

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA E CUSTO ADAPTATIVO DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTENTE A CLORANTRANILIPROLE

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

O inseticida clorantraniliprole, pertencente à nova classe das diamidas antranílicas, tem sido intensamente utilizado no Brasil para o controle de *Plutella xylostella* (L.). O primeiro relato de resistência a este químico surgiu na Ásia, onde estudos com *P. xylostella* mostram a instabilidade da resistência, sugerindo a presença de custo adaptativo associado, além de apontarem alteração de sítio alvo e o aumento da atividade enzimática como prováveis mecanismos de resistência. Diante destes fatos e de relatos constantes de falhas de controle do clorantraniliprole frente a populações de *P. xylostella* no Brasil, objetivou-se avaliar os níveis de resistência de populações de *P. xylostella* a este inseticida no Agreste pernambucano, verificar a existência de resistência cruzada de clorantraniliprole a ciantraniliprole, investigar o envolvimento de enzimas detoxificativas na resistência e detectar custos associados à resistência pela análise de parâmetros biológicos e bioquímicos. As populações de *P. xylostella* oriundas de seis municípios foram altamente resistentes a clorantraniliprole e apresentaram moderada ou muito alta resistência a ciantraniliprole, comprovando resistência cruzada. O aumento da capacidade de metabolização através de enzimas detoxificativas não mostrou ser responsável pela resistência das populações estudadas. Os parâmetros biológicos diferiram significativamente nos insetos suscetíveis e resistentes a clorantraniliprole, embora os efeitos tenham sido mais relevantes para os insetos

resistentes. Na ausência do inseticida, indivíduos resistentes apresentaram características biológicas negativas como menor peso larval e fecundidade, maiores períodos das fases de larva e pupa indicando a presença de custos adaptativos associados à resistência. As análises bioquímicas evidenciaram a existência de custo energético associado à resistência devido a menor quantidade de glicogênio e proteínas na fase larval, menos glicose e glicogênio nas pupas, menor quantidade de glicose e proteínas nos adultos, além de menor conteúdo de glicogênio nas fêmeas adultas.

PALAVRAS-CHAVE: Parâmetros biológicos, diamidas, ciantraniliprole, resistência cruzada, atividade enzimática, reservas energéticas.

MONITORING OF RESISTANCE AND FITNESS COST OF *Plutella xylostella* (L.)

(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTANT CLORANTRANILIPROLE

by

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

(Under the direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

ABSTRACT

The clorantraniliprole insecticide, belonging to the new class of antranílicas diamides, has been extensively used in Brazil for the control of *Plutella xylostella* (L.). The first report of resistance to this chemical emerged in Asia, where studies with *P. xylostella* show the instability of resistance, suggesting the presence of associated fitness cost, in addition to demonstrating alteration of target site and increased enzymatic activity as the likely mechanisms of resistance. Given these facts and continued reports of failures of control against populations clorantraniliprole of *P. xylostella* in Brazil, aimed to evaluate the levels of resistance in populations of *P. xylostella* this insecticide Pernambuco, verify the existence of cross- resistance clorantraniliprole with ciantraniliprole, investigate the involvement of enzymes in resistance and detect costs associated with resistance by the analysis of biological and biochemical parameters. The populations of *P. xylostella* coming six municipalities were highly resistant to clorantraniliprole and had moderate or very high resistance to ciantraniliprole, demonstrating cross-resistance. Increased capacity in metabolizing enzymes was not responsible for the resistance of the studied populations. Significant differences were observed in the biological parameters of insects susceptible and resistant clorantraniliprole, although the effects were more relevant to the resistant insects. In the absence of insecticide resistant individuals had negative

biological characteristics such as lower larval weight and fecundity, longer periods of larval and pupal indicating the presence of fitness costs associated with resistance. Biochemical analyzes showed the existence of energetic cost associated with resistance due to the smaller amount of glycogen and protein in larval stage, lower glucose and glycogen pupae, smaller amount of glucose and protein in adults and minor content of glycogen in adult females.

KEY WORDS: Life history, diamides, ciantraniliprole, cross resistance, enzymatic activity, energetic reserves

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA E CUSTO ADAPTATIVO DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTENTE A CLORANTRANILIPROLE

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

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

RECIFE - PE

Fevereiro – 2014

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA E CUSTO ADAPTATIVO DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTENTE A CLORANTRANILIPROLE

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA E CUSTO ADAPTATIVO DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTENTE A CLORANTRANILIPROLE

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Fábio A. Brayner dos Santos – CPqAM/FIOCRUZ

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Franklin Magliano da Cunha – PNPd/UFRPE

A minha mãe Terezinha, por sempre ter acreditado
em mim e a todos que fizeram da minha
caminhada mais leve e alegre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu chegar até o fim desta fase, cuja presença pude sentir em todos os momentos, concedendo-me ânimo, coragem e força para continuar. E por ter me permitido durante este tempo conhecer pessoas maravilhosas que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA), pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amados pais Terezinha Rocha e Luiz Carlos por todo amor, amparo e cuidado.

Aos meus queridos amigos Andresa Cristina, Paolo Augustus, Wellington Marques, Mateus Campos, Karjoene Cassimiro, Jefferson Ellias, Hugo da Nóbrega, Jaconias Neto, Alberto Belo, Marcelo Henrique, Glaucilane dos Santos, Carolina Arruda, Thiago Alves que fizeram e fazem minha alegria todos os dias. Obrigada por todos os sorrisos e gargalhadas, amo, adoro e admiro vocês.

Em especial à Andresa Cristina e à Glaucilane dos Santos pela ajuda na realização dos ensaios para quantificação de proteínas, carboidratos e lipídios.

Aos meus amigos Vanessa Moura, Andrea Verçosa e Frederico Alexandre cuja companhia incutiu leveza, alegria e descontração aos meus dias. Em especial a “Van”, minha linda amiga de infância que tanto amo.

A Ricardo Lopes que me amparou em muitos momentos difíceis. Obrigada pela amizade, pelo carinho, por todos os bons momentos e pelos cuidados.

A “Neuzinha”, uma pessoa muito especial, que se mostrou uma verdadeira mãe pra mim.

Obrigada pelo apoio, pelos conselhos e pelas orações.

A minha orientadora Valéria Wanderley Teixeira pelo apoio, pela amizade e pela compreensão. Obrigada por ter acreditado em mim durante todos esses anos.

Ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela amizade e pelo suporte sempre de grande valia.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pelos ensinamentos, pela amizade e assistência. Com certeza um dos maiores vínculos estabelecidos durante estes anos de curso.

A Franklin Magliano da Cunha pela ajuda com a metodologia para quantificação de carboidratos e lipídios que foi de grande valia nessa reta final e pelo apoio durante toda a minha trajetória tanto na graduação quanto na pós-graduação.

Ao professor José Vargas de Oliveira, pessoa adorável por quem sinto enorme carinho e admiração. Também mora no meu coração em um lugar muito especial.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE que me ajudaram no cumprimento de mais uma etapa da minha vida.

Aos demais que porventura tenha esquecido citar o nome, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO.....	01
LITERATURA CITADA.....	07
2 CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA EVOLUÍDA EM CAMPO A CLORANTRANILIPROLE EM <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE).....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO.....	24
AGRADECIMENTOS.....	28
LITERATURA CITADA.....	28
3 RESISTÊNCIA DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) A DIAMIDAS ANTRANÍLICAS NO BRASIL	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO.....	43

MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO.....	52
AGRADECIMENTOS.....	56
LITERATURA CITADA.....	56
4 CUSTO ENERGÉTICO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) A CLORANTRANILIPROLE	65
RESUMO	66
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	69
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO.....	73
AGRADECIMENTOS.....	77
LITERATURA CITADA.....	77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Brassicaceae é uma importante família botânica que contribui economicamente com aproximadamente 3,6 milhões de hectares cultivados e produção de 89,5 milhões de toneladas em todo o mundo (FAOSTAT 2011). Dentre as variedades cultivadas mais importantes destacam-se o repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) que é a mais consumida no Brasil, a couve manteiga (*B. oleracea* L. var. *acephala* DC.), a couve-flor (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.), a couve brócolis (*B. oleracea* L. var. *italica* Plenck) e a couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) (Liang *et al.* 2003, Aragão *et al.* 2008, Filgueira 2008,).

Uma das mais importantes limitações do cultivo deste grupo de hortaliças tem sido o ataque de insetos-praga, dos quais podemos citar: os pulgões, *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer), o curuquerê-da-couve, *Ascia monuste orseis* (Latr.), a mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Genn.), a lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), a lagarta-mede-palmo, *Trichoplusia ni* (Hueb.) e a traça-das-brássicas, *Plutella xylostella* L. (Gallo *et al.* 2002, Filgueira 2008), considerada a mais destrutiva no Brasil e em várias partes do mundo (Talekar & Shelton 1993, Shelton *et al.* 2000, Monnerat *et al.* 2004, Medeiros *et al.* 2005, Khaliq *et al.* 2007).

Os prejuízos acarretados pela *P. xylostella* advém da alimentação das larvas que após a eclosão se alimentam do parênquima foliar, passando em seguida a se alimentar da epiderme da parte inferior das folhas, deixando a epiderme superior transparente onde posteriormente surgem furos inutilizando o produto comercial. Também consomem caules e brotos vegetativos de repolhos, couves e inflorescências (couve-flor e couve brócolis) (Imenes *et al.* 2002, Medeiros 2004, Cardoso *et al.* 2010). As perdas são proporcionais à severidade do ataque, podendo

acarretar a morte das plantas e até mesmo inviabilizar as áreas de cultivo (Morató 2000, Cardoso *et al.* 2012).

O método mais utilizado para o controle de *P. xylostella* é o químico. Muitas vezes é realizado de forma preventiva, por meio de produtos não seletivos em regime de aplicação de uma a duas vezes por semana (Mazlan & Mumford 2005, Grzywacz *et al.* 2010), resultando no enorme gasto de 1,4 bilhões de dólares anualmente para o controle ao se considerar o regime de aplicação semanal (Zalucki *et al.* 2012).

A elevada pressão de seleção devido ao uso abusivo de inseticidas para o controle dessa praga a tornou resistente a todas as classes de inseticidas, inclusive aos biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Shelton *et al.* 2000, Mota-Sanchez *et al.* 2002, Mohan & Gujar 2003, Sarfraz & Keddie 2005, Khaliq *et al.* 2007, Zago *et al.* 2014). Recentemente, surgiu o primeiro relato de resistência ao inseticida clorantraniliprole, ingrediente ativo da mais nova classe de inseticidas, as diamidas antranílicas (Wang & Wu 2012).

As diamidas constituem um novo grupo inseticida, cujo primeiro membro comercial foi o flubendiamida, pertencente à classe das diamidas do ácido ftálico. O seu registro ocorreu primeiramente nas Filipinas em 2006 e em 2007, no mesmo país, foi registrado o clorantraniliprole, o primeiro inseticida da classe das diamidas antranílicas. Até o final de 2008 ambos já estavam sendo utilizados em mais de 10 países para o controle de lepidópteros em várias culturas (Lahm *et al.* 2009). Neste ano a DuPontTM anunciou o desenvolvimento comercial da segunda diamida antranílica, o ciantraniliprole, também ativo contra Lepidoptera, no entanto, com maior espectro de ação dentro da Ordem Hemiptera (DuPont 2008, Lahm *et al.* 2009).

O clorantraniliprole, além de excelente atividade contra Lepidoptera, mostra eficácia contra pragas das ordens Coleoptera, Diptera, Isoptera e Hemiptera (DuPontTM Coragen[®] 2014). Apresenta-se primeiramente ativo por ingestão e secundariamente por contato pela absorção

através da cutícula, mostrando significante atividade embrionocida e larvicida (Ioriatti *et al.* 2009, DuPont Coragen® 2014). Em estudo conduzido com larvas *P. xylostella*, *T. ni* (Hübner), *Spodoptera exigua* (Hübner) e *Helicoverpa Zea* (Boddie) foi enquadrado como inseticida de velocidade muito rápida de ação por provocar cessamento da alimentação e consequente redução dos danos em apenas 15,4; 23,4; 25,3 e 20,3 minutos após a exposição, respectivamente (Hanning *et al.* 2009). Também apresenta ação translaminar, demonstrada em estudo com *P. xylostella* usando repolho, além de boa atividade residual (Lahm *et al.* 2009, Han *et al.* 2012, DuPont Coragen® 2014).

A grande contribuição das diamidas reside no seu distinto mecanismo de ação, que ao contrário da maioria dos inseticidas comercializados que atuam no sistema nervoso, tem como alvo a musculatura estriada do inseto. O inseticida se liga aos receptores de rianodina, que modulam os canais de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático das células musculares e promove a liberação do cálcio de forma não regulada, comprometendo o processo de contração muscular. Os sinais de envenenamento consistem no cessamento da alimentação, letargia, paralisia muscular e por fim a morte (Lahm *et al.* 2007). Além do mecanismo de ação diferenciado, este grupo de inseticida apresenta reduzida toxicidade a mamíferos, aves, animais aquáticos e inimigos naturais dos insetos-praga (Brugger *et al.* 2010, DuPont Coragen® 2014).

Clorantroliprole foi liberado para o controle de *P. xylostella* no Brasil em novembro de 2009. Antes da liberação, foi estabelecida a linha base de suscetibilidade com populações de diferentes regiões geográficas (Silva *et al.* 2012). Todas as populações foram altamente suscetíveis ao inseticida com valores de CL₅₀ variando de 0,015 a 0,056 mg/L. Contudo as populações da região nordeste do país, exibiram maior tolerância ao inseticida. No mesmo estudo foi estimada a concentração diagnóstica de 0,3 mg/L que é capaz de discriminar indivíduos

resistentes de suscetíveis podendo assim, ser utilizada para detectar e monitorar a resistência (Silva *et al.* 2012).

O estabelecimento da linha base de suscetibilidade compreende o primeiro passo de um programa de monitoramento da resistência por determinar a variabilidade natural da resposta a inseticidas (Robertson *et al.* 2007). Com as informações geradas é possível monitorar mudanças logo cedo dos dados toxicológicos e com isto detectar a evolução para a resistência em fase inicial (Prabhaker *et al.* 2006). Diante da rápida e ampla adoção de clorantraniliprole pelos produtores de brássicas, o monitoramento para mudanças na suscetibilidade a este inseticida é extremamente relevante para assegurar a sua sustentabilidade em longo prazo (Silva *et al.* 2012).

Até o presente, o monitoramento da resistência de *P. xylostella* para clorantraniliprole foi relatado apenas na China, onde foi constatada a evolução para a resistência em cinco de 20 populações testadas em apenas dois anos de comercialização do produto (Wang & Wu 2012). Após detecção e avaliação dos níveis de resistência esta foi caracterizada como autossomal e parcialmente recessiva. Investigações sobre o mecanismo de resistência revelou o possível envolvimento de destoxificação metabólica embora este não pareça ser o principal mecanismo (Wang *et al.* 2012).

A redução da sensibilidade aos inseticidas pelos insetos pode ser causada por diferentes mecanismos como, por exemplo, o aumento da capacidade de metabolização do inseticida através de enzimas de destoxificação (esterase, glutatona S-transferase ou oxidase de função mista), por diminuição da sensibilidade do sítio alvo ou por reduzida penetração cuticular/aumento da excreção. Um ou mais mecanismos podem atuar em conjunto, conferindo altos níveis de resistência para todas as classes de inseticidas (Hemingway *et al.* 2004, Kliot & Ghanim 2012).

O sequenciamento do gene de *P. xylostella* que codifica o provável sítio de ligação das diamidas nos receptores de rianodina em duas populações asiáticas (Tailândia e Filipinas) revelou

a existência de uma mutação que pode contribuir completa ou parcialmente para a resistência (Trocza *et al.* 2012). Embora existam evidências sobre os mecanismos envolvidos na resistência a clorantraniliprole, as pesquisas são ainda incipientes e restritas a populações asiáticas da praga.

A resistência é um fenômeno genético resultante do surgimento de mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou seu metabolismo (Li *et al.* 2007). Os indivíduos com mutações vantajosas, que conferem resistência, possuem maior probabilidade de sobrevivência e reprodução mediante exposição a inseticidas, contribuindo com uma progênie maior que indivíduos suscetíveis. Isto resulta no aumento da frequência do gene que confere resistência nas gerações seguintes (Beatty & Marquardt 1996). Na prática, a evolução para a resistência pode ser percebida quando ocorrem fracassos repetidos no controle mediante o uso de determinado produto na dose recomendada pelo fabricante (IRAC 2014).

Na ausência de pressão de seleção exercida pelo inseticida, os indivíduos resistentes, frequentemente, são menos aptos que os indivíduos suscetíveis. Isto porque a evolução para a resistência muitas vezes está associada a custos adaptativos que compreendem: aumento da fase de duração larval, redução do peso das larvas e pupas, sobrevivência, fecundidade, fertilidade, longevidade, habilidade de evitar predação e parasitismo, produção de feromônio, aumento do número de adultos deformados, dentre uma série de outras características indesejáveis (Delisle & Vincent 2002, Berticat *et al.* 2004, Foster *et al.* 2005, Cao & Han 2006, Anilkumar *et al.* 2008, Yu-ping *et al.* 2010).

Uma explicação para tais efeitos é a existência de “trade-off” entre a resistência a inseticidas e a história de vida dos insetos resistentes. Acredita-se que indivíduos resistentes apresentem as reservas energéticas reduzidas em relação aos indivíduos suscetíveis, diminuindo a energia disponível para as suas funções biológicas (Rivero *et al.* 2011). Reforçando esta hipótese, em estudo com mosquitos fêmeas do gênero *Culex* resistentes a inseticidas pela produção elevada de

esterases, foi relatada menor quantidade de lipídios e açúcares e conseqüentemente menos energia total em relação a fêmeas suscetíveis (Rivero *et al.* 2011). Em outra pesquisa, conduzida com fêmeas do mesmo gênero resistentes a permetrina pelo envolvimento citocromo P-450, menor quantidade de glicogênio e lipídio foi associada a um maior tempo de desenvolvimento de ovo a adulto e menor tamanho corporal em relação às fêmeas suscetíveis (Hardstone *et al.* 2010).

As desvantagens adaptativas provenientes da resistência fazem com que os genes que conferem estas características raramente se fixem na população natural resultando em um declínio da frequência de indivíduos resistentes na população na ausência do inseticida. Em *P. xylostella* e em *Choristoneura rosaceana* (Harris) a resistência a clorantraniliprole tem se mostrado instável, reduzindo rapidamente em poucas gerações quando não há exposição ao inseticida, sugerindo a presença de custo adaptativo (Kliot & Ghanim 2012, Sial & Brunner 2012, Wang *et al.* 2012).

O conhecimento dos custos adaptativos associados à resistência pode contribuir para o desenvolvimento e a aplicação de táticas de manejo para mitigar a evolução da resistência ou o retorno da suscetibilidade ao inseticida. Podem-se adotar táticas que favoreçam, por exemplo, a atuação de inimigos naturais quando estão presentes características que tornam o inseto mais suscetível ao parasitismo. O prolongamento da fase imatura é um exemplo, pois aumenta o tempo de exposição do inseto aos seus inimigos naturais em relação ao indivíduo suscetível (Wu *et al.* 2005, Ode 2006, Foster *et al.* 2011).

Diante da facilidade com que *P. xylostella* evolui para resistência a inseticidas, da ausência de estudos que investiguem os níveis atuais de suscetibilidade desta praga a clorantraniliprole no Brasil, bem como da possível existência de custo adaptativo associado à resistência a este produto, objetivou-se: (1) detectar e avaliar os níveis de resistência de *P. xylostella* a clorantraniliprole em municípios do Agreste pernambucano, onde se faz o uso intensivo de inseticidas de todas as classes e existem relatos de falhas de controle a diamidas; (2) verificar a possível existência de

resistência cruzada de clorantraniliprole a ciantraniliprole, diamida que em breve será comercializada no país; (3) investigar o envolvimento de enzimas destoxificativas na resistência; (4) detectar a presença de custos adaptativos e de custo energético em indivíduos resistentes através da análise de parâmetros biológicos e da quantificação de glicose, glicogênio, lipídio e proteína.

Literatura Citada

- Anilkumar, K.J., M. Puztai-Carey & W.J. Moar. 2008.** Fitness costs associated with Cry1Ac resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): a factor countering selection for resistance to Bt cotton? *J. Econ. Entomol.* 101: 1421-1431.
- Aragão, F., F.A.A. Feitosa, C.P. Moraes & M.C.M. Corrêa. 2008.** Sistema de produção de repolho utilizando tnt como mulching e manta. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/sbsp/anais/Trab_Format_PDF/237.pdf, acessado em janeiro de 2014.
- Beaty, B.J. & W.C. Marquardt. 1996.** The biology of diseases vectors. Niwot, University Press of Colorado, 632p.
- Berticat, C., O. Duron, D. Heyse & M. 2004.** Raymond. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet. Res. Camb.* 83:189–196.
- Brugger, K.E., P.G. Cole, I.C. Newman, N. Parker, B. Scholz, P. Suvagia, G. Walker & T.G Hammond. 2010.** Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest. Manage. Sci.* 66: 1075–1081.
- Cao, G. & Z. Han. 2006.** Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. *Pest Manage. Sci.* 62: 746–751.
- Cardoso, M.O., A.M.S.R. Pamplona & M. Michereff Filho. 2010.** Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros-praga em couve e repolho no Amazonas. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 15p. (Circular Técnica 35).
- Cardoso, M.O., R.F. Berni, C. Krug & I.C. Antonio. 2012.** Danos por *Plutella xylostella* em couve-de-folhas jovem afetados pela altura e pelo nitrogênio. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 19p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16).
- Delisle, J. & C. Vincent. 2002.** Modified pheromone communication associated with insecticidal resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chemoecology* 12:47–51.

- DuPont. 2008.** Disponível em: <http://www2.dupont.com>, acessado em janeiro de 2014.
- DuPont™ Coragen®. 2014.** Disponível em: <http://www2.dupont.com>, acessado em janeiro de 2014.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics. 2011.**
Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, acessado em janeiro de 2014.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Foster, S.P., I. Denholm, G.M. Poppy, R. Thompson & W. Powell. 2011.** Fitness trade-off in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) between insecticide resistance and vulnerability to parasitoid attack at several spatial scales. Bull. Ent. Res. 101: 659-666.
- Foster, S.P., I. Denholm, R. Thompson, G.M. Poppy & W. Powell. 2005.** Reduced response of insecticide-resistant aphids and attraction of parasitoids to aphid alarm pheromone; a potential fitness trade-off. Bull. Ent. Res. 95: 37–46.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Grzywacz, D., A. Rossbach, A. Rauf, D.A. Russell, R. Srinivasan & A.M. Shelton. 2010.** Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. Crop Prot. 29: 68-79.
- Han, W., S. Zhang, F. Shen, M. Liu, C. Ren & X. Gao. 2012.** Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Pest Manage. Sci. 68: 1184-1190.
- Hannig, G.T., M. Ziegler & P.G. Marçon. 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 Manage. Sci. 65: 969–974.
- Hardstone, M.C., X. Huang, L.C. Harrington & J.G. Scott. 2010.** Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 47: 188-198.
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 653-665.

- Imenes, S.D.I., T.B. campos, S.M. Rodrigues Neto & E.C. Bergman. 2002.** Avaliação da atratividade de feromônio sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. Arq. Inst. Biol. 69: 81-84.
- Ioriatti C., G. Anfora, G. Angeli, V. Mazzoni & F. Trona. 2009.** Effects of chlorantraniliprole on eggs and larvae of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae). Pest. Manage. Sci. 65: 717-722.
- IRAC - Insecticide Resistance Action Committee. 2014.** Disponível em: <http://www.irac-online.org/>, acessado em janeiro de 2014.
- Khaliq, A., M.N.R. Attique & A.H. Sayyed. 2007.** Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. Bull. Entomol. Res. 97: 191-200.
- Kliot, A. & M. Ghanim. 2012.** Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Manage. Sci. 68: 1431-1437.
- 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.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. Bioorg. Med. Chem. 17: 4127-4133.
- Li, X., M.A. Schuler & M.R. Berenbaum. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annu. Rev. Entomol. 52: 231-253.
- Liang, G.-M., W. Chen & T.-X. Liu. 2003.** Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Prot. 22: 333-340.
- Mazlan, N., & J. Mumford. 2005.** Insecticide use in cabbage pest management in the Cameron Highlands, Malaysia. Crop Prot. 24: 31-39.
- Medeiros, C.A.M. 2004.** Efeito inseticida de extratos vegetais aquosos sobre *Ascis monuste orseis* (Latreille) em couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). Dissertação de Mestrado, UEP, Jaboticabal, 83p.
- Medeiros, C.A.M., A.L. Boiça Junior & A.L. Torres. 2005.** Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. Bragantia 64: 227-232.
- Mohan, M. & G.T. Gujar. 2003.** Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. Crop Prot. 22: 495-504.

- Monnerat, R.G., S.C.M. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, T.M. Butt & D. Bordat. 2004.** Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. Horticult. Bras. 22: 607-609.
- Morató, M.G. 2000.** Plagas y enfermedad en el cultivo de coliflor. Descripción e control. Vida Rural 8: 1-5.
- Mota-Sanchez, D., P.S. Bills & M.E. Whalon. 2002.** Arthropod resistance to pesticides: status and overview, p. 127-214. In: W.B. Wheeler (Ed.), Pesticides in Agriculture and the Environment. New York, Marcel Dekker, 360 p.
- Ode, P.J. 2006.** Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. Annu. Rev. Entomol. 51: 163-185.
- Prabhaker, N., S. Castle, F. Byrne, T.J. Henneberry & N.C. Toscano. 2006.** Establishment of baseline susceptibility data to various insecticides for *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae) by comparative bioassay techniques. J. Econ. Entomol. 99: 141-154.
- Rivero, A., A. Magaud, A. Nicot & J. Vezilier. 2011.** Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. J. Med. Entomol. 48:694–700.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & N.E. Savin. 2007.** Bioassays with Arthropods. Boca Raton, CRC Press, Inc., 224p.
- Sarfraz, M. & B.A. Keddie. 2005.** Conserving the efficacy of insecticides against *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae). J. Appl. Entomol. 129: 149-157.
- Shelton, A.M., F.V. Sances, J. Hawley, J.D. Tang, M. Boune, D. Jungers, H. Collins & J. Farias. 2000.** Assessment of insecticide resistance after the outbreak of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. J. Econ. Entomol. 93: 931-936.
- Sial, A.A. & J.F. Brunner. 2012.** Selection for resistance, reversion towards susceptibility and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). Pest Manage. Sci. 68: 462–468.
- 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.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of the diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.
- Trocza, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G. Emyr 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.

- Wang, X. & Y. Wu. 2012.** High Levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. J. Econ. Entomol. 105: 1019-1023.
- Wang, X., S.K. Khakame, C. Ye, Y. Yang & Y. Wu. 2012.** Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. Pest Manage. Sci. 69: 661-665.
- Wu, K., W. MU, G. Liang & Y. Guo. 2005.** Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of cotton in northern China. Pest Manage. Sci. 61: 491-498.
- Yu-ping, Z., L. Yong-yue, Z. Ling & L. Guang-wen. 2010.** Life-history traits and population relative fitness of trichlorophon-resistant and -susceptible *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). DOI:10.1155/2010/895935.
- Zago, H.B., H.A.A. Siqueira, E.J.G. Pereira, M.C. Picanço & R. Barros. 2014.** Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. Pest Manage. Sci. 70: 488-495.
- Zalucki, M.P., A. Shabbir, R. Silva, D. Adamson, L. Shu-Sheng & M.J. Furlong. 2012.** Estimating the Economic Cost of One of the World's Major Insect Pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): Just How Long is a Piece of String? J. Econ. Entomol. 105:1115-1129.

CAPÍTULO 2

CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA EVOLUÍDA EM CAMPO A CLORANTRANILIPROLE EM *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

LÍLIAN M.S. RIBEIRO¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA² HUGO N. FERREIRA¹, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA² E HERBERT A. A. SIQUEIRA¹.

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.N. Ferreira, A.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2014. Custos adaptativos associados à resistência evoluída em campo a clorantraniliprole em *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Bulletin of Entomological Research. 104: 88-96.

RESUMO – *Plutella xylostella* (L.) é a mais importante praga das plantas da família Brassicaceae no mundo, acarretando gastos de 4-5 bilhões de dólares para o controle. Um caso de resistência elevada desta praga a clorraniliprole foi associada à eficácia reduzida deste inseticida em campos de brássicas no Brasil. Objetivou-se pesquisar a aptidão biológica de *P. xylostella* devido a essa resistência. Foram avaliados parâmetros biológicos de indivíduos suscetíveis e resistentes de *P. xylostella* submetidos a concentrações subletais de clorraniliprole. A população de campo mostrou alta resistência à clorraniliprole ($RR_{50} = 27.793$ vezes), que diminuiu rapidamente nas primeiras gerações. Com a exposição de larvas suscetíveis e resistentes às suas respectivas CL_1 , CL_{10} , CL_{25} houve um aumento da duração das fases de larva e de pupa e redução do peso de pupa em ambas as populações. As fêmeas resistentes apresentaram maior período de postura e longevidade na CL_{25} , enquanto que os machos viveram mais na CL_1 . Sem exposição ao inseticida, insetos resistentes apresentaram menor peso larval e fecundidade, maiores períodos de larva e pupa, maior eclosão de larvas e longevidade dos machos. Clorraniliprole impactou negativamente os parâmetros biológicos de ambas as populações, embora esses efeitos tenham sido mais relevantes para os insetos resistentes. Indivíduos resistentes apresentaram características biológicas negativas e positivas quando comparados com os indivíduos suscetíveis, tanto na ausência quanto na presença de clorraniliprole. Apesar do importante papel que estes “trade-offs” podem desempenhar na evolução da resistência a clorraniliprole, aplicações práticas ainda dependem de informações como a dominância dos custos adaptativos e da resistência.

PALAVRAS-CHAVE: Sobrevivência, diamida antranílica, biologia, Brassicaceae, traça-das-brássicas

FITNESS COSTS ASSOCIATED WITH FIELD-EVOLVED RESISTANCE TO
CHLORANTRANILIPROLE IN *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

ABSTRACT – *Plutella xylostella* (L.) is the most important pest of Brassicaceae worldwide, with a recent estimate of US\$ 4-5 billion expenditure for the control of this insect. A case of very high resistance of this pest to chlorantraniliprole was recently associated with reduced efficacy in a Brazilian field of *Brassica* spp. We aimed to investigate the fitness of due to this resistance. Biological parameters were assessed in both susceptible and resistant *P. xylostella* strains subjected to sublethal chlorantraniliprole concentrations. The field strain showed high resistance to chlorantraniliprole ($RR_{50} = 27.793$ -fold), though resistance rapidly decreased in the first generations. The exposure of susceptible and resistant larvae to their respective LC_1 , LC_{10} , and LC_{25} values led to an increased duration of the larval and pupae phases and reduced weight in both strains. Resistant females showed a significantly higher egg-laying period and longevity at LC_{25} , whereas the males lived longer at LC_1 . The resistant insects presented significantly lower larval weight and fecundity and higher larval and pupal periods, hatchability, and male longevity when not exposed to chlorantraniliprole. Chlorantraniliprole negatively impacted the biological parameters of both strains tested, although these effects were more relevant to the resistant insects. Resistant *P. xylostella* showed negative and positive biological characteristics when compared to the susceptible individuals in both the absence and presence of chlorantraniliprole. Despite the important role that these trade-offs may play in the evolution of resistance to chlorantraniliprole, practical applications still depend on such information as the dominance of fitness costs and resistance.

KEY WORDS: Survivorship, anthranilic diamide, life history, Brassicaceae, diamondback moth

Introdução

Brassicaceae é economicamente uma importante família botânica, com aproximadamente 3,6 milhões de hectares cultivados em todo o mundo no ano de 2011 (FAOSTAT 2011). Esta família é importante na maior parte do Brasil, onde é cultivada tanto para a subsistência como por grandes produtores (Aragão *et al.* 2008). No entanto, grandes perdas são normalmente esperadas devido aos frequentes surtos de pragas, principalmente da traça-das-brássicas, *Plutella xylostella* (L.). Nos últimos anos, este microlepidóptero tornou-se a praga mais destrutiva de Brassicaceae no Brasil e no mundo (Yu & Nguyen 1992, Talekar & Shelton 1993, Shelton *et al.* 1997, Medeiros 2002, Liang *et al.* 2003). Dentre as medidas de controle utilizadas, métodos químicos são os mais amplamente adotados, sendo os piretróides e organofosforados os compostos mais utilizados anteriormente (Castelo Branco & Medeiros 2001, Monnerat *et al.* 2004). No entanto, a elevada pressão de seleção induzida pelo uso indiscriminado de inseticidas, juntamente com a alta plasticidade genética inerente a esta espécie, *P. xylostella* desenvolveu resistência a praticamente todas as classes de inseticidas, incluindo aqueles a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, dificultando o seu controle (Shelton *et al.* 2000, Mota-Sanchez *et al.* 2002, Mohan & Gujar 2003, Sarfraz & Keddie 2005, Khaliq *et al.* 2007, Zago *et al.* 2014).

Em novembro de 2009, o uso de clorraniliprole foi liberado no Brasil para o controle de *P. xylostella*. Este inseticida pertence a uma nova classe química, a das diamidas antranílicas, usada para controlar quase todas as espécies de Lepidoptera economicamente importantes. Clorraniliprole atua através de um novo mecanismo, a ativação dos receptores de rianodina, moduladores dos canais de cálcio presentes nas fibras musculares, para estimular a liberação das reservas internas de cálcio de forma não regulada, resultando na cessação de alimentação, letargia, paralisia muscular e finalmente a morte (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2007, Teixeira *et al.* 2009). Além disso, o composto apresenta uma baixa toxicidade para os mamíferos, demonstrado

por uma DL_{50} oral aguda superior a 5000 mg kg^{-1} em ratos e uma boa seletividade no que diz respeito a artrópodes não-alvo, tornando-o adequado para utilização em programas de manejo integrado de pragas (Lahm *et al.* 2007, Brugger *et al.* 2010).

Recentemente, estudo de linha base de suscetibilidade no Brasil mostrou que populações de *P. xylostella* foram muito homogêneas e suscetíveis a clorantraniliprole (Silva *et al.* 2012), provando que este composto é uma excelente ferramenta para o manejo da resistência a outras classes de inseticidas. No entanto, altos níveis de resistência a clorantraniliprole têm sido recentemente relatados para populações de *P. xylostella* na China (Wang & Wu 2012). A resistência a esta diamida foi caracterizada por Wang *et al.* (2012) como parcialmente recessiva e instável, o que sugere um custo adaptativo associado. Custos adaptativos em indivíduos resistentes podem prejudicar o estabelecimento da resistência no campo na ausência de um inseticida (Gassmann *et al.* 2009), ou até mesmo reverter a resistência em função da natureza de tais custos.

Depois de quase dois anos de comercialização de clorantraniliprole, registros de falhas de controle em áreas do Nordeste do Brasil nos induziram a investigar as populações para a resistência. A população de *P. xylostella* (Camocim de São Félix - PE) altamente resistente a esta diamida foi criada em laboratório para posterior caracterização. Por ela ter mostrado uma diminuição relativamente rápida da resistência em apenas três gerações de relaxamento da pressão, este estudo teve como objetivo avaliar a existência de um custo associado ao elevado nível de resistência nesta população, submetendo indivíduos suscetíveis e resistentes na presença e na ausência de concentrações subletais de clorantraniliprole.

Material e Métodos

Criação dos insetos. Foram utilizadas duas populações de *P. xylostella*, uma população padrão mantida em laboratório desde 1998, sem qualquer contato com inseticidas e uma população coletada em dezembro de 2011 em área de cultivo de *Brassica* spp. no município de Camocim de São Félix - PE, onde houve relatos de falha no controle por inseticidas à base de diamidas. As duas populações foram mantidas individualmente no Laboratório de Interações Inseto-Tóxico e foram alimentadas com folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) sem o contato com inseticidas. A população coletada em Camocim de São Felix - PE foi testada na primeira geração, sendo considerada resistente. Também foi resistente a piretróides, reguladores de crescimento, metomil e *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

Bioensaios de suscetibilidade. Curvas de concentração-resposta com clorraniliprole (Premio®, concentrado solúvel a 20%, DuPont Brasil Ltda) foram estabelecidas para as duas populações através de bioensaios para verificação da suscetibilidade e obtenção das concentrações subletais utilizadas nos ensaios subsequentes. Discos de folhas de couve (5 cm de diâmetro) foram lavadas em hipoclorito de sódio a 5%, bem enxaguadas com água da torneira e tratadas com concentrações crescentes de solução clorraniliprole por imersão durante 30 segundos. Após secagem à temperatura ambiente, os discos foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm) contendo um papel de filtro (5 cm) embebido com água destilada. Foram avaliadas nove concentrações do inseticida (e três replicatas de cada) em água destilada contendo o emulsificante Triton X-100 (0,01%). As concentrações usadas para a população suscetível foram 0,0009; 0,0019; 0,0039; 0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125 e 0,25 mg/L, as concentrações utilizadas para a população resistentes foram 14,06; 28,12; 56,25; 112,5; 225; 450; 900; 1800 e 3600 mg/L.

Os valores de CL_{50} obtidos para as populações suscetível e resistente foram 0,0073 e 204,32 mg/L, respectivamente. O controle foi composto por folhas de couve tratadas com água destilada mais

Triton X-100 (0,01%). Larvas recém-eclodidas foram obtidas a partir de ovos postos em uma folha de couve por fêmeas ao longo de 24 horas. A folha foi então transferida para um recipiente de plástico, sem folha de couve fresca. Após incubação (três dias em média), as larvas que eclodiram foram capturadas com a ajuda de um pincel de cerdas macias, suspensas pelos fios de seda e transferidas para as placas de Petri. No total, dez larvas recém-eclodidas (0-24 h) foram transferidas para cada placa de Petri. Todos os bioensaios foram mantidos dentro de uma câmara de crescimento a 25 ± 1 ° C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12 h. A mortalidade foi avaliada após 96 h de exposição tocando as larvas com o auxílio de um pincel de cerdas macias, as larvas foram considerados mortas quando nenhum movimento foi observado. Os dados de mortalidade foram corrigidos usando a mortalidade da testemunha (Abbott 1925) e submetidos a uma análise de Probit (Finney 1971) utilizando o programa POLO-Plus (LeOra-Software 2005). A razão de resistência e o seu intervalo de confiança a 95 % foram calculados de acordo com o método descrito por Robertson *et al.* (2007).

Efeitos subletais de clorantniliprole sobre a biologia *P. xylostella*. Discos de folhas de couve (8 cm em diâmetro) foram imersos durante 30 segundos em solução de clorantniliprole correspondente aos valores de CL_1 , CL_{10} , CL_{25} estimados para cada população. As concentrações foram de 0,001, 0,002 e 0,004 mg/L para a população suscetível e de 35, 78 e 123 mg/L para a população resistente. Após secagem, os discos de folhas foram transferidos para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada. O controle consistiu de discos de couve tratados com água destilada mais Triton - X100 (0,01 %). Para cada placa de Petri, 12 larvas recém-eclodidas (0-24 h) foram transferidas e cada tratamento consistiu em 15 repetições. Após 96 h de exposição, os discos foliares tratados e não tratados foram substituídos diariamente por folhas frescas sem inseticida até que as larvas atingissem a fase de pupa. Os parâmetros avaliados foram a sobrevivência diária larval, período larval, peso larval medido com 6 dias (período anterior ao

início da formação de pupas), o período e viabilidade de pupa. As pupas foram pesadas com 24 h após a formação, transferidas para tubos de ensaio de acrílico e acompanhadas até a emergência dos adultos. Os adultos emergidos foram sexados para determinar a razão sexual e os casais foram transferidos para gaiolas cilíndricas de plástico transparentes (12 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com uma abertura lateral fechada com tecido voal. Discos de folhas de couve (8 cm de diâmetro) postas sobre papel de filtro foram oferecidas como substrato para oviposição e substituídas diariamente. As gaiolas foram fechadas na parte inferior com uma esponja embebida em água para manter a umidade. Aos adultos foram oferecidos chumaços de algodão embebidos em solução de mel a 10%. Dez replicatas por tratamento foram realizadas. Foram avaliados o número total de ovos por fêmea, eclosão das larvas e longevidade de adultos. O experimento foi conduzido a 25 ± 1 °C, 60 ± 10 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h.

Análises estatísticas. Os dados referentes à sobrevivência larval diária foram comparados pelo teste de log-rank, utilizando o método de Kaplan-Meier. Os demais parâmetros foram comparados por análise não-paramétrica porque a maior parte dos dados não assumiram os pressupostos de normalidade. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para avaliar os efeitos do tratamento dentro de cada população. Quando necessário teste de comparação múltipla para comparações pareadas foi realizado utilizando o teste de Wilcoxon, seguido por uma correção de Bonferroni seqüencial (Rice 1989). As comparações entre as populações foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon (teste U), adotando $\alpha = 0,05$ em todos os casos. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (SAS Institute 2001).

Resultados

Curvas de concentração-resposta. Os valores de CL_{50} estimados para as populações suscetível e resistente foram de 0,0073 mg/L e 204,32 mg/L de clorantniliprole, respectivamente. A

população de campo foi altamente resistente (razão de resistência = 27.701 vezes) a clorantraniliprole quando comparada com a população de laboratório (Tabela 1). A estabilidade da resistência foi avaliada a partir da primeira geração e diminuiu drasticamente até a terceira geração (razão de resistência = 4.690 vezes) (Tabela 1), quando a colônia foi acidentalmente perdida. Independente disso, os dados sugerem instabilidade da resistência ao inseticida clorantraniliprole.

Sobrevivência larval. O tratamento com concentrações subletais de clorantraniliprole não afetaram a sobrevivência da população suscetível (teste de log-rank: $\chi^2 = 6,07$, GL = 3, P = 0,1082) (Fig. 1A) e apenas os tratamentos com a CL₁₀ (teste de log-rank: $\chi^2 = 11,59$, GL = 1, P = 0,0007) e CL₂₅ (teste de log-rank: $\chi^2 = 14,51$, GL = 1, P = 0,0001) reduziram significativamente a sobrevivência da população resistente quando comparada com a testemunha (Fig. 1B). A testemunha da população resistente apresentou sobrevivência significativamente maior que a testemunha da população suscetível (teste de log-rank: $\chi^2 = 4,03$, GL = 1, P = 0,0445), fato também observado no tratamento com a CL₁ (teste de log-rank: $\chi^2 = 5,00$, GL = 1, P = 0,0253) (Fig. 2). A sobrevivência nas concentrações mais elevadas, CL₁₀ e CL₂₅, não diferiu entre as populações (teste de log-rank: $\chi^2 = 2,39$, GL = 1, P = 0,1219 e $\chi^2 = 0,24$, GL = 1, P = 0,6217, respectivamente) (Fig. 2).

Peso e período larval. Os tratamentos subletais com clorantraniliprole reduziram o peso larval em ambas as populações. Os tratamentos com CL₁₀ (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,01, $\chi^2 = 10,33$, GL = 1, P = 0,0013) e CL₂₅ (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,0083, $\chi^2 = 13,17$, GL = 1, P = 0,0003) reduziram significativamente o peso larval da população suscetível quando comparada com a testemunha, embora o peso larval não tenha diferido entre esses valores de CL (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,05, $\chi^2 = 0,0004$, GL = 1, P = 0,9835). A CL₁ não diferiu da testemunha

(teste de Wilcoxon: adjusted $\alpha = 0,025$, $\chi^2 = 0,79$, GL = 1, P = 0,37). Apesar de todos os tratamentos com o inseticida terem reduzido significativamente o peso larval da população resistente quando comparada com a testemunha (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,0083, 0,01, 0,0125, respectivamente. CL₁: $\chi^2 = 15,04$, GL = 1, P = 0,0001; CL₁₀ e CL₂₅: $\chi^2 = 20,25$, GL = 1, P < 0,0001), o peso larval dos insetos tratados com a CL₁₀ e a CL₂₅ foram similares (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,05, $\chi^2 = 0,0017$, GL = 1, P = 0,9669) (Tabela 2). As larvas da população resistente apresentaram pesos menores (teste de Wilcoxon: Testemunhas: $\chi^2 = 10,06$, GL = 1, P = 0,0015; valores de CL₁: $\chi^2 = 20,25$, GL = 1, P < 0,0001; valores de CL₁₀: $\chi^2 = 18,78$, GL = 1, P < 0,0001; valores de CL₂₅: $\chi^2 = 15,20$, GL = 1, P < 0,0001) e período de desenvolvimento mais longo (teste de Wilcoxon: Testemunhas: $\chi^2 = 13,99$, GL = 1, P = 0,0002; valores de CL₁: $\chi^2 = 15,07$, GL = 1, P = 0,0001; valores de CL₁₀: $\chi^2 = 15,73$, GL = 1, P < 0,0001; valores de CL₂₅: $\chi^2 = 17,92$, GL = 1, P < 0,0001) comparado com a população suscetível em todos os tratamentos (Tabela 2). Com relação ao período larval, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos CL₁ e CL₁₀ na população suscetível (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,025, $\chi^2 = 1,45$, GL = 1, P = 0,2284) bem como entre os tratamentos com CL₁₀ e CL₂₅ (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,05, $\chi^2 = 0,72$, GL = 1, P = 0,3946). Apenas os tratamentos com CL₁ e CL₂₅ diferiram significativamente (Wilcoxon test: α ajustado = 0,0125, $\chi^2 = 6,86$, GL = 1, P = 0,0088), enquanto as CL₁₀ e CL₂₅ diferiram significativamente da CL₁ na população resistente. O período larval dos tratamentos com CL₁ (Wilcoxon test: α ajustado = 0,0166, $\chi^2 = 6,04$, GL = 1, P = 0,0139), CL₁₀ (Wilcoxon test: α ajustado = 0,01, $\chi^2 = 11,46$, GL = 1, P = 0,0007) e CL₂₅ (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,0083, $\chi^2 = 17,96$, GL = 1, P < 0,0001) diferiram significativamente da testemunha na população suscetível bem como na população resistente (teste de Wilcoxon: ajustado $\alpha = 0,0083$,

0,01, 0,0125, respectivamente. CL_1 : $\chi^2 = 16,89$, $GL = 1$, $P < 0,0001$; CL_{10} e CL_{25} : $\chi^2 = 21,41$, $DF = 1$, $P < 0,0001$) (Tabela 2).

Peso, período e viabilidade pupal. O peso das pupas oriundas das larvas tratadas com o inseticida não diferiu estatisticamente da testemunha dentro de cada população (teste de Kruskal-Wallis: suscetível: $\chi^2 = 0,97$, $GL = 3$, $P = 0,80$; resistente: $\chi^2 = 4,19$, $GL = 3$, $P = 0,24$) (Tabela 3). Embora não tenham sido observadas diferenças no peso da testemunha de ambas as populações, suscetível e resistente (Wilcoxon test: $\chi^2 = 2,55$, $GL = 1$, $P = 0,1102$), pupas resistentes pesaram menos que as pupas suscetíveis tratadas com a CL_1 (teste de Wilcoxon: $\chi^2 = 6,29$, $GL = 1$, $P = 0,0121$), LC_{10} ($\chi^2 = 4,04$, $GL = 1$, $P = 0,0442$), e CL_{25} ($\chi^2 = 4,74$, $GL = 1$, $P = 0,0294$) (Tabela 3). Nenhum dos tratamentos afetou significativamente o período pupal da população suscetível segundo o teste de Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 2,91$, $GL = 3$, $P = 0,4045$) ou da população resistente (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,0083 para todas as comparações pareadas). No entanto, a duração do desenvolvimento pupal da população resistente foi maior que das pupas da população suscetível, tanto entre as testemunhas ($\chi^2 = 21,13$, $GL = 1$, $P < 0,0001$) como entre as concentrações avaliadas (teste de Wilcoxon: valores de CL_1 : $\chi^2 = 16,78$, $GL = 1$, $P < 0,0001$; valores de CL_{10} : $\chi^2 = 20,52$, $GL = 1$, $P < 0,0001$; valores de CL_{25} : $\chi^2 = 20,84$, $GL = 1$, $P < 0,0001$) (Tabela 3). Não houve diferença na viabilidade pupal entre os tratamentos (teste de Kruskal-Wallis: suscetível: $\chi^2 = 1,50$, $GL = 3$, $P = 0,6805$; resistente: $\chi^2 = 1,69$, $GL = 3$, $P = 0,6372$) ou entre as populações (teste de Wilcoxon: Testemunhas: $\chi^2 = 0,99$, $GL = 1$, $P = 0,3183$; valores de CL_1 : $\chi^2 = 0,14$, $GL = 1$, $P = 0,7011$; valores de CL_{10} : $\chi^2 = 1,16$, $GL = 1$, $P = 0,2798$; valores de CL_{25} : $\chi^2 = 2,47$, $GL = 1$, $P = 0,1159$) (Tabela 3).

Razão sexual, período de oviposição, número de ovos, eclosão das larvas. A razão sexual não foi alterada pelos tratamentos (teste de Kruskal-Wallis: suscetível: $\chi^2 = 0,59$, $GL = 3$, $P = 0,8984$;

resistente: $\chi^2 = 1,33$, GL = 3, P = 0,7214) e não diferiu entre as populações (teste de Wilcoxon: Testemunhas: $\chi^2 = 1,05$, GL = 1, P = 0,3037; valores de CL₁: $\chi^2 = 0,34$, GL = 1, P = 0,5576; valores de CL₁₀: $\chi^2 = 0,3893$, GL = 1, P = 0,5326; valores de CL₂₅: $\chi^2 = 0,0981$, GL = 1, P = 0,7541) (Tabela 4). O tratamento com CL₂₅ aumentou o período de oviposição da população resistente comparado com a população suscetível (Wilcoxon test: $\chi^2 = 4,37$, GL = 1, P = 0,0364) (Tabela 4), entretanto o número total de ovos por fêmea não diferiu significativamente entre os tratamentos para cada população (teste de Kruskal-Wallis: suscetível: $\chi^2 = 5,51$, GL = 3, P = 0,1376; resistente: $\chi^2 = 1,66$, GL = 3, P = 0,6445). O número de ovos da testemunha foi significativamente menor para as fêmeas resistentes que para as suscetíveis (teste de Wilcoxon: $\chi^2 = 4,54$, GL = 1, P = 0,0330) (Tabela 4). A porcentagem de ovos eclodidos não diferiu entre os tratamentos para cada população (Kruskal-Wallis teste: suscetível: $\chi^2 = 1,49$, GL = 3, P = 0,6834; resistente: $\chi^2 = 2,53$, GL = 3, P = 0,4693), mas diferiu entre as testemunhas (teste de Wilcoxon: $\chi^2 = 5,75$, GL = 1, P = 0,0164), sendo significativamente maior para a população resistente (Tabela 4). Os tratamentos com clorantraniliprole afetaram significativamente a longevidade dos machos resistentes, que foi menor que a longevidade da testemunha (teste de Wilcoxon: α ajustado = 0,0125, 0,01, 0,0083, respectivamente. CL₁: $\chi^2 = 7,04$, GL = 1, P = 0,0079; CL₁₀: $\chi^2 = 10,38$, GL = 1, P = 0,0013 e CL₂₅: $\chi^2 = 12,97$, GL = 1, P = 0,0003) (Tabela 5). Os insetos machos resistentes apresentaram uma longevidade significativamente maior em comparação aos insetos suscetíveis comparando as testemunhas (teste de Wilcoxon: $\chi^2 = 3,70$, GL = 1, P = 0,0543) e os tratamentos com a CL₁ (Wilcoxon test: $\chi^2 = 6,05$, GL = 1, P = 0,0139), enquanto que as fêmeas resistentes mostraram uma longevidade maior que as fêmeas suscetíveis quando expostas a CL₂₅ (teste de Wilcoxon: $\chi^2 = 5,01$, GL = 1, P = 0,0251) (Tabela 5).

Discussão

A resistência constitui uma grande ameaça para a vida útil de um inseticida, particularmente quando usado contra *P. xylostella*, um inseto que apresenta grande plasticidade genética. Apesar do pouco uso comercial de clorantraniliprole no Brasil, a resistência tem evoluído muito rapidamente a níveis alarmantes em populações de campo de *P. xylostella*, principalmente em áreas do Nordeste do Brasil (27.703-vezes nesse caso). Estes níveis de resistência foram muito maiores dos que os relatados em outros trabalhos recentes (Troczka *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012, Wang & Wu 2012), sugerindo uma rápida evolução no campo por causa do uso indevido de clorantraniliprole, o que reduz sua eficácia. Desde o seu lançamento, clorantraniliprole tem sido praticamente o único inseticida utilizado pelos produtores para tratar suas plantações, impondo uma alta pressão de seleção na maioria das áreas de cultivo de *Brassica*. Diante da resistência anterior aos piretróides, reguladores de crescimento, abamectina, indoxacarbe (Oliveira *et al.* 2011, Santos *et al.* 2011) e *B. thuringiensis* (Zago *et al.* 2014), a dependência de clorantraniliprole ocorreu devido a sua alta eficácia (Silva *et al.* 2012). Apesar dos mecanismos de resistência não terem sido elucidados nessa população, Troczka *et al.* (2012) mostrou que uma única mutação no receptor de rianodina em *P. xylostella* é o principal fator associado à resistência à diamidas. Altos níveis de resistência são normalmente associados com alterações no sítio alvo, sendo em muitos casos instáveis, o que provavelmente está associado com a resistência à diamidas nas populações brasileiras. De fato, verificou-se que a resistência não foi estável, diminuindo acentuadamente, o que sugere a presença de custo adaptativo associado à resistência. Esta hipótese foi suportada pelo aumento no ciclo larval e a redução de peso nos indivíduos resistentes na ausência de clorantraniliprole e expostos a CL₁. O mesmo padrão de redução foi observado para o peso de pupas, especialmente quando comparados os insetos suscetíveis e resistentes na presença do

inseticida, sugerindo um impacto maior no desenvolvimento dos insetos resistentes quando expostos.

O alongamento da fase larval e redução do peso foram mais impactantes nos insetos resistentes do que nos suscetíveis em todas as concentrações, apesar da significância observada entre os tratamentos para os insetos suscetíveis. Estes resultados, em conjunto com aqueles para a sobrevivência e longevidade, indicam que a população resistente mostra uma maior sensibilidade para efeitos subletais do que a população suscetível. Tais alterações do período larval e peso também foram relatados em larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Xu *et al.* 2010, Lai & Su 2011). Han *et al.* (2012) observaram diversos efeitos subletais de clorraniliprole em *P. xylostella* após o tratamento com valores de CL₁₀ e CL₂₅, incluindo uma diminuição da taxa de formação de pupa, peso de pupas, emergência dos adultos, fecundidade e eclosão das larvas e um prolongamento do período de pré-oviposição, embora poucas diferenças tenham sido observadas no presente trabalho. As discrepâncias entre nosso estudo e o de Han e colaboradores estão potencialmente associadas com a idade das larvas utilizadas no experimento - eles usaram larvas de terceiro instar, enquanto que usamos larvas neonatas, o que possivelmente permitiu a recuperação dos insetos durante o seu desenvolvimento (Lai & Su 2011). Han *et al.* (2012) e Lai & Su (2011) não verificaram efeito significativo de clorraniliprole sobre a longevidade de adultos de *P. xylostella* e *S. exigua*, respectivamente, quando as larvas foram tratadas com concentrações subletais deste inseticida. Resultado semelhante foi observado na população suscetível, no entanto, os machos da população resistente apresentaram longevidade significativamente reduzida. Este achado sugere um custo adaptativo maior para insetos resistentes quando submetidos a concentrações subletais de clorraniliprole e um efeito diferencial sobre os sexos. Também foram observadas respostas diferenciais em ambos os sexos

para o comportamento de acasalamento de *Cydia pomonella* L. (Knight & Flexner 2007), uma vez que os machos foram mais afetados pela exposição ao clorantraniliprole do que as fêmeas.

O menor peso larval, maior período de pupas e larvas, a baixa fecundidade dos indivíduos resistentes na ausência de clorantraniliprole sugerem um custo adaptativo nestes indivíduos, o que é comumente associado com resistência a inseticidas (Jia *et al.* 2009, Yu- Ping *et al.* 2010, Sun *et al.* 2012). No entanto, também foram observadas características positivas, como maior sobrevivência larval, maior porcentagem de eclosão de larvas e maior longevidade de machos, sugerindo um possível mecanismo fisiológico de compensação (Yin *et al.* 2009). O aumento da longevidade de machos pode sugerir uma vantagem para indivíduos resistentes, aumentando a sua chance de acasalamento e probabilidade de fertilização, embora estes aspectos possam ser afetados pela resistência em alguns casos (Alyokhin & Ferro 1999, Wyss *et al.* 2003). Como a redução no sucesso de acasalamento em machos de *P. xylostella* resistentes à *B. thuringiensis* foi abordado por Groeters *et al.* (1993), o efeito de clorantraniliprole sobre essas características exige mais atenção.

As fêmeas de *P. xylostella* resistentes ao clorantraniliprole apresentaram períodos de oviposição significativamente maiores na maior concentração avaliada, no entanto, este aspecto não é aparentemente relevante, pois não foi acompanhado por um aumento da fecundidade (o número total de ovos por fêmea não diferiu da população suscetível). De fato, trabalhos anteriores demonstram que a exposição prévia ou a expressão de genes de resistência podem não ter impacto, como também podem aumentar ou diminuir a aptidão biológica de insetos (Fournier *et al.* 1988, Haubruge & Arnaud 2001, James & Price 2002, Ako *et al.* 2004). No presente trabalho, tanto a população suscetível quanto à população resistente sofreram impacto sobre a biologia devido à exposição à clorantraniliprole, sendo este mais intenso na população resistente, provavelmente devido às características biológicas naturalmente inferiores mostradas nas

comparações entre os insetos não expostos ao inseticida. Han *et al.* (2012) descobriram que a exposição a concentrações subletais de clorantraniliprole afetam a dinâmica populacional de *P. xylostella* suscetível, reduzindo o crescimento da próxima geração, independentemente da exposição. Embora esta hipótese não tenha sido testada neste estudo, é provável que o mesmo aconteça com a população resistente e de forma mais intensa devido às características biológicas observadas.

Os alelos que conferem resistência estão geralmente associados a efeitos negativos sobre a aptidão biológica de pragas na ausência do inseticida e estes alelos tipicamente tornam-se raros em populações na ausência de pressão de seleção (Hoffmann & Parsons 1991, Hollingsworth *et al.* 1997). Tabashnik *et al.* (1994) mostraram que uma população de *P. xylostella* altamente resistente a Bt na ausência do inseticida teve a resistência rapidamente revertida e a perda da resistência foi associada ao aumento da aptidão biológica. Apesar das poucas gerações avaliadas no presente estudo, a reversão da resistência a clorantraniliprole foi observada e a resistência parece estar associada com a redução do fitness de *P. xylostella*. Além disso, os custos adaptativos associados à resistência parecem ser inerentes aos indivíduos, na presença e ausência de clorantraniliprole, que também teve efeitos negativos sobre os parâmetros biológicos de indivíduos suscetíveis em uma exposição subletal, sendo mais pronunciado nos insetos resistentes. No entanto, a resistência à clorantraniliprole não causa consistentemente uma desvantagem para *P. xylostella* e alguns efeitos positivos foram observados tanto na ausência quanto na presença de clorantraniliprole quando comparado com os indivíduos suscetíveis.

Por causa da alta resistência a clorantraniliprole constatada no campo e a existência de efeitos negativos sobre a biologia *P. xylostella* inerentes a essa resistência, a rotação de inseticidas com diferentes modos de ação deve ser adotada como uma prática para o manejo de *P. xylostella* para diminuir a frequência de genes resistentes e assim, restaurar a suscetibilidade em populações

de campo (Georghiou 1983, Roush & McKenzie 1987). Não foi observada resistência cruzada entre clorantraniliprole e outros inseticidas utilizados no controle de *P. xylostella* no Brasil (Silva *et al.* 2012). Espinosade, abamectina, e clorfenapir, por exemplo, são boas opções para gerenciar as populações de *P. xylostella* nos cultivos de *Brassica* de áreas tropicais onde o inseto apresenta muitas gerações por ano. Se tal prática é acompanhada pela redução da aplicação de diamidas, a frequência de resistência a estes compostos pode ser reduzida em curto prazo, restaurando a suscetibilidade do inseto.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou em parte a pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Ako, M., C. Borgemeister, H. Poehling, A. Elbert & R. Nauen. 2004.** Effects of neonicotinoid insecticides on the bionomics of two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 1587-1594.
- Alyokhin, A.V. & D.N. Ferro. 1999.** Relative fitness of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) resistant and susceptible to the *Bacillus thuringiensis* Cry3A toxin. *J. Econ. Entomol.* 92: 510–515.
- Aragão, F., F.A.A. Feitosa, C.P. Moraes & M.C.M. Corrêa. 2008.** Sistema de produção de repolho utilizando tnt como mulching e manta. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br>, acessado em agosto de 2012.
- Brugger, K.E., P.G. Cole, I.C. Newman, N. Parker, B. Scholz, P. Suvagia, G. Walker & T.G. Hammond. 2010.** Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest Manage. Sci.* 66: 1075-1081.

- Castelo Branco, M. & M.A. Medeiros. 2001.** Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traças-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 7-13.
- 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.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics. 2011.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, acessado em janeiro de 2014.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis, A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge, University Press, 333p.
- Fournier, D., M. Pralavorio, J. Coulon & J.B. Bergé. 1988.** Fitness comparison in *Phytoseiulus persimilis* strains resistant and susceptible to methidation. *Exp. Appl. Acarol.* 5: 55-64.
- Gassmann, A.J., Y. Carrière & B.E. Tabashnik. 2009.** Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 147-163.
- Georghiou, G.P. 1983.** Management of resistance in arthropods, p. 769-792 In G.P. Georghiou & T. Satto (eds.), *Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects*. New York, Plenum Press, 797p.
- Groeters, F.R., B.E. Tabashnik, N. Finson & M.W. Johnson. 1993.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1035–1039.
- Han, W., S. Zhang, F. Shen, M. Liu, C. Ren & X. Gao. 2012.** Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 68, 1184-1190.
- Haubruge, E. & L. Arnaud. 2001.** Fitness consequences of malathion-specific resistance in red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and selection for resistance in the absence of malathion. *J. Econ. Entomol.* 94: 552-557.
- Hoffmann, A.A. & P.A. Parsons. 1991.** Evolutionary genetics and environmental stress. New York, Oxford University Press, 284p.
- Hollingsworth, R.G., B.E. Tabashnik, M.W. Johnson, R.H. Messing & D.E. Ullman 1997.** Relationship between susceptibility to insecticides and fecundity across populations of cotton aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 90: 55-58.
- James, D.G. & T.S. Price. 2002.** Fecundity in twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. *J. Econ. Entomol.* 95: 729-732.

- Jia, B., Y. Liu, Y.C. Zhu, X. Liu, C. Gao & J. Shen. 2009.** Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manage. Sci.* 65: 996–1002.
- Khaliq, A., M.N.R. Attique & A.H. Sayyed. 2007.** Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Bull. Entomol. Res.* 97: 191-200.
- Knight, A.L. & L. Flexner. 2007.** Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantranilipole, an anthranilic diamide insecticide. *Pest Manage. Sci.* 63: 180-189.
- Lahm, G.P., T.M. Stevenson, T.P. Selby, J.H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C.A. Bellin, C.M. Dubas, B.K. Smith, K.A. Hughes, J.G. Hollingshaus, C.E. Clark & E.A. Benner. 2007.** Rynaxypyr: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274–6279.
- Lai, T. & J. Su. 2011.** Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Pest Sci.* 84: 381–386.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA.
- Liang, G.-M., W. Chen & T.X. Liu. 2003.** Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.* 22: 333-340.
- Medeiros, A. 2002.** O controle biológico de insetos-praga e sua aplicação em cultivos de hortaliças. Brasília, Embrapa Hortaliças, 15p. (Circular Técnica 8).
- Mohan, M. & G.T. Gujar. 2003.** Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and detoxification enzymes. *Crop Prot.* 22: 495-504.
- Monnerat, R.G., S.C.M Leal-Bertioli, D.J. Bertioli. T.M. Butt & D. Bordat. 2004.** Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPDPCR. *Hortic. Bras.* 22: 607-609.
- Mota-Sanchez, D., P.S. Bills & M.E. Whalon. 2002.** Arthropod resistance to pesticides: status and overview, p. 127-214. In: W.B. Wheeler (Ed.), *Pesticides in Agriculture and the Environmental*. New York, Marcel Dekker, 360 p.
- Oliveira, A.C., H.A.A. Siqueira, J.V. Oliveira, J.E. Silva & M. Michereff Filho. 2011.** Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Sci. Agric.* 68: 154-159.
- Rice, W.R. 1989.** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.

- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & N.E. Savin. 2007.** Bioassays with Arthropods. Boca Raton, CRC Press, 224p.
- Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Santos, V.C., H.A.A. Siqueira, J.E. Silva & M.J.D.C. Farias. 2011.** Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the State of Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 40: 264-270.
- Sarfraz, M. & B.A. Keddie. 2005.** Conserving the efficacy of insecticides against *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Appl. Entomol.* 129: 149-157.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC.
- Shelton, A.M., C.J. Perez, J.D. Tang & J. Vandenberg. 1997.** Prospects for novel approaches towards management of the diamondback moth. The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pest. In A. Sivapragasm, W.H Loke, A.k Hussan & G.S Lim (eds.), *Malays. Agric. Res. Devel.* 90: 17-22.
- Shelton, A.M., F.V. Sances, J. Hawley, J.D. Tang, M. Boune, D. Jungers, H.L. Collins & J. Farias. 2000.** Assessment of insecticide resistance after the outbreak of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. *J. Econ. Entomol.* 93: 931-936.
- 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.
- Sun, J., P. Liang & X. Gao. 2012.** Cross-resistance patterns and fitness in fufenozide-resistant diamondbackmoth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 68: 285-289.
- Tabashnik, B.E., N. Finson, F.R. Groeters, W.J. Moar, M.W. Johnson, K. Luo & M.J. Adang. 1994.** Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4120-4124.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Teixeira, L.A.F., L.J. Gut, J.C. Wise & R. Isaacs. 2009.** Lethal and sublethal effects of chlorantraniliprole on three species of *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Pest. Manage. Sci.* 65: 137-143.
- Troczka, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G. Emyr 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.

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

Wang, X., S.K. Khakame, C. Ye, Y. Yang & Y. Wu. 2012. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manage. Sci.* 69: 661-665.

Wyss, C.F., H.P. Young, J. Shukla & R.M. Roe. 2003. Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad. *Crop Prot.* 22: 307–314.

Xu, X.L., D.J. Xu, G.C. Xu & Z.Y. Gu. 2010. Sublethal effects of chlorantraniliprole on *sdpooptera exigugua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Jiangsu Agric. Sci.* 1:139-140.

Yin, X.-H., Q.-J. Wu, X.-F. Li, Y.-J. Zhang, & B.-Y. Xu. 2009. Demographic Changes in Multigeneration *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) After Exposure to Sublethal Concentrations of Spinosad. *J. Econ. Entomol.* 102:357-365.

Yu, S.J. & S.N. Nguyen. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Phys.* 44: 74-81.

Yu-ping, Z., L. Yong-yue, Z. Ling & L. Guang-wen. 2010. Life-history traits and population relative fitness of trichlorphon-resistant and -susceptible *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Psyche.* 2010: 1-8.

Zago, H.B., H.A.A. Siqueira, E.J.G. Pereira, M.C. Picanço & R. Barros. 2014. Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Manage. Sci.* 70: 488-495.

Tabela 1. Suscetibilidade de populações de *P. xylostella* a clorantraniliprole após 96 h de exposição.

População	G ⁽¹⁾	N ⁽²⁾	GL ⁽³⁾	Inclinação ± EP ⁽⁴⁾	CL ₅₀ (IC95%) mg/L	χ^2 ⁽⁵⁾	RR ₅₀ (IC 95%) ⁽⁶⁾
Recife - PE	300+	419	7	2,9 ± 0,27	0,0073 (0,0063 – 0,0086)	6,25	-
Camocim - PE	1	458	7	3,0 ± 0,28	204,3 (176,91 – 236,64)	2,23	27.793 (22.364 – 34.541)
Camocim - PE	2	268	7	2,0 ± 0,21	108,3 (84,49 – 138,03)	6,53	14.744 (10.998 – 19.765)
Camocim - PE	3	197	7	1,7 ± 0,27	34,7 (17,47 – 54,54)	8,85	4.690 (3.105 – 7.084)

¹ Geração testada.

² Número total de insetos tratados.

³ Grau de liberdade.

⁴ Erro padrão.

⁵ Teste de qui-quadrado (P > 0,05).

⁶ Razão de resistência: razão da estimativa de CL₅₀ entre as populações resistente e suscetível calculada através do “teste de razão letal” (Robertson *et al.* 2007).

Tabela 2. Medianas do peso e período larval de *P. xylostella* suscetível e resistente exposta a concentrações subletais de clorantraniliprole.

Tratamento	Peso larval ¹ (IC 95%) (mg)		Período larval ¹ (IC95%) (dias)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
Testemunha	4,7 (4,13 – 6,00)* a	3,5 (2,27 – 4,30) a	8,0 (7,75 – 8,25)* a	8,3 (8,25 – 8,90) a
CL ₁	4,4 (2,89 – 5,60)* a	1,8 (1,46 – 2,42) b	8,2 (8,00 – 9,00)* b	9,4 (9,25 – 9,70) b
CL ₁₀	3,5 (1,81 – 4,60)* b	1,2 (1,13 – 1,57) c	8,5 (8,17 – 9,60)* bc	10,0 (9,78 – 10,29) c
CL ₂₅	3,6 (1,71 – 4,15)* b	1,4 (0,85 – 1,70) c	8,8 (8,33 – 9,50)* c	10,0 (9,67 – 11,00) c

¹Valores com letras diferentes dentro da coluna são significativamente diferentes com base no teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Wilcoxon e correção de Bonferroni.

*Difere estatisticamente entre as populações pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Tabela 3. Medianas do período pupal, peso e viabilidade de pupas de *P. xylostella* suscetível e resistente cujas larvas foram expostas a concentrações subletais de clorraniliprole.

Tratamento	Peso de pupas ¹ (IC 95%) (mg)		Período pupal ¹ (IC95%) (dias)		Viabilidade de pupas ¹ (IC95%) (%)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
Testemunha	6,2(5,78–6,67) a	5,8(5,55–6,48) a	4,1(4,00–4,38)*a	4,5(4,40–4,89) a	100,0(88,9–100,0) a	100,0(90,0–100,0) a
CL ₁	6,4(5,60–6,64)*a	5,7(5,37–6,19) a	4,1(4,00–4,44)*a	4,8(4,56–4,91) a	100,0(90,0–100,0) a	100,0(85,7–100,0) a
CL ₁₀	6,0(5,61–6,76)*a	5,7(5,02–6,05) a	4,1(4,00–4,33)*a	4,6(4,43–4,71) a	100,0(85,7–100,0) a	100,0(87,5–100,0) a
CL ₂₅	6,2(5,44–6,49)*a	5,5(5,42–5,95) a	4,1(4,00–4,27)*a	4,8(4,60–5,00) a	100,0(83,3–100,0) a	100,0(100,0–100,0) a

¹Os valores seguidos pela mesma letra dentro da coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

* Difere estatisticamente entre as populações pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Tabela 4. As medianas da razão sexual, período de oviposição, fecundidade e porcentagem de eclosão das populações suscetível e resistente de *P. xylostella* cujas larvas foram expostas a concentrações subletais de clorantraniliprole.

Tratamento	Razão sexual ¹ (IC 95%)		Período de oviposição ¹ (IC 95%) (dias)		Fecundidade ¹ (IC 95%)		Eclosão ¹ (%) (IC95%)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
Testemunha	0,50 (0,40 – 0,66) a	0,55 (0,40 – 0,66) a	12,0 (5 – 16) a	14,5 (8 – 17) a	311,5 (191 – 388)*a	227,5 (129 – 306) a	56,0 (0 – 80,9) a	80,1 (32,9 – 97,7)*a
CL ₁	0,50 (0,33 – 0,66) a	0,50 (0,25 – 0,60) a	11,5 (4 – 14) a	11,0 (4 – 16) a	253,0 (206 – 341) a	235,0 (116 – 308) a	58,4 (0 – 93,3) a	72,9 (49,7 – 89,8) a
CL ₁₀	0,55 (0,37 – 0,71) a	0,50 (0,33 – 0,66) a	11,0 (6 – 15) a	10,5 (6 – 23) a	280,0 (205 – 326) a	241,0 (66 – 284) a	61,3 (7,6 – 87,6) a	76,8 (0,00 – 91,9) a
CL ₂₅	0,50 (0,37 – 0,66) a	0,50 (0,33 – 0,66) a	5,5 (4 – 13) a	14,0 (2 – 20)*a	228,0 (81 – 328) a	214,0 (15 – 264) a	70,11 (11,4 – 91,7) a	85,9 (33,1 – 100,0) a

¹Os valores seguidos pela mesma letra dentro da coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

* Difere estatisticamente entre as populações, pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Tabela 5. Medianas de machos e fêmeas adultos das populações suscetível e resistente de *P. xylostella* cujas larvas foram expostas a concentrações subletais de clorantraniliprole.

Tratamento	Longevidade ¹ (IC95%) (dias)			
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
Testemunha	♂28,5 (6,0 – 31,0) a	♂30,5 (25,0 – 35,0)* a	♀14,0 (6,0 – 17,0) a	♀18,5 (9,0 – 39,0) a
CL ₁	♂21,0 (13,0 – 23,0) a	♂26,5 (10,0 – 31,0)* b	♀12,0 (5,0 – 18,0) a	♀12,5 (4,0 – 20,0) a
CL ₁₀	♂15,0 (7,0 – 30,0) a	♂19,0 (14,0 – 31,0) b	♀11,0 (6,0 – 18,0) a	♀14,0 (6,0 – 31,0) a
CL ₂₅	♂17,5 (7,0 – 26,0) a	♂23,0 (14,0 – 26,0) b	♀8,0 (4,0 – 22,0) a	♀15,5 (9,0 – 27,0)*a

¹Valores seguidos por letras diferentes dentro da coluna são significativamente diferentes com base no teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Wilcoxon e correção de Bonferroni.

*Diferem estatisticamente entre populações pelo teste de Wilcoxon (P<0,05).

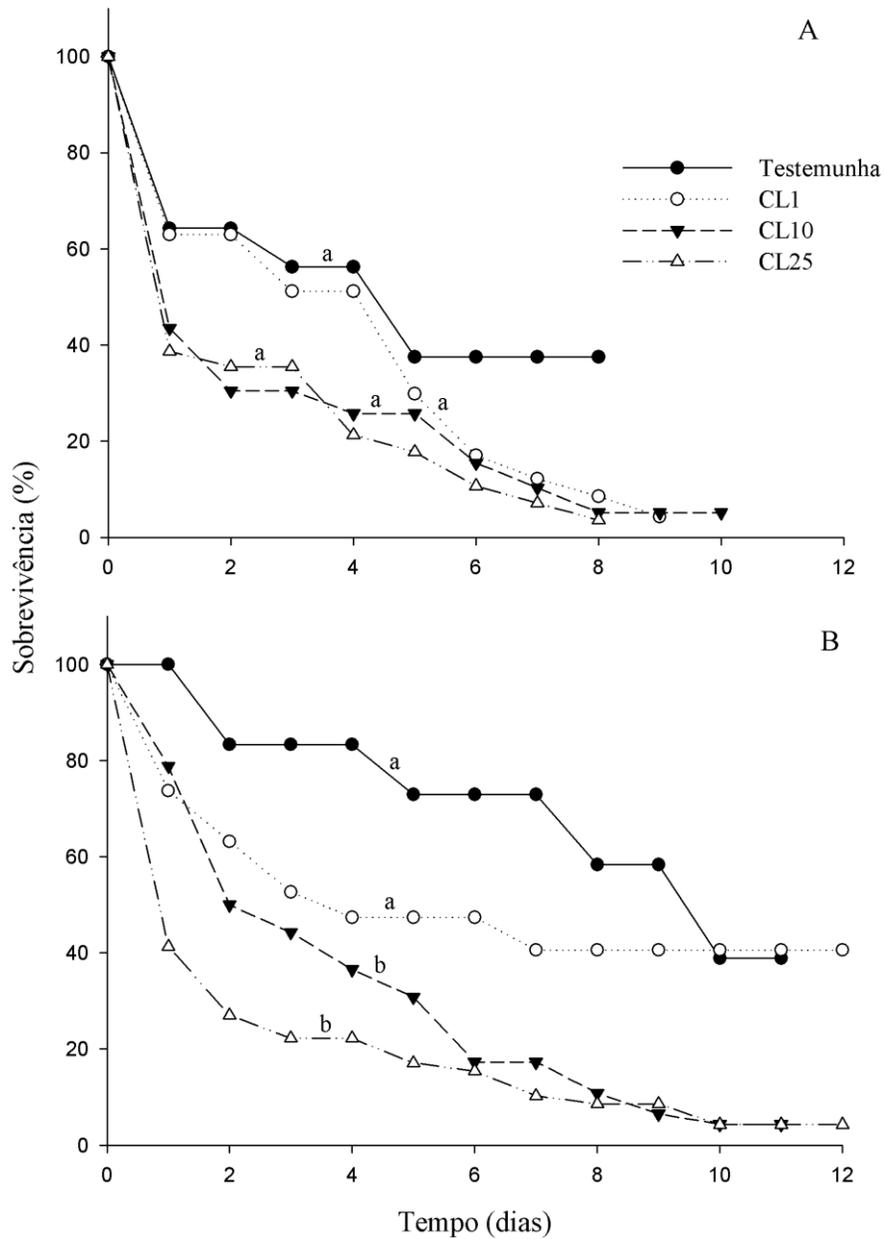


Figura 1. Sobrevivência larval de *P. xylostella* suscetível (A) e resistente (B) exposta a concentrações subletais de clorantraniliprole. Letras diferentes indicam média significante pelo teste de log-rank ($P < 0,05$). Temperatura: 25 ± 1 °C, U.R: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.

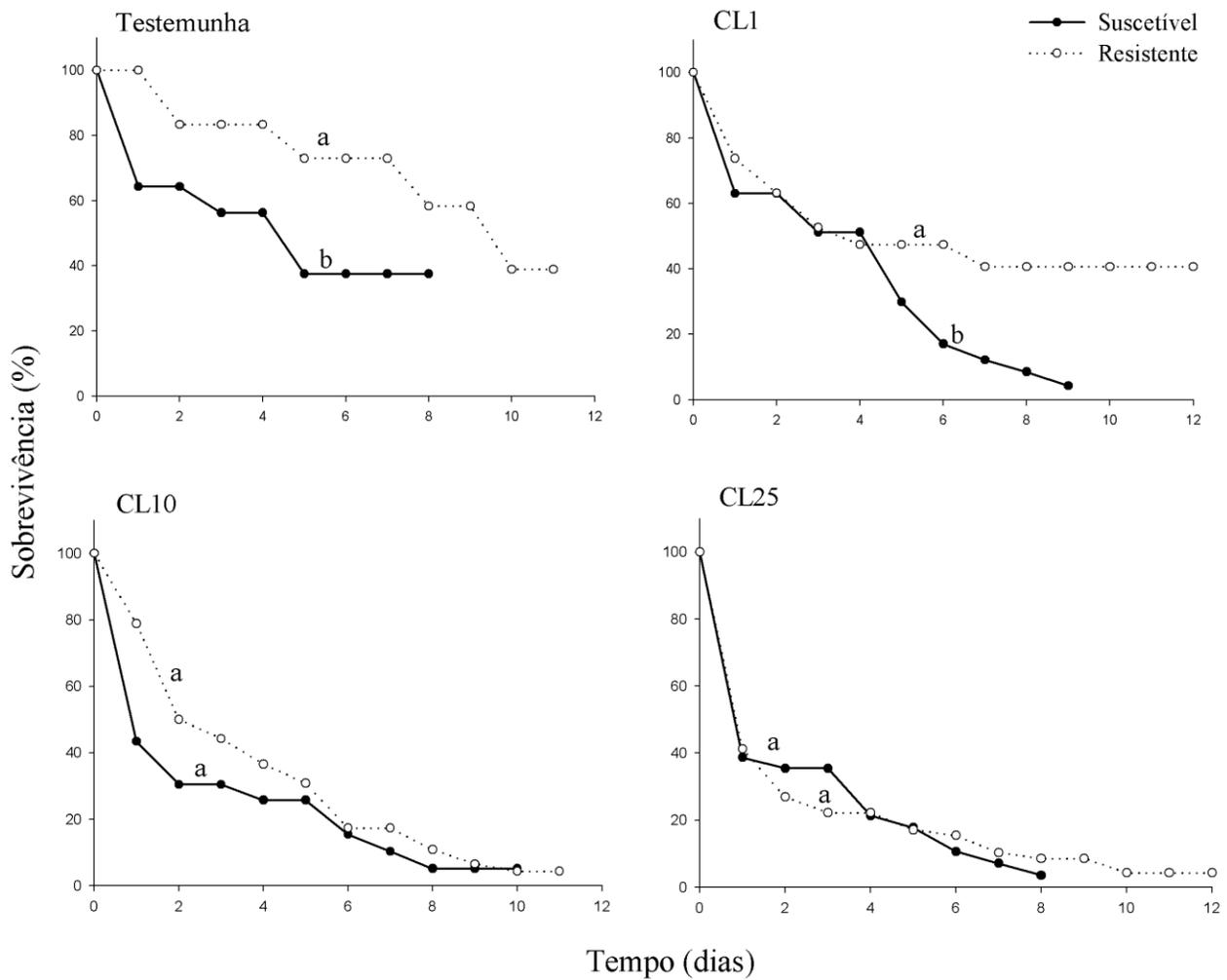


Figura 2. Sobrevivência larval diferencial entre *P. xylostella* suscetível e resistente exposta a concentrações subletais de clorantraniliprole. Letras diferentes indicam média significativa pelo teste de log-rank ($P < 0,05$). Temperatura: 25 ± 1 °C, U.R: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) A DIAMIDAS ANTRANÍLICAS NO BRASIL

LÍLIAN M.S. RIBEIRO¹, HERBERT A. A. SIQUEIRA¹, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA², HUGO N. FERREIRA¹,
WELLINGTON M. SILVA¹, MARCELO H.P. AMARAL¹ E VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

Ribeiro, L.M.S., H.A.A. Siqueira, A.A.C. Teixeira, H.N. Ferreira, W.M. Silva, M.H.P. Amaral &
V. Wanderley-Teixeira. Resistência de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a
diamidas antranílicas no Brasil. A ser submetido ao Journal of Pest Science.

RESUMO – A utilização indiscriminada de clorantraniliprole ocasionou a evolução de resistência em *Plutella xylostella* (L.) na China e no Brasil. No entanto, não se sabe se a resistência está amplamente distribuída em regiões produtoras de brássicas do Brasil e os mecanismos envolvidos. Assim, objetivou-se avaliar o nível de suscetibilidade a clorantraniliprole e a possível existência de resistência cruzada com ciantraniliprole em populações de *P. xylostella* de áreas produtoras de brássicas no Estado de Pernambuco. Também se investigou a associação da atividade das enzimas detoxificativas com a resistência visando verificar o mecanismo envolvido. As populações foram submetidas às concentrações diagnóstica e recomendada de clorantraniliprole. O nível de resistência foi avaliado através de curvas de concentração-resposta utilizando-se clorantraniliprole e ciantraniliprole. Ensaios foram conduzidos para avaliar a atividade de três enzimas detoxificativas: esterase, glutationa-S-transferase e oxidase de função mista. Todas as populações de campo apresentaram resistência muito alta a clorantraniliprole, enquanto que para o ciantraniliprole, esta resistência foi moderada ou muito alta. Embora as atividades enzimáticas tenham variado de forma significativa entre as populações, não apresentaram correlação com a toxicidade dos inseticidas. Logo, a resistência aos inseticidas não pode ser atribuída ao aumento da atividade destas enzimas. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar tal fato, já que em apenas dois anos de utilização no país, o clorantraniliprole tornou-se ineficaz contra *P. xylostella* em áreas comerciais de brássicas, o que pode afetar negativamente o controle com ciantraniliprole no futuro devido à resistência cruzada entre esses dois formulados.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-brássicas, Brassicaceae, clorantraniliprole, ciantraniliprole, resistência cruzada, mecanismo de resistência

RESISTANCE OF *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) TO DIAMIDES
IN BRAZIL

ABSTRACT - The indiscriminate use of clorantraniliprole has caused the emergence of *Plutella xylostella* (L.) resistant populations in China and Brazil. However, it is unknown whether the resistance is widely distributed in brassica producing regions of Brazil and the mechanisms involved. Thus, we aimed to evaluate the level of susceptibility to clorantraniliprole and a possible existence of cross-resistance with ciantraniliprole in populations of *P. xylostella* from brassica producing areas in the state of Pernambuco. In addition, examined the enzymes detoxificants activity association with resistance in order to ascertain the possible mechanism involved. The populations of *P. xylostella* were subjected to diagnostic and recommended clorantraniliprole concentrations. The level of resistance was evaluated by concentration-response curves using clorantraniliprole and ciantraniliprole. Tests were conducted to evaluate the activity of three enzymes: esterase, glutathione -S- transferase and mixed function oxidase. All field populations showed very high resistance to clorantraniliprole, while for ciantraniliprole, this resistance was moderate or very high. Although the enzymatic activities have varied significantly between populations, these were not correlated with the toxicity of insecticides. Thus, survival to insecticides probably cannot be attributed to increased activity of these enzymes. However, most studies should be conducted to elucidate this fact, since in only two years of use in the country, clorantraniliprole became ineffective against *P. xylostella* in commercial areas of brassica, which may adversely affect control with ciantraniliprole in the future due to cross-resistance exists between these two formulated.

KEY WORDS: Diamondback moth, Brassicaceae, clorantraniliprole, ciantraniliprole, cross-resistance, resistance mechanism

Introdução

Plutella xylostella (L.) é a principal praga em todas as regiões do mundo que cultivam plantas da família Brassicaceae (Talekar & Shelton 1993). Problemas com esta praga atingem maiores proporções nos subtrópicos e trópicos onde o cultivo é contínuo o que demanda muitas pulverizações ao longo do ciclo de cultivo. Altos níveis de pressão de seleção, o ciclo curto e a alta fecundidade da *P. xylostella* contribuíram para que esta desenvolvesse resistência a uma vasta gama de inseticidas (Wright 2004), incluindo os novos inseticidas tais como: espinosade e indoxacarbe (Zhao *et al.* 2002, 2006), além dos microbianos a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Shelton *et al.* 2007). Até o momento há registro de resistência da praga a 92 ingredientes ativos diferentes (APRD 2014), sendo considerada uma praga particularmente difícil de ser controlada de forma sustentável (Grzywacz *et al.* 2010).

Os anos de 2006 e 2007 marcaram o início da utilização das diamidas, um novo grupo de inseticida, com mecanismo de ação diferenciado e altamente eficaz contra insetos da Ordem Lepidoptera (Lahm *et al.* 2009). As diamidas agem ativando seletivamente os receptores de rianodina em insetos provocando mortalidade pela liberação descontrolada dos estoques de cálcio presentes nas células musculares (Lahm *et al.* 2009). Atualmente estão disponíveis no mercado o flubendiamida, pertencente à classe das diamidas do ácido ftálico, além de dois produtos da classe das diamidas antranílicas, o clorantraniliprole que já é amplamente comercializado, e o ciantraniliprole, lançado recentemente sendo vendido apenas em alguns países (Lahm *et al.* 2009, Selby *et al.* 2013, Teixeira & Andaloro 2013).

O clorantraniliprole foi liberado para utilização no Brasil em novembro de 2009. Pouco antes de sua introdução no país, estudo de linha base com *P. xylostella* mostrou sua efetividade contra populações da praga de diferentes áreas geográficas, incluindo aquelas oriundas de municípios do Agreste Pernambucano. Embora suscetíveis, as populações desta região foram as

mais tolerantes ao inseticida, fato atribuído ao histórico de resistência a inseticidas de outras classes químicas intensamente utilizados anteriormente (Oliveira *et al.* 2011, Santos *et al.* 2011, Silva *et al.* 2012). Devido à elevada eficácia e favorável perfil ecotoxicológico, as diamidas passaram a ser amplamente utilizadas em todo o mundo (Teixeira & Andaloro 2013). Embora bastante eficiente, a ampla e incorreta utilização levou ao desenvolvimento de resistência em populações de *P. xylostella* a este produto em apenas dois anos de utilização na China (Wang & Wu 2012), conferindo inclusive resistência cruzada ao flubendiamida (Wang *et al.* 2012). Após a constatação da resistência, estudos sobre os mecanismos responsáveis por conferir resistência da praga foram conduzidos, e indicaram a existência de alteração no sítio alvo como principal mecanismo (Trocza *et al.* 2012), bem como o envolvimento em pequeno grau de enzimas detoxificativas (Wang *et al.* 2012).

No Brasil, alto nível de resistência (RR=27.793-vezes) de *P. xylostella* a clorantraniliprole foi constatado em uma população do Agreste pernambucano cuja evolução para resistência ocorreu dentro de dois anos após a introdução do produto no mercado (Ribeiro *et al.* 2014). Este resultado alarmante, nos fez pensar se este alto nível de resistência estaria distribuído entre as populações da região. Diante disto, esta pesquisa objetivou investigar a suscetibilidade a clorantraniliprole de populações de *P. xylostella* oriundas de áreas de cultivo de brássicas do Agreste pernambucano. Além disso, verificar a possível existência de resistência cruzada entre esse inseticida e o ciantraniliprole, diamida ainda não registrada no país, bem como investigar o envolvimento de enzimas detoxificativas na resistência.

Material e Métodos

Criação dos insetos. Nove populações foram utilizadas de *P. xylostella*, sendo uma padrão de suscetibilidade mantida em laboratório desde 1998, sem qualquer contato com inseticidas, e oito

populações coletadas em áreas de cultivo de *Brassica* spp. nos municípios de Chã Grande - PE, Sapucarana - PE, Jupi – PE, Bezerros – PE, Camocim de São Félix – PE e Boas Novas – PE, no período de novembro de 2011 a janeiro de 2012 onde houve relatos de falha no controle por inseticidas à base de diamidas. Nos municípios de Camocim – PE e Boas Novas – PE foram coletadas populações de duas áreas distintas, sendo denominadas de Camocim I e II e Boas Novas I e II. As populações foram mantidas individualmente no Laboratório de Interações Inseto-Tóxico e foram alimentadas com folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) sem o contato com inseticidas.

Bioensaios de concentração diagnóstica e concentração de campo. Para confirmar a resistência a diamidas, as populações de campo e de laboratório foram submetidas à concentração diagnóstica de 0,3 mg/L estipulada por Silva *et al.* (2012), e à concentração de 1,875 mg/L de clorantraniliprole (Premio[®], concentrado solúvel a 20%, DuPont Brasil Ltda), recomendada pelo fabricante para o controle de *P. xylostella*. As soluções do inseticida foram preparadas por diluição do produto formulado em água destilada contendo o espalhante adesivo Triton X - 100 na concentração de 0,01%. Folhas de couve cortadas em discos 5 cm de diâmetro, lavadas em hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas com água de torneira foram tratadas por imersão por 30 segundos nas soluções do inseticida, sendo as folhas da testemunha tratadas apenas com água destilada mais Triton X -100 a 0,01%. Após secagem à temperatura ambiente, os discos de couve tratados foram colocados em placas de Petri, contendo papel filtro umedecido com água destilada. Foram transferidas 10 larvas de segundo instar para cada placa, sendo realizadas dez replicatas por tratamento. Cada experimento foi repetido duas vezes. As placas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 h, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ até o momento da avaliação. A mortalidade foi analisada após 96 h e a mortalidade corrigida pela

fórmula de Abbott (1925). O inseticida foi considerado eficiente quando a mortalidade das larvas foi superior a 90% (Castelo Branco *et al.* 2003).

Bioensaios de suscetibilidade. Curvas de concentração-resposta com clorantraniliprole e ciantraniliprole foram estabelecidas para as nove populações através de bioensaios para verificação da suscetibilidade. Discos de folhas de couve foram tratados em concentrações crescentes de cada inseticida seguindo a metodologia mencionada anteriormente. Foram avaliadas sete a nove concentrações de cada inseticida em triplicata. Para clorantraniliprole as concentrações usadas variaram de 0,0009 a 0,25 mg/L para a população suscetível e de 14,06 a 3.600 mg/L para as populações de campo. Para ciantraniliprole as concentrações testadas variaram de 0,001 a 3 mg/L para a população suscetível enquanto que para as populações de campo variou de 14 a 900 mg/L para Camocim I, de 2,81 a 180 mg/L para Camocin II, de 3,51 a 900 mg/L para Chã-Grande e Jupi, de 0,30 a 220 mg/L para Sapucarana e entre 0,137 a 300 mg/L para Bezerros, Boas Novas I e II. Todos os bioensaios foram conduzidos com larvas de segundo instar inicial, mantidas dentro de uma câmara de crescimento a 25 ± 1 ° C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12 h. A mortalidade foi avaliada após 96 h de exposição tocando as larvas com o auxílio de um pincel de cerdas macias e as larvas foram consideradas mortas quando nenhum movimento foi observado. Os dados de mortalidade foram corrigidos e submetidos a uma análise de Probit (Finney 1971) utilizando o programa POLO-Plus (LeOra-Software 2005). A razão de resistência e o seu intervalo de confiança a 95 % foram calculados de acordo com o método descrito por Robertson *et al.* (2007).

Extração de amostras para análise de atividade enzimática. Para a análise de α -esterase (α -EST), 30 larvas de terceiro instar de *P. xylostella* de cada população foram coletadas e homogeneizadas individualmente com o auxílio de um homogeneizador múltiplo em 100 μ L de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5. Para análise da atividade glutational-S-transferase (GST)

foram coletadas 10 larvas de terceiro instar de cada população em triplicata as quais foram homogeneizadas em 200 μ L tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Após homogeneização as amostras para quantificação de EST e GST foram centrifugadas a 14.000g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante obtido estocado a -20 °C para utilização posterior. Para os ensaios de atividade oxidase de função mista (MFO), 30 larvas de terceiro instar de cada população foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 com glicerol (20%). O homogeneizado foi centrifugado a 14.000g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante ultracentrifugado a 100.000g por 1 hora a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato e preservado a -80 °C até uso posterior como fonte de enzimas microssomais. A proteína total foi determinada através do método do ácido bicinonínico (Smith 1985) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Atividade de esterase. A atividade de EST foi medida usando o substrato α - naftil acetato (α -Na) a 25 mM de acordo com Dary *et al.* (1990). Em cada poço de uma microplaca de fundo chato de 96 poços foram depositados 2 μ L do substrato α - naftil acetato, 10 μ L de amostra (diluída de 1:10 em fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5,) e 188 μ L de tampão fosfato de sódio. Em seguida, as amostras foram incubadas a 30 °C por 15 minutos. Após este período, a interrupção da reação foi feita pela adição de 33,2 μ L de FAST Blue B a 0,3 % e absorbância lida em leitora de microplacas (Elx800, BioTek®) com filtro de 595 nm. A atividade de esterase foi extrapolada a partir de uma curva padrão preparada com α - naftol, sendo expressa em milimoles de α - naftol por minuto por micrograma de proteína.

Atividade de glutathiona-S-transferase. A atividade de conjugação de glutathiona reduzida foi determinada usando substrato 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB), formando 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona na presença de GST de acordo com o método de Habig *et al.* (1974). Para a reação, 138 μ L de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), 10 μ L da amostra, 150 μ L de glutathiona reduzida

(10 mM) foram depositados em tubos de microcentrifuga. A pré-mistura foi incubada em banho maria a 30 °C por 5 minutos. Posteriormente a pré-mistura foi transferida para uma cubeta e a reação iniciada com adição de 2 µL de CDNB a 150 mM. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutationa foi medida por espectrofotometria a 340 nm durante 5 minutos com intervalos de leitura de 30 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os dados de absorbância foram analisados em função do tempo de reação após adição do CDNB. A inclinação da reta (absorbância/min) foi transformada em unidade de concentração utilizando o coeficiente de extinção do CDNB ($9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em micromoles de glutathione conjugada por minuto por miligrama de proteína.

Atividade de oxidase de função mista. Foram utilizados dois substratos o primeiro foi o p-nitroanisol para quantificar a atividade de MFO através da reação de formação de p-nitrofenol por O-desmetilação, conforme descrito por Rose & Brindley (1985). Foram adicionados 178,8 µL de tampão fosfato de sódio de resuspensão (0,1 M, pH 7,5), 56,2 µL da amostra, 2,5 µL p-nitroanisol (2 mM) e 12,5 µL de NADPH reduzido (9,6 mM) em tubos de microcentrifuga, sendo a mistura incubada por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, o HCl (1 M) foi adicionado como solução de parada e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi depositada por poço de uma microplaca de fundo chato de 96 poços e absorbância foi lida a 405 nm em leitora de placa (Elx800, BioTek®). As amostras foram analisadas em triplicata e a atividade por amostra foi obtida através da equação linear estimada para a absorbância em função da curva padrão de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligrama de proteína. O segundo substrato utilizado foi o 4-cloro-N-metilanilina, visando quantificar a atividade de MFO através da formação de 4-cloroanilina por N-desmetilação. Em tubos de microcentrifuga foram adicionados 50 µL de tampão fosfato de sódio com Tween 20 a 2% (0,1M, pH 7,5), 25 µL da amostra, 25 µL 4-cloro-N-

metilanina (7,5 mM), 25 µL de NADPH reduzido (9 mM). A reação foi processada por 16 minutos a temperatura de 37 °C e interrompida pela adição de 187,5 µL de p-dimetilaminobenzaldeído a 233,33 mM diluído em 3 N de ácido sulfúrico. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min a 4 °C. A atividade por amostra foi obtida da equação linear estimada para a absorbância em função da curva padrão de 4 - cloroanilina e expressa em nanomoles de 4-cloroanilina por minuto por miligrama de proteína.

Análise dos dados. Os dados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância pelo procedimento PROC GLM e as médias entre as populações comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade. Os valores da CL₅₀ para clorantraniliprole e ciantraniliprole juntamente com os dados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise de correlação de Pearson, utilizando o PROC CORR, adotando $\alpha = 0,05$. As análises foram realizadas através do programa estatístico SAS (SAS Institute 2001).

Resultados

Dose diagnóstica e dose de campo. As concentrações diagnóstica e de campo de clorantraniliprole não foram eficazes contra as populações de *P. xylostella* coletadas em áreas de cultivo com relatos de falhas no controle, uma vez que permitiram elevada sobrevivência. A mortalidade variou de 0 a 0,4% e de 0 a 10,2% para cada concentração, respectivamente, enquanto que ambas provocaram 100% de mortalidade na população de laboratório (Recife-PE), confirmando, a presença de resistência nas populações de campo (Fig. 1).

Bioensaios de suscetibilidade e resistência cruzada entre clorantraniliprole e ciantraniliprole. Quando comparadas com a população de laboratório, todas as populações de campo apresentaram resistência muito elevada a clorantraniliprole que variou de acordo com as áreas de coleta (Tabela 1). Dentre as populações de campo, o menor valor de CL₅₀ encontrado foi

de 43,28 mg/L para Boas Novas II e o maior foi de 162,57 mg/L para a população de Bezerros, conferido resistência de 7.492 e 28.125 vezes, respectivamente. As concentrações letais para 80% dos indivíduos, mortalidade estipulada pela legislação brasileira para o inseticida ser considerado efetivo, variaram de 113,51 a 334,60 mg/L (Tabela 1), valores 60,5 e 178,4 vezes acima da concentração do produto recomendada pelo fabricante para o controle. Apesar de nunca terem sido expostas ao ciantraniliprole, as oito populações de campo também foram resistentes a este inseticida e apresentaram níveis moderados ou muito elevados de resistência. A população de Bezerros apresentou o menor valor de CL_{50} (0,43 mg/L), sendo apenas 12,63 vezes mais resistente que a população de laboratório, enquanto que a população mais resistente foi Jupi com CL_{50} de 69,69 mg/L e razão de resistência de 2.024 vezes. Os valores CL_{80} para Bezerros e Jupi foram de 9,65 e 134,1 mg/L, respectivamente (Tabela 2). Embora fraca, houve correlação significativa entre as CL_{50} de ambos os inseticidas ($r = 0,33$, $P < 0,0001$). Este dado junto com o fato de que as populações analisadas sofreram pressão de seleção apenas com clorantraniliprole, mas apresentam níveis consideráveis de resistência ao ciantraniliprole, confirmam a presença de resistência cruzada entre as duas diamidas antranílicas.

Ensaio enzimáticos. As atividades de α -EST, GST e de MFO variaram de forma significativa entre as populações (Tabela 3). Em todos os casos a maior atividade não correspondeu ao maior nível de resistência e a menor atividade a menor resistência. A atividade de α -EST variou de 0,23 mmol/min/ μ g de proteína para Sapucarana, população com níveis intermediários de resistência para ambos os inseticidas, a 4,0 mmol/min/ μ g de proteína para Camocin II, segunda população mais resistente a clorantraniliprole e resistência intermediária a ciantraniliprole. As atividades dessas enzimas na população de Jupi, maior nível de resistência a ciantraniliprole e terceira mais resistente a clorantraniliprole, juntamente com Boas Novas I, II e Chã-grande, não diferiram da população suscetível. Sapucarana, Camocin I e Bezerros, que é a mais resistente a

clorraniliprole, apresentaram atividades significativamente inferiores à população suscetível, enquanto que camocin II foi significativamente maior (Tabela 3). A correlação entre os valores de CL_{50} e a atividade de α -EST foi significativa e negativa para ambos os inseticidas (clorraniliprole: $r = -0,19$, $P = 0,0017$; ciantraniliprole: $r = -0,15$, $P = 0,0137$), indicando que quanto maior o valor de CL_{50} , menor foi a atividade de α -EST. A população que apresentou a menor atividade de GST foi a suscetível ($10,85 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína), enquanto que Camocin I, quinta população menos resistente a clorraniliprole e segunda mais resistente a ciantraniliprole, apresentou a maior atividade ($23,89 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). As atividades de camocin II, Jupi, Chã-grande e Bezerros foram estatisticamente iguais a da população suscetível, enquanto que Boas Novas II, Sapucarana, Camocim I e Boas Novas I foram significativamente superiores (Tabela 3). Não houve correlação entre as CL_{50} dos inseticidas com a atividade enzimática de GST (clorraniliprole: $r = 0,15$, $P = 0,1771$; ciantraniliprole: $r = 0,17$, $P = 0,1220$). A menor atividade de MFO mediando N-desmetilação foi observada para a população de Jupi ($18,60 \text{ nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína), a terceira mais resistente a clorraniliprole e a mais resistente a ciantraniliprole. A maior atividade foi observada para a população de chã-grande ($72,71 \text{ nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Quatro das oito populações resistentes apresentaram atividades similares a da população suscetível (Tabela 3). Em relação à atividade de MFO com base na reação de O-desmetilação, a menor atividade foi observada para Boas Novas II ($1,13 \text{ nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) uma das menos resistentes a ambos os inseticidas, enquanto que a população suscetível apresentou a maior atividade enzimática ($28,20 \text{ nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) similar apenas a população de Camocim I. As demais populações apresentaram atividade estatisticamente menor que a população de laboratório (Tabela 3). As correlações entre os valores de CL_{50} dos inseticidas e as atividades de MFO utilizando o substrato para N-desmetilação (clorraniliprole: $r = 0,03$, $P = 0,7860$; ciantraniliprole: $r = 0,0005$, $P = 0,9961$) e o substrato para O-desmetilação

(clorantraniliprole: $r = -0,27$, $P = 0,1633$; ciantraniliprole: $r = 0,08$, $P = 0,6590$) não foram significativas.

Discussão

Clorantraniliprole surgiu como uma excelente ferramenta para o controle de diversas pragas por apresentar um modo de ação diferenciado altamente eficaz contra diversas espécies de insetos (Lahm *et al.* 2007, 2009), inclusive *P. xylostella* (Wang *et al.* 2010, Silva *et al.* 2012), conhecida pelo seu amplo histórico de resistência no mundo (Talekar & Shelton 1993, Furlong *et al.* 2013).. No entanto, a utilização generalizada e intensa desta nova classe inseticida acarretou a perda de sua eficácia em pouco tempo de uso como observado no presente estudo em que foram verificados níveis altíssimos de resistência de *P. xylostella* nos campos de produção de brássicas do Estado de Pernambuco, Brasil. Os níveis de resistência aqui encontrados, cujo maior valor encontrado foi de 28.125 vezes, foram muito superiores aos detectados na China, Filipinas e Tailândia onde foram observadas razões de resistência de 2.000, 4.100 e 200 vezes, respectivamente (Trocza *et al.* 2012, Wang & Wu 2012).

Estudo de linha base conduzido no Brasil, logo após a introdução de clorantraniliprole no país, mostrou que as populações estavam altamente suscetíveis a este inseticida com valores de CL_{50} variando de 0,015 a 0,038 mg/L (Silva *et al.* 2012), enquanto que dentro de dois anos de intensa utilização foram detectados valores muito superiores, os quais variaram de 43,48 a 162,57 mg/L. A rápida evolução para a resistência observada nas populações pernambucanas não surpreende visto que estão sob constante pressão de seleção devido ao uso de inseticidas em regime de aplicação de até quatro pulverizações semanais (Oliveira *et al.* 2011). Devido ao uso inadequado de inseticidas, as populações de *P. xylostella* desta área são conhecidas por serem

resistentes a diversos produtos químicos de diferentes modos de ação como indoxacarbe, abamectina, lufenuron, deltametrina e inseticidas a base de *B. thuringiensis* Berliner (Oliveira *et al.* 2011, Santos *et al.* 2011, Ribeiro *et al.* 2012).

Até o momento nenhum estudo havia sido direcionado para avaliar a existência de resistência cruzada entre as duas diamidas antranílicas existentes. Constatou-se que resistência muito alta a clorantraniliprole conferiu moderada ou muito alta resistência ao ciantraniliprole que nunca foi utilizado para o controle das populações avaliadas, confirmando a presença de resistência cruzada entre as diamidas. Forte resistência cruzada em populações de *P. xylostella* da China, Tailândia e Filipinas foi verificada entre clorantraniliprole e o flubendiamida, diamida do ácido ftálico que apresenta o mesmo modo de ação das diamidas antranílicas (Trocza *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012). Normalmente, altos índices de resistência cruzada são observados entre inseticidas que apresentam mesmo modo de ação (Pu *et al.* 2010), assim em programas de manejo da resistência deve-se evitar a rotação entre diamidas visando retardar o aparecimento da resistência (IRAC 2014).

Nos casos em que a resistência já se encontra estabelecida, como nos oito municípios onde foram coletadas as populações testadas neste estudo, deve-se suspender temporariamente o uso das diamidas e realizar rotação com inseticidas aos quais as populações ainda se mantêm suscetíveis (Georghiou & Taylor 1977). Com a descontinuidade do uso, a suscetibilidade ao clorantraniliprole tende a ser restabelecida já que a resistência a este produto tem se mostrado instável, reduzindo significativamente na ausência de exposição dentro de poucas gerações (Wang *et al.* 2012, Ribeiro *et al.* 2014).

O aumento nos processos metabólicos que acarretam maior destoxificação dos inseticidas através de enzimas como as ESTs, GSTs e MFOs constitui um dos mais importantes mecanismos que conferem resistência aos insetos (Mohan & Gujar 2003). Investigação sobre o envolvimento

de destoxificação metabólica na resistência de uma população asiática de *P. xylostella* resistente a clorantraniliprole mostrou sinergismo limitado de inibidores de enzimas metabólicas sobre a toxicidade deste inseticida, sugerindo que a destoxificação metabólica contribui apenas em parte para a resistência (Wang *et al.* 2012). Enquanto que ensaios bioquímicos conduzidos com *Choristoneura rosaceana* (Harris) selecionada para a resistência em laboratório apontaram para o envolvimento de ESTs na resistência (Sial *et al.* 2011). No presente estudo, mecanismos metabólicos não são os principais responsáveis pelos altos níveis de resistência observados nas populações brasileiras de *P. xylostella*, pois não houve correlação entre os valores de CL₅₀ obtidos para as duas diamidas e as atividades de GST e MFO, enquanto que a atividade de α -EST foi menor quanto maior se apresentou a resistência.

A ausência de correlação entre a toxicidade e as atividades de α -EST, GST e MFO também foi verificada em populações de *Spodoptera exigua* (Hübner) tolerantes e resistentes a clorantraniliprole coletadas em campo na China (Lai *et al.* 2011). Os autores também analisaram bioquimicamente uma das populações de campo moderadamente resistentes ao inseticida após seleção em laboratório por 13 gerações e observaram significativo aumento da atividade de EST e MFO, no entanto, após ensaios com sinergistas conduzidos com esta e outras duas populações de campo resistentes não foi observado efeito sinérgico sobre a toxicidade com inibidores de EST, enquanto que as razões de sinergismo das populações resistentes foram similares à razão de sinergismo da população suscetível com inibidor de MFOs, sugerindo o envolvimento destas na destoxificação de clorantraniliprole, mas não na resistência. E nenhum efeito sinérgico foi observado utilizando inibidor de GST.

O envolvimento de MFOs na destoxificação de clorantraniliprole também parece ocorrer em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Jiang *et al.* 2012). Testes bioquímicos realizados com populações de *Spodoptera litura* (Fabricius) de campo tolerantes a clorantraniliprole, assim como

nesta pesquisa, também sugeriram a ausência de envolvimento dos três grupos de enzimas destoxicativas na sobrevivência deste inseto pela ausência de correlação entre as toxicidades e as atividades enzimáticas, embora maior atividade de MFO tenha sido observada na maioria das populações de campo e o aumento da atividade de GST e EST tenha sido observado em algumas populações (Su *et al.* 2012).

Curiosamente foi observada redução na atividade de α -EST com o aumento do valor de CL₅₀ para clorantraniliprole e ciantraniliprole, sendo significativamente menor em relação à população suscetível as atividades nas populações de Sapucarana, Camocin I e Bezerros. Atividade inferior à população suscetível também foi observada para MFO com o substrato para O-desmetilação em sete das oito populações de campo avaliadas. Não se sabe ao certo o motivo responsável pela reduzida atividade enzimática nestas populações, no entanto, não se pode descartar a possibilidade de ser consequência de efeitos pleiotrópicos, os quais frequentemente estão associados à resistência (Chevillon *et al.* 1997). Menor atividade de α -EST e MFO em relação à população padrão de suscetibilidade foi constatada em *S. exigua* resistente a clorantraniliprole (Lai *et al.* 2011), enquanto que menor atividade de EST e GST foi observada em *Helicoverpa armigera* Hübner resistente a *B. thuringiensis* (Cao *et al.* 2010).

A exclusão do envolvimento de enzimas destoxicativas como o principal fator responsável por conferir resistência às populações de *P. xylostella* nesta pesquisa, reforça a hipótese de alteração no sítio alvo como principal mecanismo de resistência, o qual foi constatado em estudo anterior com populações da praga da Tailândia e das Filipinas. A resistência foi atribuída a uma mutação na região do gene que codifica o provável sítio de ligação das diamidas levando a substituição de uma glicina por ácido glutâmico na proteína. Os autores afirmam que esta mutação pode ter efeito significativo na ação das diamidas, contribuindo completa ou parcialmente para a resistência (Trocza *et al.* 2012).

A rapidez com que as populações evoluíram para a resistência a clorraniliprole nas áreas estudadas mostra a importância da implementação urgente de um programa de manejo da resistência com a adoção da estratégia de rotação de inseticidas de diferentes modos de ação que selecionem os insetos para diferentes mecanismos de resistência, visando conservar a eficácia de novos químicos por maior espaço de tempo (Shen & Wu 1995, Troczka *et al.* 2012). Pois o custo de desenvolvimento de novos inseticidas é geralmente alto e requer uma demanda de tempo apreciável, desde a síntese da molécula, realização de testes toxicológicos e de ensaios de campo, até chegar ao registro para finalmente ser utilizado no campo (Knight & Norton 1989).

Conclui-se que em dois anos, a utilização do clorraniliprole tornou-se ineficaz contra *P. xylostella* em áreas de cultivo de brássicas do Agreste pernambucano e que a resistência a este produto inviabiliza o controle com ciantraniliprole, a diamida antranílica de segunda geração que ainda será comercializada no país, além de que a resistência da praga em campo não pode ser explicada pelo aumento da capacidade de metabolização do inseticida através de enzimas de destoxificação, mas provavelmente por alteração do sítio alvo.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

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

APRD – Arthropod Pesticide Resistance Database. 2014. Disponível em: <http://www.pesticideresistance.com/display.php?page=species&arId=571>, acessado em janeiro de 2014.

- Cao, G., Q. Lu, L. Zhang, F. Guo, G. Liang, K. Wu, K.A.G. Wyckhuys, Y. Guo. 2010.** Toxicity of chlorantraniliprole to Cry1Ac-susceptible and resistant strains of *Helicoverpa armigera*. Pestic. Biochem. Physiol. 98: 99–103.
- Castelo Branco, M. & A.G. Gatehouse. 2001.** A survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. Neotrop. Entomol. 30: 327-332.
- Castelo Branco, M. & M.A. Medeiros. 2001.** Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traças-das-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. Pesq. Agropec. Bras. 36: 7-13.
- Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.** Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. Hortic. Bras. 21: 549-552.
- Chen, Y.-B., J.-L. Li, X.-S. Shao, X.-Y. Xu & Z. Li. 2013.** Design, synthesis and insecticidal activity of novel anthranilic diamides with benzyl sulfide scaffold. Chin. Chem. Lett. 24: 673–676.
- Chevillon, C., D. Bourguet, F. Rousset, N. Pasteur & M. Raymond. 1997.** Pleiotropy of adaptative changes in populations: comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. Genet. Res. 70: 195–204.
- Dary, O., G.P. Georghiou, E. Parsons & N. Pasteur. 1990.** Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. J. Econ. Entomol. 83: 2187-2192.
- DuPont™ Coragen®. 2014.** Disponível em: <http://www2.dupont.com>, acessado em janeiro de 2014.
- Ferreira, S.W.J., R. Barros & J.B. Torres. 2003.** Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae), para regiões produtoras de crucíferas em Pernambuco. Neotrop. Entomol. 32: 407-411.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis, A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge, University Press, 333p.
- Furlong, M.J, D.J Wright & L.M. Dossall. 2013.** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. Annu. Rev. Entomol. 58: 517-541.
- Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319–323.
- Grzywacz, D., A. Rossbach, A. Rauf, D.A. Russell, R. Srinivasan & A.M. Shelton. 2010.** Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. Crop Prot. 29: 68-79.

- Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- IRAC - Insecticide Resistance Action Committee. 2014.** Disponível em: <http://www.irac-online.org/>, acessado em janeiro de 2014.
- Jiang, W.-H., W.-P. Lu, W.-C. Guo, Z.-H. Xia, W.-J. Fu & G.-Q. Li. 2012.** Chlorantraniliprole susceptibility in *Leptinotarsa decemlineata* in the North Xinjiang Uygur Autonomous Region in China. *J. Econ. Entomol.* 105: 549-554.
- Knight, A.L. & G.W. Norton. 1989.** Economics of agricultural pesticide resistance in arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 297-313.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- Lahm, G.P., T.M. Stevenson, T.P. Selby, J.H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C.A. Bellin, C.M. Dubas, B.K. Smith, K.A. Hughes, J.G. Hollingshaus, C.E. Clark & E.A. Benner. 2007.** Rynaxypyr: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274-6279.
- Lai, T., J. Li & J. Su. 2011.** Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101: 198-205.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA.
- Mohan, M., G.T. Gujar. 2003.** Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Prot.* 22: 495-504.
- Oliveira, A.C., H.A.A. Siqueira, J.V. Oliveira, J.E. Silva & M. Michereff Filho. 2011.** Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Sci. Agric.* 68: 154-159.
- Poelking, A. 1992.** Diamondback moth in the Philippines and its control with *Diadegma semiclausum*, p. 271-278. In N.S Talekar (ed.), Diamondback moth and other crucifer pests. Proceedings of the Second International Workshop. AVRDC, Taiwan, 603 p.
- Pu, X., Y. Yang, S. Wu & Y. Wu. 2010.** Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*. *Pest Manage. Sci.* 66: 371-378.
- Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2012.** Immunological response of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Colomb. Entomol.* 38: 208-214.

- 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.* Boca Raton, CRC Press, 224p.
- Rose, R.L. & W.A. Brindley. 1985.** An evaluation of the role of oxidative enzymes in Colorado potato beetle resistance to carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23: 74-84.
- Santos, V.C., H.A.A. Siqueira, J.E. Silva & M.J.D.C. Farias. 2011.** Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the State of Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 40: 264-270.
- SAS Institute 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- Selby, T.P., G.P. Lahm, T.M. Stevenson, K.A. Hughes, D. Cordova, I.B. Annan, J.D. Barry, E.A. Benner, M.J. Currie & T.F. Pahutski. 2013.** Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 6341–6345.
- Shelton, A.M., 2007.** Considerations on the use of transgenic crops for insect control. *J. Dev. Stud.* 43: 890–900.
- Shen, J.L & Y.D Wu. 1995.** *Insecticide Resistance in Cotton Bollworm and its Management.* Beijing, China Agriculture Press, pp. 193–200.
- Sial, A. A., J.F. Brunner & S.F. Garczynski. 2011.** Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 274–279.
- Silva, 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.
- 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.
- Su, J., T. Lai & J. Li. 2012.** Susceptibility of field populations of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in China to chlorantraniliprole and the activities of detoxification enzymes. *Crop Prot.* 42: 217-222.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.

- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Teixeira, L.A. & J.T. Andalaro. 2013.** Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106: 76–78.
- Torres, A.L., A.L. Boiça Júnior, C.A.M. Medeiros & R. Barros. 2006.** Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- Trocza, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G. Emyr 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.
- Ulmer, B., C. Gillott, D. Woods & M. Erlandson. 2002.** Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. *Crop Prot.* 21: 327-331.
- Wang, X. & Y. Wu. 2012.** High Levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. *J. Econ. Entomol.* 105: 1019-1023.
- Wang, X., S.K. Khakame, C. Ye, Y. Yang & Y. Wu. 2012.** Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manage. Sci.* 69: 661-665.
- Wang, X., X. Li, A. Shen & Y. Wu. 2010.** Baseline susceptibility of Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. *J. Econ. Entomol.* 103: 843-848.
- Wright, D. 2004.** Biological control of DBM: a global perspective, p. 9-14. In D. Bordat & A.A Kirk (Eds.), *Improving biocontrol of Plutella xylostella*. Montpellier, Proceedings of the International Symposium in Montpellier, France, 21–24 Oct 2002.
- Zhao, J.Z., H.L. Collins, Y.X. Li, R.F.L. Mau, G.D. Thompson, M. Hertlein, J.T. Andalaro, R. Boykin & A.M. Shelton. 2006.** Monitoring diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. *J. Econ. Entomol.* 99: 176-181.
- Zhao, J.Z., Y.X. Li, H.L. Collins, L. Gusukuma-Minuto, R.F.L. Mau, G.D. Thompson & A.M. Shelton. 2002.** Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.* 95: 430-436.

Tabela 1. Suscetibilidade de populações de *P. xylostella* coletadas em campo ao inseticida clorantraniliprole.

População	N ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	Inclinação ± EP ⁽³⁾	CL ₅₀ (CI95%) mg/L	CL ₈₀ (IC95%) mg/L	χ^2 ⁽⁴⁾	RR ₅₀ (IC95%) ⁽⁵⁾
Recife	400	7	2,32 ± 0,22	0,005 (0,004 – 0,007)	0,013 (0,009 – 0,019)	10,30	-----
Boas Novas II	184	7	2,01 ± 0,32	43,28 (29,68 – 59,18)	113,51 (81,53 – 183,34)	4,80	7.492 (5.106 – 10.992) *
Chã Grande	296	6	3,27 ± 0,39	77,21 (63,59 – 93,60)	139,51 (113,42 – 183,61)	1,15	13.365 (10.200 – 17.511) *
Sapucarana	458	7	2,40 ± 0,20	89,55 (75,30 – 105,89)	200,24 (165,82 – 252,00)	6,55	15.507(12.002 – 20.036) *
Camocim I	399	6	3,12 ± 0,30	112,45 (96,36 – 130,90)	208,93 (176,24– 259,02)	5,35	19.474 (15.249 – 24.868)*
Boas Novas I	458	7	2,16 ± 0,17	115,25 (96,26 – 137,81)	282,45 (229,70 – 363,78)	5,70	19.944 (15.339 – 25.931) *
Jupi	269	7	2,12 ± 0,22	123,92 (96,97 – 157,31)	309,13 (237,43 – 433,19)	4,41	21.440 (15.763 – 29.162) *
Camocim II	249	7	3,39 ± 0,42	149,07 (113,42 – 197,69)	263,65 (198,68– 409,98)	9,20	25.798 (19.677 – 33.822) *
Bezerros	406	7	2,68 ± 0,24	162,57 (137,32 – 193,41)	334,60 (274,20 – 403,45)	2,61	28.125 (21.761 – 36.350) *

¹Número total de insetos utilizados

²Grau de liberdade.

³Erro padrão.

⁴Teste de qui-quadrado ($P > 0,05$).

⁵Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do “teste de razão letal” (Robertson *et al.* 2007) e intervalo de confiança a 95% das estimativas da CL₅₀.

* Razão de resistência significativa para clorantraniliprole, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 2. Suscetibilidade de populações de *P. xylostella* coletadas em campo ao inseticida ciantraniliprole.

População	N ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	Inclinação ± EP ⁽³⁾	CL ₅₀ (IC95%) mg/L	CL ₈₀ (IC95%) mg/L	χ ²⁽⁴⁾	RR ₅₀ (IC95%) ⁽⁵⁾
Recife	414	6	4,47 ± 0,61	0,029 (0,025 – 0,034)	0,045 (0,038 – 0,058)	5,89	----
Bezerros	263	6	0,62 ± 0,09	0,43 (0,14 – 0,92)	9,65 (4,96 – 23,18)	3,60	12,63 (5,09 – 31,34) *
Boas Novas II	268	6	0,73 ± 0,09	0,55 (0,25 – 1,00)	7,68 (4,27 – 16,53)	2,57	16,22 (8,13 – 32,34) *
Boas Novas I	190	6	1,04 ± 0,14	1,35 (0,73 – 2,23)	8,68 (5,13 – 17,49)	4,12	39,24 (22,21 – 69,33) *
Sapucarana	370	5	0,62 ± 0,08	10,61 (5,81 – 18,82)	235,86 (107,91 – 771,17)	4,17	308 (169 – 561) *
Camocim II	162	5	1,56 ± 0,21	33,11 (20,88 – 56,50)	114,60 (65,25 – 313,36)	5,28	962 (654 – 1413) *
Chã Grande	425	7	2,57 ± 0,22	36,99 (31,22 – 43,97)	78,64 (64,52 – 100,58)	4,74	1.075 (850 – 1359) *
Camocim I	302	5	2,27 ± 0,22	63,98 (43,77 – 91,84)	149,77 (102,99 – 268,95)	9,66	1.943 (1433 – 2634) *
Jupi	323	7	2,96 ± 0,33	69,69 (55,44 – 87,47)	134,1 (105,10 – 188,16)	7,11	2.024 (1587 – 2583) *

¹Número total de insetos utilizados

²Grau de liberdade.

³Erro padrão.

⁴Teste de qui-quadrado (P > 0,05).

⁵Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do “teste de razão letal” (Robertson *et al.* 2007) e intervalo de confiança a 95% das estimativas da CL₅₀.

* Razão de resistência significativa para ciantraniliprole, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 3. Médias da atividade de enzimas destoxicativas de larvas de terceiro instar de *P. xylostella*.

População	Atividade enzimática			
	α -EST mmol/min/ μ g	GST μ mol/min/mg	MFO (N-desmetilação) nmoles/min/mg	MFO (O-desmetilação) nmoles/min/mg
Recife	2,56 \pm 0,21 bc	10,85 \pm 0,63 c	41,16 \pm 1,02 d	28,20 \pm 4,25 a
Boas Novas II	3,62 \pm 0,43 ab	23,89 \pm 2,70 b	39,24 \pm 0,55 d	1,13 \pm 0,26 c
Chã-grande	3,19 \pm 0,30 ab	16,17 \pm 1,38 bc	72,71 \pm 1,72 a	4,73 \pm 0,40 c
Sapucarana	0,23 \pm 0,02 d	35,46 \pm 2,28 a	37,56 \pm 2,06 d	5,67 \pm 1,76 c
Camocim I	0,26 \pm 0,03 d	39,80 \pm 1,63 a	66,39 \pm 5,30 ab	17,80 \pm 2,59 ab
Boas Novas I	3,65 \pm 0,29 ab	22,21 \pm 4,21 b	47,13 \pm 1,70 cd	12,52 \pm 1,73 bc
Jupi	1,67 \pm 0,19 c	18,07 \pm 1,13 bc	18,60 \pm 0,86 e	12,95 \pm 3,99 bc
Camocim II	4,00 \pm 0,34 a	15,03 \pm 2,72 bc	39,78 \pm 1,40 d	9,75 \pm 0,89 bc
Bezerros	0,26 \pm 0,02 d	20,85 \pm 1,94 bc	55,03 \pm 5,79 bc	8,79 \pm 1,92 bc

*Médias seguidas de mesma letra dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

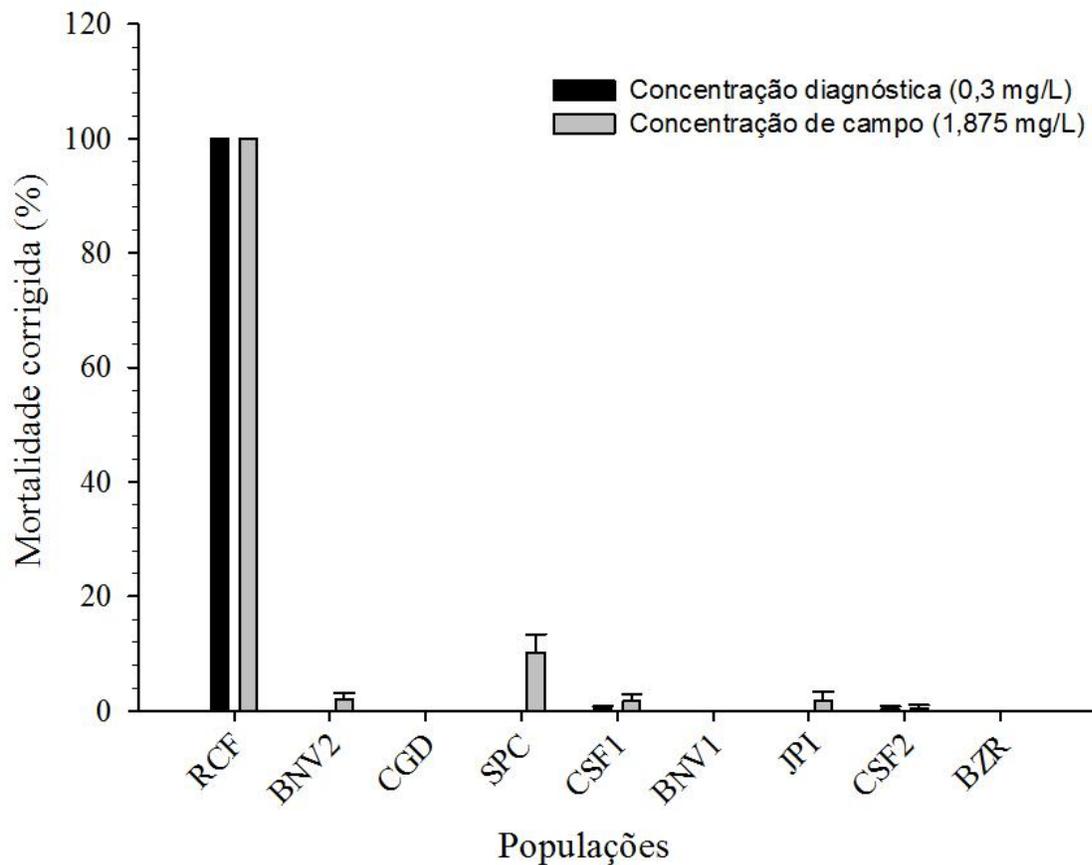


Figura 1. Mortalidade corrigida (média \pm EP) de larvas de segundo instar de *P. xylostella* oriundas das populações de laboratório e de campo, submetidas às concentrações diagnóstica e de campo de clorantraniliprole. RCF: Recife, BNV2: Boas Novas II, CGD: Chã-grande, SPC: Sapucarana, CSF1: Camocim I, BNV1: Boas Novas I, JPI: Jupi, CSF: Camocim II e BZR: Bezerros.

CAPÍTULO 4

CUSTO ENERGÉTICO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) A CLORANTRANILIPROLE

LÍLIAN M.S. RIBEIRO¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ANDRESA C.B. OLIVEIRA¹, GLAUCILANE
S. CRUZ¹, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA² E HERBERT A. A. SIQUEIRA¹

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.

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

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

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

Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, A.C.B. Oliveira, G.S. Cruz, A.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. Custo energético associado à resistência de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a clorantraniliprole. A ser submetido ao Bulletin of Insectology.

RESUMO – Custos adaptativos associados à resistência ao inseticida clorantraniliprole foram recentemente relatados em *Plutella xylostella* (L.) e incluem menor peso larval, maior período de pupa e menor fecundidade na ausência do inseticida. Acredita-se que efeitos negativos sobre a biologia de insetos resistentes são consequências de alterações fisiológicas decorrentes da realocação de recursos para manter o mecanismo de resistência. Para dar suporte a esta hipótese, avaliou-se a quantidade de nutrientes de *P. xylostella* suscetível e resistente a clorantraniliprole em diferentes fases de desenvolvimento. Curvas de concentração-resposta foram estabelecidas para confirmar a resistência. Para a extração e quantificação de glicose, glicogênio, lipídios e proteínas foram coletados ovos e pupas com no máximo 24 horas de idade, larvas alimentadas com seis dias de idade, machos e fêmeas recém-emergidos. Os ovos de indivíduos resistentes apresentaram maior quantidade de proteínas, enquanto que pupas e fêmeas maior quantidade de lipídios. Os insetos resistentes exibiram menor quantidade de glicogênio e proteínas na fase larval, enquanto as pupas apresentaram menor quantidade de glicose e glicogênio. Os adultos apresentaram menos glicose e proteínas, enquanto, apenas nas fêmeas a quantidade de glicogênio foi inferior. A resistência de *P. xylostella* a clorantraniliprole está associada a um custo energético que poderia justificar os custos adaptativos anteriormente relatados. A presença de características favoráveis representadas pela maior quantidade de proteínas nos ovos e de lipídios nas pupas e fêmeas adultas resistentes podem compensar os prejuízos fisiológicos decorrentes da menor quantidade de carboidratos e proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-brássicas, reserva de energia, lipídios, proteínas, custo energético, clorantraniliprole

ENERGETIC COST ASSOCIATED WITH RESISTANCE OF *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) TO CLORANTRANILIPROLE

ABSTRACT – Fitness costs associated with insecticide resistance clorantraniliprole were recently reported in *Plutella xylostella* (L.) and include lower larval weight, pupal period of higher and lower fertility in the absence of insecticide. It is believed that negative effects on the biology of resistant insects are consequences of physiological changes resulting from the reallocation of resources to maintain the resistance mechanism. To support this hypothesis, we evaluated the amount of nutrients in *P. xylostella* susceptible and resistant at clorantraniliprole in different stages of development. Concentration-response curves were established to confirm resistance. For extraction and quantification of glucose, glycogen, lipids and proteins were collected eggs and pupae with a maximum of 24 hours, larvae fed with six days old and newly emerged males and females. Resistant insects exhibited smaller amount of glycogen and protein in the larval stage, less glucose and glycogen when pupa. Adults showed less glucose and protein, but females also had lower amount of glycogen. The eggs of resistant individuals showed a higher amount of protein, while pupae and females larger amount of lipids. The resistance of *P. xylostella* clorantraniliprole is associated with a energetic cost that could justify the previously reported fitness costs. The presence of favorable characteristics like largest amount of proteins and lipids present in resistant eggs, pupae and adult females can compensate the physiological damage arising from the lower amount of carbohydrates and proteins.

KEY WORDS: Diamondback moth, energetic reserve, lipids, proteins, energetic cost, clorantraniliprole

Introdução

A resistência a inseticidas é um fenômeno genético resultante do surgimento de mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou seu metabolismo (Li *et al.* 2007). Os indivíduos com mutações vantajosas, que conferem resistência, possuem maior probabilidade de sobrevivência e reprodução mediante exposição a inseticidas, contribuindo com uma progênie maior que indivíduos suscetíveis. Isto resulta no aumento da frequência do gene que confere resistência nas gerações seguintes (Beatty & Marquardt 1996). No entanto, na ausência de pressão de seleção exercida pelo inseticida, os indivíduos resistentes, frequentemente, são menos aptos que os indivíduos suscetíveis porque a evolução para a resistência muitas vezes está associada a custos adaptativos (Furlong *et al.* 2013).

Os custos adaptativos parecem ser decorrentes de efeitos pleiotrópicos dos genes que conferem a resistência ou de genes intimamente ligados a estes e incluem uma série de características negativas como redução de sobrevivência, longevidade, fecundidade e maior vulnerabilidade a inimigos naturais (Boivin *et al.* 2001, Foster *et al.* 2007, Djogbenou *et al.* 2010). Acredita-se que estes e outros custos associados à resistência na ausência de inseticidas podem ser decorrentes da realocação de recursos para manter o mecanismo de resistência, acarretando mudanças no metabolismo e no desenvolvimento (Crow 1956).

É particularmente aceito que a produção de elevada quantidade de enzimas para destoxificar inseticidas em insetos resistentes, às vezes muito superior ao normal (até 50 vezes), esgota as reservas energéticas dos insetos, reduzindo a energia disponível para outras funções biológicas e gerando um “trade-off” energético entre a resistência e as características biológicas do inseto (Roush & McKenzie 1987, Raymond *et al.* 2001). No entanto, evidências para essa realocação são insuficientes porque estudos buscando relações entre a resistência a inseticidas, custos

adaptativos e custos energéticos não têm sido realizados em várias espécies pragas (Castañeda *et al.* 2011).

Recentemente surgiram os primeiros relatos de resistência de *Plutella xylostella* (L.), principal praga de brássicas no mundo, ao inseticida clorraniliprole (Wang & Wu 2012, Wang *et al.* 2012, Ribeiro *et al.* 2014), produto pertencente a mais nova classe de químicos desenvolvida para o controle de Lepidoptera (Lahm *et al.* 2009). Embora incipientes, investigações sobre o mecanismo de resistência têm apontado para o envolvimento de alteração no sítio alvo como principal mecanismo e a participação em pequeno grau de enzimas destoxicativas (Troczka *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012). Posteriormente estudo visando detectar efeitos negativos associados à resistência a esta nova molécula mostrou a existência de custos adaptativos, evidenciados pelo menor peso larval, maior período de pupa e menor fecundidade de insetos resistentes em relação aos suscetíveis na ausência do inseticida, sendo também inferior o peso das pupas quando as larvas foram anteriormente expostas a concentrações subletais do produto (Ribeiro *et al.* 2014).

Diante dos fatos é provável que exista custo energético associado à resistência a clorraniliprole e para dar suporte a esta hipótese esta pesquisa objetivou quantificar parâmetros bioquímicos como glicose, glicogênio, lipídio e proteína de ovos, larvas, pupas e adultos de *P. xylostella* suscetível e resistente a clorraniliprole.

Material e Métodos

Criação dos insetos. Foram utilizadas duas populações de *P. xylostella*. Uma população padrão de suscetibilidade mantida em laboratório desde 1998, sem contato com inseticidas e outra coletada em outubro de 2013 no município de Jupi – PE em área de cultivo de *Brassica* spp. com relato de falha no controle por inseticidas à base de diamidas. As duas populações foram mantidas individualmente no Laboratório de Interações Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da

Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), alimentadas com folhas de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* sem contato com inseticidas. Os insetos coletados em Jupi – PE foram multiplicados e utilizados na F-1 para realização de todos os ensaios.

Bioensaios de suscetibilidade. Curvas de concentração-resposta foram estabelecidas para o inseticida clorantraniliprole (Premio[®], concentrado solúvel a 20%, DuPont Brasil Ltda) com as duas populações através de bioensaios para avaliar o nível de suscetibilidade. Foram utilizadas sete concentrações de cada inseticida diluído em água destilada contendo espalhante adesivo Triton X-100 a 0,01%, sendo cada concentração testada em triplicata. A testemunha constou de folhas tratadas em água destilada com Triton X-100 na mesma concentração. Os ensaios foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h onde permaneceram por 72 h. Após este intervalo de tempo a mortalidade foi avaliada e os dados submetidos a uma análise de Probit (Finney 1971) utilizando o programa POLO-Plus (LeOra-Software 2005). A razão de resistência e o seu intervalo de confiança a 95 % foram calculados de acordo com o método descrito por Robertson *et al.* (2007).

Extração de glicose, glicogênio, lipídio e proteína. A extração das amostras e a quantificação dos nutrientes foram conduzidas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Os procedimentos realizados tanto para extração quanto para quantificação de glicose, glicogênio e lipídio seguiram metodologia adaptada de Van Handel (1985a, 1985b), Van Handel & Day (1988) e Kaufmann & Brown (2008). Para a extração foram utilizados 50 ovos com até 24 h após a postura, cinco larvas com seis dias de idade alimentadas com folhas de couve, uma pupa recém-formada, um macho e uma fêmea de *P. xylostella* com no máximo 24 h de emergidos e não alimentados. Para cada fase de desenvolvimento foram utilizadas 10 repetições. Inicialmente os insetos foram transferidos para tubos de microcentrifuga

e macerados em 200 μL de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 2%. Em seguida foram adicionados 800 μL de solução clorofórmio/metanol (1:1) e as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 3.000 rpm. O precipitado resultante foi estocado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise de glicogênio enquanto que o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em cada tubo foram adicionados 600 μL de água destilada e o material foi novamente centrifugado por 2 minutos a 3.000 rpm. Após a centrifugação, a fase superior contendo glicose foi separada da fase inferior contendo os lipídios e ambas foram estocadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Para análise de proteína foram utilizados 30 ovos, uma larva com 6 dias alimentada com couve, uma pupa, uma fêmea e um macho com no máximo 24 h de idade não alimentados, sendo 10 repetições para cada fase. Os materiais foram macerados em tubos de microcentrifuga em 50 μL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) e o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante resultante de cada amostra foi transferido para um novo tubo e estocado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até a realização das análises.

Quantificação de glicose e glicogênio. As amostras contendo a glicose extraída foram transferidas individualmente para tubos de vidro de centrífuga graduados de 13 mL de capacidade e mantidas em banho-maria a $100\text{ }^\circ\text{C}$ para evaporação do solvente até o volume de 200 μL . Em seguida as amostras foram avolumadas para 5 mL com antrona, agitadas em vórtex para homogeneização e novamente colocadas em banho-maria por 17 minutos. Para a quantificação de glicogênio as amostras anteriormente coletadas foram transferidas para tubos de centrífuga e imediatamente avolumadas para 5 mL com antrona, agitadas em vórtex e aquecidas da mesma forma por igual período. Por fim o material foi resfriado e a absorbância aferida em espectrofotômetro a 625 nm. As concentrações de glicose e glicogênio foram estimadas a partir de curva padrão estabelecida com glicose anidra em água deionizada.

Quantificação de lipídio. As amostras de lipídio foram transferidas individualmente para tubos de centrífuga de vidro e levadas ao banho-maria a $100\text{ }^\circ\text{C}$ até a completa evaporação do solvente.

Após a evaporação, foram adicionados em cada tubo 200 µL de ácido sulfúrico P.A. seguindo-se com o aquecimento em banho-maria por 10 minutos a 100 °C. Após este período o conteúdo de cada tubo foi avolumado para 5 mL com o reagente vanilina e o material foi resfriado e homogeneizado em vórtex. Em seguida foi medida a absorvância em espectrofotômetro a 625 nm. A concentração de lipídio foi estimada a partir de curva padrão estabelecida com óleo de soja comercial em clorofórmio.

Quantificação de proteína. A concentração de proteína total das amostras foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Smith 1985) usando um kit de análise de proteínas (Pierce Co.). Em uma placa de microtitulação foram adicionados 10 µL de cada amostra em triplicata, em seguida foram acrescentados em cada poço 200 µL de ácido bicinconínico (BCA) e a placa foi incubada à 37°C por 30 minutos. Após este intervalo a absorvância foi medida usando-se leitora de placa (Biotek®) com filtro de 562 nm. As concentrações de proteína foram estimadas a partir de curva padrão estabelecida usando albumina de soro bovino (BSA).

Análises estatísticas. As médias das dosagens de glicose, glicogênio, lipídio e proteína das populações suscetível e resistente foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade, sendo os dados de glicose das pupas e dos adultos e de glicogênio dos ovos, das pupas e das fêmeas adultas transformados em $\log(x + 1)$ e de proteína dos ovos em $\text{SEN}(x)$ para assumir normalidade. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados

Bioensaios de suscetibilidade. A população de campo foi altamente resistente a clorantraniliprole apresentando CL_{50} de 107,72 mg/L, valor bastante superior ao encontrado para a população de laboratório de apenas 0,005 mg/L. Pelo cálculo da razão de resistência a população de Jupi - PE foi 18.635 vezes mais resistente que a população de Recife – PE (Tabela 1).

Quantificação de glicose, glicogênio e lipídio. A quantidade de glicose não diferiu entre as populações nas fases de ovo ($F = 1,13$, $P = 0,6270$) e larva ($F = 4,26$, $P = 0,6690$), enquanto que foi significativamente maior nos insetos suscetíveis quando na fase de pupa ($F = 6,75$, $P = 0,0013$) e na fase adulta (macho: $F = 2,37$, $P < 0,0001$; fêmea: $F = 3,88$, $P < 0,0001$) (Tabela 2). Com relação à quantidade de glicogênio não foram detectadas diferenças entre as populações nos ovos ($F = 2,59$, $P = 0,1655$) e nos machos ($F = 1,08$, $P = 0,0946$). No entanto, a quantidade desta reserva foi consideravelmente maior nas larvas ($F = 1,22$, $P = 0,0347$), nas pupas ($F = 3,86$, $P < 0,0001$) e nas fêmeas ($F = 1,92$, $P < 0,0001$) suscetíveis que nas resistentes (Tabela 2). Já a quantidade de lipídio foi significativamente maior nas pupas ($F = 1,53$, $P = 0,0011$) e fêmeas ($F = 2,28$, $P = 0,0081$) resistentes, não diferindo entre insetos suscetíveis e resistentes nos ovos ($F = 3,01$, $P = 0,3607$), nas larvas ($F = 2,74$, $P = 0,1593$) e nos machos ($F = 2,70$, $P = 0,1272$) (Tabela 2).

Quantificação de proteína. A quantidade de proteína não diferiu entre as populações na fase de pupa ($F = 1,68$, $P = 0,5376$), sendo significativamente maior nos ovos da população resistente ($F = 1,11$, $P = 0,0048$), enquanto que na fase larval ($F = 2,61$, $P = 0,0002$), nos machos ($F = 7,41$, $P = 0,0001$) e nas fêmeas ($F = 1,75$, $P < 0,0001$) foi superior nos insetos suscetíveis (Tabela 2).

Discussão

As análises bioquímicas de *P. xylostella* resistente ao inseticida clorantraniliprole evidenciaram a existência de custo energético associado à resistência. Em relação aos suscetíveis, os insetos resistentes exibiram menor quantidade de glicogênio e proteínas na fase larval, menos glicose e glicogênio quando pupa, enquanto que os adultos apresentaram menos glicose e proteínas, sendo também inferior na fêmea a quantidade de glicogênio. Resultados semelhantes

envolvendo redução de fontes energéticas foram recentemente relatados em mosquitos do gênero *Culex*, mostrando a menor quantidade de glicogênio, açúcar e lipídios em indivíduos resistentes cujo mecanismo de resistência estava associado à atuação de enzimas detoxificativas (Hardstone *et al.* 2010, Rivero *et al.* 2011).

Os carboidratos, lipídios e proteínas são as principais moléculas estocadas para serem usadas como fonte de energia para as atividades dos insetos (Van der Horst *et al.* 1997) e o nível das reservas de nutrientes acumulados modulam vários aspectos importantes da vida destes como, por exemplo, a taxa de crescimento, o momento da metamorfose, e desenvolvimento do ovo (Mirth & Riddiford 2007). A reduzida quantidade de carboidratos e proteínas encontrada nos indivíduos resistentes poderia justificar o menor peso larval, maior período de pupa e larva e a reduzida fecundidade anteriormente observados em *P. xylostella* resistente a clorantraniliprole (Ribeiro *et al.* 2014).

O glicogênio e a trealose são as reservas mais importantes de carboidratos nos insetos podendo ser facilmente convertidas em glicose que então é oxidada para fornecer energia e são sintetizadas quando o consumo de carboidrato é superior à necessidade imediata. Constituem uma fonte de energia para os músculos do vôo (Klowden 2007), para a metamorfose (Wheeler & Buck 1992, Odell 1998, Reim *et al.* 2009), para a muda, para oogênese e para as funções normais do corpo (Beenackers *et al.* 1981). Desta forma os níveis energéticos de larvas e adultos podem interferir na sobrevivência e nas reservas usadas no vôo, afetando o comportamento de cópula e de oviposição e a busca por hospedeiro (Hardstone *et al.* 2010). É também provável que a redução de recursos energéticos também possa interferir na capacidade de montar uma resposta imune, tornando os indivíduos resistentes menos imunocompetentes, já que a implementação de uma resposta imune parece ser custosa em termos de energia e nutrientes (Povey *et al.* 2009, Rivero *et al.* 2011).

Muitos insetos holometábolos, incluindo *P. xylostella* tem a necessidade particular de estocar proteínas, as quais são adquiridas ainda na fase larval devendo ser transferidas para os estágios pupal e adulto nos quais são essenciais para a metamorfose, desenvolvimento do adulto, reprodução e manutenção geral do corpo (Riddiford & Law 1983, Wheeler *et al.* 2000, Klowden 2007). As proteínas de estocagem são sintetizadas pelo corpo gorduroso e secretadas na hemolinfa onde a sua quantidade cresce acentuadamente durante o ultimo instar larval e então passa a diminuir por ser sequestrada pelo corpo gorduroso para poder ser transferidas para as fases subsequentes e constituem uma importante reserva de aminoácidos para os insetos (Riddiford & Law 1983, Kanost *et al.* 1990). Os aminoácidos entram na composição de proteínas estruturais do tegumento, na esclerotização cuticular, na neurotransmissão, na síntese de hormônios e de enzimas que participam de reações metabólicas, além de também servirem como substrato metabólico para obter energia para o vôo (Gade & Auerswald 2002, Klowden 2007). Assim, as menores quantidades de proteínas observadas nas larvas e adultos resistentes contribuem para os efeitos negativos observados sobre os parâmetros biológicos observados nestes insetos.

Ao contrário do observado em larvas e adultos, os ovos da população resistente apresentaram quantidade significativamente maior de proteínas que os ovos da população suscetível, o que representa uma vantagem diante dos indivíduos suscetíveis. Este achado pode estar relacionado à maior taxa de eclosão de larvas de *P. xylostella* resistentes a clorantraniliprole observado por Ribeiro *et al.* (2014), pois, durante a oogênese grandes quantidades nutrientes, dentre os quais proteínas, são acumulados no interior dos ovos, sendo fundamentais para a sobrevivência e crescimento do embrião (Sappington & Raikhel 1998).

Aparentemente, os indivíduos resistentes converteram de forma preferencial os carboidratos oriundos da dieta em lipídios ao invés de glicogênio, pois as pupas e fêmeas resistentes apresentaram maior quantidade de lipídios e menor quantidade de glicogênio que as suscetíveis.

Lipídios constituem uma importante fonte de energia metabólica que pode ser mobilizada a qualquer momento para satisfazer as necessidades energéticas do inseto, a quantidade superior observada nos insetos resistentes representa uma vantagem já que a sua oxidação rende mais que duas vezes mais energia que a oxidação de carboidratos, sendo este inclusive o motivo de serem considerados a maior reserva energética dos animais (Klowden 2007).

Duas populações de *Sitophilus zeamais* Mots. resistentes a piretróides, uma com e outra sem custo adaptativo associado à resistência, apresentaram maiores células de gordura que a suscetível, sugerindo que as populações resistentes tiveram as células do corpo gorduroso modificadas para favorecer maior estoque de reservas energéticas. Além disto, estas células também apresentaram mais proteínas e carboidratos que as células dos insetos suscetíveis. O maior estoque energético do corpo gorduroso, segundo os autores, forneceria maior capacidade de mobilização para suprir o requerimento energético necessário para manter o mecanismo de resistência ao inseticida funcional (Guedes *et al.* 2006), o que também poderia justificar a maior quantidade de lipídios da população de *P. xylostella* resistente a clorantraniliprole. Em estudo posterior envolvendo as mesmas populações de *S. zeamais* foi observada elevada atividade de lipase e trealase na população com custos adaptativos reforçando a hipótese de maior necessidade de mobilização de reservas energéticas para manter o mecanismo de resistência (Araújo *et al.* 2008).

Diante dos resultados, concluiu-se que a resistência de *P. xylostella* ao inseticida clorantraniliprole está associada a um custo energético, o qual poderia justificar os efeitos negativos sobre parâmetros biológicos deste inseto anteriormente relatados e que características favoráveis também estão presentes podendo em algum nível compensar os prejuízos fisiológicos decorrentes da menor quantidade de nutrientes observada nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

- Araújo, R.A., R.N.C. Guedes, M.G.A. Oliveira & G.H. Ferreira. 2008.** Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bull. Entomol. Res.* 98: 417–424.
- Beaty, B.J. & W.C. Marquardt. 1996.** The biology of disease vectors. Niwot, University Press of Colorado, 632p.
- Beenackers, A.M.T., D.J.V.D. Horst & W.J.A.V. Marrewijk. 1981.** Role of lipids in energy metabolism, pp. 53-100. In R.G.H. Downer (ed.), *Energy Metabolism in Insects*. New York, Plenum.
- Boivin, T., C. Chabert d'Hieres, J.C. Bouvier, D. Beslay, & B. Sauphanor. 2001.** Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 99: 381-386.
- Castañeda, L.E., K. Barrientos, P.A. Cortes, C.C. Figueroa, E. Fuentes-Contreras, M. Luna-Rudloff, A.X. Silva & L.D. Bacigalupe. 2011.** Evaluating reproductive fitness and metabolic costs for insecticide resistance in *Myzus persicae* from Chile. *Physiol. Entomol.* 36: 253–260.
- Crow, J.F. 1956.** Genetics of insect resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 1: 227-246.
- Djogbenou, L., V. Noel & P. Agnew. 2010.** Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar. J.* 9:12.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis, A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge, University Press, 333p.
- Foster, S.P., M. Tomiczek, R. Thompson, I. Denholm, G. Poppy, A.R. Kraaijeveld & W. Powell. 2007.** Behavioural side-effects of insecticide resistance in aphids increase their vulnerability to parasitoid attack. *Anim. Behav.* 74: 621-632.
- Furlong, M.J., D.J. Wright & L.M. Dossall. 2013.** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 517-541.

- Gade, G. & L. Auerswald. 2002.** Beetles' choice-proline for energy output: control by AKHs. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132:117–29.
- Guedes, R.N.C., E.E. Oliveira, N.M.P. Guedes, B. Ribeiro & J.E. Serrão. 2006.** Cost and mitigation of insecticide resistance in maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiol. Entomol.* 31: 30–38.
- Hardstone, M.C., X. Huang, L.C. Harrington & J.G. Scott. 2010.** Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 47: 188–198.
- Kanost, M.R, I.K Kawooya, J.H. Law, R.O. Ryan, M.E. Van Heusden & R. Ziegler. 1990.** Insect haemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22: 299–396.
- Kaufmann, C. & M.R. Brown. 2008.** Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.* 54:367–377.
- Klowden, M.J. 2007.** Physiological systems in insects. Burlington, Elsevier Inc., 688p.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127–4133.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA.
- Li, X., M.A. Schuler & M.R. Berenbaum. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 231–253.
- Mirth, C.K & L.M. Riddiford. 2007.** Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bio Essays* 29: 344–55.
- Odell, J.P. 1998.** Energetics of metamorphosis in two holometabolous insect species: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Exp. Zool.* 280: 344–353.
- Povey, S., S.C. Cotter, S.J. Simpson, K.P. Lee & K. Wilson. 2009.** Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? *J. Anim. Ecol.* 78: 437–446.
- Raymond, M., C. Berticat, M. Weill, N. Pasteur & C. Chevillon. 2001.** Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112: 287–296.
- Reim, C., C. Kaufmann & W.U. Blanckenhorn. 2009.** Size-dependent energetics of metamorphosis in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria*. *Evol. Ecol. Res.* 11: 1111–1130.

- 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.
- Riddiford, L.M. & J.H. Law. 1983.** Larval serum proteins of Lepidoptera, pp. 75-85, In K. Scheller (ed), *The larval serum proteins of insects*. Stuttgart, Thieme.
- Rivero, A., A. Magaud, A. Nicot & J. Vézilier. 2011.** Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 48: 694-700.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & N.E. Savin. 2007.** *Bioassays with Arthropods*. Boca Raton, CRC Press, 224p.
- Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Sappington, T.W. & A.S. Raikhel. 1998.** Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28: 277–300.
- SAS Institute. 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC computer program, version By SAS Institute.
- 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.
- Trocza, B., C.T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T.G. Emyr 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.
- Van der Horst, D.J., S.F. Vroemen & W.J.A. Van Marrewijk. 1997.** Metabolism of stored reserves in insect fat body: hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system. *Comp. Biochem. Phys. B* 117: 463–474.
- Van Handel, E. & J.F. Day. 1988.** Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4: 549-550.
- Van Handel, E. 1985a.** Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 299-304.
- Van Handel, E. 1985b.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302-304.

- Wang, X. & Y. Wu. 2012.** High Levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. J. Econ. Entomol. 105: 1019-1023.
- Wang, X., S.K. Khakame, C. Ye, Y. Yang & Y. Wu. 2012.** Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. Pest Manage. Sci. 69: 661-665.
- Wheeler, D.E. & N.A. Buck. 1992.** Protein, lipid and carbohydrate use during metamorphosis in the fire ant *Solenopsis xyloni*. Physiol. Entomol. 17: 397-403.
- Wheeler, D.E., I. Tuchinskaya & N.A. Buck. 2000.** Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg reproduction in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Insect Physiol. 46: 95 1-958.

Tabela 1. Suscetibilidade de *P. xylostella* coletada em campo ao inseticida clorantraniliprole.

População	N ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	Inclinação ± EP ⁽³⁾	CL ₅₀ (IC95%) mg/L ⁽⁴⁾	χ^2 ⁽⁵⁾	RR (IC95%) ⁽⁶⁾
Recife	400	7	2,32 ± 0,22	0,005 (0,004 – 0,007)	10,30	---
Jupi	532	7	2,55 ± 0,20	107,72 (92,84 – 125,01)	2,47	18.635 (14.624 – 23.747)

¹Número total de insetos utilizados

²Grau de liberdade.

³Erro padrão.

⁴Concentração letal em miligramas de ingrediente ativo por litro de água para 50% dos insetos com intervalo de confiança de 95%.

⁵Teste de qui-quadrado ($P > 0,05$).

⁶Razão de resistência: razão das estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada através do “teste de razão letal” (Robertson *et al.* 2007) e intervalo de confiança a 95% das estimativas da CL₅₀.

Tabela 2. Quantidade (média \pm EP) de glicose, glicogênio, lipídio e proteína em ovos, larvas, pupas e adultos macho e fêmea de *P. xylostella*.

Fase	Glicose (μg)		Glicogênio (μg)		Lipídio (μg)		Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
Ovo	2,76 \pm 0,449	3,08 \pm 0,477	20,08 \pm 2,621	15,70 \pm 1,244	179,66 \pm 7,188	166,16 \pm 12,468	1,36 \pm 0,038	1,91 \pm 0,018*
Larva	54,54 \pm 3,709	50,82 \pm 7,652	150,12 \pm 18,531*	86,96 \pm 20,507	384,41 \pm 20,149	327,16 \pm 33,381	7,07 \pm 0,308*	4,30 \pm 0,498
Pupa	64,04 \pm 5,780*	41,69 \pm 1,364	112,33 \pm 9,090*	64,32 \pm 2,862	386,33 \pm 28,489	561,66 \pm 35,207*	18,20 \pm 0,635	17,55 \pm 0,824
Macho	32,92 \pm 4,152*	6,97 \pm 1,142	23,21 \pm 2,471	17,16 \pm 2,378	204,00 \pm 17,713	258,50 \pm 29,121	4,32 \pm 0,298*	2,54 \pm 0,109
Fêmea	41,24 \pm 5,525*	11,96 \pm 0,957	90,81 \pm 13,663*	29,54 \pm 2,777	210,16 \pm 21,445	325,83 \pm 32,381*	6,21 \pm 0,166*	4,67 \pm 0,220

*Estatisticamente diferente entre as populações pelo teste t ($P < 0,05$).