

MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA TRAÇA-DO-  
TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS

por

JEFFERSON ELIAS DA SILVA

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

RESUMO

A *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é atualmente uma das pragas mais importantes para a cultura do tomateiro no Brasil, mas tem ganhado destaque no cenário mundial principalmente depois da sua introdução em alguns países europeus, no Norte da África, Oriente Médio e em países vizinhos a China, maior produtor mundial de tomate. As diamidas são os inseticidas mais novos utilizados para o controle desta espécie. Na fase inicial de registro, esses inseticidas apresentaram um controle bastante efetivo, com uma resposta homogênea em baixas doses. No entanto, após dois anos de uso, surgiram então os primeiros relatos de falhas de controle. Diante disso, o objetivo do nosso estudo foi identificar populações resistentes a esses inseticidas, e posteriormente caracterizar geneticamente essa resistência. As populações de *T. absoluta* submetidas aos primeiros experimentos apresentaram variações significativas em resposta às diamidas, com níveis de resistência heterogênea ao clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida com razões de resistência baseadas nos valores das  $CL_{50}$  chegando a 288.995 vezes para clorantraniliprole, 18.423 para ciantraniliprole e 80.413 para flubendiamida. Após ser submetida a seleções sucessivas com doses crescentes de clorantraniliprole a população de América Dourada (AMD) mostrou o mais alto nível de resistência já mencionado para clorantraniliprole com uma razão de resistência de 1.076.957 vezes, e a seleção desta população em

laboratório aumentou ainda mais o nível de resistência a ciantraniliprole e flubendiamida, constatando a resistência cruzada entre esses inseticidas. Entretanto, não foi observada resistência cruzada com outras classes de inseticidas. A caracterização da resistência de *T. absoluta* a diamidas foi autossômica, incompletamente recessiva e monogênica. Não houve uma associação direta dos níveis de resistência observados com a atividade enzimática, indicando que o metabolismo não está envolvido com a resistência de *T. absoluta* a diamidas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle químico, resistência cruzada, herança genética, metabolismo, clorantraniliprole.

MONITORING AND CHARACTERIZATION OF RESISTANCE OF TOMATO PINWORM,  
*Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) POPULATIONS TO  
DIAMIDES

por

JEFFERSON ELIAS DA SILVA

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

ABSTRACT

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is currently one of the most important pests for tomato growing in Brazil, but it has gained prominence in the world scenario mainly after its introduction in some European countries, North Africa, East and in neighboring countries China, the world's largest tomato producer. Diamides are the newest insecticides used to control this species. In the initial registration phase, these insecticides showed a very effective control, with a homogeneous response at low doses. However, after two years of use, the first reports of control failures emerged. Therefore, the objective of our study was to identify populations resistant to these insecticides, and later to characterize this resistance genetically. The populations of *T. absoluta* submitted to the first experiments presented significant variations in response to diamides, with heterogeneous resistance levels to chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide with resistance ratios based on LC<sub>50</sub> values reaching 288,995 times for chlorantraniliprole, 18,423 for cyantraniliprole and 80,413 to flubendiamide. After being subjected to successive selections with increasing doses of chlorantraniliprole the population of America Dourada (AMD) showed the highest level of resistance already mentioned for chlorantraniliprole with a resistance ratio of 1,076,957 times, and the selection of this

population in laboratory has also increased plus the level of resistance to cyantraniliprole and flubendiamide, noting the cross-resistance between these insecticides. However, no cross-resistance was observed with other classes of insecticides. The characterization of the resistance of *T. absoluta* to diamidas was autosomal, incompletely recessive and monophatorial. There was no direct association of resistance levels observed with enzyme activity, indicating that metabolism is not involved with *T. absoluta* resistance to diamides.

**KEY WORDS:** Chemical control, cross-resistance, genetic inheritance, metabolismo, chlorantraniliprole.

MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA TRAÇA-DO-  
TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS

por

JEFFERSON ELIAS DA SILVA

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

RECIFE - PE

Fevereiro – 2018

MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA TRAÇA-DO-  
TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS

por

JEFFERSON ELIAS DA SILVA

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Lílian Maria da Solidade Ribeiro - UFRPE

MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA TRAÇA-DO-  
TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS

por

JEFFERSON ELIAS DA SILVA

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

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Lílian Maria da Solidade Ribeiro - UFRPE

\_\_\_\_\_  
Jorge Braz Torres - UFRPE

\_\_\_\_\_  
Wellington Marques da Silva – IBGM

\_\_\_\_\_  
Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes– FIOCRUZ/IAM

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Luiz Elias da Silva e Jane Marques Brito da Silva** pela criação, educação e apoio constante.*

*Dedico*

*Aos meus irmãos **Jeffter Elias da Silva e Liêdja Marques da Silva**, e ao meu amável sobrinho **Liendel Vinícius Marques do Nascimento**.*

*Ofereço*

*À **Deus** por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.*



## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, pela oportunidade de realização deste curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo, contribuindo desta forma para o desempenho do trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, pela orientação na minha formação desde o fim da graduação até os dias atuais.

Ao Prof. José Vargas de Oliveira, pela amizade e orientações.

Aos Professores de Entomologia Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo conhecimento adquirido durante a minha formação.

Ao meu pai Luiz Elias da Silva, pelo carinho e apoio durante a minha formação.

A minha irmã Liêdja Marques da Silva, ao meu irmão Jeffter Elias da Silva e ao meu amável sobrinho Liendel Vinícius Marques do Nascimento pelo carinho e alegria que me proporcionam.

Aos colegas de laboratório Natália Bermudez, Paolo Augustus, Daniel, Lílian, Débora, Liliane e Paulo.

Aos colegas egressos Natália Vinasco e Jaconias Escócio.

A Carla Patrícia pela efetiva ajuda no primeiro artigo.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	1
LITERATURA CITADA.....	13
2 RESISTÊNCIA EVOLUÍDA EM CAMPO E RESISTÊNCIA CRUZADA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>Tuta absoluta</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS .....	19
RESUMO .....	20
ABSTRACT .....	21
INTRODUÇÃO .....	22
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	29
AGRADECIMENTOS.....	31
LITERATURA CITADA.....	31
3 RESISTÊNCIA DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A CLORANTRANILIPROLE: HERANÇA, METABOLISMO E RESISTENCIA CRUZADA .....	40
RESUMO .....	41
ABSTRACT .....	42

INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	45
RESULTADOS .....	52
DISCUSSÃO.....	55
AGRADECIMENTOS.....	59
LITERATURA CITADA.....	59
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., é considerado uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, assim como também é uma das culturas agrícolas mais estudadas. Talvez isso se deva a sua grande importância nutricional na alimentação humana, podendo ser consumido na forma *in natura* ou processado. Entre 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. Grande parte desta produção é geralmente destinada ao processamento industrial, sendo uma pequena parcela destinada ao comércio de tomate fresco. Dentre os principais países produtores mundiais em 2017 tem-se destaque para: China, Índia, EUA, Turquia, Egito, Itália, Irã, Espanha e Brasil (FAO 2018). No Brasil, a cultura do tomate 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 (IBGE 2017). A região Sudeste é 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. Dentre todos os estados, Goiás tem se destacado como maior produtor, com uma produção estimada em torno de 978.258 toneladas de tomate, o que corresponde a 26% da produção nacional (IBGE 2017).

Dentre os problemas fitossanitários enfrentados por produtores de tomate, um dos mais importantes é atribuído ao ataque de insetos-praga (Souza & Reis 1992). Algumas das pragas que estão comumente associadas a cultura do tomateiro são: a *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée), a

*Helicoverpa zea* (Boddie), a *Bemisia tabaci* biótipo B (Gennadius) e a *Tuta absoluta* (Meyrick), tendo esta última alcançado grande destaque como uma das mais importantes (Filho *et al.* 2000, Leite *et al.* 2001).

### **A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**

A *T. absoluta* é uma importante praga do tomateiro no Brasil (Filho *et al.* 2000, Leite *et al.* 2001). Seu primeiro registro no país ocorreu em setembro de 1979, em Morretes no litoral do Paraná (Muszinski *et al.* 1982), e no final dos anos 80, sua presença já era relatada em muitos campos de produção de tomate do país (França 1993). Provavelmente a intensa comercialização de tomate para mesa, através do contínuo intercâmbio regional entre os centros produtores e consumidores favoreceram a dispersão da praga.

A *T. absoluta* é uma praga que tem o 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* Lam., *Solanum saponaceum* Dun., *Lycopersicon puberulum* Phil., *Datura ferox* L., *Datura stramonium* L. e *Nicotiana glauca* L. (Garcia & Espul 1982, Larraín 1986).

A *T. absoluta* apresenta quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto e depende muito das condições ambientais, 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 *et al.* 1998). Na América do Sul, *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 nas primeiras horas

do dia (Nakano & Paulo 1983). As fêmeas depositam seus ovos na face inferior das folhas e hastes, e em menor grau nos frutos. 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 (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 diferentes fases 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.

### **Danos e impactos econômicos**

Os impactos econômicos de pragas estão diretamente associados ao aumento no custo de produção agrícola, assim como na redução de produtos a serem comercializados, e na perda de negociações de produtos entre mercados principalmente para exportação para países onde não se tem a presença da praga. Como em muitos casos já relatados, uma vez que a praga é introduzida e

se estabelece em um território, ainda por ela não habitado, torna-se difícil limitar a sua dispersão e a realização de seu controle (Keller *et al.* 2011, Garnas *et al.* 2016).

A *T. absoluta* é uma espécie multivoltina; apresenta um alto potencial reprodutivo, e pode se adaptar muito facilmente a diferentes ambientes o que a permite aumentar rapidamente a sua população em um curto espaço de tempo (Tropea Garzia *et al.* 2012). A diminuição na produção de tomate é, principalmente, decorrente do grau de infestação da *T. absoluta*. As injúrias ocasionadas pelas larvas são caracterizadas por minas presentes nas folhas da planta afetando a sua capacidade fotossintética. Dependendo da fase de desenvolvimento da planta, larvas de *T. absoluta* podem, ainda, ocasionar minas em suas hastes matando assim as plantas mais novas. Podem, ainda, perfurar ocasionalmente os frutos, aumentando os custos com as seleções pós-colheita (Galdino *et al.* 2015). As perfurações nos frutos podem servir como porta de entrada para agentes patogênicos que poderão infestar o tecido das plantas ocasionando infecções (Tropea Garzia *et al.* 2012).

### **Invasão da *Tuta absoluta* pelo mundo**

Uma avaliação recente sobre a traça-do-tomateiro na Europa mostrou que a *T. absoluta* depois de ter sido registrada na área invadida aumentou seu raio de presença em 600 Km por ano durante um período de nove anos (Roques *et al.* 2016). A *T. absoluta* foi primeiramente registrada fora da América Neotropical na Espanha em 2006. Alguns anos depois, esta praga se espalhou rapidamente para muitos países da Bacia do Mediterrâneo, além da parte Norte e Central da Europa (Desneux *et al.* 2011). Mais recentemente a *T. absoluta* invadiu vários países do Oriente Médio, como, o Afeganistão e algumas regiões subsaarianas, da Gâmbia à África do Sul, ameaçando a sustentabilidade das culturas de tomate nestas regiões (Pfeiffer *et al.* 2013, Brévault *et al.* 2014, Tonnang *et al.* 2015). Após atingir a costa norte da África e a região subsaariana, o movimento da praga passou a ser direcionado para o sul graças ao cultivo contínuo estabelecido nestas regiões, e

aos mecanismos de vigilância deficitários, além da falta de conhecimentos fitossanitários para impedir a entrada e transporte de plantas contendo o inseto (Tonnang *et al.* 2015). Os últimos registros de *T. absoluta* em países Africanos foram feitos na Zâmbia, Moçambique, Botswana e África do Sul. A previsão era de que em 2017 todo o continente Africano estaria invadido por esta espécie (Guimapi *et al.* 2016). A invasão da *T. absoluta* segue rapidamente em direção ao continente asiático, mais precisamente em direção a China, maior produtor mundial de tomate. No início de 2014, *T. absoluta* foi relatada no sul da Índia (Sridhar *et al.* 2014, Kalleshwaraswamy *et al.* 2015). No início de 2016 esta espécie foi encontrada em fazendas de tomate no Vale de Katmandu no Nepal (Bajracharya *et al.* 2016). Além disso, alguns registros confirmaram a presença da praga ao Norte de Bangladesh (Hossain *et al.* 2016), mostrando desta forma todo o caminho percorrido pela *T. absoluta* até o presente momento.

### **Controle químico da *Tuta absoluta***

O método mais comumente empregado para o controle de *T. absoluta* principalmente nos países da América do Sul, ainda, é o controle químico por meio de aplicações de inseticidas, geralmente com inseticidas que atuam a nível de sistema nervoso. No Brasil, o impacto de *T. absoluta* sobre os plantios de tomateiro levou ao uso excessivo de inseticidas pelos produtores, principalmente nos primeiros anos após a sua detecção, onde houve um aumento súbito no número de aplicações passando de 10 a 12 pulverizações por cultivo para mais de 30 aplicações, requerendo cerca de 4 a 6 pulverizações semanais (Guedes & Picanço 2012, Tomé *et al.* 2012). O mesmo ocorreu depois da *T. absoluta* ter sido detectada em países da Europa e Norte da África (Desneux *et al.* 2011).

Na Europa, tem-se relatos de até 15 aplicações de inseticidas para o controle da *T. absoluta* em, apenas, um ciclo da cultura. No Brasil, atualmente são registrados para o controle deste inseto



107 inseticidas dos mais variados grupos químicos. Apesar da longa lista de inseticidas registrados para o controle da praga, muitos desses não apresentam controle satisfatório em suas dosagens recomendadas, com eficácia baixa a moderada. Geralmente as pulverizações são realizadas sem que anteriormente tenha sido realizado o monitoramento para definir o momento certo em que as aplicações devem ser realizadas nas lavouras.

Na América do Sul, os primeiros inseticidas utilizados para controle da traça-do-tomateiro durante a década de 70 foram os organofosforados, sendo estes substituídos posteriormente na mesma década por piretróides. Em 1980, o uso de piretróides era alternado com moléculas como cartape, sendo ambas altamente eficientes no controle da *T. absoluta*. Durante o início dos anos 90, novos inseticidas foram introduzidos, como a abamectina, os IGRs, espinosade e clorfenapir. Entretanto, durante os últimos anos observou-se uma queda gradativa da eficiência de algumas classes de inseticidas no controle de populações deste inseto (Siqueira *et al.* 2000, Lietti *et al.* 2005, Silva *et al.* 2011). Diante disso, novas moléculas foram registradas para o controle desta espécie incluindo as diamidas que foram adotadas como uma nova ferramenta no controle.

### **Inseticidas da classe das diamidas**

As diamidas antranílicas e de ácido ftálico compreendem um grupo de inseticidas muito recente comercializado no mercado. Este grupo de inseticidas é derivado de alcaloides isolados da planta *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae), encontrada na América do Sul e Caribe (Satelle *et al.* 2008). As diamidas modulam a abertura dos receptores de rianodina desregulando a liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático de células musculares (Lahm *et al.* 2009). Desta forma, larvas tratadas passam a regurgitar o alimento, posteriormente sofrem letargia generalizada, de forma que o inseto passa a se alimentar menos e finalmente chega à paralisia muscular e a morte (Cordova *et al.* 2006a, Lahm *et al.* 2009). Tanto o clorantraniliprole quanto a flubendiamida são

altamente tóxicos principalmente para insetos da Ordem Lepidoptera, incluindo *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Silva *et al.* 2012), *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lai & Su 2011), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Tohnishi *et al.* 2005) e *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera:Noctuidae) (Lahm *et al.* 2007). Ciantranilprole é o mais recente inseticida dos representantes das diamidas a ser registrado para o controle de *T. absoluta*.

Embora mamíferos e insetos tenham receptores de rianodina, diferenças significativas na codificação de proteínas entre estes são observadas, o que torna as diamidas seletivas. Com isso, os receptores de rianodina são bastante importantes para tentar se encontrar moléculas de inseticidas que apresentem baixa toxicidade a inimigos naturais, polinizadores e mamíferos (Satelle *et al.* 2008). Alguns trabalhos têm mostrado a baixa toxicidade de diamidas a mamíferos, aves e peixes não apresentando risco a organismos não alvo (Lahm *et al.* 2007, Gradish *et al.* 2010).

### **Resistência de *Tuta absoluta* a inseticidas**

O uso indiscriminado de inseticidas tem contribuído para a seleção de populações resistentes da traça-do-tomateiro. No Brasil, inicialmente foram relatados casos de resistência de *T. absoluta* a metamidofós, permetrina, abamectina e cartape (Siqueira *et al.* 2000, Siqueira *et al.* 2001). Posteriormente, Silva *et al.* (2011) observaram falhas de controle com os inseticidas reguladores de crescimento teflubenzurom, diflubenzurom e triflumurom nas dosagens recomendadas pelo fabricante para o controle de *T. absoluta*, em campo. Castelo Branco *et al.* (2001) documentaram a resistência de populações de *T. absoluta* a organofosforados e piretróides 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), fez o primeiro registro de resistência a diamidas em populações em casa de vegetação na Itália.

### **Mecanismos de resistência em insetos**

Os mecanismos fisiológicos conhecidos e envolvidos na resistência de insetos a inseticidas se dividem em três: a destoxificação metabólica, alteração do sítio alvo e penetração reduzida. A resistência comportamental tem sido identificada para diversas espécies de artrópodes (Chareanviriyaphap *et al.* 1997, Kongmee *et al.* 2004, Jallow & Hoy 2005). A destoxificação metabólica do inseticida pode estar ligada aos vários processos metabólicos nos quais o produto é transformado em uma forma menos tóxica ou não tóxica, podendo até mesmo ser eliminado rapidamente do corpo do inseto. As enzimas monoxigenases e glutatona S-transferases estão comumente envolvidas na destoxificação de inúmeros princípios ativos. As esterases, também, são muito importantes, principalmente na destoxificação a organofosforados, carbamatos e piretroides (Conyers *et al.* 1998). Inibidores enzimáticos, como sinergistas, podem fornecer subsídios para determinar os possíveis mecanismos metabólicos envolvidos na resistência (Bernard & Philogène 1993). A alteração de sítio alvo constitui outro mecanismo de resistência, decorrente de mutações em genes que codificam para o sítio de ação do inseticida, impedindo ou dificultando a ligação da molécula com seu sítio alvo. Estas alterações podem comprometer de forma parcial ou total a atividade do inseticida em questão. Como exemplo deste tipo de resistência tem-se alterações em genes que codificam a enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), e os canais de sódio dependentes de voltagem (Hemingway *et al.* 1999, Lee *et al.* 2001, Hemingway *et al.* 2004). Os efeitos de piretroides e DDT são conhecidos por causar a ativação constante dos canais de sódio. Efeito conhecido como nocaute ou “*Knock down*”. O uso intensivo destes produtos acabou levando várias populações de

diferentes espécies de insetos a desenvolverem resistência do tipo *Kdr* ou *Knockdown resistance* (Soderlund & Knipple 2003). Inseticidas como organofosforados e carbamatos agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) (Hemingway 2000). A AChE possui um importante papel no sistema nervoso central, finalizando o impulso nervoso pela catalização da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina.

A resistência decorrente da redução na penetração de inseticidas no corpo de insetos é um fenômeno, ainda, pouco estudado. Pode estar diretamente relacionada com a quantidade de lipídeos presente no corpo dos insetos capaz de reter o inseticida na cutícula, ou até mesmo devido a sua impermeabilidade. Ahmad *et al.* (2006) relataram uma demora na penetração de inseticidas na cutícula de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em populações do Paquistão. A população mais suscetível absorveu deltametrina em uma hora, enquanto que a população mais resistente absorveu o mesmo produto em seis horas.

Com relação às respostas por comportamento, os insetos podem evitar alimentar-se de plantas, por meio da detecção de mudanças no ambiente através de órgãos mecanorreceptores e quimiorreceptores localizados nas antenas e nas pernas, além de evitarem ovipositar em plantas tratadas com inseticidas. A resistência comportamental poderia estar ligada a efeitos irritantes ou repelentes dos inseticidas sobre os insetos, que passam a evitar desta forma as áreas tratadas com inseticidas (Yu & Nguyen 1992).

### **Alterações nos receptores de rianodina**

As diamidas são inseticidas que se ligam aos receptores de rianodina modulando a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  liberando o estoque de  $\text{Ca}^{+2}$  interno a partir das células, prejudicando o funcionamento normal dos músculos (Cordova *et al.* 2006b, Lahm *et al.* 2009). Mutações não sinônimas (G4946E) foram observadas em *P. xylostella*, e estas foram comprovadas como

responsáveis pela resistência da praga a clorantraniliprole. Posteriormente verificou-se por meio de monitoramento que esta mutação já havia se espalhado, e já se encontrava presente em populações resistentes de *P. xylostella* de 9 países situados em 3 diferentes continentes (Steinbach *et al.* 2015, Troczka *et al.* 2015). Esta informação levou a hipótese de que a mesma mutação poderia estar envolvida na resistência de *T. absoluta* a diamidas. Diante disso, Roditakis *et al.* (2017) observaram em seus estudos mudanças em regiões específicas no gene do receptor de rianodina em populações de *T. absoluta*, e associaram estas alterações a resistência da espécie a clorantraniliprole. Foram detectadas as presenças de quatro mutações em populações resistentes ao inseticida (G4903E, I4746M, G4903V e I4746T).

### **Manejo da resistência de *Tuta absoluta* a inseticidas**

A evolução da resistência de pragas a inseticidas tem se tornado um dos grandes entraves em programas de controle de pragas que envolvem o uso de controle químico. Algumas estratégias são necessárias para a detecção antecipada da resistência. Um dos primeiros pontos em programas de monitoramento da resistência é o estabelecimento de linha base de suscetibilidade de populações de insetos pragas, para desta forma, determinar a variabilidade de resposta natural a um determinado produto antes de sua liberação. Além disso, é importante fazer o uso de técnicas como doses diagnósticas ou discriminatórias para distinguir indivíduos suscetíveis de indivíduos resistentes, para monitorar possíveis evoluções para a resistência (Wang *et al.* 2010).

O manejo é definido como sistema de decisão para uso de táticas de controle, que podem ser adotadas de forma isolada, ou associadas harmoniosamente, numa estratégia baseada em análises de custo benefício que levam em conta o interesse ou impacto nos produtores, sociedade e ambiente.

Em programas de manejo da resistência, o ataque múltiplo tem sido uma das principais táticas recomendadas para o controle de pragas em campo, por envolver o uso de dois ou mais inseticidas não relacionados em rotação ou mistura (Georghiou 1983).

### **Manejo da *Tuta absoluta***

O primeiro passo para a implementação de um programa de manejo integrado de pragas (MIP) em uma cultura está na identificação do problema, ou seja, no reconhecimento do agente causal de um determinado problema ocasionado a planta. Programas de manejo são mais efetivos quando conduzidos no início, ou até mesmo antes da evolução da resistência. Entretanto, na maioria dos casos a implementação do manejo só é iniciada após a constatação de falhas de controle (Tabashnik 1989). Para reduzir o tamanho das populações da traça-do-tomateiro em plantios de tomate deve-se, primeiramente, reduzir a oferta de alimentos para os insetos (Villas Bôas *et al.* 2009). Isso pode ser conseguido através de plantios em épocas em que ocorre baixa incidência da praga. O fato das áreas de plantio coexistirem durante todo o ano de forma escalonada, além da não eliminação de restos de cultura, acaba contribuindo para a dificuldade no controle da traça-do-tomateiro, pela disponibilidade de plantas de diferentes idades, proporcionando a esta uma quantidade abundante e contínua de alimento. Torna-se importante evitar plantios sucessivos da cultura, principalmente na mesma área. A destruição de restos culturais constitui uma atividade de extrema importância após a colheita. Observações realizadas em campo evidenciam que grande parte dos produtores não destroem imediatamente os restos culturais após o cultivo (Villas Bôas *et al.* 2009), o que acaba permitindo que as pupas presentes no solo ou nas folhas das plantas se desenvolvam e formem novos adultos. Estes adultos eventualmente dispersam para áreas vizinhas cultivadas com tomate e aumentam o potencial de dano nestas. A destruição de plantas hospedeiras alternativas também é muito importante, como

solanáceas silvestres e outras espécies de plantas (França & Castelo Branco 1992). A irrigação por aspersão pode contribuir para redução de populações de traça-do-tomateiro, através da lavagem de até 30% dos ovos presentes nas plantas, e contribui para a mortalidade de pupas presentes no solo, interferindo desta forma na capacidade de multiplicação das populações do inseto (Castelo Branco 1992, Costa *et al.* 1998). O controle biológico através de liberações massais de parasitoides de ovos, como *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), associado a aplicações do inseticida biológico *Bacillus thuringiensis* pode ser uma alternativa no manejo integrado de pragas associado à rotação de cultura, escolha de inseticidas seletivos e cultivares tolerantes. Armadilhas de feromônio colocadas ao redor da cultura poderão indicar o momento em que os primeiros adultos chegam às lavouras, auxiliando para o tempo exato em que o controle químico deve ser efetivamente iniciado. Este método pode contribuir para a redução no custo de produção, assim como a realização de amostragens semanais da parte superior das plantas (Castelo Branco *et al.* 1996).

## **Objetivo**

O objetivo desta pesquisa foi fazer inicialmente o monitoramento da resistência em populações de *T. absoluta* a três diamidas (clorantraniliprole, flubendiamida e ciantraniliprole), resistência esta que foi comprovada no segundo capítulo. Diante dos altos níveis de resistência encontrados, a população resistente passou a ser selecionada para posteriormente ser submetida a caracterização genética da resistência, para averiguarmos se a resistência de *T. absoluta* a diamidas está ligada ao sexo ou é autossomal, bem como estimar os valores dos graus médios de dominância e o número de genes envolvidos na resistência. Ainda no terceiro capítulo é apresentado o levantamento das atividades de esterase, glutatona *S*-transferase e monooxigenases dependente de citocromo P450 das populações suscetível e resistente. Dessa forma, ainda no

terceiro capítulo foi verificado se a resistência às diamidas pode estar associada ao mecanismo metabólico.

### Literatura citada

- Ahmad, M., I. Demholm & R.H. Bromilow. 2006.** Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethrin-resistance strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* 62: 805-810.
- Bajracharya A.S.R., R.P. Mainali, B. Bhat, S. Bista, P.R. Shashank & N.M. Meshram. 2016.** The first record of south american tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Nepal. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4: 1359-1363.
- Barrientos, Z.R., H.J. Apablaza, S.A. Norero & P.P. Estay. 1998.** Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Cien. Invest. Agr.* 25: 133-137.
- Bernard, C. & B.J.R. Philogène. 1993.** Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. *J. Toxicol. Environ. Health* 38: 199-223.
- Brévault, T., S. Sylla, M. Diatte, G. Bernadas & K. Diarra. 2014.** *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae): A New Threat to Tomato Production in Sub-Saharan Africa. *Afr. Entomol.* 22: 441-444.
- 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, 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.
- Castelo Branco, M. 1992.** Flutuação populacional da traça-do-tomateiro no Distrito Federal. *Hortic. Bras.* 10: 33-34.
- Castelo Branco, M., F.H. França & R.R. Fontes. 1996.** Eficiência relativa de inseticidas em mistura com óleo mineral sobre o nível de dano econômico da traça-do-tomateiro. *Hortic. Bras.* 14: 36-38.
- 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.



- Chareanviriyaphap, T., D.R. Roberts, R.G. Andre, H.J. Harlan, S. Manguin & M.J. Bangs. 1997.** Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. 13: 171-183.
- Conyers, C.M., A.D. MacNicoll & N.R. Price. 1998.** Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorous insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis*, (Coleoptera: Silvernidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 435-448.
- Cordova, D., E.A. Benner, M.D. Sacher, J.J. Rauh, J.S. Sopa, G.P. Lahm, T.P. Selby, T.M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D.F. Rhoades, L. Wu, R.M. Smith & Y. Tao. 2006a.** Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pestic. Biochem. Physiol. 84: 196-214.
- Cordova, D., E.A. Benner, M.D. Sacher, J.J. Rauh, J.S. Sopa, G.P. Lahm, T.P. Selby, T.M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D.F. Rhoades, L. Wu, R.M. Smith & Y. Tao. 2006b.** Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pestic. Biochem. Physiol. 84: 196-214.
- Costa, J.S., A.M.R. Junqueira, W.L.C.E. Silva & F.H. França. 1998.** Impacto da irrigação via pivô-central no controle da traça-do-tomateiro. Hort. Bras. 16: 19-23.
- Desneux, N., M.G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. J. Pest Sci. 84: 403-408.
- FAO, 2018.** FAOSTAT. –Statistical Database. Food and Agricultural Organization, Rome.
- Filgueira, F.A.R. 2000.** Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa, Editora UFV, 412p.
- Michereff, F.M., E.F. Vilela, A.B. Attygalle, J. Meinwald, A. Svatoš & G.N. Jham. 2000.** Field trapping of tomato moth, *Tuta absoluta* with pheromone traps. J. Chem. Ecol. 26: 875-881.
- França, F.H. 1993.** Por quanto tempo conseguiremos conviver com a traça-do-tomateiro? Hort. Bras. 11: 176-178.
- França, F.H. & M. Castelo Branco. 1992.** Ocorrência da traça-do-tomateiro (*Scrobipalpuloides absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. Hort. Bras. 10: 6-10.
- Galdino, T.V.d.S., M.C. Picanço, D.O. Ferreira, G.A.R. Silva, T.C. de Souza & G.A. Silva. 2015.** Is the performance of a specialist herbivore affected by female choices and the adaptability of the offspring? PLoS ONE 10: e0143389.
- Garcia, M.F. & J.C. Espul. 1982.** Bioecología de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina. Rev. Invest. Agropec. INTA 18: 135-146.

- Garnas, J.R., M.-A. Auger-Rozenberg, A. Roques, C. Bertelsmeier, M.J. Wingfield, D.L. Saccaggi, H.E. Roy & B. Slippers. 2016.** Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biol. Invasions* 18: 935-952.
- Georghiou, G.P. 1983.** Management of resistance in arthropods, p. 769-792. In G.P. Georghiou & T. Saito (eds.), *Pest resistance to pesticides: Challenges and Prospects*. Plenum Press, New York, NY, 797p.
- Gradish, A.E., C.D. Scott-Dupree, L. Shipp, C.R. Harris & G. Ferguson. 2010.** Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.* 66: 142-146.
- Guedes, R.N.C. & M.C. Picanço. 2012.** The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bull.* 42: 211-216.
- Guimapi, R.Y.A., S.A. Mohamed, G.O. Okeyo, F.T. Ndjomatchoua, S. Ekesi & H.E.Z. Tonnang. 2016.** Modeling the risk of invasion and spread of *Tuta absoluta* in Africa. *Ecol. Complex.* 28: 77-93.
- Hemingway, J., J. Miller & Mumcuoglu. 1999.** Pyrethroid resistance mechanisms in the head louse *Pediculus capitis* from Israel: implications for control. *Med. Vet. Entomol.* 13: 89-96.
- 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. Hanson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 653-665.
- Hossain, M.S., M.Y. Mian & R. Muniappan. 2016.** First Record of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) from Bangladesh. *J. Agric. Urban Entomol.* 32: 101-105.
- IBGE. 2017.** Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, pp. 1-81, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- 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.
- Kalleshwaraswamy, C.M., M.S. Murthy, C.A. Viraktamath & N.K.K. Kumar. 2015.** Occurrence of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in the Malnad and Hyderabad-Karnataka Regions of Karnataka, India. *Fla. Entomol.* 98: 970-971.
- Keller, R.P., J. Geist, J.M. Jeschke & I. Kühn. 2011.** Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environ. Sci. Eur.* 23: 23.

- 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.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 4127-4133.
- Lahm, G.P., T.M. Stevenson, T.P. Selby, J.H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C.A. Bellin, C.M. Dubas, B.K. Smith, K.A. Hughes, J.G. Hollingshaus, C.E. Clark & E.A. Benner. 2007.** Rynaxypyr: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274-6279.
- Lai, T. & J. Su. 2011.** Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Pest Sci.* 84: 381.
- Larraín, P.S. 1986.** Plagas del tomate. *IPA, La Platina.* 39: 30-35.
- Lee, S., D. Soderlund & S. Lee. 2001.** The V410M mutation associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* reduces the pyrethroid sensitivity of house fly sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 19-29.
- Leite, G.L.D., M. Picanço, R.N.C. Guedes & J.C. Zanuncio. 2001.** Role of plant age in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Sci. Hortic.* 89: 103-113.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- Muszinski, T.I., 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. Bras.* 11: 291-292.
- Nakano, O. & A.D. Paulo. 1983.** A traças-do-tomateiro. *Agroquímica* 20: 8-12.
- Pfeiffer, D.G., R. Muniappan, D. Sall, P. Diatta, A. Diongue & E.O. Dieng. 2013.** First Record of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Senegal. *Fla. Entomol.* 96: 661-662.
- 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.
- Roditakis, E., D. Steinbach, G. Moritz, E. Vasakis, M. Stavrakaki, A. Ilias, L. García-Vidal, M.d.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza, E. Morou, J.E. Silva, W.M. Silva, H.A.A. Siqueira, S. Iqbal, B.J. Troczka, M.S. Williamson, C. Bass, A. Tsagkarakou, J. Vontas & R. Nauen. 2017.** Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 80: 11-20.

- 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.
- Satelle, D., D. Cordova & T. Cheek. 2008.** Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8: 107-119.
- 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 Manag. Sci.* 67: 913-920.
- Silva, J.E., H.A.A. Siqueira, T.B.M. Silva, M.R. Campos & R. Barros. 2012.** Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. *Crop Prot.* 35: 97-101.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes, D.B. Fragoso & L.C. Magalhaes. 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Pest Manag.* 47: 247-251.
- Soderlund, D.M. & D.C. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563-577.
- Souza, J.C. & P.R. Reis. 1992.** Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte. EPAMIG, 14p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 2).
- Sridhar, V., A. Chakravarthy, R. Asokan, L. Vinesh, D. Rebijith & S. Vennila. 2014.** New record of the invasive South American tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in India. *Pest Manag. Hortic. Ecosyst.* 20: 148-154.
- Steinbach, D., O. Gutbrod, P. Lümmer, S. Matthiesen, C. Schorn & R. Nauen. 2015.** Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 63: 14-22.
- Tabashnik, B.E. 1989.** Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.
- Tohnishi, M., H. Nakao, T. Furuya, A. Seo, H. Kodama, K. Tsubata, S. Fujioka, H. Kodama, T. Hirooka & T. Nishimatsu. 2005.** Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests. *J. Pestic. Sci.* 30: 354-360.

- 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.
- Tonnang, H.E.Z., S.F. Mohamed, F. Khamis & S. Ekesi. 2015.** Identification and risk assessment for worldwide invasion and spread of *Tuta absoluta* with a focus on Sub-Saharan Africa: implications for phytosanitary measures and management. *PLoS ONE* 10: e0135283.
- Trocza, B.J., A.J. Williams, M.S. Williamson, L.M. Field, P. Lüemmen & T.G.E. Davies. 2015.** Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. 5: 14680.
- Tropea Garzia, G., G. Siscaro, A. Biondi & L. Zappalà. 2012.** *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. *EPPO Bull.* 42: 205-210.
- Uchôa-Fernandes, M.A., T.M.C. Della Lucia & E.F. Vilela. 1995.** Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) *An. Soc. Entomol. Brasil* 24: 159-164.
- 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.
- Villas Bôas, G.L., M. Castelo Branco & M.A. Medeiros. 2009.** Manejo integrado da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI). Brasília, Embrapa Hortaliças, 16p. (Circular técnica, 73).
- Wang, X., X. Li, A. Shen & Y. Wu. 2010.** Baseline susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. *J. Econ. Entomol.* 103: 843-848.
- Yu, S.J. & S.N. Nguyen. 1992.** Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44: 74-81.

## CAPÍTULO 2

# RESISTÊNCIA EVOLUÍDA EM CAMPO E RESISTÊNCIA CRUZADA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A DIAMIDAS<sup>1</sup>

JEFFERSON E. SILVA

Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

---

<sup>1</sup>Silva, J.E., C.P.O. Assis, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. Resistência evoluída no campo e resistência cruzada de populações brasileiras de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a diamidas. *Journal of Economic Entomology*. 109: 2190-2195.

RESUMO - *Tuta absoluta* (Meyrick) é uma das mais importantes pragas do tomateiro no mundo com o uso intensivo de aplicações de inseticidas no seu controle. As diamidas representam uma nova classe de inseticidas recentemente registrados para o controle de *T. absoluta*. Após seis anos de uso, falhas de controle em populações desta praga foram notificadas, sugerindo a hipótese de desenvolvimento de resistência. Portanto, foi realizado um levantamento da resistência utilizando nove populações de *T. absoluta* coletadas em áreas de plantios abertos, inclusive de áreas com relatos de redução da eficácia de diamidas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Levantamentos iniciais utilizando doses diagnósticas e de bula provaram a perda de eficácia das diamidas contra a maioria das populações. Os valores das CL<sub>50</sub> para clorantraniliprole variaram de 0,0044 (Brasília) a 1.263 (América Dourada) mg de ingrediente ativo por litro (as razões de resistência (RR<sub>50</sub>) variaram de 1,0 – 288.995 vezes), ao passo que os valores das CL<sub>50</sub> para ciantraniliprole e flubendiamida, variaram de 0,015 (Brasília) a 281 (América Dourada) mg i.a./L e de 0,038 (Guaraciaba do Norte) para 3.018 (Gameleira 1) mg i.a./L, respectivamente. As razões de resistência (RR<sub>50</sub>) variaram de 1,0 a 18.423 vezes para ciantraniliprole e de 1,0 a 80.413 vezes para flubendiamida. Os valores de log da CL<sub>50</sub> foram fortemente correlacionados, o que representa uma provável resistência cruzada entre os inseticidas. Altos níveis de resistência a diamidas em *T. absoluta* foi observado neste estudo, sugerindo que estratégias para mitigar a resistência e, assim, controlar a praga não devem incluir apenas inseticidas. Outras táticas de controle devem ser cuidadosamente implementadas ao longo do tempo para aumentar a vida útil destes produtos, incluindo práticas rotacionais com outras moléculas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resistência cruzada, clorantraniliprole, ciantraniliprole, flubendiamide, traça-do-tomateiro

FIELD-EVOLVED RESISTANCE AND CROSS-RESISTANCE OF BRAZILIAN *Tuta absoluta*  
(MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) POPULATIONS TO DIAMIDE  
INSECTICIDES

ABSTRACT – *Tuta absoluta* (Meyrick), is one of the most important tomato pests worldwide, and it is heavily controlled by the application of insecticides. Anthranilic and phthalic diamide insecticides represent a new class of insecticides that has been recently registered to control *T. absoluta*. After six years of use, control failures have been reported in populations of this pest, suggesting a hypothetical resistance development. Therefore, a resistance survey was performed using nine populations of *T. absoluta* that were collected in open fields, including areas with reports of a reduced efficacy of diamides in the Northeast and Central regions of Brazil. Initial surveys with diagnostic and label doses proved the reduced efficacy of diamides against most populations. The LC<sub>50</sub> values of chlorantraniliprole varied from 0.0044 (Brasília) to 1,263 (América Dourada) mg AI L<sup>-1</sup> the resistance ratios (RR<sub>50</sub>) ranged from 1.0- to 288,995-fold, whereas the LC<sub>50</sub> values for cyantraniliprole and flubendiamide, respectively, varied from 0.015 (Brasília) to 281 (América Dourada) mg AI L<sup>-1</sup> and from 0.038 (Guaraciaba do Norte) to 3,018 (Gameleira 1) mg AI L<sup>-1</sup>. The resistance ratios (RR<sub>50</sub>) ranged from 1.0- to 18,423-fold for cyantraniliprole and from 1.0- to 80,413-fold for flubendiamide. A strong and significant correlation was observed between the log LC<sub>50</sub> values of pairwise diamides, which denoted cross-resistance among them. Very high resistance to diamides in *T. absoluta* was observed in this study, suggesting that strategies to mitigate resistance and thereby control the pest must not include only insecticides. Other control tactics must be carefully implemented over time to increase the lifespan of diamides, including rotational practices with other molecules.

KEY WORDS: Cross-resistance, chlorantraniliprole, cyantraniliprole, flubendiamide, leafminer



## Introdução

As diamidas compõem a mais nova classe de inseticidas e tem um espectro de atividade limitado a insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera e Diptera. Flubendiamida (diamida de ácido ftálico) e clorantraniliprole (diamida antranílica) foram às primeiras moléculas comerciais disponíveis. As diamidas são muito tóxicas a insetos alvos e inofensivas a inimigos naturais quando comparadas aos inseticidas neurotóxicos, o que faz delas uma ferramenta adequada dentro de programas de manejo integrado de pragas (Mills *et al.* 2016). Esses inseticidas atuam ativando os receptores de rianodina de insetos esgotando os estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático, levando a contração muscular continuada, seguida de paralisia e finalmente a sua morte (Lahm *et al.* 2005, Lahm *et al.* 2009). Como nova ferramenta para o controle de insetos, o desenvolvimento da resistência em pragas a esses produtos pode prejudicar a sua eficácia em campo. Até o momento a resistência a diamidas foi relatada apenas para *Plutella xylostella* (L.) (Wang & Wu 2012, Ribeiro *et al.* 2014), e mais recentemente em populações de casa de vegetação de *T. absoluta* (Roditakis *et al.* 2015).

A *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma das mais destrutivas pragas do tomateiro, *Solanum lycopersicum* (L.). Desde o seu primeiro relato na Espanha, essa tem causado perdas consideráveis em muitas áreas de cultivo de tomateiro pela Europa, Norte da África, Oriente Médio e mais recentemente na Índia. A relevante importância da *T. absoluta* como praga nos últimos anos é devida as grandes perdas ocasionadas, podendo chegar a 100% em muitas áreas. Essas perdas são ocasionadas pela formação de minas em folíolos do tomateiro assim como a perfuração de frutos ainda verdes por larvas do inseto. As larvas geralmente preferem o terço médio da planta, onde se observa um maior número de minas (Picanço *et al.* 1995). No Brasil os produtores de forma geral preferem utilizar o controle com inseticidas químicos visto que aparentemente os resultados para este tipo de controle são mais rápidos com relação a outras

práticas adotadas (Picanço *et al.* 2007). No entanto, o uso de inseticidas nem sempre proporciona a eficácia esperada de controle (Guedes *et al.* 1994). Isso tem levado a pulverizações excessivas com inseticidas em uma determinada época do ano (Picanço & Guedes 1999).

Os primeiros casos de resistência a inseticidas em *T. absoluta* foram relatados para organofosforados e piretróides no Chile (Salazar & Araya 1997, Salazar & Araya 2001) e a avermectinas e derivados de nereistoxina no Brasil (Siqueira *et al.* 2000) e Argentina (Lietti *et al.* 2005). Outros casos de resistência em *T. absoluta* têm sido relatados para classes de inseticidas tais como as oxadiazinas, reguladores de crescimento de insetos e *Bacillus thuringiensis* (Silva *et al.* 2011a). Mais recentemente, a *T. absoluta* tornou-se resistente aos inseticidas pertencentes às novas classes, tais como espinosade e espinetoram (Campos *et al.* 2015a). Em 2015, Roditakis *et al.* (2015) relataram o primeiro caso de resistência a diamidas em populações italianas que foram obtidas de casa de vegetação.

Flubendiamida e clorraniliprole são dois dos mais importantes inseticidas utilizados no controle de *T. absoluta*, em culturas de tomate nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Estes inseticidas foram registrados em 2008 e 2009, respectivamente para o controle de *T. absoluta* e outras pragas da ordem Lepidoptera, inicialmente proporcionando um alto nível de eficácia no controle de pragas em baixas doses (Campos *et al.* 2015b). No entanto, falhas de controle em *T. absoluta* têm sido relatadas nos últimos três anos por produtores em suas áreas. Esta possível falha de controle nos leva a hipótese de que estas populações de *T. absoluta* têm desenvolvido resistência a diamidas. Neste estudo, nós constatamos altos níveis de resistência de populações de campo de *T. absoluta* a diamidas atualmente registradas para o seu controle, assim como resistência cruzada a ciantraniliprole, um possível substituto ao clorraniliprole.

## Material e Métodos

**Insetos.** As populações de *T. absoluta* foram coletadas de campo comercial e experimental de tomate em duas regiões do Brasil durante 2014 e 2015 (Tabela 1). As larvas de *T. absoluta* foram coletadas de folhas, hastes e frutos infestados. O material vivo coletado foi embalado em sacos plásticos e enviado para o Laboratório de Interações Inseto-Tóxico (LIIT, Recife, Brasil) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Ao chegar, cada população foi colocada imediatamente em gaiola de criação (45 x 45 x 45 cm) com malha anti-afídeo. Os adultos foram mantidos em gaiolas com dimensões de 30 x 30 x 30 cm, onde folhas de tomate da cultivar “Santa Clara” foram fornecidas diariamente como substrato para oviposição. Os adultos de *T. absoluta* foram diariamente alimentados com solução de glicose a 10% (Yoki alimentos Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e as larvas foram alimentadas com folhas de tomate da cultivar “Santa Clara” (IC 5500), folhas estas produzidas em casa de vegetação isentas de aplicações de inseticida. As populações foram mantidas em laboratório a  $25 \pm 1$  °C, com umidade relativa de  $65 \pm 5\%$  e um fotoperíodo de 12:12 h. As larvas foram submetidas aos bioensaios entre a terceira e a quinta geração.

**Inseticidas.** Neste estudo foram utilizadas as seguintes diamidas em todos os experimentos: clorraniliprole (Prêmio<sup>®</sup>, 200 g i.a./L SC, suspensão concentrada, DuPont, Paulínia, SP, Brasil), flubendiamida (Belt<sup>®</sup>, 480 g i.a./L SC, suspensão concentrada, Bayer S.A., Socorro, SP, Brasil) e ciantraniliprole (Benevia<sup>®</sup>, 100 g i.a./L, suspensão concentrada em óleo, DuPont, SP, Brasil).

**Dose Diagnóstica e de Campo Utilizadas nos Bioensaios.** Inicialmente as populações foram submetidas às doses diagnósticas sugeridas por Campos *et al.* (2015b): 1 mg i.a./L de clorraniliprole, 1 mg i.a./L de ciantraniliprole e 3 mg i.a./L de flubendiamida. Para avaliar a possibilidade de falhas de controle foi, também, utilizada à dose de bula para cada um dos

inseticidas conforme registrado no Ministério da Agricultura para o controle de *T. absoluta* (concentração expressa em mg de ingrediente ativo por litro de solução para pulverização em campo). Para isto foram utilizadas as dosagens de 3 mg i.a./L de clorantraniliprole e 300 mg i.a./L de flubendiamida. Os experimentos foram realizados submergindo folíolos de tomate por um período de 30 s em solução contendo inseticida, e tanto nos tratamentos quanto no controle utilizou-se Agr'óleo<sup>®</sup> (Gota Ltda, Contenda, PR, Brasil) a 0,025% (concentração final) como espalhante. Em seguida os folíolos foram mantidos a temperatura ambiente para sua secagem. Posteriormente, esses foram colocados em placas de Petri (8 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura) contendo papel filtro humedecido com 400 µL de água destilada. Dez larvas de segundo ínstar foram transferidas para cada placa de Petri e, após a transferência, estas foram mantidas em câmara de crescimento por onde permaneceram por um período de 96 h a  $25 \pm 1$  °C, UR  $65 \pm 5\%$  e um fotoperíodo de 12:12 h. As avaliações foram realizadas com o auxílio de uma lupa (Opton 5x, Alemanha). O critério utilizado nas avaliações foi o seguinte: larvas que conseguiram caminhar o equivalente ao comprimento do seu corpo após serem tocadas cuidadosamente com um pincel de cerdas macias foram consideradas vivas, às que não conseguiram foram consideradas mortas.

**Bioensaios.** Os ensaios toxicológicos foram conduzidos utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com duas repetições, todo experimento foi repetido pelo menos uma segunda vez seguindo os métodos utilizados por Campos *et al.* (2015b). Inicialmente ensaios preliminares foram realizados para determinar uma resposta “tudo ou nada”, para a partir de então ser estabelecida a gama de concentrações utilizadas nos bioensaios de “concentração-resposta”. Os intervalos de concentrações utilizados para clorantraniliprole variaram de 0,000625 a 16.000 mg i.a./L; para ciantraniliprole variou de 0,003125 a 4.000 mg i.a./L e para flubendiamida a

variação foi de 0,00390625 a 76.800 mg i.a./L. Os bioensaios de suscetibilidade foram realizados de forma semelhante aos experimentos realizados para dose diagnóstica e dose de bula.

**Análise Estatística.** O teste Z unilateral com nível de confiança 100 (1 –  $\alpha$ )% com correção para continuidade (Snedecor & Cochran 1989) foi usado para determinar se a fração observada de sobreviventes na dose diagnóstica foi significativamente maior que o 1% esperado de frequência. Sendo assim, o número de sobreviventes necessários para apresentar significância foi determinado a 1% de frequência fenotípica  $\alpha = 0,05$  (Roush & Miller 1986) para cada 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 *et al.* 2013) utilizando o teste-*t* pareado de Student a  $P < 0,05$ . Os dados de mortalidade dos ensaios de susceptibilidade foram submetidos à análise de Probit (Finney 1971) com  $\alpha = 0,05$  (teste de  $\chi^2$ ) após a correção pela mortalidade do controle seguindo a fórmula de Abbott (Abbott 1925), utilizando o programa POLO-Plus (Software 2005) para estimar os valores de limite de confiança. As 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 coeficiente de correlação de Pearson (*r*) foi usado para testar a relação entre os log-transformados emparelhados dos valores de CL<sub>50</sub> das populações entre os inseticidas utilizando o PROC CORR (SAS Institute 2001) ao nível de 0,05 de significância para avaliar a resistência cruzada entre os inseticidas.

## Resultados

**Dose Diagnóstica e Dosagem de Bula.** Todas as populações, exceto Brasília (BSL) e Guaraciaba do Norte (GBN) apresentaram níveis de mortalidade variando de  $1,11 \pm 1,11$  a  $78,9 \pm 4,80\%$

sugerindo potencial resistência das populações as três diamidas (Tabela 2). O número de indivíduos sobreviventes para obter o nível de significância a pelo menos 1% da frequência fenotípica (com  $\alpha = 0,05$ ) foi de três sobreviventes. No entanto, todas as populações, exceto Brasília e Guaraciaba, apresentaram resultados muito superiores a este valor (dados não apresentados), sugerindo a presença de fenótipos resistentes. As populações que apresentaram os mais baixos números de sobreviventes foram: Bezerros e Lagoa Grande para clorraniliprole e ciantraniliprole, respectivamente. Clorraniliprole apresentou baixa eficácia nas populações de *T. absoluta* de América Dourada, Gameleira 1, João Dourado 1, Lagoa Grande e Pesqueira nas doses de bula recomendada (Tabela 2). As demais populações: Bezerros, João Dourado 2, Gameleira 2 e Brasília continuaram sendo economicamente controladas por este inseticida. Flubendiamida não foi eficiente no controle das populações: América Dourada, Gameleira 1, Gameleira 2, João dourado 1, João Dourado 2, Lagoa Grande e Pesqueira na dose de bula recomendada, sugerindo com isso que falha de controle pode estar ocorrendo em campo, no entanto, outras populações como Bezerros e Brasília ainda se mostraram suscetíveis a dose de bula.

**Bioensaios.** Os dados de mortalidade das populações de *T. absoluta* se ajustaram ao modelo de Probit para todos os inseticidas ( $\chi^2$  não foi significativo,  $P > 0,05$ ). A população de Brasília foi a mais suscetível para clorraniliprole, com uma  $CL_{50}$  de 0,0044 mg i.a./L (Tabela 3), e para ciantraniliprole, com uma  $CL_{50}$  de 0,015 mg i.a./L (Tabela 4). Para flubendiamida a população de Guaraciaba foi a mais suscetível, com uma  $CL_{50}$  de 0,038 mg i.a./L (Tabela 5).

As respostas das populações utilizadas no estudo as três diamidas foram heterogêneas. Os valores obtidos por meio das  $CL_{50}$  para clorraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida entre todas as populações de *T. absoluta* variaram de 0,0049 – 1.262,7; de 0,016 – 281,3 e de 0,30 – 3.018 mg i.a./L, respectivamente. As razões de resistência ( $RR_{50}$ ) para clorraniliprole,

ciantraniliprole e flubendiamida variaram de 1,12 – 288.995; 1,03 a 18.423 e 7,95 a 80.413 vezes, respectivamente comparadas com as populações de Brasília ou Guaraciaba. Baseado no limite de confiança a 95% de probabilidade para as razões de resistência, as populações de Bezerros (RR = 44,55 vezes), Lagoa Grande (RR = 355,76 vezes), João Dourado 1 (RR = 658,37 vezes), João Dourado 2 (RR = 524,85 vezes), Gameleira 1 (RR = 21.155 vezes), Gameleira 2 (RR = 1.064 vezes), Pesqueira (RR = 147.928 vezes) e América Dourada (RR = 288.995 vezes) exibiram razões de resistência muito altas e significantes para clorantraniliprole (Tabela 3). Oito populações exibiram razões de resistência significativa ao ciantraniliprole: Bezerros (RR = 78,34 vezes), João Dourado 1 (RR = 109,07 vezes), Gameleira 2 (RR = 147,03 vezes), João Dourado 2 (RR = 555,80 vezes), Lagoa Grande (RR = 1.895 vezes), Gameleira 1 (RR = 5.932 vezes), Pesqueira (RR = 10.010 vezes) e América Dourada (RR = 18.423 vezes) (Tabela 4). Para flubendiamida, nove populações exibiram resistência significativa: Brasília (RR = 7,95 vezes), Bezerros (RR = 11,03 vezes), João Dourado 1 (RR = 5.405 vezes), João Dourado 2 (RR = 5.901 vezes), Lagoa grande (RR = 17.943 vezes), Gameleira 2 (RR = 27.854 vezes), Pesqueira (RR = 37.254 vezes), América Dourada (RR = 58.044 vezes) e Gameleira 1 (RR = 80.413 vezes) (Tabela 5).

Uma forte correlação foi observada entre os valores de  $CL_{50}$  de clorantraniliprole e ciantraniliprole ( $r = 0,950$ ;  $P < 0,0001$ ;  $n = 10$ ), de clorantraniliprole e flubendiamida ( $r = 0,887$ ;  $P < 0,0006$ ;  $n = 10$ ), e de flubendiamida e ciantraniliprole ( $r = 0,886$ ;  $P < 0,0006$ ;  $n = 10$ ). Estes resultados sugerem resistência cruzada entre diamidas antranílicas e destas com diamidas de ácido ftálico.

## Discussão

As diamidas entraram no mercado brasileiro de inseticidas como grande promessa para o controle de pragas, mais especificamente lepidópteros incluindo a *T. absoluta*. Os ingredientes ativos flubendiamida e clorantraniliprole foram registrados em 2008 e 2009, respectivamente, no Brasil. Campos *et al.* (2015b) avaliaram a suscetibilidade de populações de *T. absoluta* coletadas em 2010/2011, e elas foram altamente suscetíveis a estes produtos. No entanto, registros recentes de falhas de controle para esta espécie nos levaram a avaliar a suscetibilidade de populações de *T. absoluta* coletadas em algumas áreas do Brasil a diamidas. As doses diagnósticas utilizadas neste estudo foram previamente estabelecidas por Campos *et al.* (2015b), em estudo de linha base.

Nossos resultados mostraram que a maioria das populações apresentou frequência de resistência acima de 10%, sugerindo que o uso destas doses poderia ter ajudado a monitorar a resistência de populações de *T. absoluta*. Todas as populações com exceção de Bezerros e Brasília sobreviveram a pelo menos uma dose de campo utilizada nos experimentos. Em estudos anteriores, falhas de controle por inseticidas tradicionais e novos foram observadas nesta espécie (Silva *et al.* 2011b), sendo essas geralmente associadas ao desenvolvimento de resistência. Embora algumas populações se mostraram resistentes a estes inseticidas, outras se mantiveram suscetíveis as doses recomendadas de clorantraniliprole e flubendiamida. 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* às diamidas.

O desenvolvimento de resistência a clorantraniliprole e flubendiamida também conferiu resistência cruzada a ciantraniliprole, um inseticida similar que até então não se encontrava registrado para o controle da *T. absoluta*, no Brasil. Recentemente, Roditakis *et al.* (2015)



relataram os primeiros casos de resistência a ambos clorantraniliprole e flubendiamida em populações de *T. absoluta* italianas coletadas diretamente de casa de vegetação. No entanto, este é o primeiro registro com níveis impactantes de resistência (até 289.000 vezes) a diamidas em populações de *T. absoluta* obtidas diretamente de campo. A resistência parece não estar restrita a apenas uma determinada região de coleta; esta resistência parece ser selecionada localmente devido os diferentes graus de suscetibilidade observados neste estudo entre locais próximos sugerindo uma variação no padrão de uso de diamidas e uma baixa dispersão (fluxo gênico) da praga para outras áreas. Estes altos níveis de resistência em populações de *T. absoluta* foram relatados após três a quatro anos depois da fase de registro do produto, indicando um rápido desenvolvimento nestas áreas.

O uso inadequado das diamidas por produtores de tomate na maioria das áreas avaliadas nos últimos anos levou ao desenvolvimento de altos níveis de resistência e eficácia reduzida no controle de *T. absoluta*. A falta de práticas alternativas de manejo como: a preservação de inimigos naturais; a destruição de restos culturais; uso de níveis econômicos de injúrias; a rotação de inseticidas com diferentes modos de ação ajudaria a retardar a resistência a diamidas. Silva *et al.* (2016b) mostraram que a maioria destas populações ainda eram suscetíveis a espinosinas, o que poderia ser usado como uma alternativa para reduzir a resistência a diamidas. Além disso, Campos *et al.* (2014) mostraram claramente a ausência de resistência cruzada entre espinosinas e diamidas em seu trabalho, o que sugere uma alternativa interessante para realizar o manejo desta praga. Além destes inseticidas, outras moléculas tais como: abamectina, clorfenapir, indoxacarbe, e metaflumizone podem ser utilizados como alternativas para o manejo químico de populações de *T. absoluta* (Silva *et al.* 2016a).

O ciantraniliprole encontra-se hoje registrado no Brasil para o controle de diversas pragas, inclusive para a traça-do-tomateiro. No entanto, este deve ser utilizado com cautela, pois apresenta

uma forte correlação de resistência cruzada com outras diamidas (antranílicas e de ácido ftálico), o que não foi observado para inseticidas com modos de ação distintos, tais como piretroides, organofosforados, oxadiazinas, avermectinas (Sang *et al.* 2015) e espinosinas (Campos *et al.* 2014).

Em síntese, a resistência a clorantraniliprole e flubendiamida desenvolveu-se rapidamente em populações de *T. absoluta* no Brasil. Isto já era esperado devido à alta frequência de pulverizações para controlar esta praga, o que resultou nos elevados níveis de resistência aqui observados. Apesar dos altos níveis de resistência observados neste estudo, verifica-se que para algumas regiões, populações de *T. absoluta*, ainda, se mostram suscetíveis a diamidas fato que nestas regiões deve-se estabelecer um plano de manejo com o objetivo de não perder esta ferramenta que poderá ser utilizada em rotação com outros produtos. Estudos adicionais estão sendo realizados para ajustar o programa de manejo da resistência da *T. absoluta* no Brasil.

### **Agradecimentos**

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

### **Literatura Citada**

- Abbott, W.S. 1925.** A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015a.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* 88: 405-412.

- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015b.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *Pest Manag. Sci.* 71: 537-544.
- Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, W.M. Silva, T.B.M. Silva, V.R.F. Silva, R.N.C. Guedes & H.A.A. Siqueira. 2014.** Spinosad and the tomato Borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLoS ONE* 9(8): e10325.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis. England, London.
- Gontijo, P.C., M.C. Picanco, E.J.G. Pereira, J.C. Martins, M. Chediak & R.N.C. Guedes. 2013.** Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Ann. Appl. Biol.* 162: 50-59.
- Guedes, R.N.C., M.C. Picanco, A.L. Matioli & D.M. Rocha. 1994.** Efeito de inseticidas e sistemas de condução do tomateiro no controle de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 23: 321-325.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Biorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- Lahm, G.P., T.P. Selby, J.H. Freudenberger, T.M. Stevenson, B.J. Myers, G. Seburyamo, B.K. Smith, L. Flexner, C.E. Clark & D. Cordova. 2005.** Insecticidal anthranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 4898-4906.
- Lietti, M.M.M., E. Botto & R.A. Alzogaray. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 113-119.
- Mills, N.J., E.H. Beers, P.W. Shearer, T.R. Unruh & K.G. Amarasekare. 2016.** Comparative analysis of pesticide effects on natural enemies in western orchards: A synthesis of laboratory bioassay data. *Biol. Control* 102: 17-25.
- Picanço, M.C. & R.N.C. Guedes. 1999.** Manejo integrado de pragas no Brasil: situação atual, problemas e perspectivas. *Ação Ambiental* 2: 23-27.
- Picanço, M.C., D.J.H. Silva, G.L.D. Leite, A.C. Mata & G.N. Jham. 1995.** Intensidade de ataque de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) ao dossel de três espécies de tomateiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 30: 429-433.
- 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.

- Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.N. Ferreira, Á.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2014.** Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res. 104: 88-96.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & N.E. Savin. 2007.** Bioassays with Arthropods, pp. 224. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (2007). 224p.
- Roditakis, E., E. Vasakis, M. Grispuou, M. Stavrakaki, R. Nauen, M. Gravouil & A. Bassi. 2015.** First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. J. Pest Sci. 88: 9-16.
- Roush, R.T. & G.L. Miller. 1986.** Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. Agric. Téc. 61: 429-435.
- Salazar, E.S. & J.E. Araya. 1997.** Detección de resistência a inseticidas em la polilla del tomate. Simiente 67: 8-22.
- Sang, S., B. Shu, X. Yi, J. Liu, M. Hu & G. Zhong. 2015.** Cross-resistance and baseline susceptibility of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) to cyantraniliprole in the south of China. Pest Manag. Sci. 72: 922-928.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- 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 Manag. Sci. 67: 913-920.
- Silva, T.B.M., W.M. Silva, M.R. Campos, J.E. Silva, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016a.** Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. Crop Prot. 79: 80-86.
- Silva, W.M., M. Berger, C. Bass, M. Williamson, D.M.N. Moura, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016b.** Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Pestic. Biochem. Physiol. 131: 1-8.
- Siqueira, H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- Snedecor, G.W. & W.G. Cochran. 1989.** Statistical methods. Iowa state University Press, Ames, IA. 503p.
- Software, L. 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows Computer Program computer program, version 2.0. By Software, L.

**Wang, X. & Y. Wu. 2012.** High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. J. Econ. Entomol. 105: 1019-1023.

Tabela 1. Locais de coleta das populações de *Tuta absoluta* de 10 localidades produtoras de tomate do Brasil.

População	Iniciais	Coordenadas geográficas	Data de coleta
América Dourada – BA	AMD	11° 28' S, 41° 27' W	agosto/2014
Bezerros – PE	BZR	08° 13' S, 35° 44' W	janeiro/2015
Brasília – DF	BSL	15° 56' S, 48° 08' W	julho/2014
Gameleira I – BA	GMLI	11° 26' S, 41° 38' W	agosto/2014
Gameleira II – BA	GMLII	11° 24' S, 41° 40' W	agosto/2014
Guaraciaba do Norte – CE	GBN	04° 10' S, 40° 44' W	fevereiro/2010
João Dourado II – BA	JDRII	11° 18' S, 41° 41' W	agosto/2014
João Dourado I – BA	JDRI	11° 19' S, 41° 39' W	agosto/2014
Lagoa Grande – PE	LGD	09° 00' S, 40° 22' W	agosto/2014
Pesqueira – PE	PSQ	08° 16' S, 36° 44' W	agosto/2014

Tabela 2. Mortalidades corrigidas (%) ( $\pm$  EP) de populações de *Tuta absoluta* expostas a dosagens de rótulo e diagnóstica de inseticidas moduladores de receptores de rianodina.

Região	População	Subgrupos				
		Diamidas antranílicas		Diamida do ácido ftálico		
		Clorantraniliprole (1 mg i.a./L) <sup>1</sup>	Ciantraniliprole (3 mg i.a./L) <sup>2</sup>	Ciantraniliprole (1 mg i.a./L) <sup>1</sup>	Flubendiamida (3 mg i.a./L) <sup>1</sup> (300 mg i.a./L) <sup>2</sup>	
Nordeste	América Dourada – BA	1,11 $\pm$ 1,11*	5,11 $\pm$ 3,09**	14,35 $\pm$ 3,36*	12,17 $\pm$ 3,75*	16,57 $\pm$ 3,17**
	Bezerros – PE	78,17 $\pm$ 4,64*	100	59,65 $\pm$ 6,80*	72,86 $\pm$ 2,77*	91,60 $\pm$ 1,98
	Gameleira I – BA	33,72 $\pm$ 7,30*	49,11 $\pm$ 7,85**	35,87 $\pm$ 4,29*	15,75 $\pm$ 5,18*	20,94 $\pm$ 4,55**
	Gameleira II – BA	44,06 $\pm$ 5,59*	88,05 $\pm$ 2,51	29,79 $\pm$ 5,15*	22,93 $\pm$ 4,63*	38,33 $\pm$ 6,26**
	Guaraciaba do Norte – CE	100	100	100	100	100
	João Dourado I – BA	28,31 $\pm$ 2,23*	55,14 $\pm$ 4,61**	29,82 $\pm$ 3,27*	30,61 $\pm$ 3,47*	55,05 $\pm$ 3,45**
	João Dourado III – BA	64,57 $\pm$ 6,08*	86,87 $\pm$ 3,34	34,67 $\pm$ 4,05*	51,19 $\pm$ 5,12*	62,01 $\pm$ 3,48**
	Lagoa Grande – PE	25,75 $\pm$ 4,40*	60,67 $\pm$ 5,47**	78,92 $\pm$ 4,80*	61,00 $\pm$ 6,56*	70,31 $\pm$ 6,62
	Pesqueira – PE	33,73 $\pm$ 5,73*	51,57 $\pm$ 8,05**	48,40 $\pm$ 5,07*	21,52 $\pm$ 5,14*	50,25 $\pm$ 5,33**
Centro-Oeste	Brasília – DF	100	100	97,98 $\pm$ 1,36	100	100

85  $\leq$  número de insetos  $\leq$  105 foram avaliados dependendo da população.

<sup>1</sup>\*Fração observada de sobreviventes significativa pelo teste Z a 1% de frequência esperada  $\alpha = 0,05$ .

<sup>2</sup>\*\* Mortalidade significativamente diferente de 80% pelo teste-*t* pareado de Student a  $P < 0,05$ .

Tabela 3. Toxicidade relativa de clorantianiliprole para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura: 25 ± 1 °C; U.R.: 65 ± 5% e fotoperíodo de 12 h.

População	N <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Inclinação ± EP <sup>3</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	CL <sub>80</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	χ <sup>2</sup> <sup>5</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>6</sup>	RR <sub>80</sub> (LC95%) <sup>6</sup>
BSL	298	6	1,27 ± 0,16	0,0044 (0,0024 – 0,0068)	0,020 (0,013 – 0,038)	6,05	1,00 (0,57 – 1,75)	1,00 (0,55 – 1,81)
GBN	331	7	1,50 ± 0,17	0,0049 (0,003 – 0,008)	0,018 (0,011 – 0,034)	11,06	1,12 (0,67 – 1,88)	0,89 (0,52 – 1,54)
BZR	302	6	1,24 ± 0,15	0,195 (0,122-0,277)	0,934 (0,670-1,404)	1,95	44,55 (25,35 – 78,32)*	46,73 (26,82 – 81,41)*
LGD	288	6	1,91 ± 0,20	1,55 (1,20-1,97)	4,30 (3,32-5,95)	2,26	355,76 (223,25 – 566,91)*	214,93 (129,27 - 357,36)*
JDRII	301	6	1,05 ± 0,13	2,29 (1,36 – 3,40)	14,45 (9,86 – 23,69)	4,24	524,85 (288,64 – 954,37)*	722,71 (396,75 – 1.316)*
JDRI	292	6	1,01 ± 0,14	2,88 (1,86 – 4,38)	19,47 (11,44 – 43,41)	1,57	658,37 (368,85 – 1.175)*	973,92 (452,41 – 2.097)*
GMLII	436	10	0,83 ± 0,07	4,65 (3,19-7,02)	48,02 (27,56-100,36)	5,40	1.064 (607,35 – 1.863)*	2.402 (1.116 – 5.173)*
GMLI	296	6	1,21 ± 0,15	92,43 (59,95-129,92)	457,74 (324,93-709,83)	0,53	21.155 (12.214 – 36.640)*	22.899 (12.972 – 40.421)*
PSQ	292	6	1,24 ± 0,15	646,32 (423,49 – 917,49)	3082 (2.135 – 4.942)	1,32	147.928 (85.331 – 256.445)*	154.193 (85.632 – 277.648)*
AMD	299	6	1,35 ± 0,14	1.262,7 (945,8-1.673,3)	5285 (3.743-8.376)	2,38	288.995 (177.430 – 470.711)*	264.380 (148.374 – 471.083)*

<sup>1</sup> Número total de insetos.

<sup>2</sup> Grau de liberdade.

<sup>3</sup> Erro padrão da média.

<sup>4</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

<sup>5</sup> Qui-quadrado (P>0.05).

<sup>6</sup> Razão de resistência: razão da CL<sub>50</sub> e CL<sub>80</sub> estimada entre as populações resistentes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson & Preisler (1992) e a razão do limite de confiança a 95%. \*Razão de resistência significativa porque o limite de confiança não inclui o valor 1,0.



Tabela 4. Toxicidade relativa de ciantraniliprole para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura:  $25 \pm 1$  °C; U.R.:  $65 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

População	n <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Inclinação $\pm$ EP <sup>3</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	CL <sub>80</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	$\chi^2$ <sup>5</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>6</sup>	RR <sub>80</sub> (LC95%) <sup>6</sup>
BSL	278	6	1,36 $\pm$ 0,15	0,015 (0,011 - 0,020)	0,06 (0,05 - 0,10)	2,68	1,00 (0,64 - 1,55)	1,00 (0,59 - 1,71)
GBN	317	8	1,32 $\pm$ 0,21	0,0157 (0,0076 - 0,0253)	0,068 (0,044 - 0,112)	3,27	1,03 (0,54 - 1,97)	1,08 (0,60 - 1,94)
BZR	296	6	1,82 $\pm$ 0,20	1,20 (0,90 - 1,53)	3,47 (2,68 - 4,82)	3,00	78,34 (52,07 - 117,88)*	54,95 (34,10 - 88,56)*
JDRI	303	6	1,46 $\pm$ 0,16	1,67 (1,22 - 2,19)	6,29 (4,68 - 9,16)	2,57	109,07 (71,14 - 167,22)*	99,56 (60,14 - 164,82)*
GMLII	305	7	1,47 $\pm$ 0,17	2,25 (1,55 - 3,03)	8,38 (6,26 - 12,00)	2,84	147,03 (93,28 - 231,76)*	132,67 (80,69 - 218,13)*
JDRII	283	8	1,35 $\pm$ 0,15	8,49 (6,17 - 11,38)	35,55 (25,31 - 55,62)	7,75	555,80 (359,50 - 859,29)*	562,59 (326,84 - 968,38)*
LGD	293	6	1,27 $\pm$ 0,17	28,93 (17,32 - 41,88)	133,42 (95,54 - 200,34)	1,28	1.895 (1.115 - 3.220)*	2.111 (1.249 - 3.569)*
GMLI	293	6	1,62 $\pm$ 0,19	90,59 (63,26 - 121,43)	299,18 (222,76 - 431,12)	2,07	5.932 (3.791 - 9.283)*	4.734 (2.872 - 7.803)*
PSQ	288	6	0,96 $\pm$ 0,13	152,87 (96,20 - 224,30)	1.148 (726,64 - 2.221)	1,29	10.010 (5.956 - 16.826)*	18.161 (9.376 - 35.176)*
AMD	289	6	1,00 $\pm$ 0,12	281,3 (190,8 - 405,0)	1.950 (1.211 - 3.922)	5,76	18.423 (11.339 - 29.932)*	30.860 (15.552 - 61.237)*

<sup>1</sup> Número total de insetos.

<sup>2</sup> Grau de liberdade.

<sup>3</sup> Erro padrão da média.

<sup>4</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

<sup>5</sup> Qui-quadrado (P>0.05).

<sup>6</sup> Razão de resistência: razão da CL<sub>50</sub> e CL<sub>80</sub> estimada entre as populações resistentes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson & Preisler (1992) e a razão do limite de confiança a 95%. \*Razão de resistência significativa porque o limite de confiança não inclui o valor 1,0.

Tabela 5. Toxicidade relativa de flubendiamida para larvas de *Tuta absoluta*. Temperatura:  $25 \pm 1$  °C; U.R.:  $65 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

População	n <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Inclinação $\pm$ EP <sup>3</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	CL <sub>80</sub> (LC95%) <sup>4</sup>	$\chi^2$ <sup>5</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>6</sup>	RR <sub>80</sub> (LC95%) <sup>6</sup>
GBN	279	9	2,13 $\pm$ 0,48	0,038 (0,017 – 0,056)	0,093 (0,065 – 0,136)	3,50	1,00 (0,48 – 2,09)	1,00 (0,62 – 1,62)
BSL	299	6	1,44 $\pm$ 0,14	0,30 (0,19 - 0,45)	1,14 (0,72 - 2,32)	9,09	7,95 (4,40 – 14,35)*	12,26 (7,46 – 20,15)*
BZR	288	6	2,26 $\pm$ 0,22	0,41 (0,34 - 0,51)	0,98 (0,77 - 1,32)	2,90	11,03 (6,28 – 19,38)*	10,44 (6,76 – 16,11)*
JDRI	278	6	1,73 $\pm$ 0,19	202,83 (153,16 – 259,90)	622,11 (474,92 – 878,22)	2,35	5.405 (3.013 – 9.696)*	6.664 (4.224 – 10.513)*
JDRII	303	7	1,13 $\pm$ 0,13	221,48 (146,56 – 312,24)	1.233 (852,93 – 1.989)	3,50	5.901 (3.104 – 11.219)*	13.208 (7.710 – 22.626)*
LGD	291	6	1,24 $\pm$ 0,17	673,4 (391,3 – 989,0)	3.200 (2.278 – 4.821)	2,85	17.943 (9.008 – 35.741)*	34.281 (20.780 – 56.554)*
GMLII	324	7	0,91 $\pm$ 0,11	1.045 (698 - 1.525)	8.793 (5.376 - 17.660)	3,80	27.854 (14.531 – 53.392)*	94.181 (48.002 – 184.784)*
PSQ	285	6	0,79 $\pm$ 0,12	1.398 (772,9 – 2.215)	16.468 (9.233 – 41.454)	0,46	37.254 (17.972 – 77.223)*	176.398 (80.136 – 388.291)*
AMD	287	6	0,96 $\pm$ 0,12	2.178 (1.422 - 3.179)	16.500 (10.143 - 34.008)	0,57	58.044 (30.149 – 111.751)*	176.737 (89.848 – 347.655)*
GMLI	304	6	1,42 $\pm$ 0,15	3.018 (2.226 - 3.964)	11.856 (8.699 - 17.715)	1,68	80.413 (44.316 – 145.914)*	126.990 (77.864 – 207.112)*

<sup>1</sup> Número total de insetos.

<sup>2</sup> Grau de liberdade.

<sup>3</sup> Erro padrão da média.

<sup>4</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

<sup>5</sup> Qui-quadrado (P>0.05).

<sup>6</sup> Razão de resistência: razão da CL<sub>50</sub> e CL<sub>80</sub> estimada entre as populações resistentes e população mais suscetível, determinado pelo método de Robertson & Preisler (1992) e a razão do limite de confiança a 95%. \*Razão de resistência significativa porque o limite de confiança não inclui o valor 1,0.

### CAPÍTULO 3

## RESISTÊNCIA DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) A CLORANTRANILIPROLE: HERANÇA, METABOLISMO E RESISTENCIA CRUZADA<sup>1</sup>

JEFFERSON E. SILVA

Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

---

<sup>1</sup>Silva, J.E. Resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a clorantraniliprole: herança, metabolismo e resistência cruzada. Artigo a ser submetido.

RESUMO – *Tuta absoluta* conhecida como traça-do-tomateiro, tornou-se uma das principais pragas do tomateiro no mundo. As diamidas compõem uma das classes de inseticidas em amplo uso no Brasil. No entanto, recentemente foram relatados casos de alta resistência desta praga a diamidas. A resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole foi geneticamente e bioquimicamente caracterizada, assim como foi verificada a possibilidade de resistência cruzada entre diamidas e inseticidas de outros grupos químicos. Curvas de concentrações-resposta foram estimadas para os parentais GBN-Sus (Guaraciaba do Norte – população suscetível) e AMD-Sel (América Dourada – população selecionada), para as gerações F<sub>1</sub> e para o retrocruzamento, por meio do método de bioensaio de imersão de folhas. Estudos de herança indicaram que a resistência a clorantraniliprole é monogênica, incompletamente recessiva e autossomal. A dominância da resistência a clorantraniliprole foi dependente da dose, mudando para recessiva à medida que a concentração do inseticida foi aumentada. Além disso, concentrações acima de 0,4 miligramas de clorantraniliprole tornaram a resistência totalmente recessiva. Esterases, glutatona *S*-transferase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 aparentemente não estão envolvidas na resistência ao clorantraniliprole, indicando que essas enzimas detoxificativas não compõem o principal mecanismo de resistência ao inseticida. Além disso, o espectro de resistência cruzada foi restrito apenas a flubendiamida e ciantraniliprole, sugerindo que o mecanismo de resistência envolvido seja alteração do sítio alvo. Portanto, a suspensão do uso de clorantraniliprole no controle da traça-do-tomateiro seria um componente útil no manejo da resistência a diamidas para esta espécie. O uso de diamidas para *T. absoluta*, em áreas introduzidas, deve ser cuidadosamente monitorado para evitar a seleção rápida de altos níveis de resistência e o potencial de sua disseminação para novas áreas.

PALAVRAS-CHAVE: Diamidas, falhas de controle, genética, dominância efetiva, metabolismo

## RESISTANCE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) TO

### CHLORANTRANILIPROLE: GENETICS, METABOLISM, AND CROSS-RESISTANCE

**ABSTRACT** –*Tuta absoluta*, known as tomato leafminer, become the most important tomato's pest of worldwide. Diamides are one of the few effective classes of insecticides in use in Brazil. But recently, cases of very high resistance to diamides in field populations of this pest from Brazil were reported. Herein, the resistance of *T. absoluta* to chlorantraniliprole were genetically and biochemically characterized, as well as the possibility of cross-resistance between diamides and insecticides of other chemical groups. Concentration-mortality curves were estimated for parental GBN-Sus (Guaraciaba do Norte – susceptible population) and AMD-Sel (América Dourada – selected population), F<sub>1</sub> and backcross generations, through the leaf dipping method. Inheritance studies indicated that chlorantraniliprole resistance is monogenic, incompletely recessive, and autosomal. Chlorantraniliprole resistance dominance was dose dependent shifting to recessive as concentration of that insecticide increased. Additionally, concentrations above 0.4 mg of chlorantraniliprole making resistance totally recessive. Esterases, glutathione *S*-transferases and cytochrome P450-dependent monooxygenases are apparently not involved in the chlorantraniliprole resistance, indicating that these detoxification enzymes are not the underlying resistance mechanism. Furthermore, the cross-resistance spectrum was restricted to the insecticide flubendiamide and cyantraniliprole, suggesting that altered target site may be the mechanism involved. Therefore, the suspension of chlorantraniliprole use against the tomato borer would be a useful component in diamide resistance management for this species. Diamides use against this species in introduced areas should be carefully monitored to prevent rapid selection of high levels of resistance and the potential for its spread to new areas.

**KEY WORDS:** Diamides, control failure, cross resistance, genetics, effective dominance, metabolism

## Introdução

A *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma das pragas mais importantes do tomateiro no Brasil, e tem apresentado altas infestações em campo durante os últimos anos; ocasionando consideráveis perdas econômicas a produtores em algumas regiões do país. Sua importância se deve as injúrias ocasionadas por larvas, principalmente aos folíolos das plantas, o que compromete seriamente a produtividade da cultura, podendo provocar perdas de até 100%, dependendo da época do ano e da intensidade de infestação no plantio. O uso de inseticidas tem sido uma das principais medidas adotadas de controle. No entanto, nem sempre tem atendido as expectativas de controle esperadas por agricultores (Guedes *et al.* 1994). Em algumas áreas o número de pulverizações chega a ser superior a 30 por cultivo (Picanço & Guedes 1999). Este uso indiscriminado de inseticidas tem levado a seleção para resistência em *T. absoluta* a vários inseticidas, tais como piretroides e organofosforados (Salazar & Araya 1997, 2001), a abamectina e derivados de nereistoxinas (Siqueira *et al.* 2000) e a reguladores de crescimento (Silva *et al.* 2011). A resistência tem se desenvolvido rapidamente nesta espécie devido ao uso de forma inadequada do controle químico por agricultores. Este tipo de controle tem sido o método mais comumente utilizado em países Sul-americanos e, mais recentemente, por produtores de tomate de países Europeus, do Norte da África e Oriente Médio (Desneux *et al.* 2011).

Nestes últimos dez anos, novos grupos de inseticidas tem sido registrado para o controle de pragas do tomate, dentre estes as diamidas. As diamidas compreendem um grupo de inseticidas com um modo de ação diferenciado dos demais inseticidas tradicionais. Pertencem ao mais novo grupo de inseticidas sintéticos (Grupo 28 – moduladores dos receptores de rianodina) de acordo com a classificação dada pelo Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC 2016). São inseticidas altamente ativos contra insetos pragas, em especial, lepidópteros (Lahm *et al.* 2007). E são bastante úteis no controle de espécies que apresentam resistência a outros grupos químicos

(Nauen *et al.* 2007). Estes produtos atuam diretamente nos receptores de rianodina, promovendo a sua ativação e a liberação desordenada de cálcio, ocasionando no inseto sintomas como: a cessação alimentar, letargia, paralisia e morte (Lahm *et al.* 2005, Cordova *et al.* 2006, Hannig *et al.* 2009). Quando utilizados inicialmente em populações brasileiras de *T. absoluta* apresentaram alta eficiência de controle em baixas doses (Campos *et al.* 2015b). Com o passar dos anos, algumas populações passaram a apresentar falhas de controle (Silva *et al.* 2016a). No Brasil além de utilizar clorraniliprole para o controle da *T. absoluta*, utilizam-se também flubendiamida, ciantraniliprole, espinetoram, abamectina, triflumurom, clorfenapir, cloridrato de cartape, permetrina, indoxacarbe e metoxifenoazida. Estes são alguns dos principais ingredientes ativos atualmente registrados para o controle da traça-do-tomateiro. Apesar de alguns destes já demonstrarem falhas de controle, outros como clorfenapir, abamectina e indoxacarbe apresentam grande eficácia no controle da *T. absoluta* (Silva *et al.* 2016b).

Recentemente, Silva *et al.* (2016a) relataram altos níveis de resistência em populações de *T. absoluta* coletadas em campo a diamidas. A população de América Dourada (AMD-Sel) nesse trabalho, após ser mantida sob pressão de seleção em laboratório com a concentração de 1.000 mg/L de clorraniliprole, alcançou mais de 1.000.000 de vezes de resistência. A partir disso, se buscou entender esta resistência de *T. absoluta* a clorraniliprole através de estudos genéticos e bioquímicos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a herança da resistência de *T. absoluta* a clorraniliprole (se é autossomal ou ligada ao sexo, recessiva ou dominante e se existe um ou mais genes envolvidos nessa resistência); a resistência cruzada de diamidas com outras classes de inseticidas, bem como se metabolismo detoxificativo está associado a esta resistência. O conhecimento das bases genéticas e bioquímicas da resistência é fundamental para que se tenha sucesso na hora de implementar um plano adequado de manejo, uma vez que tais fatores são determinantes na velocidade de desenvolvimento da resistência.

## Material e Métodos

**Insetos.** As populações de *T. absoluta* utilizadas no experimento foram coletadas em campos comerciais e experimentais de tomateiro durante os anos de 2010/2015, na região Nordeste do Brasil. Foram utilizadas nos experimentos as populações designadas AMD-Sel (América Dourada - BA, Brasil) e GBN-Sus (Guaraciaba do Norte, CE, Brasil). A população de *T. absoluta* GBN-Sus foi utilizada nos experimentos como população padrão de suscetibilidade. As populações foram mantidas em laboratório em gaiolas de larvas (45x45x45 cm) e gaiolas de adultos (30x30x30 cm). As gaiolas dos adultos foram usadas apenas para oviposição, onde folhas de tomate foram fornecidas diariamente para oviposição. Adultos de *T. absoluta* foram alimentados com solução de glicose a 10% (Yoki, Brasil), enquanto as larvas foram alimentadas com folhas de tomate cultivar Santa Clara (IC11 5500), cultivado em casa de vegetação sem uso de inseticidas. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura  $25\pm 1$  °C,  $65\pm 5\%$  de umidade relativa e fotofase de 12:12h.

**Inseticidas.** O inseticida clorantraniliprole foi utilizado em sua formulação comercial registrada para uso em campo no controle da traça-do-tomateiro (200 g i.a./L, suspension concentrate, DuPont Brazil, Paulínia, SP, Brasil). Para avaliar a resistência cruzada entre diamidas e outros inseticidas, bioensaios foram realizados com os seguintes inseticidas: abamectina (18 g a.i./L, concentrado emulsionável, Syngenta proteção de cultivos, São Paulo, SP, Brasil), cloridrato de cartape (500 g i.a./Kg, pó solúvel, Iharabras, Paulínia, SP, Brasil), clorfenapir (240 g i.a./L, suspensão concentrada, BASF S.A., São Paulo, Brasil), ciantraniliprole (100 g i.a./L, suspensão concentrada em óleo, DuPont, Paulínia, SP, Brasil), flubendiamida (480 g i.a./L, suspensão concentrada, Bayer S.A., Socorro, SP, Brasil), indoxacarbe (300 g i.a./Kg, granulado dispersível, DuPont, Brasil, Paulínia, SP, Brasil), malationa (1000 g i.a./L, concentrado emulsionável, Cheminova Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), metoxifenoazida (240 g a.i./L, suspensão



concentrada, Dow Agrosiences Industrial Ltda, São Paulo, SP, Brasil), permetrina (384 g i.a./L, concentrado emulsionável, FMC Química do Brasil, Campinas, SP, Brasil), espinetoram (250 g i.a./Kg, granulado dispersível, Dow AgroSciences, Franco da Rocha, SP, Brasil), triflumurom (480 g i.a./L, suspensão concentrada, Bayer S.A., Belford Roxo, RJ, Brasil). Nos ensaios de sinergismo foram utilizados os sinergistas: dietil maleato (DEM), butóxido de piperonila (PBO) e *S,S,S*-tributil fosforotritioato (DEF) obtidos da Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA).

**Bioensaios de Suscetibilidade.** Os bioensaios foram conduzidos usando o delineamento inteiramente casualizado com duas repetições, e todos os bioensaios foram repetidos pelo menos duas vezes. As soluções de clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida assim como o controle foram preparadas com 0,025% de Agr'óleo<sup>®</sup> (Gota Ltda, Contenda, PR, Brasil) como espalhante adesivo, para os outros inseticidas usou-se Triton X - 100 na proporção de 0,01%. Os folíolos de tomate foram imersos por 30 segundos em solução inseticida e mantidos a temperatura de sala até a secagem. As folhas foram posteriormente transferidas para placas de petri (8 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) contendo papel filtro umedecido com 400 µL de água destilada. Dez larvas de segundo instar inicial foram transferidas para cada placa de petri, em seguida as placas foram transferidas para câmara de crescimento onde permaneceram a  $25 \pm 1$  °C,  $65 \pm 5$ % umidade relativa e 12 h de fotofase. A mortalidade larval foi avaliada após 7 dias para metoxifenoazida, 96 horas para diamidas e 48 horas para os demais inseticidas. A avaliação da mortalidade foi realizada com o auxílio de uma lupa (Opton<sup>®</sup>, Germany). Os critérios utilizados nas avaliações se basearam no caminhar de larvas após serem estimuladas com pincel de cerdas macias; e larvas que não conseguiram se locomover o equivalente ao comprimento de seu corpo foram consideradas mortas.

**Seleção para Resistência a Clorantraniliprole.** A população de AMD-Sel, previamente identificada como resistente a clorantraniliprole, foi submetida a seleções contínuas com este

inseticida após a sétima geração em condições de laboratório. A concentração utilizada na seleção foi baseada nos bioensaios de concentração-mortalidade e utilizada em escala crescente até a décima quinta geração, quando a seleção foi sempre mantida com a concentração de 1000 mg clorantraniliprole/L.

**Herança da Resistência a Clorantraniliprole.** Para avaliar a possibilidade da herança da resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole ser autossomal ou ligada ao sexo; dominante ou recessiva, foram realizados cruzamentos recíprocos entre a população resistente e a suscetível: AMD-Sel ♀ x GBN-Sus ♂ e AMD-Sel ♂ x GBN-Sus ♀. A sexagem foi conduzida no estágio larval, de modo que ao chegar a fase adulta machos virgens acasalassem somente com fêmeas virgens da outra população e vice-versa. Nos experimentos de cruzamentos recíprocos utilizou-se pelo menos 150 casais. Para estimar o número de loci influenciando a resistência, a progênie F<sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos foi retrocruzada com a população resistente, sendo a descendência obtida deste cruzamento submetida a bioensaio de suscetibilidade a clorantraniliprole. A dominância estimada (*h*) da resistência a clorantraniliprole foi testada por meio de bioensaios de concentração-mortalidade com clorantraniliprole para os parentais (GBN-Sus e AMD-Sel) e para as progênies F<sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos. Oito concentrações de clorantraniliprole (0,010; 0,020; 0,040; 0,080; 0,100; 0,200; 0,300 e 0,400 mg i.a./L), além dos controles (compostos apenas por água mais o adjuvante), foram utilizados nos indivíduos obtidos da F<sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos entre AMD-Sel e GBN-Sus. A base monogênica da resistência a clorantraniliprole foi testada no retrocruzamento entre indivíduos obtidos dos cruzamentos recíprocos com o parental AMD-Sel. Larvas de segundo ínstar obtidas do retrocruzamento foram submetidas a bioensaio de concentração-mortalidade com clorantraniliprole. Foi realizado posteriormente o teste direto de herança para reconhecer sua base mono ou poligênica.

**Resistência Cruzada.** Larvas de segundo ínstar foram utilizadas em bioensaios de concentração-mortalidade com os inseticidas abamectina, cloridrato de cartape, clorfenapir, ciantraniliprole, flubendiamida, indoxacarbe, malationa, metoxifenoazida, permetrina, espinetoram e triflumurom para estabelecer o perfil de resistência cruzada com clorantraniliprole. O método de bioensaio usado foi o mesmo descrito para os bioensaios de concentração-mortalidade.

**Ensaio de Sinergismo para Clorantraniliprole.** Para investigar o possível envolvimento de enzimas detoxificativas na resistência de *T. absoluta* a diamidas 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 suscetível e resistente foram usadas neste experimento em tratamento apenas com clorantraniliprole, em tratamento clorantraniliprole + DEF, clorantraniliprole + DEM e clorantraniliprole + PBO para detectar se o metabolismo está envolvido na resistência. Os métodos de bioensaios utilizados foram os mesmos descritos anteriormente, no entanto nos bioensaios utilizando sinergistas todas as larvas foram tratadas topicamente (0,2 µL/larva) com uma concentração de 1 µg/µL de DEF, DEM e PBO antes de expor as larvas ao clorantraniliprole. Todos os sinergistas utilizados foram dissolvidos em acetona.

**Extração de Amostras para Análise de Atividade Enzimática.** Para extração de proteína foram coletadas 10 larvas de terceiro ínstar em triplicata para esterase e para glutathione *S*-transferase. Para esterase as larvas foram mantidas em tampão fosfato (pH 7,2; 0,02M) e para glutathione *S*-transferase utilizou-se o tampão fosfato pH 7,5 a 0,1M. As larvas foram maceradas e homogeneizadas antes de serem submetidas a centrifugação a 16,000 g. Após a centrifugação o *pelet* foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para determinação de proteína na amostra. A concentração de proteína foi determinada seguindo o método de ácido bicinconínico (Smith *et al.* 1985), usando albumina de soro bovino como padrão (BSA). Nos ensaios para monooxigenases

dependentes de citocromo P450, as amostras continham 30 larvas de terceiro ínstar cada, homogeneizadas em 1000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,5) contendo 10% de glicerol [vol:vol], 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético [EDTA], 0,1 mM ditioneitol [DTT], 1 mM 1-fenil-2-tiourea [PTU] e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF]. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g por 1 h em ultracentrífuga. Os *pelets* microsossomais foram então resuspensos em tampão de resuspensão (0,1M tampão fosfato de sódio, pH 7,5, contendo 10% [vol:vol] glicerol, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, e 1 mM PMSF).

**Ensaio de Esterase.** A atividade de esterase foi medida por meio do método adaptado de Van Asperen (1962). Uma solução estoque de 250mM dos substratos acetato de  $\alpha$ -naftila e acetato de  $\beta$ -naftila foram preparados em acetona. Em cada reação, 2  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -naftil acetato a 25mM, 10  $\mu\text{L}$  da amostra diluída de 1:10 e 188  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (pH 7,2, 0,02M) foram utilizados. O mesmo procedimento foi utilizado para análise de esterase usando  $\beta$ -naftil acetato como substrato. As reações foram incubadas a 30°C por 15 min. A reação foi paralisada utilizando 33,2  $\mu\text{L}$  de FAST Blue B a 0,3% em 3,5% de SDS. A absorbância foi lida a 600 nm para  $\alpha$ -naftol e a 555 nm para  $\beta$ -naftol em leitora de microplacas (Synergy H1, Multi-Mod, BioTek®, USA). O ensaio de atividade de acetato de *p*-nitrofenila (PNPA) consistiu de um volume final de 210  $\mu\text{L}$  contendo uma mistura de 5  $\mu\text{L}$  de PNPA diluído em acetonitrila, 195  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio a 0,02M (pH 7,2) e 10  $\mu\text{L}$  da preparação enzimática. O ensaio foi iniciado pela adição de pNPA e a mudança na absorbância foi registrada a 405 nm. A inclinação da reta (absorbância  $\text{min}^{-1}$ ) foi transformada em unidade de concentração utilizando o coeficiente de extinção de 6,53  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

**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 7,5). Para cada reação foram utilizados 113 µL de tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,5), 10 µL de amostra contendo proteína, 75 µL de glutathione reduzida (10 mM) e 2 µL 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, Multi-Moder, 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 M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>).

**Atividade de MFOs.** A atividade de citocromo P450 foi determinada pela avaliação da *O*-desmetilação do substrato *p*-nitroanisol (O<sub>2</sub>N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-CH<sub>3</sub>) a *p*-nitrofenol. As reações foram realizadas por meio da mistura de 175 µL do tampão de resuspensão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,5), 50 µL da amostra, 5 µL de *p*-nitroanisol (144mM em etanol) e 10 µL de NADPH reduzido (9.6 mM). A mistura foi preparada em tubos tipo Eppendorf com capacidade volumétrica de 1 ml e incubada por 30 min a 30°C com 10 µL de HCl (1M) adicionado para a parada da reação. A reação em mistura foi então centrifugada a 3.000 x *g* por 15 min, e 200 µL do sobrenadante foram lidos a 405 nm em leitora de microplacas. Cada amostra foi analisada em triplicata. A atividade de citocromo P450 por amostra foi determinada baseada em curva padrão de *p*-nitrofenol e expressa como nmol de *p*-nitrofenol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína.

**Análise Estatística.** Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos a análise de Probit utilizando o programa POLO Plus (LeOra-Software 2005) para calcular as concentrações médias letais (valores de CL<sub>50</sub>) e seus limites de confiança a 95% de probabilidade, assim como as

inclinações das curvas e seus respectivos erros padrões. Teste de igualdade e paralelismo, também, foram realizados para as curvas obtidas para os dois híbridos utilizando o mesmo programa. As mortalidades observadas nos tratamentos foram corrigidas pela mortalidade do controle utilizando o método de Abbott (1925). As 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 clorantraniliprole 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  $LC_{50}$ s de AMD-Sel, da  $F_1$  e de GBN-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 homocigotos dominantes, heterocigotos, e homocigotos suscetíveis, respectivamente (Hartl 2000). O valor de fitness para os indivíduos homocigotos dominantes foi considerado 1,0; enquanto que os valores para os heterocigotos e homocigotos recessivos foram calculados como a razão entre a taxa de sobrevivência observada da progênie  $F_1$  agrupada obtidas dos cruzamentos recíprocos e a taxa de sobrevivência da população AMD-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 clorantraniliprole em *T. absoluta* foi testada inicialmente comparando as inclinações das curvas de concentração-mortalidade dos cruzamentos recíprocos  $F_1$  (entre as populações resistente e suscetível) e seu retrocruzamento. Os resultados do retrocruzamento foram comparados com os dados esperados utilizando o teste de  $\chi^2$ . O número

mínimo de genes efetivos ( $n_E$ ) foi estimado com a fórmula  $n_E = (L_2 - L_1)^2 / (8\sigma_s^2) \leq n$ , onde  $L_1$  e  $L_2$  são os logaritmos das  $CL_{50}$ s das populações GBN-Sus e AMD-Sel, respectivamente. O número de genes é  $n$ , e a variação genética extra segregada na geração do retrocruzamento além da  $F_1$  é  $\sigma_s^2$ , a qual pode ser estimada por  $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - (\sigma_{F1}^2 + 1/2 \sigma_{P1}^2 + 1/2 \sigma_{P2}^2)$ , onde  $\sigma_{B1}^2$ ,  $\sigma_{B2}^2$ ,  $\sigma_{F1}^2$ ,  $\sigma_{P1}^2$  e  $\sigma_{P2}^2$  são as variações fenotípicas do  $F_1$  agrupado, do retrocruzamento ( $F_1$  agrupado x AMD-Sel) da população selecionada resistente AMD-Sel e da população suscetível GBN-Sus. O retrocruzamento entre o  $F_1$  agrupado x GBN-Sus não foi realizado, desse modo considerou-se  $\sigma_{B2}^2 = 0$ .

## Resultados

A população resistente AMD-Sel apresentou-se inicialmente 1.076.957 vezes mais resistente quando comparada a população suscetível GBN-Sus (Tabela 1) com base nos valores de  $CL_{50}$ . Os valores de  $CL_{50}$  para  $F_1$  ( $\text{♀R} \times \text{♂S}$ ) e  $F_1'$  ( $\text{♀S} \times \text{♂R}$ ) foram de 0,020 e 0,023 respectivamente, apresentando igualdade e paralelismo entre ambas as curvas, havendo uma sobreposição dos seus limites de confiança a 95%, sendo desta forma descartada a hipótese da resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole sofrer alguma influência maternal. Os níveis de resistência dos cruzamentos recíprocos,  $F_1$ ,  $F_1'$  e  $F_1$  agrupado, foram de 6,28; 7,16 e 6,67 vezes, respectivamente. Os cruzamentos recíprocos realizados na  $F_1$  indicaram que a base genética da resistência é autossômica ao invés de ser ligada ao sexo. As respostas da população GBN-Sus e das duas  $F_1$  ao inseticida foram bem similares e muito próximas quando comparadas a população AMD-Sel (Tabela 1; Fig. 1).

Os graus de dominância ( $D$ ) da resistência em *T. absoluta* calculados a partir dos valores de  $CL_{50}$  foram de -0,74, -0,72 e -0,73 para  $F_1$ ,  $F_1'$  e  $F_1$  agrupado, respectivamente (Tabela 1).

Considerando os erros padrões calculados por meio da fórmula de Lehmann (1966) para cada valor de  $D$ , então podemos inferir que a resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole é incompleta ou parcialmente recessiva (Tabela 1).

A herança da resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole foi monogênica. Das 16 concentrações utilizadas no teste, apenas quatro se mostraram significativas. Em sua grande maioria, as concentrações utilizadas não apresentaram diferenças significativas entre a mortalidade observada e a mortalidade esperada, sugerindo desta forma que a hipótese de haver apenas um gene envolvido na resistência está correta (Fig. 1; Tabela 2). Com relação ao conjunto de concentrações utilizadas no teste, estas se mostraram significativas ( $\chi^2 = 44,9$ ;  $gl = 15$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 2). Quando verificado o número mínimo de genes ( $\eta_E$ ) envolvidos na resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole por meio do método de Lande (1981), observou-se que o número estava próximo de 1 (0,78).

A dominância efetiva ( $h$ ) foi verificada para cada uma das oito diferentes concentrações que foram utilizadas para discriminar a dose suficientemente capaz de eliminar os indivíduos suscetíveis e heterozigotos de indivíduos resistentes. A concentração de 0,4 mg i.a./L foi observada como mínima para separar homozigotos e heterozigotos suscetíveis de homozigotos resistentes (Tabela 3).

Os valores de  $CL_{50}$  estimados para GBN-Sus e AMD-Sel apenas com clorantraniliprole e com clorantraniliprole + sinergistas (PBO, DEF e DEM) são mostrados na Tabela 5, os resultados mostram que na população GBN-Sus houve uma pequena razão de sinergismo para PBO (1,98) e DEF (1,11) e um baixo nível de antagonismo para o DEM (0,54), não sendo este significativo. Dentre todos os dados obtidos com os tratamentos com e sem sinergistas, apenas o tratamento contendo clorantraniliprole + PBO na população GBN-Sus apresentou diferença significativa. Quando observados os dados obtidos para AMD-Sel, observou-se um pequeno nível de



antagonismo para os três sinergistas, com valores de 0,89 para PBO; 0,58 para DEF e 0,5 para DEM, embora não significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5). As razões de resistência sinergizadas a clorantranilprole entre AMD-Sel e GBN-Sus foram de 1.120.603, 952.676 e 542.112 vezes para PBO, DEF e DEM, respectivamente (Tabela 5), maiores do que a razão de resistência não sinergizada (500.000 vezes), evidenciando antagonismo.

A possibilidade de resistência cruzada entre diamidas e inseticidas pertencentes a grupos químicos distintos não foi observada utilizando-se as populações GBN-Sus e AMD-Sel (Tabela 4). Inseticidas como o triflumurom, a permetrina e metoxifenoazida apresentaram altos valores de  $CL_{50}$ s em AMD-Sel, provavelmente devido a prévia estabilidade de resistência desta população a estes inseticidas. Os valores de  $CL_{50}$  para malationa e cloridrato de cartape foram de 260 e 352 mg i.a./L, respectivamente. Espinetoram, abamectin, clorfenapir e indoxacarbe apresentaram os mais baixos valores de  $CL_{50}$  dentre todos os inseticidas testados, com valores de 0,19; 0,67; 11,44 e 1,64 (Tabela 5).

Não houve diferença significativa na atividade de esterase entre as populações de *T. absoluta* GBN-Sus e AMD-Sel utilizando acetato de  $\alpha$ -naftila e acetato de 4-nitrofenila como substratos ( $P > 0,34$  e  $P > 0,21$ ). No entanto, para acetato de  $\beta$ -naftila houve diferença significativa ( $P < 0,03$ ). As atividades de  $\alpha$ -esterases entre as populações foram de  $9,99 \pm 0,68$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para GBN-Sus e  $11,04 \pm 0,69$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para AMD-Sel. A atividade para  $\beta$ -esterase foi de  $19,08 \pm 1,30$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para GBN-Sus e  $23,62 \pm 0,38$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  para AMD-Sel. Quanto ao substrato 4-nitrofenil acetato, a atividade observada para GBN-Sus foi de  $7,23 \pm 1,40$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e de  $5,02 \pm 0,55$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para AMD-Sel (Fig.2).

Para a glutationa *S*-transferase houve diferença significativa entre GBN-Sus e AMD-Sel com as médias de atividade de  $5,46 \pm 0,28$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  e  $9,48 \pm 1,37$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,

respectivamente ( $P < 0,04$ ) (Fig. 2). Quanto ao metabolismo oxidativo não foi observado diferença significativa para monooxigenases dependentes de citocromo P450 entre as duas populações ( $P > 0,12$ ). As atividades foram de  $2,58 \pm 0,21$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para GBN-Sus e de  $4,36 \pm 0,89$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para AMD-Sel (Fig. 2).

## Discussão

Os altos níveis de resistência atingidos por populações de *T. absoluta* a diamidas em um curto espaço de tempo (Roditakis *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016a), tem gerado grandes preocupações dentro da comunidade científica, principalmente devido ao impacto que esta pode ocasionar a tomaticultura e, conseqüentemente, a economia. Diante disso tem-se buscado informações sobre as bases genéticas e fisiológicas que governam esta resistência antes que se espalhe para outras áreas e assim poder refinar o manejo de resistência em áreas onde ainda não esteja desenvolvida. Neste estudo, uma população resistente a diamidas (AMD-Sel) (Silva *et al.* 2016a) coletada em uma área de produção de tomate sob intensas aplicações de inseticidas para controlar *T. absoluta* foi caracterizada quanto aos aspectos genéticos e bioquímicos. AMD-Sel é resistente a várias classes de inseticidas, tais como piretroides, organofosforados, derivados de nereistoxinas, reguladores de crescimento e agora às diamidas. Após seleção em laboratório, a população AMD-Sel atingiu níveis superiores a 1.000.000 de vezes de resistência, os mais altos já encontrados para *T. absoluta* a clorantraniliprole. Isto é mais de 33.000 vezes acima da dose sugerida para o controle de *T. absoluta* em campo, o que confere total ineficiência de controle do produto a esta população.

A resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole seguiu um padrão genético mendeliano. Os resultados de herança mostraram que os valores das  $CL_{50}$ s estimados para  $F_1$  e  $F_1'$  não foram significativamente diferentes entre si, havendo sobreposição dos limites de confiança, mostrando

que a resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole é autossômica. Além disso, a curva da F<sub>1</sub> agrupada comportou-se de forma similar e mais próxima a curva da população GBN-Sus, porém diferindo estatisticamente desta, sugerindo que a dominância da resistência é incompletamente recessiva. Uma menor inclinação da curva do retrocruzamento (comparada à curva da população parental AMD-Sel), bem como o teste direto (a grande maioria das concentrações testadas se ajustou ao modelo monogênico), mostrou que a resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole é monofatorial. Esse mesmo padrão de herança foi observado em estudos realizados anteriormente com *T. absoluta* por Roditakis *et al.* (2017), e em *Plutella xylostella* por Steinbach *et al.* (2015). No entanto, diferem em parte dos encontrados em populações chinesas de *P. xylostella*, onde a resistência foi autossomal, incompletamente recessiva e poligênica (Liu *et al.* 2015).

Após seleção com clorantraniliprole, a população AMD-Sel não somente aumentou o nível de resistência a esse inseticida como, também, elevou o nível de resistência a ciantraniliprole e flubendiamida. Esta resistência cruzada entre produtos do mesmo grupo foi observada anteriormente por Silva *et al.* (2016). Até então, ciantraniliprole não era registrado para o controle de *T. absoluta*, o que demonstra esta resistência cruzada entre as diamidas. Além disso, o perfil de resistência cruzada não mostrou resistência entre diamidas e espinetoram, abamectina, triflumurom, malationa, clorfenapir, cloridrato de cartape, permetrina, indoxacarbe e metoxifenoazida, o que demonstra que o mecanismo de resistência é único entre as diamidas. No entanto, existem outras resistências desenvolvidas anteriormente ou em paralelo nesta população e a seleção com diamidas não as reduziu, como observado para triflumurom, permetrina e metoxifenoazida, sugerindo uma alta estabilidade destas.

A herança da resistência de *T. absoluta* a clorantraniliprole observada neste estudo (isto é, autossomal, recessiva e monogênica), bem como um perfil de resistência cruzada restrito ao grupo das diamidas (IRAC, grupo 28), sugere que a alteração de sítio alvo esteja envolvida na

resistência de *T. absoluta* a estes inseticidas. Apesar disso, os mecanismos destoxicativos de resistência foram avaliados para se observar a extensão da contribuição destes na resistência de *T. absoluta* a diamidas. No entanto, um leve antagonismo da toxicidade de clorantraniliprole com DEM (0,5), DEF (0,58) e PBO (0,89) foi observado quando comparado com o tratamento somente com inseticida, sugerindo que a destoxificação metabólica não está associada a esta resistência. O uso de sinergista sugere preliminarmente a identificação do metabolismo na resistência, entretanto a participação de um sistema enzimático pode ser melhor compreendida a partir de reações enzima-substrato modelo (Khambay & Jewess 2010). Entretanto, uma pequena diferença na atividade de esterase, glutational *S*-transferase e monooxigenases foi observada, sendo significativas apenas as atividades quando utilizados os substratos acetato de  $\beta$ -naftila para esterase e CDNB para glutational *S*-transferase. Apesar das diferenças significativas na atividade destas enzimas ( $P < 0.05$ ), estas não refletem os altos níveis de resistência obtidos nesta população. Portanto, o metabolismo não é o principal mecanismo envolvido em resistência de altos níveis a clorantraniliprole em populações de *T. absoluta*.

As diamidas são inseticidas que se ligam aos receptores de rianodina modulando a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  liberando o estoque de  $\text{Ca}^{+2}$  interno a partir das células, prejudicando o funcionamento normal dos músculos (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2009). Alterações de aminoácidos em mutações não sinónimas (G4946E) foram observadas em *P. xylostella*, e estas foram fortemente sugeridas como responsáveis pela resistência da praga a clorantraniliprole (Trocza *et al.* 2012). Posteriormente verificou-se por meio de monitoramento que esta mutação já havia se espalhado, e já se encontrava presente em populações resistentes de *P. xylostella* de nove países situados em três diferentes continentes (Steinbach *et al.* 2015, Trocza *et al.* 2015). Esta informação levou a hipótese de que a mesma mutação poderia estar envolvida na resistência de *T. absoluta* a diamidas. Roditakis *et al.* (2017) observaram em seus estudos mudanças em

regiões específicas no gene do receptor de rianodina em populações de *T. absoluta*, incluindo populações de Silva *et al.* (2016), e associaram estas alterações a resistência da espécie a clorraniliprole. Foram detectadas as presenças de quatro mutações em populações resistentes ao inseticida (G4903E, I4746M, G4903V e I4746T), as quais estavam presentes na população AMD-Sel (dados não mostrados).

A resistência de *T. absoluta* a diamidas no Brasil tem alcançado níveis extremamente altos, com um padrão de herança autossômico, monogênico e parcialmente ou completamente recessivo. No entanto, resultados de dominância efetiva mostraram claramente que a dosagem recomendada em bula (40 mg i. a./L) torna esta resistência totalmente recessiva. Ainda, há uma grande faixa de concentração que poderá ser usada para monitoramento da resistência, pois a 0,4 mg i.a./L somente homozigotos resistentes sobreviveriam. Portanto sugerimos aqui a dose de 5 mg i. a./L como discriminatória em programas de monitoramento da resistência a clorraniliprole. Com base nestes estudos, um programa de manejo da resistência a diamidas poderá ser implementado adotando-se o uso da dose de campo com a disponibilidade de refúgio, atrelado ao monitoramento. Adicionalmente, o produtor e/ou técnicos poderão ainda rotacionar o uso de diamidas com outros produtos efetivos contra esta praga, como espinosinas, avermectinas, pirazois, oxadiazinas (Campos *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016b) e novas moléculas, para eliminar os homozigotos sobreviventes da pulverização com diamidas. Por último, faz-se necessário que estratégias de manejo integrado de pragas (MIP) sejam adotadas em paralelo para manter densidades populacionais desta praga em níveis baixos, diminuindo a possibilidade de populações resistentes atingirem o nível de controle. Diamidas usadas em áreas onde esta espécie foi introduzida ou onde populações sejam suscetíveis devem ser cuidadosamente monitoradas para mitigar o desenvolvimento rápido da resistência e sua distribuição para novas áreas.

## Agradecimentos

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

## Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015a.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *Pest Manag. Sci.* 71: 537-544.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015b.** Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* 88: 405-412.
- Cordova, D., E.A. Benner, M.D. Sacher, J.J. Rauh, J.S. Sopa, G.P. Lahm, T.P. Selby, T.M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D.F. Rhoades, L. Wu, R.M. Smith & Y. Tao. 2006.** Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84: 196-214.
- Desneux, N., M.G. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja. 2011.** The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- Georghiou, G.P. 1969.** Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 26: 224-255.
- Guedes, R.N.C., M.C. Picanço, A.L. Matioli & D.M. Rocha. 1994.** Efeito de inseticidas e sistemas de condução do tomateiro no controle de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 23: 321-325.
- Hannig, G.T., M. Ziegler & G.M. Paula. 2009.** Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *Pest Manag. Sci.* 65: 969-974.
- Hartl, D.L. 2000.** A primer of population genetics, 3rd ed. Sunderland: Sinauer. 221p.

- Hemingway, J., N.J. Hawkes, M. L. & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 653-665.
- IRAC. 2016.** IRAC Mode of Action Classification Scheme, IRAC MoA Classification. IRAC International MoA Workgroup.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- Lahm, G.P., T.P. Selby, J.H. Freudenberger, T.M. Stevenson, B.J. Myers, G. Seburyamo, B.K. Smith, L. Flexner, C.E. Clark & D. Cordova. 2005.** Insecticidal anthranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 4898-4906.
- Lahm, G.P., T.M. Stevenson, T.P. Selby, J.H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C.A. Bellin, C.M. Dubas, B.K. Smith, K.A. Hughes, J.G. Hollingshaus, C.E. Clark & E.A. Benner. 2007.** Rynaxypyr™: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274-6279.
- Lande, R. 1981.** The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541-553.
- Lehmann, E.L. 1966.** Testing statistical hypotheses. New York, Wiley, 369p.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA. computer program, version By LeOra-Software.
- Liu, X., Y. Ning, H. Wang & K. Wang. 2015.** Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of ciantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol. Exp. Appl.* 157: 271-278.
- MAPA. 2016.** Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários., Brasília, Brazil. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- Nauen, R. & D. Steinbach. 2016.** Resistance to Diamide Insecticides in Lepidopteran Pests, p. 219-240. In A.R. Horowitz & I. Ishaaya (eds.), *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer International Publishing, Cham. 339p.
- Nauen, R., S. Konanz, T. Hirooka, T. Nishimatsu & H. Kodama. 2007.** Flubendiamide: A unique tool in resistance management tactics for pest lepidoptera difficult to control. *Pflanzenschutz-Nachr Bayer* 60: 247-262.
- Picanço, M.C. & R.N.C. Guedes. 1999.** Manejo integrado de pragas no Brasil: situação atual, problemas e perspectivas. *Ação ambiental* 2: 23-27.

- Roditakis, E., C. Skarmoutsou & M. Staurakaki. 2013.** Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. *Pest Manag. Sci.* 69: 834-840.
- Roditakis, E., E. Vasakis, M. Grispu, M. Stavrakaki, R. Nauen, M. Gravouil & A. Bassi. 2015.** First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest Sci.* 88: 9-16.
- Roditakis, E., D. Steinbach, G. Moritz, E. Vasakis, M. Stavrakaki, A. Ilias, L. García-Vidal, M.D.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza, E. Morou, J.E. Silva, W.M. Silva, H.A.A. Siqueira, S. Iqbal, B.J. Troczka, M.S. Williamson, C. Bass, A. Tsagkarakou, J. Vontas & R. Nauen. 2017.** Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 80: 11-20.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 1997.** Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente* 67: 8-22.
- Salazar, E.R. & J.E. Araya. 2001.** Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. *Agric. Téc.* 61: 429-435.
- 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 Manag. Sci.* 67: 913-920.
- Silva, J.E., C.P.O. Assis, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016a.** Field-evolved resistance and cross-resistance of brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J. Econ. Entomol.* 109: 2190-2195.
- Silva, T.B.M., W.M. Silva, M.R. Campos, J.E. Silva, L.M.S. Ribeiro & H.A.A. Siqueira. 2016b.** Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Prot.* 79: 80-86.
- Siqueira, H.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. For. Entomol.* 2: 147-153.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Sparks, T.C. & R. Nauen. 2015.** IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121: 122-128.
- Steinbach, D., O. Gutbrod, P. Lümmer, S. Matthiesen, C. Schorn & R. Nauen. 2015.** Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 63: 14-22.



- Stone, B.F. 1968.** A formula for determining the degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. Bull. W.H.O. 38: 325-326.
- Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. J. Econ. Entomol. 81: 703-712.
- Trocza, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G.E. Davies, L.M. Field, M.S. Williamson, R. Slater & R. Nauen. 2012.** Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. Insect Biochem. Mol. Biol. 42: 873-880.
- Trocza, B.J., A.J. Williams, M.S. Williamson, L.M. Field, P. Lüemmen & T.G.E. Davies. 2015.** Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. Sci. Rep. 5: 14680.
- Van Asperen, K. 1962.** A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J Insect Physiol. 8: 401-416.

Tabela 1. Toxicidade de clorantraniliprole para populações suscetível, resistente, dos cruzamentos recíprocos F<sub>1</sub> (♀R x ♂S) e (♀S x ♂R) e do retrocruzamento (F<sub>1</sub> agrupado x AMD-Sel) de *Tuta absoluta*. Nota = n, número de insetos testados; GL, grau de liberdade; EP, erro padrão; e  $\chi^2$ , qui-quadrado.

Populações <sup>1</sup>	N	$\chi^2$ (GL)	Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (LC <sub>95%</sub> ) <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (LC <sub>95%</sub> ) <sup>3</sup>	DD <sub>50</sub> ± EP <sup>4</sup>
GBN-Sus	457	12,4 (8)	2,32 ± 0,46	0,0032 (0,0009 – 0,0050)	1,00 (0,55 – 1,82)	-
AMD-Sel	251	1,29 (6)	3,79 ± 0,70	3.454 (2.654 – 4.215)	1.076.957 (668.022 – 1.736.224)	-
♀R x ♂S (F <sub>1</sub> )	276	5,69 (8)	1,57 ± 0,16	0,020 (0,015 – 0,027)	6,28 (3,75 – 10,52)	-0,74 ± 0,28
♀S x ♂R (F <sub>1</sub> )	238	5,98 (7)	2,72 ± 0,52	0,023 (0,016 – 0,030)	7,16 (4,24 – 12,12)	-0,72 ± 0,20
F <sub>1</sub> agrupado	514	6,49 (9)	1,87 ± 0,17	0,021 (0,017 – 0,027)	6,67 (4,12 – 10,81)	-0,73 ± 0,25
F <sub>1</sub> agrupado x AMD-Sel	365	27,42 (18)	0,40 ± 0,05	14,17 (2,60 – 64,07)	4.419 (1.262 – 15.477)	-

<sup>1</sup>Progênes resultantes dos cruzamentos recíprocos e retrocruzamentos; <sup>2</sup>CL – concentração letal (mg de i.a. clorantraniliprole/L) que produz mortalidade; <sup>3</sup>Razão de resistência calculada por meio do método de Robertson & Preisler (1992) e limite de confiança a 95% das estimativas da CL<sub>50</sub>; <sup>4</sup>Grau de dominância.

Tabela 2. Teste direto para herança monogênica da resistência a clorantraniliprole em *Tuta absoluta*, comparando as mortalidades esperadas e observadas do retrocruzamento (F<sub>1</sub> agrupado x AMD-Sel).

Concentrações (mg/L)	Mortalidade observada (%)	Mortalidade esperada (%) <sup>1</sup>	$\chi^2$	P
0,03125	9,05	23,70	9,05*	0,0026
0,0625	14,74	37,84	14,11*	0,0001
0,125	23,76	46,43	11,06*	0,0008
0,25	29,80	47,18	6,40*	0,0114
0,5	46	48,21	0,10 <sup>ns</sup>	0,7518
1	51,40	48,21	0,21 <sup>ns</sup>	0,6467
5	52	48,21	0,30 <sup>ns</sup>	0,5838
10	49,60	48,21	0,04 <sup>ns</sup>	0,8414
50	53,71	48,21	0,63 <sup>ns</sup>	0,4273
100	43,16	48,21	0,53 <sup>ns</sup>	0,4666
500	54,53	51,67	0,16 <sup>ns</sup>	0,6891
1000	56,80	53,23	0,24 <sup>ns</sup>	0,6242
2000	65,89	61,58	0,30 <sup>ns</sup>	0,5838
4000	88,63	77,34	1,65 <sup>ns</sup>	0,1989
8000	100	96,66	0,12 <sup>ns</sup>	0,7290
16000	100	100	0	1,0000
Total	-	-	$\sum \chi^2 = 44,9$	

<sup>1</sup>Mortalidade esperada em cada concentração  $x = 0,5$  (% mortalidade de F<sub>1</sub> agrupado em  $x +$  % mortalidade de AMD-Sel em  $x$ ). <sup>ns</sup> Não significativo e \*significativos a 5% de probabilidade com base no teste de qui-quadrado.

Tabela 3. Dominância efetiva para populações suscetível (GBN-Sus) e resistente (AMD-Sel), e progênie F<sub>1</sub> agrupada em *Tuta absoluta* sobreviventes quando submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de clorantraniliprole.

Concentração (mg/L)	População/Progênie <sup>1</sup>	N	Mortalidade (%)	Desempenho <sup>2</sup>	(h) <sup>3</sup>
0,010	GBN-Sus	30	76,67	0,24	-
	F <sub>1</sub> agrupado	24	25,00	0,75	0,67
	AMD-Sel	28	0,00	1,00	-
0,020	GBN-Sus	30	96,67	0,04	-
	F <sub>1</sub> agrupado	30	33,33	0,67	0,66
	AMD-Sel	26	0,00	1,00	-
0,040	GBN-Sus	29	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	29	51,72	0,49	0,49
	AMD-Sel	26	0,00	1,00	-
0,080	GBN-Sus	30	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	30	76,67	0,24	0,24
	AMD-Sel	32	0,00	1,00	-
0,100	GBN-Sus	29	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	30	86,67	0,14	0,14
	AMD-Sel	30	0,00	1,00	-
0,200	GBN-Sus	31	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	28	92,86	0,08	0,08
	AMD-Sel	28	0,00	1,00	-
0,300	GBN-Sus	28	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	30	96,67	0,04	0,04
	AMD-Sel	31	0,00	1,00	-
0,400	GBN-Sus	27	100,00	0,00	-
	F <sub>1</sub> agrupado	29	100,00	0,00	0,00
	AMD-Sel	28	0,00	1,00	-

<sup>1</sup>GBN-Sus e AMD-Sel são as populações suscetível e resistente, respectivamente; e F<sub>1</sub> agrupado corresponde à soma dos indivíduos híbridos provenientes dos cruzamentos recíprocos entre as populações parentais.

<sup>2</sup>Desempenho corresponde a taxa de sobreviventes entre as populações (GBN-Sus) e F<sub>1</sub> agrupado e a população resistente (AMD-Sel).

<sup>3</sup>Os valores de *h* variam entre 0 (recessividade completa) e 1 (dominância completa). Se o valor de *h* corresponde a 0,5 (co-dominante ou aditivo) ou está entre  $0 < h < 0,5$  (recessividade incompleta) e  $0,5 < h < 1$  (dominância incompleta).

Tabela 4. Espectro de resistência cruzada a clorantraniliprole para a população de AMD-Sel de *Tuta absoluta*.

Inseticida	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EP <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>3</sup>	CL <sub>80</sub> (LC95%) <sup>3</sup>	χ <sup>2</sup> (GL) <sup>4</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>5</sup>
População GBN-Sus						
Clorantraniliprole	234	2,49 ± 0,30	0,0060 (0,0048 – 0,0075)	0,013 (0,010 – 0,018)	1,90 (6)	1,00 (0,73 – 1,38)
Ciantraniliprole	243	1,99 ± 0,36	0,032 (0,019 – 0,044)	0,084 (0,062 – 0,125)	2,64 (6)	1,00 (0,57 – 1,74)
Flubendiamida	265	2,22 ± 0,37	0,028 (0,019 – 0,038)	0,068 (0,051 – 0,098)	2,50 (7)	1,00 (0,62 – 1,61)
Espinetoram	238	2,16 ± 0,27	0,069 (0,053 – 0,088)	0,168 (0,129 – 0,241)	4,87 (6)	1,00 (0,70 – 1,43)
Abamectina	234	2,13 ± 0,27	0,48 (0,37 – 0,62)	1,20 (0,92 – 1,71)	3,77 (6)	1,00 (0,69 – 1,44)
Triflumurom	225	1,71 ± 0,24	2.989 (2.212 – 4.276)	9.256 (6.085 – 18.003)	5,62 (6)	1,00 (0,63 – 1,58)
Malationa	240	2,53 ± 0,42	131 (89 – 171)	281 (217 – 393)	2,00 (6)	1,00 (0,65 – 1,55)
Clorfenapir	232	2,15 ± 0,26	4,92 (3,04 – 7,51)	12,13 (7,93 – 23,06)	9,38 (6)	1,00 (0,68 – 1,48)
Cartape	248	2,82 ± 0,42	87 (64 – 111)	173 (136 – 236)	1,68 (6)	1,00 (0,69 – 1,45)
Permetrina	241	1,34 ± 0,21	342 (185 – 531)	1.449 (951 – 2.470)	4,52 (6)	1,00 (0,49 – 2,05)
Indoxacarbe	245	1,87 ± 0,19	1,02 (0,73 – 1,44)	2,86 (1,96 – 4,95)	6,59 (6)	1,00 (0,70 – 1,43)
Metoxifenoziata	227	1,75 ± 0,19	1,869 (1.422 – 2.456)	5.668 (4.127 – 8.675)	5,52 (6)	1,00 (0,68 – 1,47)

<sup>1</sup> Número total de insetos usados.

<sup>2</sup> Inclinações das curvas e erro padrão.

<sup>3</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

<sup>4</sup> χ<sup>2</sup> teste de qui-quadrado e grau de liberdade.

<sup>5</sup> Razão de resistência: razão das estimativas da CL<sub>50</sub> entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e limite de confiança a 95% das estimativas da CL<sub>50</sub>. \*Razão de resistência significativa, uma vez que o limite de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 4. Continuação.

Inseticida	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EP <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (LC95%) <sup>3</sup>	CL <sub>80</sub> (LC95%) <sup>3</sup>	χ <sup>2</sup> (GL) <sup>4</sup>	RR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>5</sup>
População AMD-Sel						
Clorantianiliprole	155	1,52 ± 0,27	1.975 (1.145 – 3.089)	7.096 (4.429 – 14.501)	2,24 (6)	327.305 (193.748 – 552.928)*
Ciantraniliprole	229	1,55 ± 0,19	1.062 (781 – 1.521)	3.716 (2.423 – 6.964)	5,72 (6)	33.503 (20.060 – 55.954)*
Flubendiamida	215	1,75 ± 0,22	12.443 (9.315 – 17.308)	37.781 (25.702 – 66.379)	3,75 (6)	440.937 (280.132 – 694.051)*
Espinetoram	267	1,81 ± 0,24	0,19 (0,13 – 0,26)	0,55 (0,40 – 0,81)	1,89 (7)	2,72 (1,76 – 4,21)*
Abamectina	241	2,29 ± 0,27	0,67 (0,53 – 0,84)	1,57 (1,23 – 2,18)	0,31 (6)	1,40 (0,99 – 1,98)
Triflumuro	216	1,87 ± 0,27	3.433 (2.557 – 4.966)	9.686 (6.391 – 18.814)	3,38 (6)	1,15 (0,73 – 1,81)
Malationa	245	2,53 ± 0,31	260 (205 – 324)	559 (440 – 768)	1,18 (6)	1,99 (1,36 – 2,91)*
Clorfenapir	242	2,94 ± 0,36	11,44 (9,33 – 14,01)	22,13 (17,72 – 29,87)	2,65 (6)	2,32 (1,65 – 3,27)*
Cartape	239	1,72 ± 0,27	352 (239 – 489)	1.090 (759 – 1.870)	1,44 (6)	4,05 (2,62 – 6,26)*
Permetrina	262	1,78 ± 0,18	1.025 (726 – 1.427)	3.043 (2.110 – 5.102)	6,62 (6)	3,00 (1,70 – 5,28)*
Indoxacarbe	238	2,79 ± 0,59	1,64 (1,02 – 2,16)	3,27 (2,50 – 4,68)	5,68 (6)	1,61 (1,05 – 2,45)*
Metoxifenoazida	222	2,03 ± 0,32	4.132 (2.917 – 5.579)	10.731 (7.750 – 17.423)	1,14 (6)	2,21 (1,46 – 3,35)*

<sup>1</sup> Número total de insetos usados.

<sup>2</sup> Inclinações das curvas e erro padrão.

<sup>3</sup> Miligramas de ingrediente ativo por litro de água.

<sup>4</sup> χ<sup>2</sup> teste de qui-quadrado e grau de liberdade.

<sup>5</sup> Razão de resistência: razão das estimativas da CL<sub>50</sub> entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992) e limite de confiança a 95% das estimativas da CL<sub>50</sub>. \*Razão de resistência significativa, uma vez que o limite de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 5. Sinergismo de clorantraniliprole em populações resistente e suscetível de *Tuta absoluta*.

Tratamento	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EP <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>3</sup>	χ <sup>2</sup> GL <sup>4</sup>	RS <sub>50</sub> (LC95%) <sup>5</sup>	sRR <sub>50</sub> (LC95%) <sup>5</sup>
População GBN-Sus						
Clorantraniliprole	147	1,38 ± 0,21	0,00395 (0,00245 – 0,00591)	5,03 (6)	1,00 (0,55 – 1,83)	---
+ PBO	145	1,74 ± 0,29	0,00199 (0,00113 – 0,00306)	4,56 (6)	1,98 (1,05 – 3,74)*	---
+ DEF	135	1,63 ± 0,23	0,00355 (0,00242 – 0,00519)	3,16 (6)	1,11 (0,63 – 1,96)	---
+ DEM	134	2,27 ± 0,66	0,00729 (0,00290 – 0,01113)	3,66 (6)	0,54 (0,28 – 1,07)	---
População AMD-Sel						
Clorantraniliprole	155	1,52 ± 0,27	1.975 (1.145 – 3.089)	2,24 (6)	1,00 (0,51 – 1,95)	500.000
+ PBO	150	1,20 ± 0,19	2.230 (1.436 – 3.616)	0,56 (6)	0,89 (0,46 – 1,70)	1.120.603
+ DEF	148	1,11 ± 0,19	3.382 (2.107 – 6.117)	2,74 (6)	0,58 (0,29 – 1,17)	952.676
+ DEM	150	1,06 ± 0,18	3.952 (2.410 – 7.691)	3,77 (6)	0,50 (0,24 – 1,03)	542.112

<sup>1</sup>Número total de larvas utilizadas no bioensaio. <sup>2</sup> Erro padrão da média. <sup>3</sup> Miligramas de clorantraniliprole por litro de água. <sup>4</sup> Qui-quadrado e Grau de Liberdade. <sup>5</sup> Razão de sinergismo: relação entre a CL<sub>50</sub> não sinergizada e a CL<sub>50</sub> sinergizada para cada população e limite de confiança a 95%, calculado pelo método de Robertson et al. (2007). \* Razão de sinergismo não significativa se o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0.

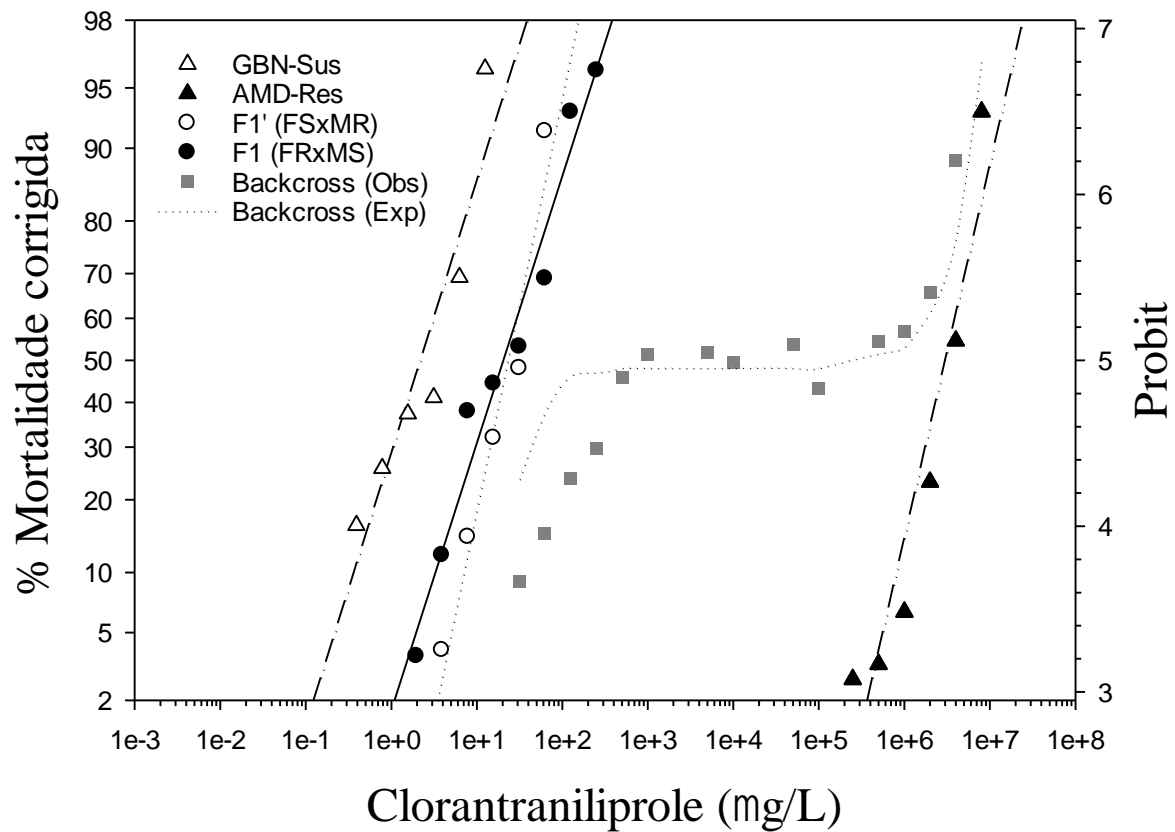


Figura 1. Curva de concentração-mortalidade para as populações de *Tuta absoluta* resistente (AMD-Sel), suscetível (GBN-Sus) e progênie da F<sub>1</sub> (♀R x ♂S e ♀S x ♂R) e mortalidades esperadas e observadas no retrocruzamento (F<sub>1</sub> agrupado x AMD-Sel) quando submetidas ao cloranthraniliprole.



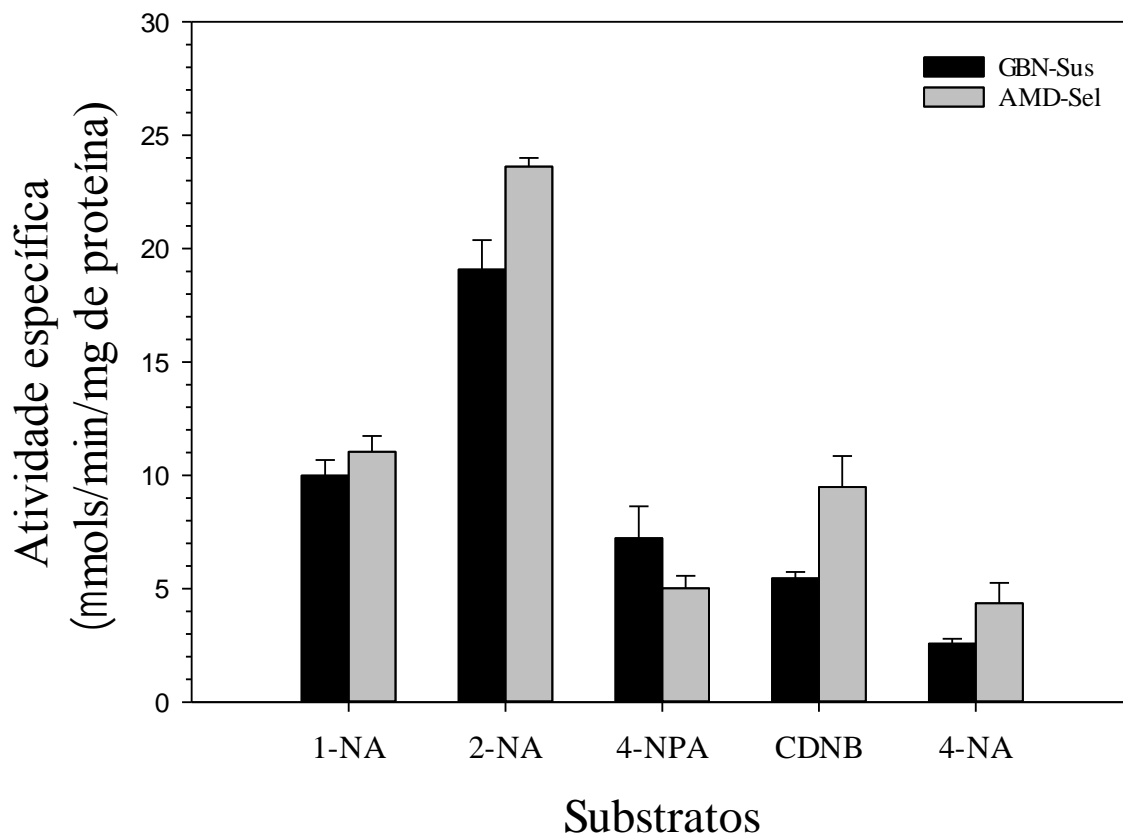


Figura 2. Média (+ EP) da atividade metabólica de enzimas em populações de *Tuta absoluta*.

## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Tuta absoluta* é uma das pragas mais importantes para a cultura do tomateiro no Brasil. As diamidas são os inseticidas mais comumente empregados para o controle desta espécie. Na fase inicial de registro, esses inseticidas apresentaram um controle bastante efetivo, com uma resposta homogênea em baixas doses. No entanto, o uso inadequado e contínuo destes produtos levou a níveis elevados de resistência, e a seleção de uma população resistente (América Dourada - AMD) a esta molécula em laboratório aumentou ainda mais o nível de resistência a ciantraniliprole e flubendiamida, constatando a resistência cruzada entre esses inseticidas, entretanto, a inexistência de resistência cruzada com inseticidas pertencentes a outros grupos químicos é importante para tomada de decisão na hora da realização do manejo da resistência. Inseticidas como espinetoram, abamectina, clorfenapir e indoxacarbe foram os que apresentaram os menores valores de CL<sub>50</sub> como visto no capítulo 3, podendo esses inseticidas serem utilizados em rotação para baixar a frequência de indivíduos resistentes. A resistência da população América Dourada (AMD) a clorantraniliprole foi autossômica, incompletamente recessiva e monogênica, baixas doses do inseticida podem ser utilizadas para controlar tanto homozigotos recessivos quanto heterozigotos e como existe apenas um gene envolvido com a resistência, essa pode cair rapidamente caso esta resistência não seja estável. Não houve uma associação direta dos níveis de resistência observados com a atividade enzimática, indicando que o metabolismo não está envolvido com os altos níveis de resistência de *T. absoluta* a diamidas. Geralmente altos níveis de resistência estão associados ao mecanismo de alteração do sítio alvo, fato que foi comprovado em trabalho em colaboração onde foi verificada a presença de uma mutação no gene do receptor de rianodina na posição G4903E.