio de vida dos adultos varia entre 10 e 15 dias para fêmeas e machos, respectivamente. Os adultos são microlepidópteros, medindo em média 5 mm de comprimento e 9 mm de envergadura, de coloração cinza prateada e abdômen marrom claro. Após a emergência dos adultos ocorre o acasalamento (Nakano & Paulo. 1983). As fêmeas depositam seus ovos na

face inferior das folhas e hastes, e em menor grau nos frutos (Torres *et al.* 2001, Pratisoli *et al.* 2003). Os ovos são pequenos (0,36 mm de comprimento por 0,22 mm de largura), cilíndricos e inicialmente apresentam uma coloração branco-brilhante ou amarelo-claro, evoluindo posteriormente para uma coloração marrom ou avermelhada no período próximo à eclosão. O período de oviposição após os primeiros acasalamentos dura em torno de sete dias, onde as fêmeas chegam a ovipositar até 76% de seus ovos neste intervalo com uma fecundidade máxima de 260 ovos (Imenes *et al.* 1990, Uchôa-Fernandes *et al.* 1995)

Larvas deste inseto quando recém-eclodidas possuem coloração amarela, à medida que vão mudando de ínstar adquirem uma coloração verde-escuro ou rosado. A *T. absoluta* apresenta quatro ínstar de desenvolvimento larval, sendo estas diferenciadas pelo comprimento do corpo e largura da cápsula cefálica, que variam de 0,4-0,6 mm e 0,16-0,18 mm durante o primeiro ínstar, no segundo ínstar variam de 0,6-6,0 mm e 0,22-0,28 mm, para o terceiro ínstar variam de 6,0-7,0 mm e 0,34-0,40 mm e o quarto ínstar variam de 7,0-8,0 mm e 0,52-0,60 mm, respectivamente. As pupas são formadas dentro das galerias presentes nos folíolos, envolvidas por um casulo de seda, nos frutos, ou ainda no solo sem o casulo. Essas apresentam um comprimento de 5-6 mm com um formato cilíndrico. Quando recém-formadas, as pupas apresentam uma coloração esverdeada e se tornam mais escuras quando os adultos estão próximos a emergir (Coelho & França 1987, Imenes *et al.* 1990, Haji 1992). O ataque desta praga ocorre principalmente nas folhas, mas também pode ocorrer no caule e frutos e estes últimos quando danificados ficam impróprios para comercialização, além de facilitar a contaminação por patógenos (Coelho & França 1987, Imenes *et al.* 1990).

Impacto da *Tuta absoluta* sobre a cultura de tomate

A traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, causa perdas econômicas severas, o que de certa forma causa o aumento dos custos de produção, como também reduz a oferta do produto a comercializar, e influencia decisivamente a negociação de produtos nos mercados de exportação. É considerada uma das mais importantes pragas desta cultura e uma vez introduzida numa região ainda por ela não habitada, se estabelece com facilidade, tornando-se difícil limitar a sua dispersão e a realização de seu controle o que chega a causar sérias perdas à tomaticultura, que variam entre 40 a 100% (Picanço *et al.* 1995, Barrientos Z. *et al.* 1998, Oliveira *et al.* 2009, Roques *et al.* 2016). Uma ilustração clara dos problemas causados por *T. absoluta* ocorreu no submédio do Vale do São Francisco na safra de 1989, onde as perdas chegaram a 50% e nenhuma lavoura de tomate ficou livre desta praga. Mesmo com a utilização de duas pulverizações semanais, perdeu-se 40% da safra (Espinoza 1991). Em 1989 a produção estimada em 14.000 ha plantados, era de 600.000 toneladas, com uma média de aproximadamente 45 t/ha. Entretanto, as médias foram de cerca de 20 t/ha. Isso comprometeu o funcionamento das indústrias de extração e processamento de polpa que passaram a trabalhar com uma quantidade bem menor do que sua capacidade. Por conseguinte, três das cinco indústrias de processamento de tomate fecharam (Haji 1992).

O desenvolvimento da cultura é prejudicado se as infestações por *T. absoluta* ocorrem precocemente em campos de tomate, pois, estes insetos atacam gemas, brotos terminais, frutos e folhas, nas quais constroem galerias transparentes. Quando a injúria é efetuada no caule, afetam o desenvolvimento da planta (Picanço *et al.* 2007). Nos frutos, as lagartas formam galerias que servem de entrada para patógenos ocasionando infecções secundárias, danificando os frutos e provocando perdas severas (Coelho & França 1987). Nas folhas, as lagartas alimentam-se do

mesófilo, deixando a epiderme intacta, criando as minas que acabam por secar e, por conseguinte reduzem o potencial de fotossíntese da planta (Oliveira *et al.* 2009).

Manejo da resistência da Traça-do-tomateiro a inseticidas

O uso de estratégias com finalidade de controlo da traça-do-tomateiro inclui várias técnicas como armadilhas com iscas contendo feromônio, desenvolvimento de cultivares de tomate resistentes, o controle biológico e o controle químico, sendo este último mais utilizado. Este método inclui estratégias como manejo por moderação, ataque múltiplo e manejo por saturação. O método químico vem sendo utilizado principalmente nos países da América do Sul e Norte da África por meio de aplicações de inseticidas, na sua maioria neurofisiológicos. No Brasil, as infestações recorrentes de *T. absoluta* sobre os plantios de tomateiro impulsionou o uso excessivo de inseticidas pelos produtores, essencialmente nos primeiros anos após a sua descoberta, onde o número de intervenções subiu de 10 a 12 para mais de 30 aplicações (Guedes & Picanço 2012, Tomé *et al.* 2012). De forma similar sucedeu com o surgimento *T. absoluta* na Europa e Norte da África (Desneux *et al.* 2011a).

Inseticidas reguladores de crescimento de insetos

A utilização de inseticidas reguladores de crescimento foi relatada pela primeira vez em 1956, tendo sido isolado o hormônio juvenil proveniente do abdome de mariposas macho de *Hyalophora cecropia* (L.) (Lepdoptera: Saturniidae) (Tunaz & Uygun 2004). O seu grande momento de uso foi descoberto em 1965, quando criações de *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) começaram a apresentar eclosão reduzida de ninfas, impossibilitando-as de chegar à fase adulta. Entretanto, descobriu-se que as anomalias ocorriam devido à presença de tiras de papel toalha nos frascos de criação. As tiras de papel apresentavam concentrações do

componente juvabione, composto pertencente a árvore *Abis balsamea* da qual é feito o papel. É um composto éster metílico do ácido domáutico, sendo ele um mímico do hormônio juvenil muito específico da família de hemípteros Pyrrhocoridae. O acontecimento ficou conhecido como “*Paper Factor*”. Com esta descoberta, aumentou o interesse da indústria na utilização do composto proveniente de plantas, como uma ferramenta de controle de insetos (Williams 1976). Para além dos derivados de plantas, outros compostos foram desenvolvidos a partir do conhecimento da bioquímica e fisiologia de desenvolvimento de insetos, conhecidos como inseticidas reguladores de crescimento de insetos (Tunaz & Uygun 2004). A utilização de reguladores de crescimento teve impacto positivo na agricultura e merecem destaque pelo controle efetivo de diversas espécies de insetos-praga. Este grupo de inseticidas atua em sistemas específicos dos insetos, com seletividade a inimigos naturais e baixa toxicidade a mamíferos (Kodandaram *et al.* 2010).

Um dos integrantes dos reguladores de crescimentos é o metoxifenoazida. Esse inseticida pertence à classe das diacilhidrazinas, que atuam como agonista não esteroide de receptores de ecdisteroides e é considerado mais efetivo que os predecessores halofenoazida e tebufenoazida (Carlson *et al.* 2001). O modo de atuação do metoxifenoazida consiste na ligação ao receptor de ecdisteroides, iniciando assim o processo de ecdise. Por se tratar de uma ligação irreversível, a molécula não é eliminada do inseto. Dessa forma, não há uma redução dos níveis de ecdisterona (20 hidroxiecdisona) no inseto, o que impede a liberação do hormônio da ecdise, fazendo com que o inseto desenvolva a nova cutícula, irregularmente, não conseguindo sair do tegumento antigo. O desenvolvimento da larva é paralisado neste estágio, e o inseto morre, pois ela expelle o intestino posterior e perde o fluido de muda (Dhadialla *et al.* 1998).

O metoxifenoazida inibe a ecdise em larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) (Dhadialla *et al.* 1998). Além

destas, tem ação inseticida sobre a traça-do-tomateiro (Lepidoptera: Gelechiidae) lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae) (Ishaaya *et al.* 1995, Irac-Br 2019). Além de ser efetivo sobre vários insetos-praga, tem com vantagem o fato de aprestar baixa toxicidade a outros organismos, tornando-o atraente em programas de manejo integrado de pragas. No entanto, um dos grandes entraves no uso de inseticidas está a evolução da resistência (Swevers *et al.* 2008).

Resistência de *Tuta absoluta* a inseticidas

No final da revolução verde, que decorreu nos anos 70, o Brasil passou a adotar o sistema de monocultura com a expansão da agricultura, aumentando assim a produção, tornando-se um grande exportador agrícola. Com clima favorável o ano todo e o avanço da mecanização, o sistema de cultivo passou a ser de sobreposição e/ou sucessão, proporcionando assim o estabelecimento e aumento populacional de insetos-praga (Oliveira *et al.* 2014). Isso promoveu grandes perdas econômicas em produtividade agrícola, em especial para os tomaticultores, levando ao aumento no uso de inseticidas. No controle da *T. absoluta* no Brasil existem registrados e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) um total de 120 inseticidas nos grupos das diacilhidrazinas, avermectinas, benzoilureias, piretroides, tretranotriterpenoides, diamidas do ácido fitálico, tiocarbamatos, antranilamidas, oxadiazinas, milbemicinas, metilcarbamatos de oxima, análogos do pirazol, éter difenílicos e espinosinas, além dos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (AGROFIT 2019).

A capacidade herdada de um organismo em tolerar doses de um determinado xenobiótico que antes seriam letais para a maioria dos indivíduos da sua espécie, levando a uma alteração na sua frequência genética se denomina resistência (WHO 1957, Croft *et al.* 1988). A resistência é pré-adaptativa, progredindo com a pressão de seleção sobre as populações de insetos. A utilização

indiscriminada de inseticidas no processo de controle tem contribuído para a seleção sem precedentes de populações resistentes da traça-do-tomateiro ao longo do tempo. Foi relatado preliminarmente no Brasil casos de resistência de *T. absoluta* a metamidofós, permetrina, abamectina e cartape (Siqueira *et al.* 2000, Siqueira *et al.* 2001). Falhas de controle foram observadas com os inseticidas reguladores de crescimento teflubenzurom, diflubenzurom e triflummurom nas dosagens recomendadas pelo fabricante para o controle de *T. absoluta*, em campo (Silva *et al.* 2011). Castelo Branco *et al.* (2001) documentou a resistência de populações de *T. absoluta* a organofosforados e piretroides utilizando doses recomendadas para o controle da praga em campo, obtendo mortalidades de 67 e 0%, respectivamente. Mais recentemente, a traça-do-tomateiro tornou-se resistente a inseticidas mais novos como espinosade e espinetoram (Campos *et al.* 2015). Roditakis *et al.* (2015) fizeram o primeiro registro de resistência a diamidas em populações de casas de vegetação na Itália.

Relato de resistência a inseticidas reguladores de crescimento de insetos

O Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC – "Insecticide Resistance Action Committee") define a resistência como uma diminuição na suscetibilidade de uma determinada população de praga a um inseticida que é observada mediante fracassos repetidos de controle com o uso do mesmo inseticida. Na perspectiva de obter níveis populacionais abaixo do nível de dano econômico, o uso exacerbado de compostos inseticidas levou à seleção de indivíduos com capacidade de sobreviver a aplicação de inseticidas. Por se tratar de um processo natural resultante da pressão de seleção exercida sobre a variabilidade genética presente na população de inseto, a evolução da resistência de pragas a inseticidas tem-se tornado um dos grandes problemas em programas de controle de pragas envolvendo o uso de produtos químicos. Dessa

forma, diversos estudos são realizados para entender a evolução com o intuito de implementar estratégias para o manejo da resistência (Crow 1957).

De acordo com “Arthropod Pesticide Resistance Database” (2019), 71 casos de resistência a metoxifenoazida foram registrados, contudo, a *T. absoluta* não faz parte deste registro. No entanto, com a utilização de metoxifenoazida, populações de *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) apresentaram razão de resistência 14 e 16 vezes em relação à população suscetível de referência nos EUA (Mota-Sanchez *et al.* 2008). Estudos feitos evidenciaram a razão de resistência a dois inseticidas reguladores de crescimento, lufenurom e metoxifenoazida de apenas 2 a 7 vezes no Paquistão para a população de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Faheem *et al.* 2013). Para *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), na China, a razão de resistência foi muito alta, variando de 104 a 672 vezes, enquanto 13 gerações de seleção de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) para resistência a metoxifenoazida, no Paquistão, obteve uma razão de resistência de 2358 vezes em relação à população suscetível de laboratório. Para a *T. absoluta* no Brasil foi registrada uma razão de resistência de 222 vezes para triflumurom (Silva *et al.* 2011).

Mecanismos de resistência de insetos a inseticidas

Os principais mecanismos envolvidos na sobrevivência de insetos aos inseticidas envolvem a redução da penetração, diminuição da sensibilidade no sítio de ação e destoxificação enzimática dos inseticidas (Kongmee *et al.* 2004, Jallow & Hoy 2005). Assim sendo, estes podem atuar tanto de forma isolada ou associados e dessa forma proporcionar altos níveis de resistência a várias classes de inseticidas (Hemingway 2000, Hemingway *et al.* 2004). Quanto aos mecanismos de resistência metabólicos em insetos, três sistemas enzimáticos merecem destaque: esterase, glutatona S-transferases e monooxigenases e em muitos casos de resistência a inseticidas é

possível ver ou detectar alterações na quantidade dessas enzimas quando esta é comparada a homólogos mais sensíveis (Brown & Brogdon 1987, Hemingway 1989).

Um estudo anterior indicou que a oxidação é uma das principais vias de degradação em larvas de *S. exigua* selecionadas em laboratório (Smagghe 2004). As enzimas esterases e monooxigenases são de capital importância envolvidas sobretudo na destoxificação de tebufenozida, organofosforados e carbamatos tendo sido relatada em várias espécies de artrópodes (Andrews *et al.* 2004, Pan *et al.* 2010).

A glutathione S-transferase é uma enzima, cuja principal função é a de catalisar a conjugação de uma diversa gama de compostos eletrofílicos com glutathione. Em insetos, estudos sugerem que a GSTs desempenha um papel importante na resistência a várias classes de inseticidas, incluindo as diacilhidrazinas (Syvanen *et al.* 1996, Abel *et al.* 2004, Smagghe 2004). Relatos de resistência devido ao aumento da atividade de GST foram observados para estes inseticidas em *Plutella xylostella* (L.) (Huang *et al.* 1998), *Musca domestica* (L.) (Kristensen 2005), *Leptinotarsa decemlineata* e *Spodoptera exigua* (Hubner), (Smagghe 2004)

As monooxigenases dependentes de citocromo P450, também, fazem parte de um importante sistema metabólico envolvido na destoxificação de xenobióticos, incluindo inseticidas. Relatos do aumento da atividade de monooxigenases dependentes de citocromo P450 associado com a resistência aos inseticidas piretroides e neonicotinoide foram documentados em insetos, tais como *Culex pipiens pallens* (Caguilett) (Shen *et al.* 2003), *Blattella germanica* (Linnaeus) (Pridgeon *et al.* 2003), *B. tabaci* (Karunker *et al.* 2008) *P. xylostella* (Bautista *et al.* 2009), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Zhu *et al.* 2010) e *Phenacoccus solenopsis* (Afzal *et al.* 2015).

Relevância do estudo

A traça-do-tomateiro, *T. absoluta* é originária da América do Sul e rapidamente se espalhou pelo Brasil entre os anos de 1979 e 1980 (França & Branco 1992, Guedes & Picanço 2012). Tornou-se um problema mundial devido ao seu curto ciclo de vida e a alta capacidade reprodutiva, considerando-a de grande potencial de risco (Coelho & França 1987, Guedes *et al.* 1994). Dada a alta suscetibilidade a pragas e doenças, desordens fisiológicas e exigências nutricionais, a produção de tomate é considerada atividade de alto risco (Loos 2008). A *T. absoluta* é considerada severa relativamente as outras pragas, uma vez que a presença desta praga em campo durante todo o ciclo do tomateiro pode ocasionar perdas de até 100% da área plantada (López 1991, Apablaza 1992, Eppo 2005). A presença de *T. absoluta* em uma área de cultivo de tomate causa variação da produtividade, levando a redução do tamanho dos frutos ou frutos com deformações o que reflete diretamente no preço na hora da venda acarretando no aumento do custo de produção (Picanço *et al.* 2004). O controle químico ainda tem sido o principal método adotado contra este inseto-praga, que atualmente tem causado o aumento no número de aplicações destes inseticidas nos campos de tomate, que em repetitivas vezes passou de 10 aplicações para mais de 30 aplicações por ciclo de cultivo da cultura (Latorraca *et al.* 2008). Este uso indiscriminado resultou no rápido aparecimento de populações resistentes (Campos *et al.* 2015).

No Brasil, ainda, não há registro de resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida em campo, mas estudo em laboratório e não publicados recentemente por Silva (2012) relatou possíveis falhas de controle em curvas de dose respostas em populações de *T. absoluta* coletadas em campo e testadas com metoxifenoazida e com uma razão de resistência considerável. Para evitar a perda de eficiência deste produto que é excelente ferramenta para o Manejo Integrado de Pragas, é importante que se realize uma caracterização detalhada da resistência, antes que a mesma ocorra amplamente no campo, permitindo assim a geração de informações que possam ser aplicadas na

tomada de decisões para o controle dessa praga, tornando este inseticida sustentável e eficaz e que medidas proativas possam ser tomadas em programas de Manejo da resistência de insetos a inseticidas. O sucesso das técnicas de manejo da resistência a inseticidas depende de muitos fatores, como a compreensão do modo de herança e do mecanismo de resistência, entretanto, é necessária uma estratégia abrangente e sistemática para manejar e retardar o desenvolvimento da resistência a inseticidas (Roush & Miller 1986, Afzal *et al.* 2015). Sendo assim, a presente pesquisa teve como objetivo realizar a caracterização e monitoramento da resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida. Com a observação de altos níveis de resistência encontrados em curvas de dose recomendada, a população resistente passou a ser selecionada e submetida a caracterização genética da resistência, para averiguar se a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida está ligada ao sexo ou é autossomal, bem como estimar os valores dos graus médios de dominância, o número de genes envolvidos na resistência, mecanismos de resistência e por fim fazer o monitoramento da resistência.

Literatura Citada

- Abel, E.L., T.K. Bammler & D.L. Eaton. 2004.** Biotransformation of methyl parathion by glutathione s-transferases 1TKB and ELA contributed equally to this study. Current address: department of molecular carcinogenesis, MD Anderson cancer center, Smithville, TX 78957. *Toxicol. Sci.* 79: 224-232.
- Afzal, M.B.S., N. Abbas & S.A. Shad. 2015.** Inheritance, realized heritability and biochemical mechanism of acetamiprid resistance in the cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 122: 44-49.
- Agrofit. 2019.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <<http://agrofit.agricultura.gov.br>> Acesso em 06/10/2019.
- Andrews, M.C., A. Callaghan, L.M. Field, M.S. Williamson & G.D. Moores. 2004.** Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.* 13: 555-561.

- Apablaza, J. 1992** A polpa do tomate e o manjeriço Tattersal (em espanhol). *Pesqu. Agropec. Bras.* 79: 12-13.
- Barrientos Z., J. Apablaza H., A. Norero & P. Estay. 1998.** Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (lepidoptera: gelechiidae). *Agri.* 25: 133-137
- Bautista, M.A.M., T. Miyata, K. Miura & T. Tanaka. 2009.** RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 38-46.
- Biondi, A., R.N.C. Guedes, F.H. Wan & N. Desneux. 2018.** Ecology, Worldwide Spread, and Management of the Invasive South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta*: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Entomol.* 63: 239-258.
- Brown, T.M& W.G. Brogdon. 1987.** Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 145-162.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* 88: 405-412.
- Campos, M.R., A. Biondi, A. Adiga, R.N.C. Guedes & N. Desneux. 2017.** From the Western Palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. *J. Pest Sci.* 90: 787-796.
- Campos, R.G. 1976.** Control químico del “minador de hojas y tallos de la papa” (*Scrobipalpula absoluta* Meyrick) em el valle del cañete. *Rev. Per. Entomol.* 19: 102-106.
- Carlson, G.R., T.S. Dhadialla, R. Hunter, R.K. Jansson, C.S. Jany, Z. Lidert & R.A. Slaweki. 2001.** The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Manage. Sci.* 57: 115-119.
- Castelo Branco, M., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. *Hortic. Bras.* 19: 60-63.
- Coelho, M.C.F & F.H. França. 1987.** Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. *Pesqu. Agropec. Bras.* 22: 129-135.
- Croft, B.A., B.A. Roft & B. Van. 1988.** Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Appl. Acarol.* 4: 277-300.

- Crow, J.F. 1957.** Genetics of Insect Resistance to Chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 2: 227-246.
- Dhadialla, T.S., G.R. Carlson & D.P. Le. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 545-569.
- Desneux, N., M. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011a.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- Desneux, N., M.G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011b.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-Vasquez, J. Gonzalez-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83: 197-215.
- EPPO. 2005.** European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Tuta absoluta*. OEPP/EPPO Bull. 35: 434-435.
- Espinoza, W. 1991.** Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco. Brasília-DF: 301.
- Faheem, U., T. Nazir, M.A. Saleem, M. Yasin & M. Bakhsh. 2013.** Status of insecticide resistance in *Helicoverpa Armigera* (Hubner) in southern Punjab, Pakistan. *Sarh. J. of Agr.* 29: 563-572.
- FAO. 2018.** FAOSTAT Statistical Database. Food and Agricultural Organization, Rome.
- França, F. H. 1993.** Por quanto tempo conseguiremos conviver com a traça-do-tomateiro? *Hort. Bras.* 11: 176-178.
- França, F.H & M.C. Branco. 1992.** Ocorrência de traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. *Hortic. Bras* 10: 6-10.
- Garcia, M.F & J.C. Espul. 1982.** Bioecologia de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina. *Rev. Invest. Agropec. INTA* 18: 135-146.

- Guedes, R.N.C & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bul. 42: 211-216.
- Guedes, R.N.C., M.C. Picanço, A.L. Matioli & D.M. Rocha. 1994.** Effect of insecticide and tomato cultivation systems in the control of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). An. Soc. Entomol Brasil. 23: 321-325.
- Haji, F.N.P. 1992.** Histórico e situação atual da traça-dotomateiro nos perímetros irrigados do submédio São Francisco. In simpósio de controle biológico, Águas de Lindóia, SP. EMBRAPA-CNPDA. 3: 57-59.
- Hemingway, J. 1989.** A note on simple biochemical methods for resistance detection and their field application in Sri Lanka. Pestic. Sci. 27: 281-285.
- Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 1009-1015.
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 653-665.
- Huang, H.S., N.T. Hu, Y.E. Yao, C.Y. Wu, S.W. Chiang & C.N. Sun. 1998.** Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 651-658.
- IBGE. 2019.** Levantamento Sistemático da produção Agrícola. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em 3 de Fevereiro de 2019.
- Imenes, S.D.L., M.A.U. Fernandes, T.B. Campos & A.P. Takematsu. 1990.** Aspectos biológicos e comportamentais da traça-do-tomateiro *Scropipalpula absoluta* (Meyrick), (Lepidoptera: Gelechiidae). Arq. Inst. Biol. 57: 63-68.
- IRAC-BR. 2019.** Comitê Brasileiro de Ação à Resistência de Inseticidas. <https://www.irac-br.org/>.
- Ishaaya, I., S. Yablonski & H.A. R. 1995.** Comparative toxicity of 2 ecdysteroid agonists, RH-2485 AND RH-5992, on susceptible and pyrethroid-resistant strains of the egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. Phytop. 23: 139-145.
- kılıç, T. 2010.** First record of *Tuta absoluta* in Turkey. Phytoparasitica 38: 243-244.
- Kodandaram, M., A. Rai & J. Halder. 2010.** Novel insecticides for management of insect pest in vegetable crops: a review. Veget. Sci. 37: 109-123.

- Kristensen, M. 2005.** Glutathione S-transferase and insecticide resistance in laboratory strains and field populations of *Musca domestica*. J. Econ. Entomol. 98: 1341-1348.
- Larraín, P.S. 1986.** Plagas del tomate. IPA, La Platina. 39: 30-35.
- Latorraca, A., G.J.G. Marques, K.V. Sousa & N.S. Fornés. 2008.** Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. Com. Ciências Saúde. 19: 365-374.
- Loos, R.A., D.J.H. Silva, P.C.R. Fontes & M.C. Picanço. 2008.** Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro em ambiente protegido. Hortic. Bras. 26: 281-286.
- Lopes, M & P.C. Stripari. 1998.** A cultura do tomateiro. Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais. Fundação Editora da UNESP: 257-304p.
- López, E. 1991.** Polilla del tomate: Problema crítico para La rentabilidad del cultivo de verano. Emp. avan. Agric. 1: 6-7.
- Maitra, S., S.M. Dombrowski, M. Basu, O. Raustol, L.C. Waters & R. Ganguly. 2000.** Factors on the third chromosome affect the level of cyp6a2 and cyp6a8 expression in *Drosophila melanogaster*. Gene. 248: 147-156.
- Morais, G.J & J.A.N. Filho. 1982.** Surto de *Scropipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no Trópico Semi-árido. Pesqu Agropec. Bras. 17: 1.
- Mota-Sanchez, D., J.C Wise, R. Vander Poppen, L.J Gut & R. Hollingworth. 2008.** Resistance of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. Pest Manage. Sci. 64: 881-890.
- Muszinski, T., I.M. Lavendowski & L.M.A. Maschio. 1982.** Constatação de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) no litoral do Paraná. An. Soc. Entomol. Brasil. 11: 291-292.
- Nakano, O & A.D. Paulo. 1983.** A traças-do-tomateiro. Agroq. 20: 8-12.
- Oliveira, C., A.M. Auad, S. Mendes, & M. Frizzas. 2014.** Crop losses and the economic impact of insect pests on Braz. agric, vol. 56: 5054.
- Oliveira, F. A., D.J.H. da Silva, G.L.D. Leite, G.N. Jham & M. Picanço. 2009.** Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Sci. Hort. 119: 182-187.

- Pan, Y., Q. Shang, K. Fang, J. Zhang & J. Xi. 2010.** Down-regulated transcriptional level of Ace1 combined with mutations in Ace1 and Ace2 of *Aphis gossypii* are related with omethoate resistance. *Chem. Biol. Interact.* 188: 553-557.
- Picanço, M., G.L.D. Leite, R.N.C. Guedes & E.A. Silva. 1998.** Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. *Crop Prot.* 17: 447-452.
- Picanço, M., R.N. Guedes, G. Leão Demolin Leite, P. Cezar Resende Fontes & E. Antônio Silva. 1995.** Incidência de *Scrobipalpuloidea absoluta* em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e de controle químico. *Hort. Bras.* 13:180-183.
- Picanço, M.C., L. Bacci, A.L.B. Crespo, M.M.M. Miranda & J.C. Martins. 2007.** Effect of integrated pest management practices on tomato production and conservation of natural enemies. *Agric. For. Entomol.* 9: 327-335.
- Picanço, M.C., S.V. Paula, A.R.N. Junior, I.R. Oliveira, A.A. Semeão & J.F. Rosado. 2004.** Impactos financeiros da adoção de manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro. *Acta. Scient.* 26: 245-252.
- Pratissoli, D., J.R.P. Parra, O.A. Fernandes, R.C. Oliveira, H.B. Zago & F.F. Pereira. 2003.** Oviposition pattern of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera; Gelechiidae), on tomato under different population densities of adults in greenhouse. *Agri.Scient* 19: 11-15.
- Roditakis, E., E. Vasakis, M. Grispou, M. Stavrakaki, R. Nauen, M. Gravouil & A. Bassi. 2015.** First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest Sci.* 88 :9-16.
- Roques, A., M.A. Auger-Rozenberg, T.M. Blackburn, J. Garnas, P. Pyšek, W. Rabitsch, D. M. Richardson, M.J. Wingfield, A.M. Liebhold & R.P. Duncan. 2016.** Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biol. Invasions.* 18: 907-920.
- Roush, R.T & G.L. Miller. 1986.** Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.* 79: 293-298.
- Shaltiel-Harpaz, L., D. Gerling, S. Graph, H. Kedoshim, L. Azolay, T. Rozenberg, Y. Nachache, S. Steinberg, A. Allouche & T. Alon. 2015.** Control of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), in open-field tomatoes by indigenous natural enemies occurring in Israel, *Econ. Entomol.* 109 :120-131.

- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.** Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Manage. Sci. 67: 913-920.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Int. J. Pest Manage. 47: 247-251.
- Siqueira, H.Á. A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- Smagghe, G. 2004.** Synergism of diacylhydrazine insecticides with metyrapone and diethylmaleate. J. Appl. Entomol. 128: 465-468.
- Swevers, L., T. Soin, H. Mosallanejad, K. Iatrou & G. Smagghe. 2008.** Ecdysteroid signaling in ecdysteroid-resistant cell lines from the polyphagous noctuid pest *Spodoptera exigua*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38: 825-833.
- Syvanen, M., Z. Zhou, J. Wharton, V. Goldsbury & A. Clark. 1996.** Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. J. Mol. Evol. 43: 236-240.
- Tarlochan S. Dhadialla, a. Glenn R. Carlson & D.P. Le. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569.
- Tomé, H.V.V., E.M.G. Cordeiro, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2012.** Egg exposure to pyriproxyfen in the tomato leaf miner *Tuta absoluta*: ovicidal activity or behavioural-modulated hatching mortality? Ann. Appl. Biol. 160: 35-42.
- Torres, J.B., C. A. Faria, W.S. Evangelista & D. Pratisoli. 2001.** Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. Int. J. Pest Manage. 47: 173-178.
- Tunaz, H & N. Uygun. 2004.** Insect growth regulators for insect. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 28: 377-387.
- Uchôa-Fernandes, M.A., T.M.C.D. Lucia & E.F. Vilela. 1995.** Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) An. Soc. Entomol. Brasil. 24: 159-164.
- Urbaneja, A., H. Montón & O. Mollá. 2009.** Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. J. Appl. Entomol. 133: 292-296.

- Vargas, H.C. 1970.** Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Idesia* 1: 75-110.
- Williams, C.M. 1976.** Juvenile Hormone. In *Retrospect and in Prospect*. Springer US, Boston, MA. 1-14.
- WHO. 1957.** World Health Organization. Expert Committee on Insecticides: Seventh report.,. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. no. 125.
- Zhu, F., R. Parthasarathy, H. Bai, K. Woithe, M. Kaussmann, R. Nauen, D.A. Harrison & S.R. Palli. 2010.** A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 8557-8562.

CAPÍTULO 2

BASES DA RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A METOXIFENOZIDA E MONITORAMENTO¹

TEÓFILO P. LANGA¹

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

¹Langa, T.P. & H.A.A. Siqueira. Bases da resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a metoxifenoazida e monitoramento. A ser submetido ao Journal of Pest Science.

RESUMO - A *Tuta absoluta* (Meyrick), uma das pragas mais importantes de tomateiro em todo o mundo, é controlada pela aplicação de inseticidas. Os reguladores de crescimento de insetos têm sido um dos mais importantes grupos de inseticidas recomendados para o controle da *T. absoluta*. Metoxifenoazida é um inseticida não ecdisteroidal que atua como agonista de ecdisteroides nos receptores destes, sendo muito efetivo para o controle de insetos da ordem Lepidoptera e com baixa ou nenhuma letalidade para inimigos naturais. Para implementar um programa de manejo da resistência de *T. absoluta* a inseticidas, este trabalho teve como objetivo caracterizar genética e bioquimicamente a resistência da *T. absoluta* a metoxifenoazida, o perfil de resistência cruzada com outros grupos químicos e fazer o monitoramento desta. A resistência da *T. absoluta* a metoxifenoazida foi incompletamente recessiva, poligênica e autossômica. A dominância efetiva revelou que a dose 10 mg/L de metoxifenoazida seria suficiente para eliminar todos os suscetíveis, homozigotos e heterozigotos, sendo designada como dose diagnóstica para monitoramento da resistência. Houve um forte sinergismo da toxicidade de metoxifenoazida na população resistente com PBO (RS=95 vezes), DEF (RS=51 vezes) e DEM (RS=45 vezes), sugerindo o envolvimento de monooxigenases, esterases e glutathione S-transferases. As razões de resistência cruzada de GBN-Sel ao metoxifenoazida foram significativas em relação a JDR1-Sus para os inseticidas tebufenoazida, cartape, deltametrina, abamectina, lufenuron, indoxacarbe e não mostrou resistência com clorantprilprole, espinetoram, malation, metomil e clorfenapir.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-do-tomateiro, herança genética, resistência cruzada e metabólica

BASIS OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) RESISTANCE TO
METHOXYFENOZIDE AND MONITORING

ABSTRACT – *Tuta absoluta* (Meyrick), one of the most important tomato pests in the world, is strongly controlled by insecticide application. Insect growth regulators have been one of the most important insecticide groups recommended for *T. absoluta* control. Methoxyphenozide is a non-ecdysteroidal insecticide that acts as an ecdysteroid agonist at their receptors, being very effective for the control of Lepidoptera insects and with little or no lethality to natural enemies. In order to implement a program of management of the resistance of *T. absoluta* to insecticides, this work aimed to characterize genetically and biochemically the resistance of *T. absoluta* to methoxyphenozide, the cross-resistance profile with other chemical groups and to monitor it. The resistance of *T. absoluta* to methoxyphenozide was incompletely recessive, polygenic and autosomal. Effective dominance revealed that the 10 mg / L dose of methoxyphenozide would be sufficient to eliminate all susceptible homozygotes and heterozygotes and is designated as a diagnostic dose for resistance monitoring. There was a strong synergism of methoxyphenozide toxicity in the population resistant to PBO (RS = 95 times), DEF (RS = 51 times) and DEM (RS = 45 times), suggesting the involvement of monooxygenases, esterases and glutathione S-transferases. GBN-Sel cross-resistance ratios to methoxyphenozide were significant relative to JDR1-Sus only for the tebufenozide, cartape, deltamethrin, abamectin, lufenuron, indoxacarb insecticides and showed no resistance to chlorantraniliprole, spininetam, malationa, metomil and chlorphenapyr.

KEY WORDS: South American Tomato moth genetic inheritance, cross-resistance and metabolic

Introdução

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é uma das pragas mais destrutivas do tomateiro, *Solanum lycopersicum* (L.). Fora da América Neotropical, esta praga foi relatada na Espanha no final de 2006 (Urbaneja *et al.* 2007), espalhou-se ainda mais pelo litoral europeu e norte da Ásia (Desneux *et al.* 2011, Campos *et al.* 2017, Biondi *et al.* 2018). O custo de produção do tomate está diretamente relacionado com a ocorrência desta praga, por causar redução da produtividade e qualidade, podendo inclusive comprometer o retorno econômico da cultura. As pragas representam um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de tomate (Guedes & Picanço 2012).

O controle químico é o principal método de controle utilizado no manejo (Mohamed & Lobna 2012). Os inseticidas reguladores de insetos (IGRs) têm sido utilizados na agricultura e merecem destaque pelo controle efetivo de diversos insetos-praga. Este grupo atua em sistemas fisiológicos específicos dos insetos, com seletividade a inimigos naturais e baixa toxicidade a mamíferos. Dentre os IGRs, está o inseticida metoxifenoazida. Este é um inseticida acelerador de ecdise que imita o hormônio natural da muda dos insetos, a ecdisona, e que age especificamente sobre larvas de lepidópteros (lagartas).

O modo de ação do metoxifenoazida é através de forte ligação à proteína receptora de ecdisona (EcR), ativando-a e iniciando o processo da muda, denominado ecdise. Imediatamente após a ligação com o receptor de ecdisona, as larvas param de se alimentar e produzem uma nova cutícula, porém mal formada por baixo da antiga, sendo que as larvas morrem por inanição e desidratação (Dhadialla *et al.* 1998). O metoxifenoazida se liga ao receptor ecdisona de lepidópteros com aproximadamente seis vezes a afinidade do tebufenoazida e 400 vezes a afinidade do próprio 20-hidroxiectdisona (20E) (Wing 1988). Essa afinidade de ligação sub-nanomolar ao receptor de ecdisona em lepidópteros explica, sem dúvida, a alta eficácia do

metoxifenoazida (Wing *et al.* 1988, Wing & Aller 1989). Da mesma forma, sua afinidade muito menor para outros EcRs, como o *Drosophila* EcR (onde sua afinidade de ligação é apenas metade da 20E), provavelmente explica sua toxicidade geral muito menor para insetos não-lepidópteros (Le *et al.* 1996).

O metoxifenoazida (RH - 2485), foi anunciado pela primeira vez por Le e Cols em 1996 (Le *et al.* 1996, Carlson *et al.* 2001). O metoxifenoazida é altamente tóxico para uma variedade de larvas de lepidópteros economicamente importantes, conforme medido por estudos padrão de incorporação em dietas em laboratório. É particularmente notável a sua eficácia contra a lagarta da beterraba (*Spodoptera exigua* (Hubner)), a broca europeia (*Ostrinia nubilalis* (Hubner)) e a mariposa (*Laspeyresia* (*Cydia*) *pomonella* (L)). A toxicidade para larvas é altamente eficiente quando a exposição e a absorção ocorrem por ingestão. A captação cuticular é significativamente menos eficiente a este inseticida (Le *et al.* 1996, Carlson *et al.* 2001).

Vários casos de resistência já foram registrados, onde cerca 600 espécies de insetos-praga resistentes a um ou mais princípios ativos de inseticidas (Sparks & Nauen 2015). De acordo com Arthropod Pesticide Resistance Database (2019), o número total de casos de resistência já relatados para *T. absoluta* a inseticidas é de 51 casos, observadas em 16 diferentes ingredientes ativos como, abamectina, betaciflutrina, bifentrina, clorantulaniliprole, cloridrato de cartape, alfacipermetrina, deltametrina, diflubenzuron, flubendiamida, indoxacarbe, etofenprox, metaflumizona, permetrina, espinosade, teflubenzuron, triflumuron. Na resistência relatada não envolve o metoxifenoazida para a *T. absoluta*, entretanto, há diversos registros de evolução da resistência para outros reguladores de crescimento (RCI) como lufenuron em *Spodoptera exigua* (Ishaaya *et al.* 1995) e *Spodoptera frugiperda* (Nascimento *et al.* 2016), tebufenoazida para *Adoxophyes honmai* (Uchibori-Asano *et al.* 2019) e metoxifenoazida em particular para *S. litura*

(Saleem *et al.* 2015), *Spodoptera exigua* (Ishtiaq *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2014) e *Musca domestica* (Shah *et al.* 2015).

O metoxifenoazida está registrado no Brasil há 14 anos e deste então vem sendo recomendado para o controle de *T. absoluta*. Uma das ameaças à sustentabilidade e eficácia dos inseticidas RCI tem sido a possibilidade de rápida evolução da resistência, se as estratégias do manejo da resistência de insetos (MRI) forem negligenciadas. Diversos fatores genéticos, bioecológicos e operacionais favorecem a evolução da resistência (Georghiou & Taylor 1977, Roush & Daly 1991). Assim, para que esses inseticidas continuem atuantes é preciso que estratégias de manejo de resistência a inseticidas (MRI) sejam eficientes. Estudos básicos de evolução da resistência em populações de pragas são de extrema importância a fim de gerar informações que possibilitem o estabelecimento de programas de manejo da resistência. Esses programas são mais efetivos quando implementados de modo preventivo, ou seja, no início da evolução da resistência (Roush & Miller 1986, Roush & McKenzie 1987). Porém, pesquisas nesta área são iniciadas somente após a constatação de falhas no controle de uma praga com o uso de um determinado produto químico. Com isso, foram feitos estudos para caracterização genética de suscetibilidade para o monitoramento e detecção da evolução da resistência com vista a entender as bases da herança genética e bioquímica da resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida em uma população proveniente de campo. Foram testadas as seguintes hipóteses: 1. A resistência de *T. absoluta* ao metoxifenoazida é autossômica, recessiva e monofatorial. 2. Enzimas detoxificativas estão envolvidas na resistência. 3. Não há resistência ou baixa resistência cruzada entre o metoxifenoazida e outros grupos químicos de inseticidas.

Material e Métodos

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

Condições Experimentais. Os procedimentos de criação para *T. absoluta* foram baseados naqueles utilizados por Siqueira *et al.* (2000a). Foram utilizadas populações de *T. absoluta* provenientes das regiões do Sul, Centro-oeste e Nordeste. Os bioensaios foram alocados em câmaras de germinação do tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $65 \pm 5\%$, com fotofase de 12 horas.

Criação e Manutenção das Populações de *Tuta absoluta*. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de *T. absoluta* de segundo ínstar originárias de criações do Laboratório de Interações Inseto-Tóxicos da UFRPE. A coleta foi feita através da retirada de folhas infestadas, as quais foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório. Assim que as populações chegaram, os insetos foram confinados em gaiolas madeira e tela de organza de 45 x 45 x 45 cm de dimensão. As criações foram compostas por três gaiolas com tela anti-afídeo. Uma gaiola foi utilizada para oviposição e outra para alimentação de lagartas com folhas de tomateiro do cultivar “Santa Clara (IC11 5500)”, cultivadas em casa de vegetação sem tratamento com inseticidas.

Inseticidas. O metoxifenoazida (240 g a.i./L, suspensão concentrada, Corteva, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado nos testes de caracterização da resistência. Para a avaliação da resistência cruzada entre metoxifenoazida com outros inseticidas foram utilizados: tebufenoazida (240g/L, Suspensão Concentrada, Iharabras S.A. Indústrias químicas, Sorocaba/SP, Brasil) lufenurona (50g/L Concentrado Emulsionável, Syngenta proteção de cultivos, São Paulo, SP, Brasil)

abamectina (18 g a.i./L, concentrado emulsionável, Syngenta proteção de cultivos, São Paulo, SP, Brasil), clorfenapir (240 g i.a./L, suspensão concentrada, BASF S.A., São Paulo, Brasil), clorantianiliprole (200 g i.a./L, suspensão concentrada, FMC, Brasil, Barueri, SP, Brasil), cartape (500 g i.a./Kg, pó solúvel, Sumitomo Chemical, São Paulo, SP, Brasil), deltametrina (25 g i.a./L, concentrado emulsionável, Bayer S.A., Belford Roxo, RJ, Brasil), espinetoram (250 g i.a./Kg, granulado dispersível, Corteva, Franco da Rocha, SP, Brasil), indoxacarbe (300 g i.a./Kg, granulado dispersível, FMC, Brasil, Barueri, SP, Brasil), malation (1000 g i.a./L, concentrado emulsionável, Cheminova Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e metomil (215g/L, Concentrado Solúvel, Du Pont do Brasil S.A, Barueri – SP, Brasil).

Seleção para Resistência a Metoxifenoizida. A população Guaraciaba do Norte foi previamente identificada como resistente a metoxifenoizida e foi submetida a seleções contínuas com este inseticida. A cada geração, com base na CL_{50} uma nova concentração era utilizada para seleção com base em bioensaios de concentração-mortalidade. Por fim, a população vem sendo mantida sob seleção com 400mg metoxifenoizida/L.

Bioensaios de Concentração-Mortalidade. Folíolos do cultivar Santa Clara foram imersos por cinco segundos em concentrações (mg i.a./L de água) pré-definidas de inseticida diluído em água com a adição de espalhante adesivo 0,025% de Agr'óleo® (Gota Ltda, Contenda, PR, Brasil) como espalhante adesivo em seguida colocados para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, os folíolos foram transferidos para placas de Petri (80 x 15 cm), contendo papel-filtro umedecido com água destilada. No total, 10 larvas de segundo ínstar de *T. absoluta* foram transferidas cuidadosamente com auxílio de um pincel para cada folíolo. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada (BOD) a 25 ± 1 °C de temperatura, umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. A mortalidade foi avaliada após 96 horas através de estímulo mecânico,

sendo consideradas mortas as larvas que não conseguiram se locomover a distância equivalente ao comprimento do corpo. Os ensaios toxicológicos foram conduzidos com o uso do delineamento inteiramente casualizado com duas repetições, o experimento por completo foi repetido pelo menos uma segunda vez seguindo método utilizado por Campos *et al.* (2015). Os intervalos de concentrações utilizados para metoxifenoazida na população resistente foram de 25mg i.a./L a 6400 mg i.a./L e os bioensaios de suscetibilidade foram de 0,015625 mg i.a./L a 4 mg i.a./L.

Estudo da Herança Genética da Resistência a Metoxifenoazida. A população Guaraciaba do Note Seleccionada (GBN-Sel) de *T. absoluta* resistente a metoxifenoazida e uma população João Dourado Suscetível (JDR-sus) susceptível foram utilizadas nesta etapa. A dominância foi inicialmente determinada comparando-se as curvas concentração-resposta entre a população resistentes, suscetível e híbrida (Milani 1963). Foram realizados cruzamentos recíprocos entre as duas populações de *T. absoluta* resistente e suscetível GBN-Sel ♀ x JDR1-Sus ♂ e JDR1- Sus ♀ x GBN-Sel ♂. A sexagem foi feita no final do ciclo larval, com vista a chegar a fase adulta com machos virgens acasalando somente com fêmeas virgens da outra população e vice-versa. Nos experimentos de cruzamentos recíprocos utilizou-se pelo menos 90 casais. Para estimar o número de loci influenciando a resistência, a progênie F₁ dos cruzamentos recíprocos foi retrocruzada com a população resistente, sendo a descendência obtida deste cruzamento submetida a bioensaio de suscetibilidade com metoxifenoazida. A dominância estimada (*h*) da resistência a metoxifenoazida foi testada por meio de bioensaios de concentração-mortalidade com metoxifenoazida para os parentais (JDR1-Sus e GBN-Sel) e para as progênes F₁ dos cruzamentos recíprocos. Foram utilizadas dez concentrações de metoxifenoazida (1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25mg i.a./L), com o controle (compostos apenas por água mais o adjuvante. A base monogênica da resistência a metoxifenoazida foi testada no retrocruzamento entre indivíduos obtidos dos cruzamentos recíprocos com os parentais GBN-Sel e JDR1. Larvas de segundo ínstar obtidas do retrocruzamento foram

submetidas a bioensaio de concentração-mortalidade com metoxifenoazida. Foi realizado posteriormente o teste direto de herança para determinar qual dose mínima torna a resistência funcionalmente recessiva (dominância efetiva).

Ensaio de Sinergismo para Metoxifenoazida. A pesquisa do possível envolvimento de enzimas destoxicativas na resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida foram utilizados os inibidores enzimáticos dietil maleato (DEM), o butóxido de piperonila (PBO), e o *S,S,S*-tributil fosforotritioato (DEF). Larvas de segundo ínstar das populações resistente e suscetível foram usadas neste experimento, em tratamento apenas com metoxifenoazida, em tratamento com metoxifenoazida + PBO, metoxifenoazida + DEF, metoxifenoazida + DEM e o metoxifenoazida + PBO +DEF para detectar se o metabolismo está envolvido na resistência. Foram utilizados métodos de bioensaios descritos anteriormente, porém nos bioensaios utilizando sinergistas todas as larvas foram tratadas topicamente (0,25 µL/larva) com uma concentração de 1 µg/µL de PBO, DEF, DEM e PBO + DEF antes de expor as larvas ao metoxifenoazida e salientar que os sinergistas utilizados foram dissolvidos em acetona. A mistura de PBO+DEF foi feita devido a eficiência observada quando calculada a razão de resistência sinergizada, onde a proporção foi de 50% para cada um.

Resistência Cruzada. Foram usadas larvas de segundo ínstar em bioensaios de concentração-mortalidade com os inseticidas, tebufenoazida, Lufenuron, abamectina, cloridrato de cartape, clorfenapir, ciantraniliprole, clorantianiliprole, indoxacarbe, malation, Deltametrina, espinetoram e metomil para estabelecer o perfil de resistência cruzada com metoxifenoazida.

Coleta de Amostras para Análise de Atividade Enzimática. Vinte larvas de terceiro ínstar em triplicata foram acondicionadas em 500 µL do tampão fosfato pH 7,2 a 0,02M para análise de esterase e em 500 µL do tampão fosfato pH 6,5 a 0,1M para análise de glutathione *S*-transferase. As larvas foram maceradas, homogeneizadas e em seguida submetidas a centrifugação a 10 000 g por 15 minutos. Após a centrifugação o pellet foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para

quantificação de proteína e medição da atividade enzimática. A concentração de proteína foi determinada seguindo o método do ácido bicinonínico (Smith *et al.* 1985), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Atividade de Esterase. A atividade de esterase foi medida por meio do método adaptado de Van Asperen (1962). Foram testados dois substratos, o α -naftil acetato e o β -naftil acetato para avaliar as atividades de α -esterase e β -esterase, respectivamente. Em cada reação, 2 μ L de substrato a 25 mM, 20 μ L da amostra diluída de 1:100 e 188 μ L de tampão fosfato de sódio (pH 7,2, 0,02M) foram utilizados. As reações foram incubadas a 30 °C por 15 min. A reação foi paralisada utilizando 33,2 μ L de FAST Blue B a 0,3% em 3,5% de SDS. A absorbância foi lida a 595 nm para α -naftol e a 555 nm para β -naftol em leitora de microplacas (Synergy H1 Hybrid, Multi-Mode, BioTek®, USA).

Atividade de Conjugação por Glutathione S-transferase (GST). A atividade de GST foi determinada usando CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato na presença de glutathione S-transferase, formando 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (Habig *et al.* 1974). A solução CDNB (150 mM) foi preparada em etanol e a glutathione reduzida (10 mM) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 6,5). Para cada reação foram utilizados 180 μ L de tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 6,5), 20 μ L de amostra contendo proteína, 75 μ L de glutathione reduzida (10 mM) e 2 μ L de CDNB (150 mM). Em seguida as placas foram submetidas à incubação a 30 °C por 4 min. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione foi imediatamente medida a 340 nm usando a leitora de microplacas (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode, BioTek®, USA) com a reação sendo analisada durante 15 min com intervalos de leitura de 51 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os dados de Absorbância foram analisados após a adição de CDNB. A inclinação da reta (absorbância/min) foi transformada em unidade de concentração utilizando o coeficiente de extinção do CDNB ($9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Monitoramento por Dose Diagnóstica e Dose Recomendada. Os bioensaios foram conduzidos usando a concentração diagnóstica de 10 mg/L obtida em ensaios anteriores para a determinação da dominância efetiva. Foram feitos ensaios com a dose recomendada pelo fabricante do princípio ativo metoxifenoazida (120 mg/L) para detectar possíveis falhas de controle em campo pelo metoxifenoazida. Os experimentos foram realizados submergindo folíolos de tomate por um período de 5 segundos em solução contendo inseticida, e tanto nos tratamentos quanto no controle utilizou-se Agr'óleo® (Gota Ltda, Contenda, PR, Brasil) a 0,025% (concentração final) como espalhante. Após a secagem em temperatura ambiente, os folíolos foram colocados em placas de Petri (8 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura) contendo papel filtro umedecido com 400 µL de água destilada. Dez larvas de segundo ínstar em 10 repetições + controle foram transferidas para cada placa de Petri e, em seguida o bioensaio foi transferido para câmara de crescimento onde permaneceram por 96 h a 25 ± 1 °C, UR $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12:12 h. As avaliações foram realizadas com o auxílio de uma lupa (Opton 5x, Alemanha). O critério de sobrevivência de larvas baseou-se no caminhar o equivalente ao comprimento do seu corpo após serem estimuladas com um pincel de cerdas macias, sendo consideradas mortas as que não atingiram o critério.

Análise Estatística. Foi utilizado o programa POLO Plus (LeOra-Software 2005) para análise Probit dos dados de concentração-mortalidade e calcular as concentrações médias letais (valores de CL_{50}) e seus limites de confiança a 95% de probabilidade, como também as inclinações das curvas e seus respectivos erros padrões. O teste de igualdade e paralelismo, também, foi feito para as curvas obtidas nos dois híbridos utilizando o mesmo programa. As mortalidades observadas nos tratamentos foram corrigidas pela mortalidade do controle utilizando o método de Abbott (1925). Razões de resistência foram calculadas utilizando o “teste de razão letal” e foram considerados significativos quando o limite de confiança (LC) a 95% não inclui o valor 1 (Robertson *et al.* 2007).

O grau médio de dominância (D) da resistência a metoxifenoazida foi calculado de acordo com o método de Stone (1968), utilizando a fórmula $D = (2.L_2 - L_1 - L_3)/(L_1 - L_3)$, onde L_1 , L_2 e L_3 são o log dos valores das CL_{50s} de GBN-Sel, da F1 e de JDR1-Sus, respectivamente. Os valores de D podem variar de -1 a 1, onde -1 indica completa recessividade, 1 indica dominância completa e, 0 indica dominância intermediária ou co-dominância. A dominância estimada (h) foi calculada para cada concentração: $h = (w_{12} - w_{22})/(w_{11} - w_{22})$, onde w_{11} , w_{12} e w_{22} representam valores ligados ao desempenho para indivíduos homozigotos dominantes, heterozigotos, e homozigotos suscetíveis, respectivamente (Hartl 2001). O valor de fitness para os indivíduos homozigotos dominantes foi considerado 1,0; enquanto os valores para os heterozigotos e homozigotos recessivos foram calculados como a razão entre a taxa de sobrevivência observada da progênie F1 agrupada obtidas dos cruzamentos recíprocos e a taxa de sobrevivência da população GBN-Sel. Os valores de h variam de 0 a 1, onde $h = 0$ indica completa recessividade, $h = 1$ indica dominância completa e $h = 0,5$ indica dominância intermediária (co-dominância).

A hipótese da resistência monogênica a metoxifenoazida em *T. absoluta* foi testada inicialmente comparando as inclinações das curvas de concentração-mortalidade dos cruzamentos recíprocos F1 (entre as populações resistente e suscetível) e seu retrocruzamento. Os resultados do retrocruzamento foram comparados com os dados esperados utilizando o teste de χ^2 . O número mínimo de genes efetivos (nE) foi estimado com a fórmula $nE = (L_2 - L_1)^2 / (8\sigma_s^2) \leq n$, onde L_1 e L_2 são os logaritmos das CL_{50s} das populações JDR-Sus e GBN-Sel, respectivamente. O número de genes é n , e a variação genética extra segregada na geração do retrocruzamento além da F1 é σ_s^2 a qual pode ser estimada por $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - (\sigma_{F1}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{P1}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{P2}^2)$. Onde σ_{B1}^2 , σ_{B2}^2 , σ_{F1}^2 , σ_{P1}^2 e σ_{P2}^2 são as variações fenotípicas do F1 agrupado, do retrocruzamento (F1 agrupado x GBN-Sel) da população selecionada resistente GBN-Sel e por fim o retrocruzamento entre o F1 agrupado x JDR1-Sus da população sensível.

Teste T de duas amostras (PROC T-TEST) foi realizado usando SAS (SAS Institute 2008) para comparar os efeitos das atividades de enzimas metabólicas na resistência à metoxifenoza.

O número de sobreviventes necessários para apresentar significância foi determinado a 1% de frequência fenotípica $\alpha = 0,05$ (Roush & Miller 1986) para o inseticida e população. A probabilidade de falha de controle foi estimada comparando-se a mortalidade observada e a mortalidade corrigida com a eficácia mínima esperada necessária para registro de inseticidas pelo Ministério da Agricultura, que é de 80% de mortalidade (Gontijo 2013) utilizando o teste-*t* pareado de Student a $P < 0,05$.

Resultados

Herança da Resistência ao Metoxifenoza. A resistência da população GBN-Sel foi de 2.352 vezes mais resistente quando comparada a população suscetível JDR1-Sus (Tabela1) com base nos valores de CL₅₀. Os valores de CL₅₀ para F₁ (♀R x ♂S) e F₁' (♀S x ♂R) foram de 0,676 e 0,618 respectivamente, apresentando igualdade entre as curvas, havendo uma sobreposição dos seus limites de confiança a 95%. Desta forma, a hipótese da resistência autossomal foi confirmada descartando a possibilidade de ligação a sexo e efeito maternal. As razões de resistência dos cruzamentos recíprocos, F₁, F₁' e F₁ agrupado, foram de 3,81; 3,55 e 3,71 vezes, respectivamente.

A resposta da população JDR1-Sus e da F₁ e F₁' ao inseticida foram similares e próximas quando comparadas a população GBN-Sel (Tabela 1; Fig. 1), sugerindo uma resistência recessiva. Os graus de dominância (*D*) da resistência em *T. absoluta* foram de -0,65, -0,67 e -0,66 para F₁, F₁' e F₁ agrupado, respectivamente (Tabela 1). Tendo em consideração os erros padrões para cada valor de *D* e os limites de confiança [*D* ± 1,96*EP], calculados e interpretados de acordo com Robertson *et al.* (2007), a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoza foi incompletamente recessiva (Tabela 1).

O teste direto para a herança monogênica da resistência de *T. absoluta* ao metoxifenoazida sugeriu que mais de um gene está envolvido na resistência, pois das 20 concentrações utilizadas para realização do teste, 12 se mostraram significativas e em apenas 8 das concentrações testadas não houve diferenças significativas entre a mortalidade observada e a esperada (Tabela 2; Fig. 1). Com relação ao conjunto de concentrações utilizadas no teste direto da herança, estas se mostraram significativas ($\chi^2 = 152,5$; gl = 19; $P > 0,05$) (Tabela 2). O número mínimo de genes efetivos (nE) envolvidos na resistência ao metoxifenoazida foi de $0,70 \pm 0,23$.

A dominância efetiva (*h*) foi demonstrada testando-se onze diferentes concentrações, visando determinar a dose capaz de eliminar os indivíduos susceptíveis, permitindo a sobrevivência apenas de indivíduos homozigotos resistentes. Das concentrações testadas, 10 mg de metoxifenoazida/L foi a mínima que eliminou 100% de fenótipos suscetíveis (Tabela 3).

Sinergismo da Toxicidade da Metoxifenoazida. Houve sinergismo significativo da toxicidade do metoxifenoazida nas duas populações JDR1-Sus e GBN-Sel para os três inibidores enzimáticos utilizados, porém, este foi muito superior na população resistente do que na suscetível (Tabela 4). Os valores de razão de sinergismo foram de 6,90; 4,63 e 7,78 para JDR1-Sus, enquanto para GBN-Sel foram de 94,89; 50,88 e 45,24, mediante exposição ao inseticida com PBO, DEF e DEM, respectivamente (Tabela 4). As razões de resistência sinergizadas para o metoxifenoazida entre GBN-Sel e JDR1-Sus foram de 305,0 vezes para PBO; 381,9 vezes para DEF e 722,3 vezes para DEM (Tabela 4). A combinação de PBO + DEF sinergizou quase que completamente a toxicidade do metoxifenoazida, apresentando uma razão de resistência sinergizada de 8,35 vezes, sugerindo que a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida está provavelmente associada unicamente ao metabolismo destoxificativo.

Resistência Cruzada. O perfil de resistência cruzada entre o metoxifenoazida e outros inseticidas comparando as populações de GBN-Sel e JDR1-Sus (Tabela 5) mostrou valores de razão de

resistência $<1,0$ e $>1,0$. As razões de resistência cruzada de GBN-Sel foram significativas em relação a JDR1-Sus para os inseticidas tebufenozida, cartape, deltametrina, abamectina, lufenuron e indoxacarbe com valores de 656,0; 10,68; 4,70; 2,65; 2,22 e 1,92 vezes, respectivamente (Tabela 5). No entanto, apenas os valores de tebufenozida e cartape demonstraram alta e moderada resistência cruzada, respectivamente. Por outro lado, a razão de resistência cruzada de GBN-Sel em relação a JDR1-Sus para o inseticida espinetoram foi significativamente menor que 1,0 (RR = 0,32), sugerindo resistência cruzada negativa. Esta mesma tendência foi observada para clorantraniliprole (RR = 0,73), clorfenapir (RR = 0,72) e malation (RR = 0,74), porém não significativa. A resistência cruzada com metomil não foi significante, porém maior que 1,0.

Atividade de Enzimas Destoxificativas na Resistência de *Tuta absoluta*. Não houve diferença significativa entre a atividade de a-esterase das colônias suscetível ($1,05 \pm 0,37$) e resistente ($0,82 \pm 0,10$; $t(8) = -1,19$, $p = 0,268$). Houve uma diferença significativa entre a atividade de b-esterase das colônias suscetível ($1,69 \pm 0,75$) e resistente ($0,69 \pm 0,14$; $t(5,52) = -3,18$; $p = 0,021$). Não houve diferença significativa entre a atividade de GST das colônias suscetível ($5,59 \pm 2,22$) e resistente ($5,71 \pm 0,96$; $t(8) = 0,10$, $p = 0,921$), (Fig. 2).

Monitoramento por Dose diagnóstica e Dose Recomendada. Respostas diferenciadas de mortalidade das populações foram observadas tanto para a concentração diagnóstica quanto para a dose recomendada. Dentre as 19 populações de *T. absoluta* avaliadas, somente nove (João Dourado 1, Gameleira, Mogemirim, Mogemirim selecionada, Sumaré, Gameleira 2 selecionada, Iraquara, Iraquara nova, América dourada pesqueira, tiveram mortalidade acima de 80% na dose de campo (Fig 3A), e as demais sugerindo diferentes graus de falha de controle. O monitoramento com a dose diagnóstica mostrou que todas as populações já apresentavam uma frequência de resistência acima de 1% (Fig. 3B), exceto a população suscetível (JDR1).

Discussão

Inseticidas seletivos com modos de ação diferentes dos neurotóxicos são desejáveis em programas de manejo integrado de pragas (MIP). No Brasil, a metoxifenoazida está registrada há 14 anos para o controle de várias pragas, incluindo a *T. absoluta*. Embora esteja a ser utilizada a um tempo relativamente longo, poucos casos de resistência de insetos a este inseticida foram relatados, como por exemplo para a população de *Cydia pomonella* (Mota-Sanchez et al. 2008), *Spodoptera littoralis* (Mosallanejad & Smagghe 2009), *Helicoverpa armigera* (Faheem et al. 2013). Entretanto, este é o primeiro caso de caracterização da resistência do metoxifenoazida a *T. absoluta* a ser relatado. Os resultados de herança mostraram que a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida foi autossômica, seguindo um padrão genético mendeliano, incompletamente recessiva e polifatorial. A recessividade relatada neste estudo foi dependente da concentração do metoxifenoazida, sendo a resistência funcionalmente recessiva em 10 mg/L, sugerindo que as concentrações recomendadas em rótulo tornam a resistência em campo igualmente recessiva. No teste direto, as mortalidades observadas diferiram das esperadas na maioria das concentrações, descartando a hipótese inicial de resistência monofatorial. A resistência polifatorial além de ocorrer na natureza é bem comum ocorrer em laboratório (Liu et al. 1981, McKenzie et al. 1982). Estudos de laboratório feitos em população de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) com inseticidas da mesma classe sugeriram uma provável resistência controlada por mais de um gene (Sun et al. 2010). Embora a resistência controlada por multigenes possa se desenvolver mais lentamente do que a resistência controlada por um único gene no campo, os modos e padrões de resistência podem ser mais variáveis, e o manejo de resistência geralmente é mais difícil quando a resistência ocorre. Em contraste, a resistência monogênica é distribuída de maneira mais uniforme e é relativamente manejável com sinergistas ou rotação com outros inseticidas sem resistência cruzada (Zhang & Zhang 1994).

Para a avaliação preliminar de possíveis mecanismos de resistência cruzada foi observado o perfil de resistência cruzada. A resistência ao metoxifenoazida, acarretou também resistência a tebufenoazida. Esta resistência cruzada entre produtos do mesmo grupo foi observada anteriormente por Mosallanejad & Smagghe (2009). A seleção com metoxifenoazida, a população GBN-Sel não só aumentou o nível de resistência a esse inseticida como, também, aumentou a susceptibilidade a espinetoram, sugerindo resistência cruzada negativa. Porém, o perfil de resistência cruzada não mostrou resistência com clorantraniliprole, espinetoram, malation, metomil e clorfenapir.

A herança da resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida observada neste estudo (isto é, autossomal, recessiva e poligênica), bem como um perfil de resistência cruzada sugere que o mecanismo metabólico esteja envolvido na resistência de *T. absoluta* a este inseticida. Contrariamente a este estudo, pesquisa feita com tebufenoazida em *Adoxophyes honmai* Yasuda (Lepidoptera: Tortricidae), evidenciou uma mutação pontual (A415V) no gene do receptor de ecdisona (*EcR*), um fator candidato responsável pela resistência ao tebufenoazida (Uchibori-Asano *et al.* 2019). Um fator primário no uso de qualquer novo produto químico para controle de pragas de insetos é o desenvolvimento de cepas resistentes. Porém, para fazer o estudo sobre o papel da resistência metabólica na cepa selecionada, também foram realizadas experiências de sinergismo com inibidores enzimáticos conhecidos. Todos os sinergistas utilizados (PBO, DEM, DEF e PBO+DEF) aumentaram a toxicidade de metoxifenoazida. No entanto, a combinação de PBO + DEF sinergizou quase que completamente a toxicidade do metoxifenoazida, sugerindo que a resistência de *T. absoluta* a metoxifenoazida está provavelmente associada unicamente ao metabolismo destoxificativo. Isso implica que as oxidases de função mista podem estar envolvidas na resistência ao metoxifenoazida (Jia *et al.* 2009). A partir desses testes, foi demonstrado um efeito elevado do PBO no nível de resistência quando comparado com o

tratamento somente com inseticida, sugerindo que a destoxificação metabólica está associada a esta resistência, apoiando a importância da mediação da resistência de monooxigenases dependente do citocromo P450 na cepa selecionada. Estudos anteriores (Smagghe *et al.* (2003), Smagghe (2004)) indicaram o metabolismo oxidativo como a principal razão para o desenvolvimento de resistência a tebufenozida e metoxifenoza em *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).

A metoxifenoza (RH-2485) é um agonista ecdisteroide não esteroide com uma estrutura de dibenzoil-hidrazina, representando um grupo usado como novos inseticidas bioracionais no controle de pragas de insetos. Ficou evidente que o metoxifenoza esteja sendo bastante utilizado para o controle de *T. absoluta* em regiões onde a dose de campo e diagnóstica não ocasionaram mortalidade acima de 80%, o que nos sugere a falha no controle com a evolução da resistência. Estudos feitos anteriormente, evidenciaram falhas de controle por inseticidas tradicionais e novos para esta espécie (Silva *et al.* 2011), sendo essas geralmente associadas ao desenvolvimento de resistência. Embora algumas populações se mostraram resistentes a estes inseticidas, outras se mantiveram suscetíveis às doses recomendadas de metoxifenoza. Isto sugere que a resistência, ainda, não está amplamente difundida e, ainda, pode ser manejada em áreas onde as populações ainda estejam suscetíveis, para os quais é aconselhável utilizar doses diagnósticas para monitorá-las. O levantamento de suscetibilidade confirmou o desenvolvimento para alta resistência em populações de *T. absoluta* a metoxifenoza.

Com a presente pesquisa, conclui-se que o modo de herança da resistência de *T. absoluta* ao metoxifenoza é autossômica, incompletamente recessiva e poligênica. O monitoramento da resistência a este inseticida pode ser feito utilizando a dose discriminatória de 10 mg i.a metoxifenoza/L. Em áreas em que existe resistência ao metoxifenoza, podem ser utilizados inseticidas pertencentes às classes dos carbamatos, espinosinas, fosforados, oxadiazinas, pirazóis,

diamidas, os quais não apresentam resistência cruzada com o metoxifenoazida. Enzimas detoxificativas contribuem para a resistência de *T. absoluta* ao metoxifenoazida.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) mediante concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Biondi, A., R.N.C. Guedes, F.H. Wan & N. Desneux. 2018.** Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, Present, And Future. Annu. Rev. Entomol. 63: 239-258.
- Campos, M. R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Pest Sci. 88: 405-412.
- Carlson, G.R., T.S. Dhadialla, R. Hunter, R.K. Jansson, C.S. Jany, Z. Lidert & R.A. Slawecki. 2001.** The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. Pest Manage. Sci. 57: 115-119.
- Campos, M.R., A. Biondi, A. Adiga, R.N.C. Guedes & N. Desneux. 2017.** From the western palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. J. Pest Sci. 90: 787-796.
- Dhadialla, T. S., A. Glenn R. Carlson & D.P. Le. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569.
- Denholmi, I & M.W. Rowland. 1992.** Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. Annu. Rev. Entomol. 37: 91-112.
- Desneux, N., M. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in afro-eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. J. Pest Sci. 84: 403-408.

- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja. 2010.** Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control. J. Pest Sci. 83: 197-215.
- Dhadialla, T., S.A. Glenn R. Carlson & D.P. Le. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569.
- Ecole, C.C., M. Picanço, M.D. Moreira & S.T.V. Magalhães. 2000.** Componentes químicos associados à resistência de *Lycopersicon hirsutum* f. *typicum* a *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). An Soc. Entomol Brasil 29: 327-337.
- Faheem, U., T. Nazir, M.A. Saleem, M. Yasin & M. Bakhsh. 2013.** Status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) in southern Punjab, Pakistan. Sarh. J. Agr. 29: 563:572.
- Fernandes, F.L., B.L & F.M.S. 2010.** Impact and selectivity of insecticides to predators and parasitoids. Entomo. Brasilis 3: 01-10.
- Georghiou, G.P & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319-323.
- Guedes, R.N.C & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *tuta absoluta* in south america: pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bull. 42: 211-216.
- Hartl, D.L. 2001.** A primer of population genetics. J. Anim. Breed. Genet. 118: 234-234.
- Ishaaya, I., S. Yablonski & A.R. Horowitz. 1995.** Comparative toxicity of 2 ecdysteroid agonists, RH-2485 and RH-5992, on susceptible and pyrethroid-resistant strains of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. Phytoparasitica 23: 139-145.
- Ishtiaq, D., D.M.A. Saleem & M. Razaq. 2012.** Monitoring of resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of the southern Punjab, Pakistan to four conventional and six new chemistry insecticides. Crop Protect. 33: 13-20.
- Jallow, M.F. A & C.W. Hoy. 2005.** Phenotypic variation in adult behavioral response and offspring fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in Response to Permethrin. J. Econ. Entomol. 98: 2195-2202.

- Jia, B., Y. Liu, Y.C. Zhu, X. Liu, C. Gao & J. Shen. 2009.** Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manage. Sci.* 65: 996-1002.
- Kongmee, M., A. Prabaripai, P. Akratanakul, M.J. Bangs & T. Chareonviriyaphap. 2004.** Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Deltamethrin and Possible Implications for Disease Control. *J. Med. Entomol.* 41: 1055-1063.
- Lande, R. 1981.** The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541-553.
- Le, D.P., M. Thirugnanam, Z. Lidert, G.R. Carlson & J.B. Ryan. 1996.** RH-2485: a new selective insecticide for caterpillar control. *Pests and diseases 2: proceedings of an international conference, Brighton, UK, 18-21.*
- Liu, M.E.U., Y.J. Tzeng & C. Sun, N 1981.** Diamondback moth resistência a vários piretróides sintéticos. *J. Econo. Entomol.* 74: 393-396.
- Mckenzie, J.A., M.J. Whitten & M.A. Adena. 1982.** The effect of genetic background on the fitness of diazinon resistance genotypes of the australian sheep blowfly, *Lucilia Cuprina*. *Heredity.* 49: 1-9.
- Milani, R. 1963.** Genetical aspects of insecticide resistance. *Bull. W.H.O. Suppl:* 29: 77-87.
- Mohamed, B & H. Lobna. 2012.** Management of *Tuta absoluta* (lepidoptera, gelechiidae) with insecticides on tomatoes. *Intec.* 15: 334-354
- Mosallanejad, H & G. Smagghe. 2009.** Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pest Manage. Sci.* 65: 732-736.
- Mota-Sanchez, D., J.C Wise, R. Vander Poppen, L. J Gut & R. Hollingworth. 2008.** Resistance of codling moth, *Cydia pomonella* (l.) (lepidoptera: tortricidae), larvae in michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. *Pest Manage. Sci.* 64: 881-890.
- Nascimento, A.R.B.D., J.R. Farias, D. Bernardi, R.J. Horikoshi & C. Omoto. 2016.** Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manage. Sci.* 72: 810-815.
- Roush, R.T & G.L. Miller. 1986.** Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.* 79: 293-298.

- Roush, R.T & J.A. Mckenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Roush, R.T & J.C. Daly. 1990.** The role of population genetics in resistance research and management. *Pesticide resistance in arthropods.* Springer US, Boston, MA. 1: 97-152.
- Saleem, M., D. Husain, G. Ghouse, M. Abbas & S. Fisher. 2015.** Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. *Crop Protect.* 79: 177-184.
- Shah, R. M., N. Abbas, S.A. Shad & M. Varlound. 2015.** Inheritance mode, cross-resistance and realized heritability of pyriproxyfen resistance in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Acta Trop.* 142: 149-155.
- Silva, G.A., M.C. Picanço, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado & R.N.C. Guedes. 2011.** Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manage. Sci.* 67: 913-920.
- Siqueira, H.Á.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.
- Smagghe, G. 2004.** Synergism of diacylhydrazine insecticides with metyrapone and diethylmaleate. *J. Appl. Entomol.* 128: 465-468.
- Smagghe, G., S. Pineda, B. Carton, P.D. Estal, F. Budia & E. Viñuela. 2003.** Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manage. Sci.* 59: 1203-1209.
- Sparks, T.C & R. Nauen. 2015.** IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121: 122-128.
- Sun, J., P. Liang & X. Gao. 2010.** Inheritance of resistance to a new non-steroidal ecdysone agonist, fufenozide, in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 66: 406-411.
- Trisyono, A., B. Puttler & G.M. Chippendale. 2000.** Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomol. Exp. Appl.* 94: 103-105.
- Uchibori-Asano, M., T. Uchiyama, A. Jouraku, A. Ozawa, G. Akiduki, K. Yamamura & T. Shinoda. 2019.** Tebufenozide Resistance in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*

(lepidoptera: tortricidae): establishment of a molecular diagnostic method based on ecr mutation and its application for field-monitoring. Appl. Entomol. Zool. 54: 223-230.

Urbaneja, A., R. Vercher & V. Navarro. 2007. La Polilla Del Tomate, Tuta Absoluta. Phytoma Espana 194: 16–23.

Williams, C.M. 1976. Juvenile hormone. Retrospect and in prospect. Springer US, Boston, MA. 1-14.

Wing, K.D & H.E. Aller. 1989 ecdysteroid agonists as novel insect growth regulators, in pesticides and alternatives. Innovative chemical and biological approaches to pest control. J. Elsevier Press: 251–257.

Wing, K.D. 1988. RH-5849, A Nonsteroidal Ecdysone Agonist - Effects On A Drosophila Cell-Line. Science. 241: 467-469.

Wing, K. D., R.A. Slawecki & G. R. Carlson. 1988. RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist - effects on larval lepidoptera. Science 241: 470-472.

Zhang, P., M. Gao, W. Mu, C. Zhou & X.H. Li. 2014. Resistant levels of *spodoptera exigua* to eight various insecticides in Shandong, China. J. Pestic. Sci. 39: 7-13.

Zhang, Y.J & W.J. Zhang. 1994. Genetic and biological factors of influence of resistance development in cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Hübner). Pest. Sci. Admin. 15: 16–19.

1 Tabela 1. Toxicidade do metoxifenoazida em larvas de *Tuta absoluta* suscetíveis (S), resistentes (R), e cruzamentos recíprocos F1
2 (♀ R x ♂ S) e F1' (♀ S x ♂ R) e retrocruzamentos (F1 agrupado x GBN-Res) e (F1 agrupado x JDR1-Sus

População	n ²	χ^2 (GL) ³	Inclinação $\pm$ EP ⁴	CLC ₅₀ (LC _{95%}) ⁵	RR ₅₀ (IC _{95%}) ⁶	GD ₅₀ $\pm$ EP ⁷
JDR1-Sus	265	3,94 (7)	1,34 $\pm$ 0,14	0,174 (0,127 – 0,236)	---	-
GBN-Res	269	6,33 (7)	1,40 $\pm$ 0,15	409,55 (300,40 – 561,65)	2352,0 (1,516,6 – 3647,4)	-
♀ R x ♂ S (F1) ¹	299	4,82 (13)	1,31 $\pm$ 0,13	0,676 (0,468 – 0,978)	3,89 (2,40 – 6,28)	-0,65 $\pm$ 0,37
♀ S x ♂ R (F1') ¹	300	9,23 (13)	1,14 $\pm$ 0,11	0,619 (0,415 – 0,919)	3,55 (2,15 – 5,87)	-0,67 $\pm$ 0,29
F1 agrupado ¹	599	13,03 (13)	1,22 $\pm$ 0,09	0,647 (0,481 – 0,870)	3,71 (2,46 – 5,60)	-0,66 $\pm$ 0,24
F1 agrupado x JDR1-Sus ¹	236	1,43 (10)	1,46 $\pm$ 0,17	0,146 (0,100 – 0,208)	0,84 (0,52 – 1,35)	
F1 agrupado x GBN-Res ¹	389	4,39 (18)	1,42 $\pm$ 0,14	3,508 (2,462 – 5,011)	20,14 (12,59 – 32,24)	-

3 ¹Progênes resultantes de cruzamentos recíprocos e retrocruzamentos; ²n, número de larvas por bioensaio; ³ χ^2 , Qui-quadrado e grau de
4 liberdade; ⁴SE – Erro padrão; ⁵LC – concentração letal (mg de metoxifenoazida /L); ⁶Razão de resistência: razão entre os valores
5 estimados de CL₅₀ entre a cepa suscetível e resistente e o intervalo de confiança a 95% calculado usando Robertson *et al.* (2007); ⁷Grau
6 de dominância.
7

8 Tabela 2. Teste indireto para herança monofatorial da resistência de *Tuta absoluta* à
9 metoxifenoazida, comparando mortalidades esperadas e observadas de retrocruzamento (F1
10 agrupado x GBN-Res).

Concentrações (mg/L)	Mortalidade Observada (%)	Mortalidade Esperada (%) ¹	χ^2
0,012	0,00	0,00	5,00*
0,024	0,00	5,00	6,25*
0,049	0,00	6,25	10,00*
0,098	0,00	10,00	4,19*
0,195	5,26	12,50	0,10ns
0,391	15,00	16,25	0,09ns
0,781	21,05	22,50	0,05ns
1,563	30,00	31,25	1,50ns
3,125	45,00	37,50	2,89ns
6,25	55,00	43,75	11,22*
12,5	73,68	50,00	18,80*
25	85,00	53,33	33,14*
50	100,00	56,67	21,23*
100	100,00	63,33	16,67*
200	100,00	66,67	12,86*
400	100,00	70,00	7,10*
800	100,00	76,67	1,54 ns
1600	100,00	88,33	0,12 ns
3200	100,00	96,55	0 ns
6400	100,00	100,00	5*
Total	-	-	152,75*

11 ¹Mortalidade esperada em cada concentração $x = 0.5$ (% de mortalidade em F1 agrupado em $x +$
12 % de mortalidade em x para GBN-Sel). ^{ns} Não significativo e *significativo a 5% de probabilidade
13 com base no teste do Qui-quadrado.

14

Tabela 3. Dominância efetiva para populações suscetível (JDR1-Sus), resistente (GBN-Sel), e progênie F₁ agrupada em *Tuta absoluta* submetidas a diferentes concentrações de metoxifenoazida.

Concentração (mg/L)	População/Progênie ¹	n	Sobrevivência (%)	Desempenho ²	<i>h</i> ³
1,25	JDR1-Sus	30	93,33	0,067	0,893
	F1 agrupado	30	10,00	0,900	
	GBN-Sel	30	0,00	1,000	
2,50	JDR1-Sus	31	100,00	0,000	0,733
	F1 agrupado	30	26,67	0,733	
	GBN-Sel	30	0,00	1,000	
5,00	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,567
	F1 agrupado	30	43,33	0,567	
	GBN-Sel	30	0,00	1,000	
7,50	JDR1-Sus	31	100,00	0,000	0,267
	F1 agrupado	30	73,33	0,267	
	GBN-Sel	30	0,00	1,000	
10,0	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	31	100,00	0,000	
	GBN-Sel	29	0,00	1,000	
12,5	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	30	100,00	0,000	
	GBN-Sel	28	0,00	1,000	
15,0	JDR1-Sus	29	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	29	100,00	0,000	
	GBN-Sel	29	0,00	1,000	
17,5	JDR1-Sus	29	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	30	100,00	0,000	
	GBN-Sel	29	0,00	1,000	
20,0	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	30	100,00	0,000	
	GBN-Sel	30	0,00	1,000	
22,5	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	30	100,00	0,000	
	GBN-Sel	29	3,45	0,966	
25,0	JDR1-Sus	30	100,00	0,000	0,000
	F1 agrupado	29	100,00	0,000	
	GBN-Sel	30	10,00	0,900	

¹JDR1-Sus e GBN-Sel são as populações suscetíveis e resistentes, respectivamente; F1 agrupado corresponde a soma dos indivíduos híbridos provenientes dos cruzamentos recíprocos entre as populações parentais. ²Desempenho correspondente a taxa de sobreviventes entre as populações suscetíveis (JDR1-Sus) e F1 agrupado, e a população resistente (GBN-Sel). ³Os valores de *h* variam entre 0 (recessividade completa) e 1 (dominância completa). Resistência é codominante ou aditiva se o valor *h* corresponder a 0,5, incompletamente recessiva se entre 0 < *h* < 0,5, e incompletamente dominante se entre 0,5 < *h* < 1.

Tabela 4. Sinergismo da toxicidade de metoxifenoazida em populações suscetível e resistente de *Tuta absoluta*.

População	Tratamento	N ¹	Inclinação ± EP ²	CL ₅₀ (CL95%) ³	χ ² GL ⁴	RS ₅₀ (CI95%) ⁵	RR ₅₀ (CI95%) ⁵
JDR1-Sus	Metoxifenoazida	180	1,34 ± 0,18	0146 (0,097 – 0,214)	2,81 (7)	---	---
	+ PBO	194	1,62 ± 0,23	0,021 (0,012 – 0,035)	13,60 (8)	6,90 (4,16 – 11,45) *	---
	+ DEF	197	1,49 ± 0,19	0,032 (0,018 – 0,053)	13,54 (8)	4,63 (2,77 – 7,72) *	---
	+ DEM	197	2,59 ± 0,39	0,019 (0,014 – 0,025)	8,56 (8)	7,78 (4,96 – 12,20) *	---
	+ PBO+DEF	200	1,81 ± 0,25	0,024 (0,018 – 0,032)	3,65 (8)	6,17 (3,80 – 10,02) *	---
GBN-Res	Metoxifenoazida	178	1,35 ± 0,17	614,78 (421,11 – 924,02)	3,73 (7)	---	4199,3 (2422,2 – 7280,1) *
	+ PBO	199	1,67 ± 0,24	6,47 (4,36 – 9,09)	2,18 (8)	94,99 (55,98 – 161,19) *	305,0 (188,2 – 494,3) *
	+ DEF	200	1,46 ± 0,18	12,08 (8,17 – 17,29)	1,30 (8)	50,88 (29,75 – 87,01) *	381,9 (232,2 – 628,1) *
	+ DEM	195	1,35 ± 0,17	13,59 (8,99 – 19,84)	4,32 (8)	45,24 (26,08 – 78,46) *	722,3 (460,3 – 1133,5) *
	+ PBO+DEF	183	1,69 ± 0,23	0,198 (0,137 – 0,275)	1,81 (7)	3103,4 (1849,1 – 5208,5) *	8,35 (5,34 – 13,06) *

25 ¹Número de larvas. ² Erro padrão. ³ mg metoxifenoazida/L e limite de confiança de 95%. ⁴ Qui-quadrado e Grau de Liberdade. ⁵ RS₅₀
26 (Razão de sinergismo) e RR (Razão de resistência) calculada pelo método de Robertson *et al.* (2017). * Razão de sinergismo
27 significativa se o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0.

Tabela 5. Resistência cruzada de metoxifenoazida em *Tuta absoluta*.

População	Inseticidas	N ¹	Inclinação ± EP ²	CL ₅₀ (CI95%) ³	χ ² GL ⁴	RR ₅₀ (CL95%) ⁵
JDR1-Sus	Metoxifenoazida	184	1,68 ± 0,21	0,117 (0,083 – 0,163)	1,43 (7)	---
	Tebufenozida	202	0,87 ± 0,12	1,110 (0,667 – 1,949)	4,06 (8)	---
	Cartape	221	1,24 ± 0,14	2,20 (1,49 – 3,25)	8,29 (9)	---
	Deltametrina	180	1,06 ± 0,15	6,62 (3,55 – 12,63)	8,36 (7)	---
	Abamectina	182	2,70 ± 0,41	0,019 (0,015 – 0,024)	2,66 (7)	---
	Lufenuron	203	1,08 ± 0,14	87,43 (54,66 – 134,57)	6,14 (8)	---
	Indoxacarbe	182	2,81 ± 0,46	0,11 (0,09 – 0,15)	1,88 (7)	---
	Methomil	182	1,63 ± 0,21	53,13 (36,98 – 74,36)	2,59 (7)	---
	Malationa	200	1,98 ± 0,25	215,13 (145,37 – 328,58)	9,69 (8)	---
	Clorantilanilprole	221	2,18 ± 0,25	0,096 (0,068 – 0,137)	10,12 (9)	---
	Clorfenapir	183	2,54 ± 0,38	1,69 (1,27 – 2,21)	1,89 (7)	---
	Spinetoram	201	1,39 ± 0,16	0,095 (0,065 – 0,137)	2,87 (8)	---
GBN-Res	Metoxifenoazida	181	1,29 ± 0,17	316,24 (210,42 – 468,06)	2,51 (7)	2694,9 (16076 – 4517,6)
	Tebufenozida	181	1,20 ± 0,16	728,12 (476,66 – 1100,56)	3,73 (7)	656,0 (336,6 – 1278,3) *
	Cartape	183	1,95 ± 0,27	23,51 (16,87 – 31,88)	0,67 (7)	10,68 (6,48 – 17,60) *
	Deltametrina	173	1,19 ± 0,19	31,08 (15,18 – 121,98)	11,40 (7)	4,70 (2,26 – 9,77) *
	Abamectina	182	2,02 ± 0,27	0,050 (0,036 – 0,067)	5,60 (7)	2,65 (1,83 – 3,82) *
	Lufenurona	182	1,08 ± 0,15	194,48 (122,23 – 304,31)	6,96 (7)	2,22 (1,18 – 4,18) *
	Indoxacarbe	182	1,75 ± 0,23	0,215 (0,151 – 0,297)	5,76 (7)	1,92 (1,26 – 2,92) *
	Metomil	222	1,25 ± 0,14	87,90 (59,61 – 129,39)	8,90 (9)	1,66 (0,99 – 2,78)
	Malationa	200	0,96 ± 0,13	158,46 (84,23 – 333,80)	10,13 (8)	0,74 (0,41 – 1,32)
	Clorantilanilprole	222	1,33 ± 0,15	0,069 (0,048 – 0,100)	2,95 (9)	0,73 (0,46 – 1,15)
	Clorfenapir	183	342 ± 0,58	1,22 (0,96 – 1,55)	0,42 (7)	0,72 (0,51 – 1,04)
	Espinetoram	201	1,50 ± 0,22	0,03 (0,019 – 0,043)	1,65 (8)	0,32 (0,18 – 0,54) *

¹ Número total de larvas utilizadas no bioensaio. ² Erro padrão. ³ mg i. a./L e limite de confiança de 95%. ⁴ Qui-quadrado e Grau de liberdade. ⁵RR₅₀: Razão de resistência calculada pelo método de Robertson *et al.* (2017). * Razão de sinergismo significativa se o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0.

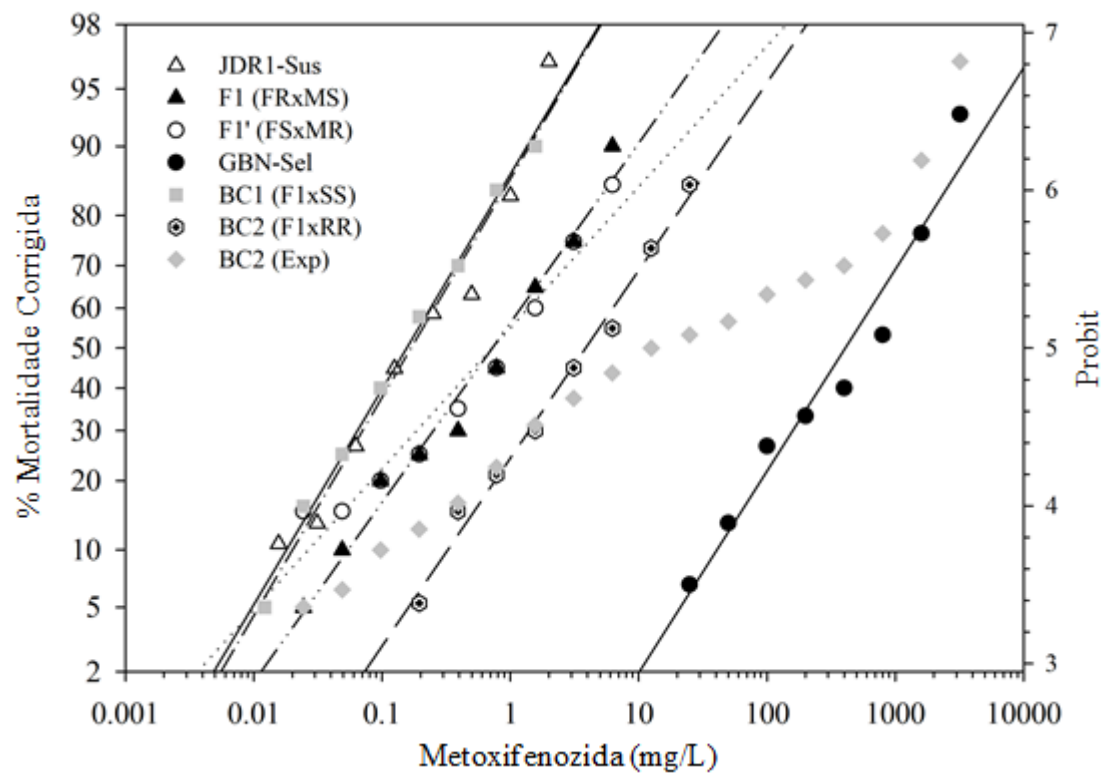


Figura 1. Herança da resistência de *Tuta absoluta* a metoxifenoza.

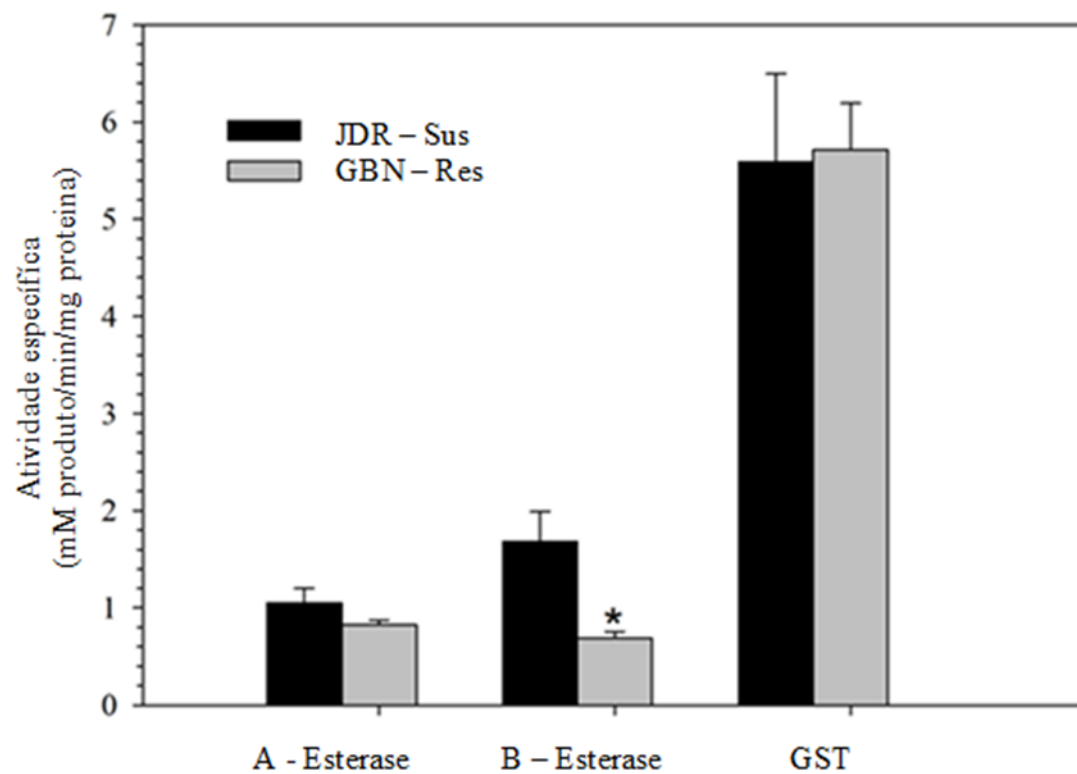


Figura 2. Média ($\pm$ EP) de atividade metabólica de enzimas em populações suscetível e resistente de *Tuta absoluta*.

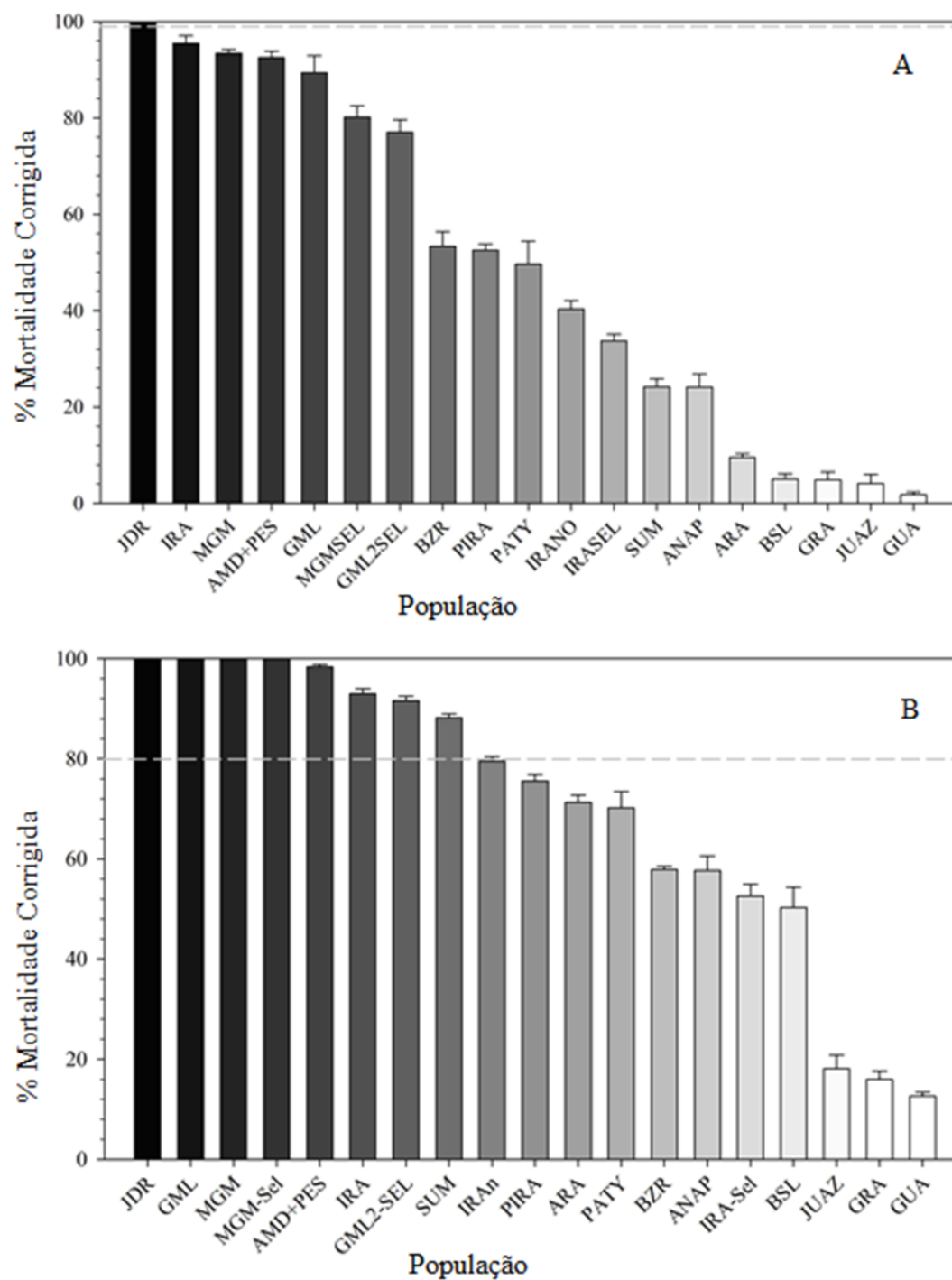


Figura 3. Monitoramento de populações de campo de *Tuta absoluta* usando (A) dose diagnóstica (10 mg metoxifenozyde/L) e (B) dose de rótulo (120 mg metoxifenozyde/L). Linha tracejada em (A) significa pelo menos 1% de frequência de resistentes. Linha tracejada em (B) significa pelo menos 80% de eficácia esperada de acordo com as exigências regulatórias no Brasil (MAPA, 2019).

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inseticidas seletivos com modos de ação diferentes dos neurotóxicos são altamente desejáveis em programas de manejo integrado de pragas (MIP). A *Tuta absoluta* é uma das pragas mais importantes para a cultura do tomateiro no Brasil. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo primordial caracterizar a resistência da traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, ao metoxifenoazida. Embora a resistência a este inseticida não tenha sido relatada em *T. absoluta*, é importante o levantamento da resistência e posterior caracterização. É o primeiro relato de caracterização de uma população resistente desta praga a este grupo inseticida. A resistência de *T. absoluta* ao metoxifenoazida é autossomal, recessiva e polifatorial ou provavelmente governada por poucos genes. Tais características sugerem a razão pela qual a resistência dessa praga em campo não tem sido reportada. A dominância efetiva nos mostrou que a dose 10 mg/L de metoxifenoazida seria suficiente para eliminar todos os suscetíveis homozigotos e heterozigotos, mas não há como transpor tal resultado para campo pelas condições diferentes do laboratório. Porém, a dose do produto recomendada em rótulo de 240g/L, i. é, cerca de 24 vezes maior, o que sugere tornar a resistência funcionalmente recessiva em campo.

O grau de toxicidade do metoxifenoazida foi sinergizada em ambas populações suscetível e resistente, no entanto este foi superior na população resistente. O sinergismo sugeriu que hidrolases, glutathione S-transferases e monooxigenases, provavelmente estão envolvidas na resistência ao metoxifenoazida.

Uma série de estudos têm sido conduzidos recentemente com *T. absoluta* no que diz respeito à sua resistência a inseticidas. Este estudo vem contribuir com mais informações a

programas de manejo de resistência desta praga a inseticidas. Apesar do tempo de uso do metoxifenoazida, não havia respostas quanto à herança da resistência desta praga ao metoxifenoazida, metabolismo e sua relação com outras moléculas. Porém, o perfil de resistência cruzada não mostrou resistência com clorfantriliprole, espinetoram, malation, metomil e clorfenapir, sendo que recomenda-se a rotação destes produtos após a aplicação de metoxifenoazida. Foi observada uma baixa resistência cruzada com deltametrina, abamectina, lufenuron, indoxacarbe, que sugere o não uso destes produtos após aplicação do metoxifenoazida. Um dos fatores mais importantes da resistência a insetos é o aumento dos processos metabólicos, levando à maior desintoxicação de inseticidas por enzimas como MOs, GSTs e esterases. Associado a um regime de rotação, respeitando a dose recomendada de metoxifenoazida, pois provável que torne a resistência funcionalmente recessiva em campo e monitorando a resistência com a dose diagnóstica sugerida neste estudo. O uso das boas práticas agrícolas associadas ao manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro contribuirá para uma maior vida útil do metoxifenoazida e diminuir os impactos no meio ambiente decorrentes da resistência de pragas a inseticidas.