

SUSCETIBILIDADE DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A
INSETICIDAS E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESPINETORAM

por

DANIEL LIMA PEREIRA

(Sob Orientação do Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

RESUMO

Diversos fatores contribuem para a evolução da resistência de um inseto-praga a determinado inseticida, incluindo a pressão de seleção devido ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas e o tipo de sistema de cultivo. Esses fatores têm gerado um aumento na frequência de populações resistentes, causando falhas de eficácia desses produtos no campo. *Liriomyza sativae*, conhecida como mosca minadora, praga-chave de diversas culturas, tem causado severos danos e perdas aos produtores. O método mais utilizado para o seu manejo é o controle químico. Devido as suas características biológicas e a ampla aplicação de inseticidas utilizados para minimizar altas infestações deste díptero, falhas de controle estão ocorrendo. Inseticidas de diferentes modos de ação como o ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram possuem registro para *L. sativae* e são aplicados de forma exacerbada. Informações sobre a suscetibilidade e as bases da resistência de *L. sativae* ainda são escassas e estas auxiliariam para melhor manejar esse inseto-praga. Assim, este trabalho tem como objetivo o monitoramento e caracterização da resistência de *L. sativae* aos principais inseticidas utilizados no campo para o seu controle, utilizando a metodologia de bioensaios com concentração diagnóstica, concentração recomendada de rótulo e curva concentração-resposta em bandejas *bioassay tray* com avaliação da mortalidade em 72 h. Populações de diferentes regiões do Brasil foram coletadas para este estudo. As moléculas utilizadas

no monitoramento se apresentaram moderadamente efetivas em relação as concentrações diagnósticas e recomendadas de bula de cada inseticida, indicando evolução de resistência, por permitir sobrevivência de indivíduos, a qual variou de 97 a 10%, aproximadamente. As populações de Arapiraca e Inhuçu apresentaram os primeiros casos de resistência de campo ao espinetoram. Os valores das CL_{50} e razão de resistência (RR_{50}) para ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram variaram de 5,53 – 86,61 mg i. a./L (RR_{50} de 1,17 a 15,67 vezes), 0,12 – 0,91 mg i. a./L (RR_{50} de 2,22 a 7,45 vezes) e 0,03 – 44,16 mg i. a./L (RR_{50} de 3,47 a 1652,17 vezes), respectivamente. A população de MSR II foi selecionada com espinetoram pelo método de imersão de folhas e a seleção foi mantida em 180 mg i. a./L, apresentando uma CL_{50} de 88,25 mg i. a./L e uma RR_{50} de 4.219,80 vezes. A genética da resistência de *L. sativae* ao espinetoram foi autossômica, incompletamente recessiva e monofatorial. A concentração discriminatória que torna a resistência à espinetoram recessiva foi de 60 mg i. a./L e pode ser usada no monitoramento. Devido esta magnitude da resistência, verificou resistência cruzada com espinosade e resistência cruzada negativa com indoxacarbe, tiametoxan e cartape. Estes resultados contribuem para o manejo da resistência de *L. sativae* a inseticidas.

PALAVRAS-CHAVE: larva minadora, herdabilidade, herança, resistência cruzada, metabolismo

SUSCETIBILITY OF *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) TO
INSECTICIDES AND CHARACTERIZATION OF RESISTANCE TO SPINETORAM

by

DANIEL LIMA PEREIRA

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

ABSTRACT

Several factors contribute to the evolution of insect pest resistance to a given insecticide, including selection pressure due to the indiscriminate use of pesticides and the type of cropping system. These factors have generated an increase in the frequency of resistant populations, causing failures of efficacy of these products in the field. *Liriomyza sativae*, known as miner fly, a key pest of several crops, has caused severe damage and losses to producers. The most used method for its management is chemical control. Due to its biological characteristics and the wide application of insecticides used to minimize high infestations of this dipteran, reports of control failures are occurring. Insecticides of different modes of action such as cyromazine, cyantraniliprole and spinetoram have registration for *L. sativae* and are applied in an exacerbated way. Information on the susceptibility and the basis of resistance of *L. sativae* are still scarce and these would help to better manage this insect pest. Thus, this work aims to monitor and characterize the resistance of *L. sativae* to the main insecticides used in the field for its control, using the methodology of bioassays with diagnostic concentration, recommended label concentration and concentration-response curve in *bioassay trays* with evaluation of mortality in 72 h. Populations from different regions of Brazil were collected for this study. The molecules used in the monitoring were moderately effective in relation to the diagnostic and recommended label concentrations of each insecticide, indicating resistance evolution, by allowing survival of individuals, which ranged from 97 to 10%, approximately. The

populations of Arapiraca and Inhuçu presented the first cases of field resistance to spinetoram. The CL_{50} and resistance ratio (RR_{50}) values for cyromazine, cyantraniliprole and spinetoram ranged from 5.53 - 86.61 mg a. i./L (RR_{50} from 1.17 to 15.67 times), 0.12 - 0.91 mg i. a./L (RR_{50} from 2.22 to 7.45 times) and 0.03 - 44.16 mg a. i./L (RR_{50} from 3.47 to 1652.17 times), respectively. The MSR II population was selected with spinetoram using the leaf dip method and the selection was maintained at 180 mg a. i./L, showing a CL_{50} of 88.25 mg a. i./L and an RR_{50} of 4,219.80 times. The genetics of *L. sativae* resistance to spinetoram was autosomal, incompletely recessive and monofactorial. The discriminating concentration that makes resistance to spinetoram recessive was 60 mg a. i./L and can be used in monitoring. Due to this magnitude of resistance, cross-resistance with spinosad and negative cross-resistance with indoxacarb, thiamethoxan and cartape were verified. These results contribute to the management of *L. sativae* resistance to insecticides.

KEY WORDS: leafminer larva, heritability, inheritance, cross-resistance, metabolism

SUSCETIBILIDADE DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A
INSETICIDAS E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESPINETORAM

por

DANIEL LIMA PEREIRA

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

RECIFE - PE

Julho – 2023

111 SUSCETIBILIDADE DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A
112 INSETICIDAS E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESPINETORAM

113 por

114

115 DANIEL LIMA PEREIRA

116

117

118

119

120 **Comitê de Orientação:**

121 Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

122

SUSCETIBILIDADE DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A
INSETICIDAS E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESPINETORAM

por

DANIEL LIMA PEREIRA

Banca Examinadora:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Elton Lucio de Araujo – UFERSA

Eliseu José Guedes Pereira – UFV

Jefferson Elias da Silva – PNPd/UFS

Tadeu Barbosa Martins Silva – UESPI

Daniel Lima Pereira
Doutor em Entomologia

Prof. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira
– UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P436s

Pereira, Daniel Lima

SUSCETIBILIDADE DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A INSETICIDAS E
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESPINETORAM / Daniel Lima Pereira. - 2023.
94 f.

Orientador: Herbert Alvaro Abreu de Siqueira.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
Agrícola, Recife, 2023.

1. Larva minadora. 2. Herdabilidade. 3. Herança. 4. Resistência cruzada. 5. Metabolismo. I. Siqueira, Herbert
Alvaro Abreu de, orient. II. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

A **Deus**, a seu Filho **Jesus** e ao **Espírito Santo** por me dar força para seguir em frente e saúde para fazer completar este tremendo desafio em minha vida.

Agradeço

Aos meus QUERIDOS PAIS, **José Ferreira de Lima** (*in memorian*) e **Rute Soares Siqueira Lima**, **Rubinéia de Siqueira Lima** e **Josenilson Feliciano da Silva** pela criação, apoio e educação repassada. À minha ESPOSA **Maria Rosane Marques dos Santos** e ao meu QUERIDO FILHO **Álvaro Davi Santos Lima**, pelo apoio constante, afeto, amor e pelo grande incentivo, no qual foi e sempre será fundamental e primordial para a minha formação pessoal e profissional.

Dedico.

*Se o SENHOR não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam;
se o SENHOR não guardar a cidade, em vão vigia a sentinela.
Inútil vos será levantar-se de madrugada, repousar tarde, comer o pão de dores, pois assim dá ele aos seus amados o sono.
Eis que os filhos são herança do Senhor, e o fruto do ventre o seu galardão.
Como flechas na mão de um homem poderoso, assim são os filhos da mocidade.
Bem-aventurado o homem que enche deles a sua aljava; não serão confundidos, mas falarão com os seus inimigos à porta.*

Salmos 127:1-5

172

173

AGRADECIMENTOS

174 À Deus, Rei dos reis, pelas graças concedidas, pelas benções, pelas forças dada a mim e
175 minha família durante minha jornada e por permitir a conclusão e elaboração deste trabalho.

176 Aos meus pais, José Ferreira Lima (*in memorian*) e Rute Soares de Siqueira Lima, Rubineia
177 de Siqueira Lima e Josenilson Feliciano da Silva. Obrigado. Vocês são os melhores do mundo.

178 Aos meus tios/irmãos Ricardo Lima, Rubens Lima, Rubenice Lima e Júnior, aos meus
179 irmãos José Arnaldo, Raphaela, Rayane, Ranyeri e Rayza Izaura, aos meus sobrinhos, ao meu filho
180 Álvaro Davi Santos Lima e outras pessoas da minha família, pelo apoio, amor e estímulo durante
181 toda a minha vida e caminhada.

182 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo
183 desempenho de sua função e na fundamental expansão para a consolidação da pós-graduação no
184 Brasil e pela concessão da minha bolsa de estudo.

185 Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação
186 em Entomologia, por ter aberto as portas, aprendizado passado, amizades construídas e
187 oportunidades concedidas na realização do trabalho.

188 Ao meu amigo e professor, Doutor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, por toda orientação
189 com a qual dividiu seu vasto conhecimento, estímulos, críticas e sugestões apresentadas e realizadas
190 durante o trabalho.

191 Ao meu amigo e professor, Doutor Walter Santos Evangelista Júnior, pela amizade e pelos
192 conselhos passados, no qual contribuiu para a minha formação.

193 A toda a família Albino, Irmã Zuleide, Irmã Neide, Irmã Nane, Irmão Roberval (Vaval) e
194 ao Irmão Rivaldo (Valdinho), que acolheu a mim, minha esposa e meu filho, nos dando toda atenção
195 e apoio, carinho e bons conselhos, além de toda a amizade e amor.

196 Aos colegas Elisabete Albuquerque, Keyla Silva, Marcos de Oliveira, Vitor Quintela de
197 Sousa, Jéssika Silva de Lima, Gabriel Guimarães, Duílio Santana, Eduardo Silva, Hélio Siqueira,
198 Dayani Nascimento e Teófilo Paulo Langa, pela ajuda, pelo companheirismo, pelas conversas
199 alegres e agradáveis e apoio durante a manutenção das criações dos insetos, os experimentos e
200 avaliações.

201 Aos servidores e técnicos de laboratório da Pós-graduação em Fitopatologia, Adelmo
202 Adriane Duarte de Santana, Maurício Estolano Alves de Macêdo e Luíz Coelho da Silva, pela
203 especial contribuição e ajuda na manutenção das plantas de feijão de porco e esterilização do solo,
204 pelas alegres e agradáveis conversas e pela boa vontade.

205

206

207

208

209

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	8
2 MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE CAMPO DE <i>Liriomyza sativae</i> BLANCHARD (DIPTERA: AGROMIZYDAE) A INSETICIDAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	25
AGRADECIMENTOS.....	29
LITERATURA CITADA.....	30
3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA DA RESISTÊNCIA DE <i>Liriomyza sativae</i> BLANCHARD (DIPTERA: AGROMIZYDAE) AO ESPINETORAM	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47

234	RESULTADOS.....	56
235	DISCUSSÃO.....	60
236	AGRADECIMENTOS.....	64
237	LITERATURA CITADA.....	64
238	4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O gênero *Liriomyza*, dípteros da família Agromyzidae, possui mais de 370 espécies, dessas, apenas 23 espécies apresentam importância econômica e ocorrem em regiões tropicais (Spencer 1973, Parrella 1982, Parrella 1987, Murphy & Lasalle 1999). Os principais representantes destes minadores polípagos são *L. trifolii* (Burguess), *L. huidobrensis* (Blanchard) e *L. sativae* (Blanchard) que atacam diversas plantas como Cucurbitáceas, Leguminosas, Solanáceas, Asteráceas, Brássicas, Compositáceas e plantas frutíferas, causando danos e injúrias no Brasil e no mundo (Murphy & Lasalle 1999, EPPO 2023).

Acredita-se que a origem desse gênero de díptero ocorreu no Paleoceno através de informações levantadas a partir de icnofósseis na América do Norte, precisamente no Sudeste do Montana, Estados Unidos da América (Winkler *et al.* 2010). De acordo com EPPO (2023), a espécie *L. sativae* já se encontra distribuída em praticamente todo continente Africano, América do Norte, América Central e América do Sul, Ásia, Oceania e Europa. De acordo com Ferreira *et al.* (2017) a espécie *L. sativae* representa mais de 97% das populações de moscas minadoras do Brasil. Sua identificação taxonômica por meio de DNA barcoding é o mais assertivo para separar *L. sativae* de outras espécies crípticas em simpatria numa mesma área (Ferreira *et al.* 2017).

Os adultos de *L. sativae* são reconhecidos por possuírem coloração preta e o amarelo como cor predominante e asas hialinas (Parrella 1982, Guimarães *et al.* 2009, Gençer 2009, Costa-Lima *et al.* 2019), sendo considerados insetos minadores devido suas larvas formarem galerias no mesofilo foliar (Spencer 1973).

A oviposição desta espécie-praga é realizada endofiticamente nas duas camadas epidérmicas da folha, podendo ovipositar até 250 ovos/fêmeas em condições ótimas (Guimarães *et al.* 2009). Os ovos medem ~ 0,28 mm de comprimento x 0,15 mm de diâmetro, e são de coloração esbranquiçada ligeiramente translúcida, com desenvolvimento embrionário que dura entre quatro e cinco dias dependendo das condições de temperatura e umidade. As larvas são vermiformes, não apresentam distinção da cabeça e passam por três ínstares que se desenvolvem no mesofilo foliar formando galerias ao se alimentarem. Elas são ainda de coloração pálida nos primeiros ínstares e alcançam a coloração alaranjada no final do ciclo larval, atingindo cerca de 3 mm de comprimento. Ao completar o desenvolvimento larval, podem permanecer nas folhas ou até mesmo no solo para puparem e emergirem os adultos. Seu ciclo biológico pode durar entre 15 a 17 dias dependendo do hospedeiro (Lima *et al.* 2009, Araujo *et al.* 2013) com um número de gerações anuais de aproximadamente 25 gerações em uma faixa de temperatura de 30°C (Lima *et al.* 2009).

De acordo com Guimarães *et al.* (2009) os machos adultos possuem menor longevidade que as fêmeas, com as fêmeas vivendo em média por 19 dias e os machos por 16 dias e segundo Parrella (1987) esta longevidade decresce com temperaturas elevadas e aumenta com fornecimentos de alimentos à base de mel. O acasalamento ocorre logo após a emergência dos adultos e a qualquer momento do dia, porém com mais frequência durante a madrugada (Parrella 1987, Guimarães *et al.* 2009).

Estes aspectos bioecológicos, fizeram com que este inseto fosse considerado praga-chave, contribuindo para o aumento da densidade populacional e consequentemente acarretando sérios problemas econômicos (Brasil *et al.* 2007, Costa-Lima *et al.* 2015, Costa-Lima *et al.* 2019). Em cultivos de solanáceas já são relatados casos em que a aplicação de inseticidas tem eliminado os inimigos naturais e consequentemente facilitando o desenvolvimento da resistência devido as altas infestações (Van Lenteren & Woets 1988, Ferguson 2004, Bueno *et al.* 2007, Camargo 2011,

Araujo *et al.* 2012). Assim, sua capacidade de causar danos severos e de reduzir o rendimento das culturas vem se agravando a todo momento (Spencer 1973, Bueno *et al.* 2007).

A *L. sativae* possui vários hospedeiros (Winkler *et al.* 2010) e provoca injúrias diretas e indiretas ao se alimentar do mesofilo foliar, reduzindo a capacidade fotossintética, tamanho e o grau brix (teor de sólidos solúveis) dos frutos, depreciando a qualidade estética e o valor comercial, causando prejuízos financeiros aos produtores (Parrella 1987, Van Lenteren & Woets 1988, Araujo *et al.* 2007). Além disso, a alimentação realizada pelas fêmeas adultas através das puncturas com o aparelho ovipositor e pelas larvas provocam a entrada de fitopatógenos como *Alternaria* (Fr.) Keissl (Deadman *et al.* 2002). Com isso, *L. sativae* tem causado perdas de, aproximadamente, 40% de toda a produção de melão nos principais polos produtores do Brasil, como os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia. Porém, o cenário mais preocupante é no Rio Grande do Norte, onde a mosca minadora representa o principal entrave para os produtores de melão em todas as áreas de produção (Fernandes 2004, Araujo *et al.* 2007, Araujo *et al.* 2013). Os prejuízos das moscas minadoras também se estendem aos cultivos de plantas ornamentais como o crisântemo, calêndula e gérbera (Stegmaier 1966, Parrella 1987).

Para amenizar esses prejuízos causados pelas moscas minadoras, medidas de controle devem ser adotadas dentro do contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP) como o uso de plantas resistentes, controle cultural, controle biológico e controle químico (Guimarães *et al.* 2009, Nunes *et al.* 2013). Dentre todos os métodos existentes no MIP, o controle químico é o mais utilizado e está amplamente difundido por ter um efeito mais rápido sobre as larvas e adultos de *Liriomyza* spp. (Cox *et al.* 1995). Atualmente, no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) tem-se registrado e autorizado para o controle de *Liriomyza* spp., 10 produtos comerciais com ingredientes ativos que incluem os grupos das avermectinas (abamectina), análogos de nereistoxinas (cartape), piretroides (lambda-cialotrina e fenpropatrina), análogo de pirazol (clorfenapir), triazinamina (ciromazina),

diamida (ciantraniliprole) e espinosinas (espinosade e espinetoram) (Agrofit 2023). De acordo com Devkota *et al.* (2016) diferentes modos de ação são empregados para o controle desta praga em distintos estágios de seu desenvolvimento. Entre os mais utilizados atualmente no manejo de *Liriomyza* spp. estão a ciromazina, ciantraniliprole e o espinetoram.

A ciromazina, único representante do grupo 17 do Comitê de Ação à Resistência de Insetos (IRAC), é um desruptor da ecdise por afetar o balanço hormonal durante o processo da muda, desenvolvido em 1970, e é amplamente utilizado no controle de dípteros com relatos de resistência, porém sem alteração de sítio-alvo (Bell *et al.* 2010, Salgado 2013, IRAC 2023).

O ciantraniliprole, outro inseticida que demonstra bom potencial, é uma diamida antranílica de risco reduzido pertencente ao grupo 28 do IRAC e atua na ativação dos receptores de rianodina, canal de cálcio não controlado por voltagem, do retículo sarcoplasmático dos músculos dos insetos liberando cálcio desreguladamente e aumentando a contração muscular, causando letargia e morte do inseto. (Cordova *et al.* 2006, Lahm *et al.* 2009, IRAC 2023). De acordo com o APRD (2023) nenhum caso de resistência para *L. sativae* foi relatado para este inseticida.

E alternativamente, o espinetoram, composto de contato e ingestão e de risco reduzido, obtido a partir da fermentação da bactéria de solo, *Saccharopolyspora spinosa*, ainda considerado um exemplo de sucesso no controle de insetos (Kirst 2010, Hertlein *et al.* 2011). Seu modo de ação único ativa primariamente os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) mudando a conformação dos receptores e provocando a abertura dos canais iônicos e a condução do estímulo nervoso através da entrada extracelular de sódio (Na⁺) (Salgado 1998, Thompson *et al.* 2000, Salgado *et al.* 2010, Casida & Durkin 2013).

Estes inseticidas possuem potencial para integrar programas de MIP e são eficazes contra moscas minadoras, controlando-as também por ação translaminar, como é o caso do ciromazina e do ciantraniliprole (Weintraub 2001, Weintraub *et al.* 2017). No entanto, *L. sativae* tem alto

potencial de desenvolver resistência para estes inseticidas de forma rápida, pois, apesar de serem produtos caros, são aplicados com muita frequência.

Esse cenário favorece a evolução da resistência, pois além do clima tropical, o aumento do número de pulverizações, aumento da dose, utilização de misturas indevidas, substituição de um produto de baixa toxicidade por outro de maior toxicidade, a polifagia, alta fecundidade e dispersão (Georghiou & Taylor 1986), facilita o acasalamento de indivíduos resistentes de *L. sativae*. A resistência é caracterizada pela habilidade herdada que um organismo possui em tolerar doses de um produto químico que naturalmente seria letal para a maioria dos indivíduos da sua espécie (Croft & Van De Baan 1988, Georghiou & Taylor 1977). Segundo Roush & McKenzie (1987), a resistência de insetos a inseticidas trata-se de uma característica pré-adaptativa, afetada por fatores genéticos como alterações no genótipo do indivíduo e suas interações, fatores bioecológicos relacionados à praga alvo e fatores operacionais relativos à utilização do produto químico. O IRAC define resistência como uma alteração hereditária na sensibilidade de uma população de insetos que se reflete em falhas de controle repetidas de um produto na dose recomendada de bula (IRAC 2023).

Um mecanismo de resistência comum em insetos é a alteração de sítio alvo, no qual uma mudança na conformação de proteínas resulta na não ligação do inseticida ao local de ação. Outro mecanismo comum consiste na atividade aumentada ou modificada de enzimas destoxificativas, geralmente esterases, monooxigenases ou glutathione *S*-transferases, que impedem o inseticida de atingir seu alvo molecular (Carrière *et al.* 2012). De acordo com Georghiou & Taylor (1977) e Hemingway *et al.* (2004), o conhecimento desses mecanismos auxilia na rotação de produtos com modos de ação distintos que sozinhos ou em combinação podem conferir um amplo espectro de resistência. No entanto, insetos resistentes podem apresentar um único mecanismo de resistência que confere resistência a dois ou mais compostos químicos pertencentes ao mesmo grupo, caracterizando resistência cruzada, e/ou quando o inseto expressa pelo menos dois diferentes

mecanismos de resistência coexistentes que conferem resistência a dois ou mais compostos químicos pertencentes a grupos diferentes (Sawicki 1987). De acordo com Wen & Scott (1997) o tempo de uso de um inseticida novo pode ser limitado pela resistência cruzada com outras classes de inseticidas e se tornar um problema de grande magnitude. Assim, é importante estabelecer bases para o manejo da resistência através da análise das características genéticas, biológicas e operacionais para se controlar a dinâmica da resistência entre populações que se interrelacionam (Curtis *et al.* 1978).

Logo, a dinâmica populacional de insetos resistentes a inseticidas em uma determinada região ou área acarreta problemas de intoxicação, contaminação do meio ambiente bem como a elevação dos custos de produção (Guedes *et al.* 1994). Sendo assim, novas classes podem ser prejudicadas e extintas colocando em risco as futuras moléculas inseticidas a serem desenvolvidas, pois a cada ano casos de resistência a inseticidas surgem no mundo (Nauen *et al.* 2019).

Pesquisa sobre a resistência a inseticidas visam monitorar as alterações em populações de insetos quanto a sua suscetibilidade ao longo de gerações em ambientes de campo e em ambientes controlados, com o propósito de estudar e compreender a estabilidade e a dinâmica da resistência (Roush & McKenzie 1987). Neste sentido, o monitoramento da suscetibilidade ajuda a dimensionar estratégias de manejo para populações resistentes (Tabashnik 1989), permitindo detectar antecipadamente populações de insetos com frequências críticas de resistência para fortalecer a tomada de decisão para controlar e retardar a evolução da resistência (Roush & Miller 1986).

O padrão de herança genética possibilita determinar se a herança da resistência se constitui autossômica ou ligada ao sexo, dominante ou recessiva e monofatorial ou polifatorial (Ffrench-Constant & Roush 1990). Assim, outros estudos podem ser realizados através da pressão de seleção com determinado inseticida e ou relaxamento de populações resistentes, utilizando outros inseticidas de modos de ação diferentes para testar se há resistência cruzada entre os inseticidas

para serem implementados na rotação de produtos afim de implementar estratégias de Manejo de Resistência a Inseticidas (MRI) podendo estes fatores, favorecer ou não a evolução da resistência (Roush & Mckenzie 1987, Tabashnik 1989).

Considerando a capacidade de evolução de *L. sativae* à resistência e a escassez de informações relativas à resistência, levantamos a hipótese de que o uso indiscriminado destes inseticidas está aumentando a frequência de indivíduos resistentes e consequentemente causando falhas de controle no campo, contribuindo para evolução da resistência e diminuindo a eficácias dos inseticidas. No entanto, a detecção precoce de indivíduos resistentes em populações de *L. sativae* possibilitará um manejo adequado, assim, o monitoramento de populações de *L. sativae* foi realizado inicialmente com os inseticidas ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram. Porém, níveis de resistência foram encontrados para o princípio ativo espinetoram em trabalho realizado por Santos (2020). Portanto, diante do nível de resistência encontrado, a população MSR II (Mossoró II) foi selecionada para ser submetida a testes de caracterização genética e bioquímica. Pois, as hipóteses de que não possui ligação a sexo, presença de alelo recessivo, resistência monofatorial, o possível envolvimento do mecanismo metabólico e a resistência cruzada com esta espinosina, não são descartadas e podem surtirem grande importância na evolução da resistência em *L. sativae*.

Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo desvendar a dinâmica dos níveis de resistência em *L. sativae* aos principais princípios ativos utilizado para seu controle (ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram) através da determinação do atual *status* da suscetibilidade; herança genética para definir a ligação a sexo ou não (autossomal); herança genética poligênica ou monogênica; se os alelos dessa resistência são dominantes ou recessivos; determinação e quantificação de enzimas envolvidas na resistência e resistência cruzada de espinetoram com outros inseticidas comumente utilizados para seu controle. Estes dados darão suporte para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência de *L. sativae* a inseticidas.

Literatura Citada

- Agrofit. 2023.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit. Acesso em: 30 de março de 2023.
- APRD. 2023.** Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em: <https://www.pesticideresistance.org/>. Acesso em: 23 de maio de 2023.
- Araujo, E., D.R.R. Fernandes, L. Geremias, A. Menezes-Netto, & M. Filgueira. 2007.** Mosca minadora associada à cultura do meloeiro no Semiárido do Rio Grande do Norte. Rev. Caatinga 20: 210-212.
- Araujo, E.L., C.H.F. Nogueira, A.C. Menezes Netto, & C.E.S. Bezerra. 2013.** Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). Ciência Rural. 43: 579-582.
- Araujo, E.L., E.M. Costa, E.R. Moura Filho, C.H.F. Nogueira, & M.R.D. Santos. 2012.** Efeito de inseticidas sobre a mosca minadora (Diptera: Agromyzidae), quando aplicados durante a fase de ovo. Agropecuária Científica no Semiárido. 8: 18-22.
- Bell, H.A., K.A. Robinson, & R.J. Weaver. 2010.** First report of cyromazine resistance in a population of UK house fly (*Musca domestica*) associated with intensive livestock production. Pest Manag. Sci. 66: 693-695.
- Brasil, A.M.S., K.C. de Oliveira, P.L. de Araújo Neto, & I.A. Nascimento. 2007.** Representatividade do custo de controle da mosca minadora na produção de melão: um estudo de caso na empresa Santa Júlia Agro Comercial Exportadora de Frutas Tropicais Ltda. In Anais do Congresso Brasileiro de Custos-ABC.
- Bueno, A.F., B. Zechmann, W.W. Hoback, R.C.O.F. Bueno, & O.A. Fernandes. 2007.** Serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*) on potato (*Solanum tuberosum*): field observations and plant photosynthetic responses to injury. Ciência Rural 37: 1510-1517.
- Camargo, A. C. 2011.** Monitoramento e manejo de insetos pragas em cultivos de tomate para processamento industrial. Dissertação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 108 p.
- Carrière, Y., C. Ellers-Kirk, K. Hartfield, G. Larocque, B. Degain, P. Dutilleul, T.J. Dennehy, S.E. Marsh, D.W. Crowder, & X. Li. 2012.** Large-scale, spatially-explicit test of the refuge strategy for delaying insecticide resistance. Proc. Nat. Acad. Sci. 109: 775-780.
- Casida, J.E., & K.A. Durkin. 2013.** Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. An. Rev. Entomol. 58: 99-117.

- 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.
- Costa-Lima, T. C., A.C. SILVA, & J.R.P. Parra. 2015.** Moscas-minadoras do gênero *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae): aspectos taxonômicos e biologia. Embrapa Semiárido Documento 268: 36 p.
- Costa-Lima, T.C., M.C.M. Chagas, & J.R.P. Parra. 2019.** Comparing Potential as Biocontrol Agents of Two Neotropical Parasitoids of *Liriomyza sativae*. *J. Neotrop. Entomol.* 48: 660-667.
- Cox, D.L., D.M. Remick, J.A. Lasota, & R.A. Dybas. 1995.** Toxicity of avermectins to *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae and adults. *J. Econ. Entomol.* 88: 1415-1419.
- Croft, B.A., & H.E. Van De Baan. 1988.** Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Exp. Appl. Acarol.* 4: 277-300.
- Curtis, C.F., L.M. Cook, & R.J. Wood. 1978.** Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. *J. Ecol. Entomol.* 3: 273-287.
- Deadman, M., I. Khan, J. Thacker, & K. Al-Habsi. 2002.** Interactions between leafminer damage and leaf necrosis caused by *Alternaria alternata* on potato in the Sultanate of Oman. *J. Plant Pathol.* 18: 210-215.
- Devkota, S., D.R. Seal, O.E. Liburd, S. Ferguson, C.T. Waddill, & C.G. Martin. 2016.** Responses of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Chemical and Biorational Insecticides. *J. Florida Entomol.* 99: 616-623.
- EPPO. 2023.** European and Mediterranean Plant Protection Organization. Disponível em: www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/insects/LIRISA_ds.pdf. Acesso em: 17 de maio de 2023.
- Ferguson, J.S. 2004.** Development and Stability of Insecticide Resistance in the Leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Cyromazine, Abamectin, and Spinosad. *J. Econ. Entomol.* 97: 112-119, 118.
- Fernandes, O. 2004.** Melão: campo minado. Vol. 4. Revista Cultivar. pp. 26-27.
- Ferreira, E.C.B., M.T.S. Freitas, K.D.S. Sombra, H.A.A. Siqueira, E.L. Araujo, & V.Q. Balbino. 2017.** Molecular identification of *Liriomyza* sp. in the Northeast and Southeast regions of Brazil. *Rev. Caatinga* 30: 892-900.

- French-Constant, R.H., & R.T. Roush. 1990.** Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: Roush RT, Tabashnik BE (eds) Pesticide resistance in arthropods. Springer, Boston, pp 4–38.
- Gençer, L. 2009.** Contribution to the knowledge of the chalcid parasitoid complex (Hymenoptera: Chalcidoidea) of agromyzid leafminers (Diptera: Agromyzidae) from Turkey, with new hosts and records. J. Plant Prot. Res. 49: 158-161.
- Georghiou, G.P., & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319-323.
- Georghiou, G.P., & C.E. Taylor. 1986.** Factors influencing the evolution of resistance. In: National Research Council, Board on Agriculture, Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistant Pest Populations. Pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington (DC): National Academy Press. p. 157–169.
- Guedes, R., M. Picanço, A. Matioli, & D. Rocha. 1994.** Efeito de inseticidas e sistemas de condução do tomateiro no controle de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). na. Soc. Entomol. Bras. 23: 321-325.
- Guimarães, J., M. Michereff Filho, V. Oliveira, R. Liz, & E.L. Araujo. 2009.** Biologia e manejo de mosca minadora no meloeiro. Brasília, Embrapa Hortaliças, 9 p. (Circular Técnica 77).
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll, & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. J. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 653-665
- Hertlein, M.B., G.D. Thompson, B. Subramanyam, & C.G. Athanassiou. 2011.** Spinosad: a new natural product for stored grain protection. J. Stored Prod. Res. 47: 131-146.
- IRAC. 2023.** Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas. Ação cooperativa em prol do manejo da resistência. Disponível em: <https://www.irac-br.org/single-post/ação-cooperativa-em-prol-do-manejo-da-resistência>. Acesso em: 23 de maio de 2023.
- Kirst, H.A. 2010.** The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. J. Antibiot. 63: 101-111.
- Lahm, G.P., D. Cordova, & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. Bioorg. Med. Chem. 17: 4127-4133.
- Costa-Lima, T.C., L.D. Geremias, & J.R.P. Parra. 2009.** Effect of temperature and relative humidity on the development of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) in *Vigna unguiculata*. Neotrop. Entomol. 38: 727-733.
- Murphy, S., & J. LaSalle. 1999.** Balancing biological control strategies in the IPM of New World invasive *Liriomyza* leafminers in field vegetable crops. Biocontrol News and Information 20: 91-104.

- Nauen, R., R. Slater, T.C. Sparks, A. Elbert, & A.J.M. McCaffery. 2019.** IRAC: insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides. 3: 995-1012.
- Nunes, G.H. S., A.C. Medeiros, E.L. Araujo, C.H.F. Nogueira, & K.D.S. Sombra. 2013.** Resistência de acessos de meloeiro à mosca-minadora *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). Rev. Bras. Fruticul. 35: 746-754.
- Parrella, M.P. 1987.** Biology of *Liriomyza*. An. Rev. Entomol. 32: 201-224.
- Parrella, M.P. 1982.** A review of the history and taxonomy of economically important serpentine leafminers (*Liriomyza* spp.) (Diptera: Agromyzidae) in California. J. Pan-Pac. Entomol. 58: 302-308.
- Roush, R.T., & G.L. Miller. 1986.** Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Roush, R.T., & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. An. Rev. Entomol. 32: 361-380.
- Salgado, V. 1998.** Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. Pestic. Biochem. Physiol. 60: 91-102.
- Salgado, V. 2013.** Insecticide mode of action: technical training manual, pp. 76p. BASF Corporation, Ludwigshafen, Germany Disponível em: https://agriculturebasfcom/global/assets/en/Crop%20Protection/innovation/BASF_Insecticide_MoA_Manual_2014pdf. Acesso em: 23 de maio de 2023.
- Sawicki, R.M. 1987.** Definition, detection and documentation of insecticide resistance, pp. 105-107 In: Ford, M G, D W Holloma, B P S Khambay & R M Sawicki (eds), Combating resistance to xenobiotics Ellis Horwood, Chichester England.
- Salgado, V., T. Sparks, L. Gilbert, & S. Gill. 2010.** The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance, pp. 207-243. In I. G. Editors-in-Chief: Lawrence, I. Kostas & S. G. Sarjeet (eds.), Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Amsterdam.
- Spencer, K.A. 1973.** Agromyzidae (Diptera) of economic importance. Vol. 9, Springer Science & Business Media. 418 p.
- Stegmaier, C.E. 1966.** Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzidae). J. Fla. Entomol. 49: 75-80.
- Tabashnik, B.E. 1989.** Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. J. Econ. Entomol. 82: 1263-1269.
- Thompson, G., R. Dutton, & T. Sparks. 2000.** Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programm. J. Pest Manag. Sci. 56: 696-702.

- Van Lenteren, J. e., & J.V. Woets. 1988.** Biological and integrated pest control in greenhouses. *An. Rev. Entomol.* 33: 239-269.
- Weintraub, P.G. 2001.** Effects of cyromazine and abamectin on the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) and its parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae) in potatoes. *Crop Prot.* 20: 207-213.
- Weintraub, P.G., S.J. Scheffer, D. Visser, G. Valladares, A. Soares Correa, B.M. Shepard, A. Rauf, S.T. Murphy, N. Mujica, C. MacVean, J. Kroschel, M. Kishinevsky, R.C. Joshi, N.S. Johansen, R.H. Hallett, H.S. Civelek, B. Chen, & H.B. Metzler. 2017.** The Invasive *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae): Understanding Its Pest Status and Management Globally. *J. Insect Sci.* 17: 1-27.
- Wen, Z. & J.G. Scott. 1997.** Cross-Resistance to imidacloprid in strains of german crkroach (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Pestic. Sci.* 49: 367-371.
- Winkler, I.S., C.C. Labandeira, T. Wappler, & P. J. Wilf. 2010.** Distinguishing Agromyzidae (Diptera) leaf mines in the fossil record: new taxa from the Paleogene of North America and Germany and their evolutionary implications. *J. Paleontol.* 84: 935-954.

611

612 **CAPÍTULO 2**

613 **MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE CAMPO DE *Liriomyza***
614 ***sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) A INSETICIDAS**

615

616

617 **DANIEL L. PEREIRA¹**

618

619

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

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632 ¹Pereira, D.L. Monitoramento da resistência de populações de campo de *Liriomyza sativae*
633 Blanchard (Diptera: Agromyzidae) a inseticidas. A ser submetido ao Journal of Economic
634 Entomology.

635

RESUMO - A *Liriomyza sativae* é considerada praga-chave de diversas culturas de alto valor comercial, como melão (*Cucumis melo* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Seu controle é realizado, globalmente, utilizando-se inseticidas químicos. No entanto, relatos de falhas de controle e de resistência aos inseticidas registrados para seu controle (ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram) têm sido reportados e representam uma ameaça aos programas de manejo. O objetivo deste estudo é monitorar a resistência e avaliar o *status* da suscetibilidade de populações de campo de *L. sativae* aos inseticidas citados. Populações do Nordeste e do Sudeste do Brasil foram coletadas e submetidas a bioensaios de concentração diagnóstica, concentração recomendada de rótulo e curvas de concentração-mortalidade com tempo de exposição de 72 horas, sob condições ambientais controladas de umidade ($65 \pm 5\%$), temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) e fotoperíodo (12h Luz). A mortalidade com ciromazina, utilizando a dose de rótulo, variou de 49,58 a 92,97% e as populações mais sensíveis foram Ibimirim e Juazeiro. Para ciantraniliprole a mortalidade variou de 85,12 (Ibimirim) a 100% com a concentração diagnóstica e 96,61 (Ibimirim) a 100% com a concentração de rótulo. Para espinetoram a mortalidade utilizando a concentração diagnóstica variou de 12,24 a 100% e 35,47 a 100% utilizando a concentração de rótulo. As populações de Inhuçu, Arapiraca e Petrolina apresentaram o primeiro relato de resistência de campo ao espinetoram. Os valores das CL_{50} e razão de resistência (RR_{50}) para ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram variaram de 5,53 – 86,61 mg i. a./L (RR_{50} de 1,17 a 15,67 vezes), 0,12 – 0,91 mg i. a./L (RR_{50} de 2,22 a 7,45 vezes) e 0,03 – 44,16 mg i. a./L (RR_{50} de 3,47 a 1652,17 vezes), respectivamente. Os resultados sugerem que populações de *L. sativae* apresentam resistência aos inseticidas ciromazina e espinetoram e estes dados servirão para implementação de medidas para retardar a evolução da resistência para estes inseticidas.

PALAVRAS-CHAVE: Triazinamina, diamida, espinosina, falhas de controle, manejo da resistência

MONITORING THE RESISTANCE OF FIELD POPULATIONS OF *Liriomyza sativae*

BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) TO INSETICIDES

ABSTRACT – *Liriomyza sativae* is considered a key pest of several high value crops, such as melons (*Cucumis melo* L.) and tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). Its control is carried out, globally, using chemical insecticides. However, reports of control failure and resistance to the insecticides registered for its control (cyromazine, cyantraniliprole and spinetoram) have been reported and represent a threat to management programs. The objective of this study is to monitor resistance and evaluate the susceptibility *status* of field populations of *L. sativae* to the above-mentioned insecticides. Populations from Northeastern and Southeastern Brazil were collected and subjected to diagnostic concentration, recommended label concentration and concentration-mortality curves bioassays with 72-hour exposure time, under controlled environmental conditions of humidity ($65 \pm 5\%$), temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) and photoperiod (12h Light). Mortality with cyromazine, using the label dose, ranged from 49.58 to 92.97% and the most sensitive populations were Ibimirim and Juazeiro. For cyantraniliprole mortality ranged from 85.12 (Ibimirim) to 100% with the diagnostic concentration and 96.61 (Ibimirim) to 100% with the label concentration. For spinetoram the mortality using the diagnostic concentration ranged from 12.24 to 100% and 35.47 to 100% using the label concentration. The populations of Inhuçu, Arapiraca and Petrolina presented the first report of field resistance to spinetoram. The CL_{50} and resistance ratio (RR_{50}) values for cyromazine, cyantraniliprole and spinetoram ranged from 5.53 - 86.61 mg i. a./L (RR_{50} from 1.17 to 15.67-fold), 0.12 - 0.91 mg i. a./L (RR_{50} from 2.22 to 7.45-fold) and 0.03 - 44.16 mg i. a./L (RR_{50} from 3.47 to 1652.17-fold), respectively. The results suggest that populations of *L. sativae* exhibit resistance to the insecticides cyromazine and spinetoram and these data will serve to implement measures to slow the evolution of resistance to these insecticides.

KEYWORDS: Triazinamine, diamide, spinosyn, control failure, resistance management

Introdução

Liriomyza sativae é um inseto-praga de diversas culturas agrícolas de alto valor econômico pelo mundo, infestando plantas frutíferas, ornamentais e hortaliças (Parrella 1987, Weintraub *et al.* 2017), incluindo espécies de solanáceas, cucurbitáceas e fabáceas em cultivos protegidos e em campo (Catapan *et al.* 2018). Recentemente, *L. sativae* obteve o *status* de praga-chave, pois antes era conhecida como praga secundária (Weintraub *et al.* 2017). Devido as injúrias causadas pelas larvas, por se alimentarem do mesofilo foliar, formando galerias, esta praga tem causado perdas de produtividade na região Nordeste, afetando entre 10 a 15% dos frutos de meloeiro destinados à exportação pela redução da área fotossintética e consequentemente pela redução no teor de sólidos solúveis (Brix) (Araujo *et al.* 2007).

O controle de *L. sativae* é sempre recomendado nos campos de produção diante dessas problemáticas trazidas pelas altas infestações, sendo o controle químico o método mais empregado e eficaz para redução populacional dessa praga (Catapan *et al.* 2018). Atualmente, os inseticidas registrados para controle do gênero *Liriomyza* incluem os piretroides, avermectinas, análogo das nereistoxinas, análogos de pirazol, triazinamina, diamidas e espinosinas (Agrofit 2023). Atualmente, os inseticidas ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram são frequentemente usados no controle das moscas minadoras. No entanto, esta praga já desenvolveu graus resistência a alguns inseticidas, como para permetrina, paration metil e metamidofós (Keil & Parrella 1990), clorpirifós (Parrella & Trumble 1989), metomil e dimetoato (Karadjova 2001), abamectina e espinosade (Ferguson 2004, Ferguson & Pineda 2010) e clorantraniliprole (Silva *et al.* 2022) e a eficácia de novas moléculas depende da suscetibilidade de populações da praga e aos modos de ação (MoA) dos inseticidas atualmente empregados no controle (Parrella & Keil 1984, Wei *et al.* 2015).

A ciromazina (N-cyclopropyl-1,3,5-triazina-2,4,6-triamine) age no estágio larval e tem propriedades translaminar, atuando como disruptor de crescimento (Wei *et al.* 2015), e pela sua

longa trajetória de uso a resistência de populações de moscas minadoras ainda não é uma grande problemática (Reitz *et al.* 2013). As diamidas têm sido utilizadas em larga escala comercial, sendo uma importante ferramenta no controle de insetos-pragas (Cordova *et al.* 2006). Nesse grupo, o modo de ação único do ciantraniliprole (3-bromo-1-(3-chloro-2-pyridyl)-4'-cyano-2'-methyl-6'-(methylcarbamyl) pyrazole-5-arboxanilide) causa a morte dos insetos por paralisia da contração muscular, atuando como modulador dos receptores de rianodina, liberando Ca^{+2} de forma desordenada das reservas intracelulares para o citosol (Cordova *et al.* 2006, Lümmer 2013), e possui característica de ação translaminar nas folhas e atividade pelo xilema (Foster *et al.* 2012).

O espinetoram, lançado em 2008 e registrado para uso no Brasil em 2014 (Agrofit 2023), também possui modo de ação único no sistema nervoso dos insetos-alvos, interage nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR), receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) e possui associação a uma subunidade do nAChR $\text{D}\alpha 6$ (Orr *et al.* 2009, Sparks *et al.* 2012). Este inseticida é eficaz contra várias ordens de inseto-pragas, porém algumas correm risco de desenvolver resistência (Sparks *et al.* 2012).

No entanto, o uso exacerbado e indiscriminado desses inseticidas, tem facilitado a seleção de populações de *L. sativae* e causado falhas de controle em razão da evolução da resistência, resultando em baixa mortalidade e diferentes níveis de suscetibilidade das larvas, como relatado em achados de Staay (1992). Esta frequência de indivíduos resistentes pode ser identificada no campo quando ainda é baixa, assim uma boa estratégia de manejo pode ser implementada (Tabashnik & Croft 1982), pois para que estes níveis de resistência sejam detectados, faz-se necessário o uso de técnicas de monitoramento da resistência que permite identificar, de forma precoce, a diminuição da suscetibilidade de populações de campo ou casa de vegetação a determinados inseticidas, com o intuito de verificar a resposta de uma população a um inseticida utilizado repetitivamente em uma mesma área de cultivo ou mesmo se o programa de manejo já implementado está sendo efetivo

(Roush & Miller 1986). De acordo com Andow (2008) os métodos utilizados para monitorar populações de insetos resistentes a inseticidas podem ser por métodos fenotípicos, quando os alelos ligados a resistência têm efeito aditivo ou dominante e os métodos genotípicos, quando os alelos que conferem resistência possuem efeito recessivo.

A resistência refere-se à habilidade de uma população de inseto-praga em sobreviver a doses de um químico que seria letal para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (WHO 1957, Crow & Kimura 1970, Croft & Van De Baan 1988). Em *Liriomyza* spp., outros fatores também podem contribuir e dificultar a mitigação dessas populações de campo, como algumas características biológicas ligadas ao seu ciclo curto e a alta fecundidade das fêmeas (Parrella & Keil 1984, Parrella 1987, Guimarães *et al.* 2009). Contudo, a principal preocupação no manejo de *L. sativae* é o aumento no custo de controle e a eventual falha de controle desses inseticidas, que por vezes possibilitam o fenômeno da resistência e frequentemente são negligenciados quando a eficácia do inseticida é reduzida e não atinge o nível de controle esperado ao seguir as recomendações da dosagem de bula do produto (Guedes 2017). Portanto, a detecção da resistência de forma precoce pode estimar a resposta de uma população de insetos antes que ela atinja níveis críticos de resistência, fornecendo referências para comparação das mudanças nos níveis de suscetibilidade entre as populações aos inseticidas utilizados, permitindo detectar a resistência em seu desenvolvimento inicial em diversas regiões onde o problema da resistência está sendo relatado (Siegfried *et al.* 2000). E para que seja possível este levantamento dos níveis de suscetibilidade, deve-se fazer uso de técnicas, estabelecidas previamente, para detectar e monitorar, de maneira contínua, as populações de *L. sativae* com utilização de concentrações diagnósticas, uso de concentrações recomendadas de bula e com bioensaios de curva concentração-resposta.

Assim, a detecção e o monitoramento possibilitam a implementação de estratégias para manejo da resistência de *L. sativae* e podem fornecer informações que permitem medidas proativas

para retardar o desenvolvimento da resistência, preservando a vida útil destes inseticidas. Diante disso, o objetivo desta pesquisa é avaliar a suscetibilidade e monitorar a resistência de populações de *L. sativae* aos inseticidas ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram.

Material e Métodos

Coleta e manutenção das populações de *L. sativae*. 13 populações de *L. sativae* foram coletadas entre o período de 2018 a 2022 em diferentes regiões do Brasil em áreas de cultivos comerciais de tomate (*Solanum lycopersicum*), melão (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) com históricos de falha de controle químico, sendo as seguintes populações: 01. Arapiraca, Alagoas (ARAP-AL); 02. Icapuí, Ceará (ICA-CE), 03. Inhuçu, Ceará (INHU-CE) e 04. Tianguá, Ceará (TIAN-CE); 05. Ibimirim, Pernambuco (IBI-PE) e 06. Petrolina (PETR-PE); 07. Juazeiro, Bahia (JUAZ-BA) e 08. Poções, Bahia (POÇO-BA); 09. São Gotardo, Minas Gerais (SGTD-MG); 10. Baraúna, Rio Grande do Norte (BAR-RN) e (11-13) Mossoró, Rio Grande do Norte (RN), denominadas de MSR II, MSR III e MSR IV. Em todas as coletas de campo, folhas com larvas foram colocados em sacos de organza e acondicionados em caixa térmica de isopor com espuma refrigerante para manter a temperatura. A décima quarta população caracterizada como padrão de suscetibilidade, Mossoró I (MSR I), foi proveniente do Laboratório de Entomologia Aplicada da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em Mossoró, Rio Grande do Norte/RN. Essa população é mantida há mais de 10 anos em condições controladas e sem contato com inseticidas. Todas as populações foram enviadas para o Laboratório de Interações Insetos-Tóxicos (LIIT), do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (PPGE) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife/PE), onde iniciou-se criações de cada população, pupas e adultos emergidos de cada população foram mantidos em gaiolas de madeira (45 x 45 x 45 cm), confeccionadas com tela antiafídica e submetidos ao modelo de criação proposto por Araujo *et al.*

(2007). Plantas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L.) DC, foram utilizadas como hospedeiro para alimentação e oviposição, sendo retiradas e substituídas por novas plantas em um período de 24 horas até o final de cada geração, colocadas em bandejas plásticas e identificadas com etiquetas com data de corte das folhas infestadas e data da coleta das pupas de *L. sativae*. Como fonte de alimentação para fêmeas e machos adultos, solução de mel a 10%, foram fornecidos no interior das gaiolas em uma esponja circular acondicionada em placa de Petri de 7,5 cm de diâmetro. As folhas infestadas com posturas, foram acondicionadas em sala de criação durante a fase de desenvolvimento embrionário e estágio larval. As folhas infestadas com as larvas de terceiro instar foram cortadas com o auxílio de tesoura na região do pecíolo e colocadas em frasco âmbar contendo água e hipoclorito de sódio a 2% e foram acondicionadas em bandejas plásticas forradas com papel manteiga até a formação das pupas sob condições controladas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h. Todas as pupas eram coletadas e acondicionadas em placas de petri, protegidas com plástico filme e identificadas com etiquetas contendo nome da população e número da geração. Após a emergência do primeiro adulto, realizava-se a solturas destes adultos nas suas respectivas gaiolas para não ocorrer mistura de populações.

Inseticidas. Os inseticidas utilizados na pesquisa foram: ciromazina (Trigard® 750 WP - Pó molhável a 75% - 750g/Kg, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil – concentração recomendada de bula: 112,5 mg i. a./L); ciantraniliprole (Benevia® - Dispersão de óleo a 10% - 100g/L, FMC Química do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil - concentração recomendada de bula: 62,5 a 100 mg i. a./L) e espinetoram (Delegate® - Grânulos dispersíveis a 25% - 250g/Kg, Corteva Agrisciences Industrial Ltda, São Paulo, Brasil - concentração recomendada de bula: 27,5 a 50 mg i. a./L). Todos com registro para controle de *Liriomyza* spp.

803 **Adjuvante.** Para melhorar a eficiência dos inseticidas foi utilizado o adjuvante agrex'Oil®
804 (Microquímica Tradecorp, Hortolândia, São Paulo, Brasil) a 0,05% (vol: vol) (óleo vegetal - 94%
805 p/p). As folhas destinadas ao controle foram tratadas apenas com água + adjuvante.

806 **Monitoramento do fenótipo resistência.** Para monitoramento da resistência em populações de *L.*
807 *sativae*, foram adotadas e utilizadas concentrações diagnósticas dos inseticidas ciantraniliprole e
808 espinetoram, baseados em estudos genéticos de Campos *et al.* (2015) para monitorar e manejar *Tuta*
809 *absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae): 10 mg i. a./L cada. E concentrações de rótulo
810 recomendada pelo fabricante para *Liriomyza* ssp. dos inseticidas ciromazina (112,5 mg i. a./L),
811 ciantraniliprole (100 mg i. a./L) e espinetoram (50 mg i. a./L). As formulações dos inseticidas foram
812 diluídas em 100 mL de água contendo óleo vegetal Agrex'Oil® na concentração de 0,05% utilizando
813 becker de vidro de volume total 250 mL. Baseados na metodologia de Santos (2020), discos de
814 folhas de 2,0 cm de diâmetro de *C. ensiformis* foram cortadas com o auxílio de um tubo de aço
815 inoxidável afiado (2,5 x 10 cm), estes discos contendo uma larva de segundo ínstar, e quando havia
816 mais que uma, o excedente era eliminado (mortos) com auxílio de alfinete. Após este processo, os
817 discos de folhas foram tratados por imersão por cinco segundos nas concentrações dos inseticidas,
818 sendo as folhas testemunhas tratadas apenas com água mais Agrex'Oil® a 0,05% e postas para secar
819 em temperatura ambiente. Posteriormente foram acondicionados em bandejas bioassay tray, modelo
820 *Clear Rearing Tray*, contendo 32 células cada, preenchidas previamente com discos de papel filtro
821 umedecidos com 150 µL de água destilada e mantidas em câmara de crescimento (*BOD* -
822 *Biochemical Oxygen Demand*) onde permaneceram por um período de 72 h, em condições de
823 temperatura com 25°C ± 1 °C, Umidade Relativa de 65 ± 5% e um fotofase de 12 horas. Em cada
824 bioensaio foram utilizadas 160 larvas de *L. sativae*. A avaliação da mortalidade das larvas foi
825 realizada com o auxílio de uma lupa (Opton 5x, Alemanha). Para categorizar e avaliar a mortalidade
826 das larvas no interior das minas, foram verificados o movimento do corpo, o movimento do aparelho

827 bucal e movimento do intestino médio, e ainda observando se o intestino estava vazio (morto) ou
828 cheio (vivo), após serem tocadas cuidadosamente com um pincel de cerdas finas. Para cada
829 bioensaio foram realizadas 32 repetições, para cada repetição uma larva, totalizando 32 larvas de
830 segundo instar para cada placa, com um total de 160 larvas testadas por bioensaio.

831 **Bioensaios de suscetibilidade.** Curvas de concentração-resposta com os inseticidas
832 ciantraniliprole, ciromazina e espinetoram foram estabelecidas após os bioensaios de concentração
833 diagnóstica e de rótulo, baseando-se nos dados de mortalidade para as 14 populações de *L. sativae*.
834 Para as diluições do inseticida ciantraniliprole as concentrações variaram de 0,039 a 20 mg i. a./L.
835 Para ciromazina as concentrações testadas variaram de 0,878 a 225 mg i. a./L. Para espinetoram as
836 concentrações variaram de 0,039 a 60 mg i. a./L. Após o preparo das concentrações, os discos de
837 folhas de feijão de porco, contendo uma larva cada, foram cortados e mergulhados nas soluções dos
838 inseticidas, conforme descrito na seção anterior. Bandejas *Bioassay tray*, modelo *Clear Rearing*
839 *Tray*, foram usadas, sendo uma para cada concentração. Posteriormente, os discos foliares foram
840 transferidos para as bandejas seguindo a ordem da menor para a maior concentração com o auxílio
841 de uma pinça, identificadas de acordo com a população testada e vedada com tampas de acetato
842 transparentes A4 e microfilme plástico lateralmente para manter a turgidez das folhas. As bandejas
843 de cada bioensaio foram acondicionadas em *BOD* com temperatura de 25 ± 1 °C, UR de $60 \pm 5\%$ e
844 fotofase de 12 horas. Para cada bioensaio de curva concentração-resposta foram realizadas 32
845 repetições, e para cada repetição uma larva, totalizando 32 larvas de segundo instar por placa,
846 totalizando 320 larvas por bioensaio. Após um período de 72 horas cada bandeja foi observada em
847 lupa para verificação da mortalidade das larvas em cada disco de folha utilizando os critérios de
848 avaliação acima citado.

849 **Análise dos dados.** Os dados de mortalidade obtidos do monitoramento, sejam com concentração
850 diagnóstica ou concentração de rótulo, foram corrigidos pela mortalidade do tratamento controle

(Abbott, 1925) e calculadas as médias de percentagem e erro padrão. As mortalidades nos bioensaios de suscetibilidade foram submetidas a análise de Probit (Finney 1971) utilizando o programa POLO-Plus (Leora-Software 2005) após a correção das mortalidades pela mortalidade no tratamento controle (Abbott, 1925). A probabilidade foi calculada tomando como referência o valor de qui-quadrado (χ^2) e o grau de liberdade (GL), utilizando DIST.QUIQUA.CD (χ^2 , GL) no Excel. o fourmilab.ch. Os valores de probabilidade de falha de controle (PFC) foram calculados pelo método de Guedes (2017). A razão de resistência e o seu intervalo de confiança a 95 % foram calculados de acordo com o método descrito por Robertson *et al.* (2017). A correlação de Pearson (r_p) ($P < 0,05$) foi realizada com o Log₁₀ das CL_{50s} de cada população para os três inseticidas testados utilizando o pacote R (R Core Team, 2022).

Resultados

Monitoramento com concentração de rótulo para ciromazina. A concentração recomendada de bula de 112,5 mg i. a./L de ciromazina causou mortalidade que variou de 49 a 93%. A população MSR IV (Mossoró IV/RN) foi a que apresentou a menor mortalidade ($49,58 \pm 0,76$), seguida de MSR II (Mossoró II/RN) que apresentou uma mortalidade ($53,59 \pm 0,48$), apresentando uma alta falha de controle por ciromazina (PFC = 38,03 e 33,01, respectivamente). As demais populações apresentaram mortalidade variando de 55,83 a 92,97% (Tabela 2). As populações de Ibimirim e Juazeiro apresentaram maior sensibilidade à dose recomendada pelo fabricante, apresentando mortalidade de 81,51 % e 92,97 %, respectivamente. Portanto, com menor probabilidade de falha de controle (PFC = -1,89 e -15,75, respectivamente) (Tabela 2). A maioria das populações testadas com ciromazina utilizando a dose recomenda de rótulo apresentaram alto risco de falha de controle, sugerindo altas frequências de indivíduos resistentes nas populações.

874 **Monitoramento com concentração diagnóstica e de rótulo para ciantraniliprole.** Dentre as
875 populações testadas com a concentração diagnóstica, a maioria apresentou mortalidade de 100%,
876 exceto a população de Ibimirim (IBI-PE) e Inhuçu (INHU-CE) que apresentaram mortalidades de
877 $85,12 \pm 0,62$ e $98,40 \pm 0,36$ %, respectivamente (Tabela 3). As populações apresentaram alta
878 suscetibilidade na concentração recomendada de rótulo, indicando que este inseticida está eficaz
879 para a maioria das populações. Ciantraniliprole apresentou uma alta eficácia no controle dessa
880 população, porém com sobreviventes na população de Ibimirim, obtendo uma mortalidade de
881 96,61% e indicando a presença de fenótipos com resistência (Tabela 3). Ao avaliar a Probabilidade
882 de Falha de Controle (PFC) da concentração recomendada no rótulo com valores de $PFC < 0$, todas
883 as populações apresentaram baixo risco para falha de controle e indicando que a molécula de
884 ciantraniliprole encontra-se efetiva em campo (Tabela 3).

885 **Monitoramento com concentração diagnóstica e de rótulo para espinetoram.** A concentração
886 diagnóstica e a recomendada de rótulo foram eficazes para a população de laboratório Mossoró I
887 (MSR I-RN), causando 100% de mortalidade. As populações de Mossoró (III e IV), Baraúna,
888 Ibimirim, Icapuí, Juazeiro e São Gotardo foram efetivamente controladas por ambas as
889 concentrações (Tabela 4). Espinetoram causou mortalidade de 12,24; 20,80; 25,18 e 94,74% para
890 as populações de Inhuçu, Arapiraca, Petrolina e Tianguá na concentração diagnóstica,
891 respectivamente. Na concentração recomendada de rótulo, apenas as populações de Arapiraca,
892 Petrolina e Inhuçu apresentaram sobreviventes, sugerindo alta probabilidade de falha de controle
893 para as populações por este inseticida no campo (Tabela 4).

894 **Bioensaios de Suscetibilidade.** Os dados de mortalidade das larvas de segundo instar de *L. sativae*
895 estão exibidos nas Tabela 5, 6 e 7 usando mortalidades corrigidas para os três inseticidas testados
896 no monitoramento e na toxicidade relativa. Estes dados se ajustaram ao modelo de Probit (χ^2 não
897 significativo, $P > 0,05$). As menores concentrações letais de ciromazina que causaram 50% de

mortalidade (CL₅₀) dos insetos foram para a populações de São Gotardo (SGTD-MG) (CL₅₀ = 5,53 mg i. a./L) e Juazeiro (CL₅₀ = 6,44 mg i. a./L) (Tabela 5). Os valores das CL₅₀ para ciromazina variaram de 5,53 a 86,61 mg i. a./L, sendo a população Mossoró IV a mais resistente (razão de resistência, RR₅₀ = 15,67 vezes) quando comparada com a população São Gotardo. Todas as populações testadas com ciromazina apresentaram inclinações baixas variando de 0,06 ± 0,11 a 1,65 ± 0,16.

Os valores de CL₅₀ para ciantraniliprole variaram de 0,12 (Baraúna) a 0,91 (Ibimirim) mg i. a./L, indicando que as populações estão sensíveis para este inseticida. A maior razão de resistência (RR₅₀) foi de 7,45 vezes para a população de Ibimirim. Baseado na inclinação da curva, a população Mossoró I foi a mais homogênea (8,29 ± 2,04) e a de Ibimirim a menos homogênea (1,29 ± 0,12) (Tabela 6).

Uma ampla variação de resposta de suscetibilidade a espinetoram foi observada entre as populações (Tabela 7). A população de Mossoró I (MSR I) foi a mais sensível (CL₅₀ = 0,03 mg espinetoram/L) e Inhuçu foi a população mais resistente (CL₅₀ de 44,16 mg espinetoram/L). A razão de resistência (RR₅₀) variou de 3,5 vezes (São Gotardo) a 1.652,2 vezes (Inhuçu) quando comparadas a população mais sensível (MSR I). Ao observar as inclinações das curvas das populações avaliadas e seus respectivos erros padrão (EP), todas as populações apresentaram baixa homogeneidade, variando de 1,42 ± 0,14 a 2,71 ± 0,32.

Não houve correlação significativa entre as suscetibilidades das populações de *L. sativae* para os inseticidas ciromazina e ciantraniliprole ($r = -0,23$, $P = 0,51$, $n = 11$), ciromazina e espinetoram ($r = -0,49$, $P = 0,15$, $n = 10$) e ciantraniliprole e espinetoram ($r = -0,09$, $P = 0,77$, $n = 11$), sugerindo não haver relação alguma entre as toxicidades destes inseticidas em campo.

Discussão

A resposta de uma população natural de insetos de campo muda ao passo em que ela é exposta a inseticidas (Ferguson 2004). Por esta razão o monitoramento com método adequado é de fundamental importância para acompanhar a evolução de resistência (Roush & Miller 1986) antes que atinja níveis críticos de frequência e cause falhas de controle, com consequente perdas econômicas. O monitoramento de populações de campo de *L. sativae* demonstrou que algumas já desenvolveram graus baixos a moderados de resistência para ciromazina e baixos a altos para espinetoram. Por outro lado, os graus de resistência para ciantraniliprole foram baixos (< 10 vezes), sugerindo que as populações estavam ainda suscetíveis a esta classe de inseticidas. Isto explica-se pelo fato que esta molécula seja pouco utilizada nestas áreas avaliadas, enquanto ciromazina e mais recentemente o espinetoram são mais utilizados para o controle de *L. sativae*, apesar do alto valor de aquisição destas moléculas pelos produtores. Os graus de resistência a ciromazina seriam relativamente mais altos se a população de referência fosse mais suscetível a esta molécula. No entanto, a maioria das populações apresentaram mortalidades na concentração recomendada de bula para ciromazina abaixo de 80%, o recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ou seja, probabilidade de falhas de controle positivas. Portanto, os baixos a moderados graus de resistência a este disruptor de crescimento de insetos são relativos e não refletem a alta frequência de resistência a ciromazina em campo. Por outro lado, observou-se alta resistência de populações a espinetoram, embora recentemente registrado para controle de *Liriomyza* spp. em diversas culturas no Brasil. Isto só foi possível porque pelo menos uma população sabidamente suscetível (Mossoró I) a esta molécula estava disponível. No entanto, a maioria das populações apresentaram alta suscetibilidade às concentrações diagnóstica e de rótulo para este inseticida. Adicionalmente, os resultados de probabilidade de falhas de controle demonstraram uma relação clara desta com os graus de resistência observados com as estimativas

das curvas de concentração resposta e que três populações daquelas áreas estariam em falha de controle. Estes são os primeiros casos de resistência a espinetoram em *L. sativae* de que temos conhecimento. Matsuda (2022) avaliando a mudança na suscetibilidade de populações de moscas minadoras no Japão a uma gama de inseticidas, entre eles ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram, durante os anos de 1991 a 2016, constatou que as populações de *L. trifolii* estavam altamente suscetíveis a estes dois últimos inseticidas.

Casos de resistência em *L. trifolii* foram relatados por Ferguson & Pineda (2010), onde baixos níveis de resistência foram encontrados com razões de resistência de 3,1; 4,2 e 39 vezes para populações de moscas minadoras da Georgia, Virgínia e Califórnia, resistentes a ciromazina, respectivamente. Nossos resultados sugerem que a pressão de seleção com ciromazina em populações de moscas minadoras em áreas cultivadas é alta, porém, em trabalhos de Acevedo *et al.* (2009) indicou que a resistência é instável em moscas domésticas na Argentina, e Ferguson (2004) em seus achados, relatou que a resistência a ciromazina é estável por pelo menos quatro gerações em moscas minadoras. Segundo Devkota *et al.* (2016) a ciromazina apresenta baixa eficácia de controle em moscas minadoras na Flórida e alta eficácia em populações de *L. sativae*, no Brasil (Damasceno *et al.* 2022). Em contrapartida, trabalhos realizados em Israel por Weintraub (2001), após monitoramento com armadilhas de coloração amarelas para averiguar o nível populacional deste inseto em cultivo de batata (*Solanum tuberosum* L.) demonstraram que este interruptor de muda foi bastante efetivo no controle de *L. huidobrensis* do plantio até a colheita, e ainda seletivo para o parasitoide de larvas, *Diglyphus isaea* Walker (Hymenoptera: Eulophidae).

O monitoramento com ciantraniliprole apontou que a maioria das populações testadas da região do Mossoró/RN, local produtor e exportador de variedade de melões, e as populações da Bahia, Minas gerais, Ceará e Alagoas estão sensíveis quando se utiliza a concentração diagnóstica de 10 mg i. a./L e a maior concentração de rótulo recomendada de 100 mg i. a./L. Porém, esta

mesma concentração de rótulo possibilitou a sobrevivência de possíveis indivíduos resistentes que representa quase 3,5% da frequência fenotípica da população de Ibimirim (IBI-PE), região produtora de melão e tomate. Então, para se haver um bom manejo desta resistência, a frequência de indivíduos resistentes deve apresentar-se abaixo de 1% (Tabashnik & Croft 1982). Lahm *et al.* (2009) já relatavam a efetividade de ciantraniliprole no controle de moscas minadoras. Em estudos de Matsuda (2022) e Silva *et al.* (2022), avaliando populações de *Liriomyza* expostas a ciantraniliprole, acharam dados similares aos aqui encontrados com RR_{50} de 7,20 vezes maiores do que a população mais sensível, demonstrando ainda uma alta efetividade frente as populações de *L. sativae*.

No monitoramento e levantamento da suscetibilidade com o inseticida espinetoram as populações de Icapuí/CE, Ibimirim/PE, Juazeiro/BA, Mossoró/RN (I, III e IV), São Gotardo/MG e Baraúnas/RN se mantiveram suscetíveis à dose diagnóstica e de rótulo. No entanto, foi constatado que as populações de Inhuçu/CE e Arapiraca/AL apresentaram casos inéditos de resistência evoluída em campo ao espinetoram com uma magnitude de 1.652 e 665,80 vezes de resistência, respectivamente, quando comparada com a população mais suscetível, MSR I. Esta resistência já é considerada muito alta, com fator de resistência de $FR > 100$, conforme Torres-Vila *et al.* (2002). Em pesquisas recentes de Silva *et al.* (2022), encontraram uma razão de resistência (RR_{50}) de 3,10 vezes, considerada uma baixa resistência ($FR = 2 - 10$) (Torres-Vila *et al.* 2002). Porém, Ferguson (2004) realizando testes de suscetibilidade utilizando o mesmo método de imersão de folhas de plantas ornamentais contendo uma larva, encontrou uma resistência maior que 188 vezes para espinosade, primeira espinosina lançada no mercado global. Em relação a estes achados, nosso monitoramento comprova que resistência a espinetoram vem evoluindo a cada ano, porém parece estar restrita apenas a algumas regiões por motivos que se observam nestes agroecossistemas, como

altos volumes de aplicações de calda e/ou altas doses do inseticida e o alto fluxo gênico de *L. sativae* para diversas áreas vizinhas.

Embora a suscetibilidade e o desenvolvimento da resistência à inseticidas em populações de *L. sativae* tenha sido observada nos Estados Unidos (Ferguson 2004) e no Vietnã (Tran & Dang Hoa 2022), a evolução da resistência à inseticidas representa uma séria ameaça à produção das áreas agrícolas, pois o controle químico ainda é o principal método de controle de *Liriomyza* spp. (Gao *et al.* 2017). Ciantraniliprole e espinetoram se apresentam como uma ferramenta importante no controle químico para manter os níveis populacionais das moscas minadoras em baixos níveis em áreas cultivadas no Brasil, evitando perdas econômicas aos produtores. No entanto, o descaso de alguns está comprometendo a eficácia de moléculas novas em tempo hábil. No panorama da ciromazina, este inseticida apresentou níveis altos de tolerância por parte destas populações testadas e que seu *status* de resistência já está agravado. Como é o caso do indoxacarbe na China, onde seu uso prologando revelou a existência de uma mutação V1848I no canal de sódio de uma população de campo de *L. trifolii* (Li *et al.* 2022). Em 2013, pesquisadores afirmavam que o ciromazina, apesar de ser comumente utilizado no campo, era um dos inseticidas mais eficazes para os agromyzídeos (Reitz *et al.* 2013), porém, isto não pode ser mais visto pelo fato de terem evoluído para resistência, considerada moderada em nossos estudos.

Por fim, cuidados redobrados e boas práticas agrícolas podem ser adotadas para que estes princípios ativos de risco reduzido e modo de ação (MoA) diferente possam garantir a efetividade destes produtos e mitigar a evolução da resistência desta praga. Outras moléculas: abamectina, cartape, clorfenapir, espinosade, fenpropatrina e lambda-cialotrina podem ser recomendados e implementados em programas de monitoramento integrando estratégias de manejo por ataque múltiplo (alternância de inseticidas), manejo por saturação para reduzir as vantagens adaptativas de indivíduos resistentes, manutenção de áreas não tratadas para refúgio de insetos, preservando-os

suscetíveis e, ainda uso de inimigos naturais. Portanto, este é o relato mais atual da suscetibilidade de *L. sativae* a inseticidas no Brasil e os resultados confirmam a probabilidade de desenvolvimento de resistência e sem nenhuma relação de resistência cruzada entre estes inseticidas.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), à fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Ministério da Educação) pelo suporte e concessão da bolsa, ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico) pelo apoio a esta pesquisa.

Literatura Citada

- Acevedo, G.R., M. Zapater, & A.C. Toloza. 2009.** Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol. Res.* 105: 489-493.
- Agrofit. 2023.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit. Acesso em: 30 de março de 2023.
- Andow, D.A. 2008.** The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *J Collection Biosaf. Rev.* 4: 142-199.
- Araujo, E.L., D.R.R. Fernandes, L. Geremias, A. Menezes-Netto, & M. Filgueira. 2007.** Mosca minadora associada à cultura do meloeiro no Semi-árido do Rio Grande do Norte. *Rev. Caatinga* 20: 210-212.
- Araujo, E.L., S.A.M. Pinheiro, L.D. Geremias, A.C.M. Netto, & L.P.M. Macedo. 2007.** Published. Técnica de criação da mosca minadora *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). *Rev. Campo Digital.* 2(1): 22-26.
- Bloomcamp, C.L., R.S. Patterson, & P.G. Koehler. 1987.** Cyromazine Resistance in the House Fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 352-357.
- Braham, M., & L. Hajji. 2012.** Management of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) with insecticides on tomatoes. In F. Perveen (Ed.), *Insecticides - Pest engineering* (pp. 333–354). InTech: Croatia.
- Brito, G.G., E.C. Costa, H. Maziero, A.B. Brito, & F.A. Dörr. 2004.** Preferência da broca-das-cucurbitáceas [*Diaphania nitidalis* Cramer, 1782 (Lepidoptera: Pyralidae)] por cultivares de pepineiro em ambiente protegido. *Ciência Rural.* 34: 577-579.
- Campos, M.R., T.B.M. Silva, W.M. Silva, J.E. Silva & H.A.A. Siqueira. 2015.** Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *Pest Manag. Sci.* 4: 537-44.
- Catapan, V., A. C. Buzanini, J.M.M. Moura, S.S. Santos.** Principais pragas de hortaliças-fruto nas famílias das Solanáceas, Cucurbitáceas e Fabáceas. In: Brandão Filho J. U. T., P. S. L. Freitas., L. O. S. Berian, & R. Goto, comps. Hortaliças-fruto .. Principais pragas de hortaliças-fruto nas famílias das Solanáceas, Cucurbitáceas e Fabáceas. Maringá: EDUEM. 357-386.
- 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.

- Costa-Lima, T.C., M.C. Chagas, & J.R. Parra. 2014.** Temperature-dependent development of two neotropical parasitoids of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae). J. Insect Sci. 14: 245.
- Croft, B.A., & H.E. Van De Baan. 1988.** Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. Exp. Appl. Acarol. 4: 277-300.
- Crow, J., & M.J. Kimura. 1970.** An introduction to population genetics theory. Nova York, Evanston e Londres: Harper & Row, Publishers. 591 p.
- Damasceno, G., T.C. Silva, O. Bernardi, & T.C. Costa-Lima. 2022.** Susceptibility of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) melon populations to abamectin, cyromazine, and cyantraniliprole. BioAssay 13: 1-3.
- Devkota, S., D.R. Seal, O.E. Liburd, S. Ferguson, C.T. Waddill, & C.G. Martin. 2016.** Responses of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Chemical and Biorational Insecticides. J. Florida Entomol. 99: 616-623.
- Ferguson, J.S. 2004.** Development and Stability of Insecticide Resistance in the Leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Cyromazine, Abamectin, and Spinosad. J. Econ. Entomol. 97: 112-119.
- Ferguson, S., & O. Pineda. 2010.** Putative Polymerase Chain Reaction Markers for Insecticide Resistance in the Leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Cyromazine and Abamectin. J. Econ. Entomol. 103: 2197-2203.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis, A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge, University Press, 333p.
- Foster, S.P., I. Denholm, J.L. Rison, H.E. Portillo, J. Margaritopoulos, & R. Slater. 2012.** Susceptibility of standard clones and European field populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), to the novel anthranilic diamide insecticide cyantraniliprole. Pest Manag. Sci. 68: 629-633.
- Gao, Y., S. Reitz, Z. Xing, S. Ferguson, & Z. Lei. 2017.** A decade of leafminer invasion in China: lessons learned. Pest Manag. Sci. 73: 1775-1779.
- Guedes, R.N.C. 2017.** Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. 73: 479-484.
- Guimarães, J., M. Michereff Filho, V. Oliveira, R.S. Liz, & E.L. Araujo. 2009.** Biologia e manejo de mosca minadora no meloeiro. Brasília, Embrapa Hortaliças, 9 p. (Circular Técnica 77).
- Karadjova, O. 2001.** Susceptibility of the South American leafminer (*Liriomyza huidobrensis* Blanch) to some insecticides. J. Agricul. Sci. 7: 279-284.

- Keil, C.B., & M.P. Parrella. 1990.** Characterization of insecticide resistance in two colonies of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). J. Econ. Entomol. 83: 18-26.
- 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. LeOraSoftware, Petaluma, CA.
- Li, F., X. Gong, L. Yuan, X. Pan, H. Jin, R. Lu, & S. Wu. 2022.** Indoxacarb resistance-associated mutation of *Liriomyza trifolii* in Hainan, China. Pestic. Biochem. Physiol. 183: 1-7.
- Lümmen, P. 2013.** Chapter Five - Calcium Channels as Molecular Target Sites of Novel Insecticides, pp. 287-347. In E. Cohen (ed.), Advances in Insect Physiology, vol. 44. Academic Press.
- Matsuda, K. 2022.** Changes in the insecticide susceptibility of the American serpentine leafminer, *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae), in indoor successively reared and crop field populations over 25 years. Appl. Entomol. Zool. 57: 71-80.
- Miller, A.L.E., K. Tindall, & B.R. Leonard. 2010.** Bioassays for Monitoring Insecticide Resistance. J. Vis. Exp. 46: 2129 p.
- Orr, N., A.J. Shaffner, K. Richey, & G.D. Crouse. 2009.** Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. Pestic. Biochem. Physiol. 95: 1-5.
- Parrella, M.P., & J.T. Trumble. 1989.** Decline of Resistance in *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in the Absence of Insecticide Selection Pressure. J. Econ. Entomol. 82: 365-368.
- Parrella, M.P. 1987.** Biology of *Liriomyza*. An. Rev. Entomol. 32: 201-224.
- Parrella, M.P., & C.B. Keil. 1984.** Insect pest management: the lesson of *Liriomyza*. Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 22-25.
- Pinto, M.C., & A.P. Prado. 2001.** Resistance of *Musca domestica* L. populations to cyromazine (insect growth regulator) in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 729-732.
- Reitz, S.R., Y.L. Gao & Z.R. Lei. 2013.** Insecticide Use and the Ecology of Invasive *Liriomyza* Leafminer Management, p. 233-253. In S. Trdan (Ed.), Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies. Rijeka, InTech, 5810p.
- Robertson, J.L., M.M. Jones, E. Olguin, & B. Alberts. 2016.** Bioassays with Arthropods (3rd ed). CRC Press: 212 p.

- Roush, R.T., & G.L. Miller. 1986.** Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Santos, E.A. 2020.** Metodologia de bioensaio e avaliação da suscetibilidade de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) a inseticidas. Tese., Universidade Federal Rural de Pernambuco Programada de Pós-Graduação em Entomologia. 90 p.
- Siegfried, B.D., T. Spencer & J.Nearman. 2000.** Baseline Susceptibility of the Cor Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab Toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 93: 1265-1268.
- Silva, P.A.F., H.A.A. Siqueira, W.M. Silva, E.L. Araujo, & A.B. Esteves Filho. 2022.** Susceptibility of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) populations to reduced risk insecticides. Crop Prot. 153: 105880.
- Sparks, T.C., J.E. Dripps, G.B. Watson, & D. Paroonagian. 2012.** Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. Pestic. Biochem. Physiol. 102: 1-10.
- Staay, M. 1992.** Chemical control of the larvae of the leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) in lettuce. CABI Rev. 57: 473-478.
- Tabashnik, B.E., & B.A. Croft. 1982.** Managing Pesticide Resistance in Crop-Arthropod Complexes: Interactions Between Biological and Operational Factors. Environ. Entomol. 11: 1137-1144.
- Torres-Vila, L.M., M.C. Rodríguez-Molina, A. Lacasa-Plasencia, & P. Bielza-Lino. 2002.** Insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* to endosulfan, carbamates and organophosphates: the Spanish case. Crop Prot. 21: 1003-1013.
- Tran, T., & T. Dang Hoa. 2022.** Susceptibility of the vegetable leafminer, *Liriomyza sativae* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) to lambda-cyhalothrin, abamectin, cypermethrin and chrothianidin. J. Agricult. Sci. Dig. 43: 378-381.
- Wei, Q.B., Z.R. Lei, R. Nauen, D.C. Cai, & Y.L. Gao. 2015.** Abamectin resistance in strains of vegetable leafminer, *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) is linked to elevated glutathione S-transferase activity. Insect Sci 22: 243-250.
- Weintraub, P.G. 2001.** Effects of cyromazine and abamectin on the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) and its parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae) in potatoes. Crop Prot. 20: 207-213.
- Weintraub, P.G., S.J. Scheffer, D. Visser, G. Valladares, A. Soares Correa, B.M. Shepard, A. Rauf, S.T. Murphy, N. Mujica, C. MacVean, J. Kroschel, M. Kishinevsky, R.C. Joshi, N.S. Johansen, R.H. Hallett, H.S. Civelek, B. Chen, & H.B. Metzler. 2017.** The Invasive *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae): Understanding Its Pest Status and Management Globally. J. Insect Sci. 17: 28p.

1215 **WHO. 1957.** World health organization. Expert committee on insecticides, seventh report., WHO
1216 technical report series, No. 125. WHO, Geneva, Switzerland.
1217

Tabela 1. Local e data de coleta das populações de *Liriomyza sativae* utilizadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas ciantraniliprole, ciromazina e espinetoram em localidades produtoras de melão e tomate do Brasil.

Código da População	Cidade/UF	Local da coleta		Data de coleta	Origem
		Latitude	Longitude		
ARAP	Arapiraca/AL	09°51'23.90"S	36°34'17.60"O	Out/2022	Tomate
BAR	Baraúna/RN	05°10'17.37"S	37°59'14.88"O	Out/2019	Melão
IBI	Ibimirim/PE	08°30'28.50"S	37°40'46.00"O	Jan/2020	Tomate
ICA	Icapuí/CE	04°50'48.84"S	37°23'19.99"O	Jan/2020	Melão
INHU	Inhuçu/CE	04°09'05.80"S	40°52'37.50"O	Out/2022	Tomate
JUAZ	Juazeiro/BA	09°31'43.00"S	40°15'00.00"O	Nov/2019	Melão
MSR I	Mossoró/RN	05°12'14.40"S	37°19'30.30"O	Nov/2018	Melão
MSR II	Mossoró/RN	04°50'41.16"S	37°16'07.00"O	Nov/2018	Melão
MSR III	Mossoró/RN	05°01'38.10"S	37°22'55.50"O	Nov/2019	Melão
MSR IV	Mossoró/RN	04°52'54.71"S	37°26'52.55"O	Nov/2021	Melão
PETR	Petrolina/PE	08°57'40.46"S	40°34'01.97"O	Dez/2022	Tomate
POÇO	Poções/BA	14°31'48.87"S	40°34'01.97"O	Dez/2022	Tomate
SGTD	São Gotardo/MG	19°18'38.76" S	46°21'52.01"O	Nov/2019	Tomate
TIAN	Tianguá/CE	03°45'09.52"S	40°58'7.35"O	Ago/2021	Tomate

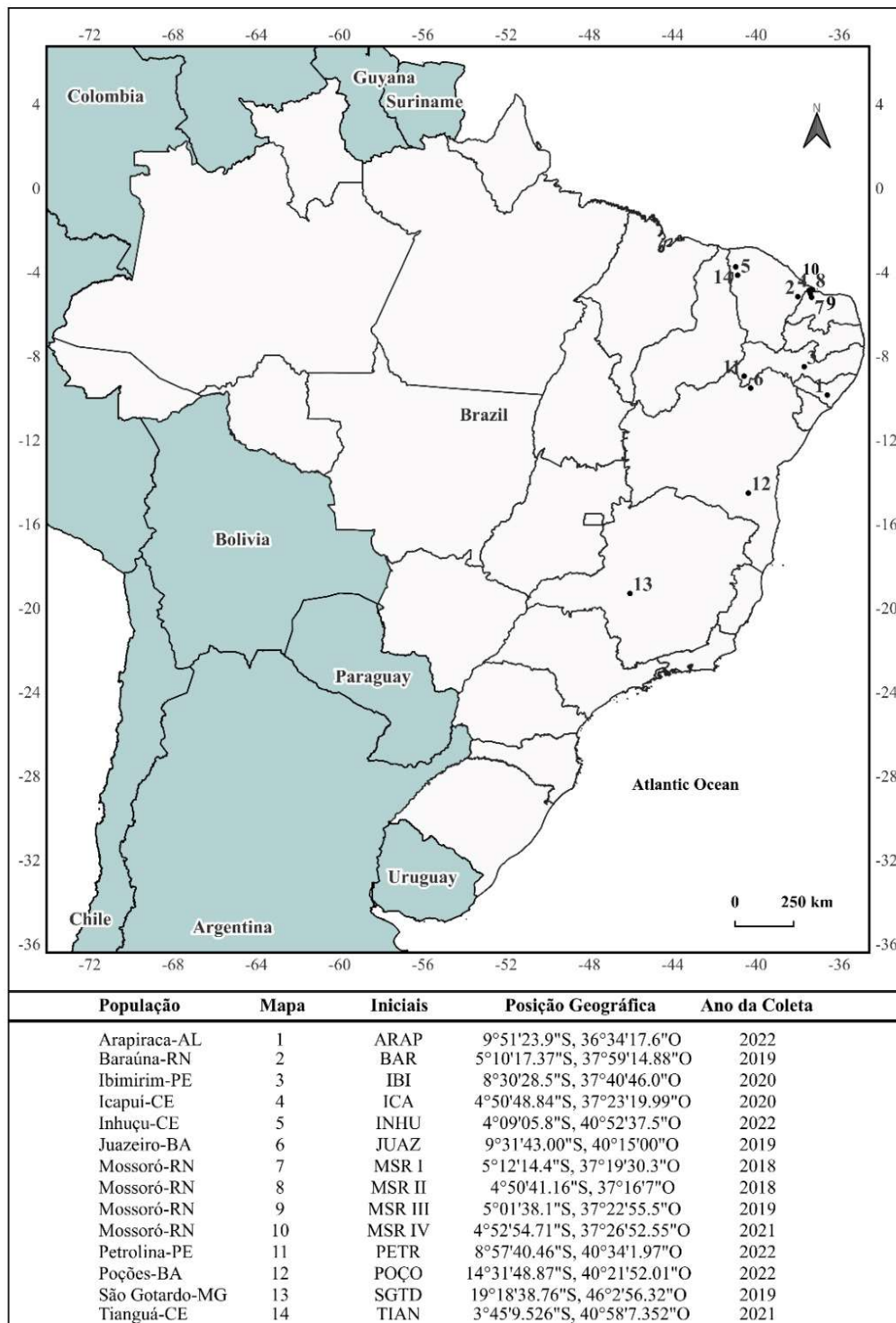


Figura 1. Locais de coleta das populações de *Liriomyza sativae* monitoradas.

1226 Tabela 2. Mortalidades corrigidas (%) ($\pm$ EP) de larvas de segundo ínstar de populações de
 1227 *Liriomyza sativae* expostas a concentração de rótulo do inseticida ciromazina. Temperatura: 25 ± 1
 1228 $^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa: $65 \pm 5\%$ e Fotofase: 12 horas.

População	N ¹	%MC $\pm$ EP ²	PFC ³
		(112,5 mg ciromazina/L)	
MSR IV-RN	160	49,58 $\pm$ 0,76	38,03
MSR II-RN	160	53,59 $\pm$ 0,48	33,01
MSR I-RN	160	55,83 $\pm$ 0,61	30,21
ARAP-AL	160	64,50 $\pm$ 0,41	19,38
MSR III-RN	160	71,15 $\pm$ 0,86	11,06
INHU-CE	160	72,39 $\pm$ 1,90	9,51
SGTD-MG	160	75,98 $\pm$ 0,71	5,03
BAR-RN	160	76,51 $\pm$ 1,16	4,36
ICA-CE	160	76,98 $\pm$ 1,48	3,78
TIAN-CE	160	80,47 $\pm$ 1,94	0,59
IBI-PE	160	81,51 $\pm$ 0,31	-1,89
JUAZ-BA	160	92,97 $\pm$ 0,37	-15,75

1229 ¹ Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ² Porcentagem de mortalidade corrigida e
 1230 Erro padrão. ³ Probabilidade de falha de controle calculado de acordo com Guedes (2017) – valores
 1231 de PFC < 0 indica baixo risco de falha de controle.
 1232

Tabela 3. Mortalidades corrigidas (%) ($\pm$ EP) de larvas de segundo ínstar de populações de *Liriomyza sativae* expostas a concentrações diagnóstica e de rótulo do inseticida ciantraniliprole. Temperatura: 25 ± 1 °C; Umidade Relativa: $65 \pm 5\%$ e Fotofase: 12 horas.

População	N ¹	% MC $\pm$ EP		PFC ⁴
		(10 mg i. a./L) ²	(100 mg i. a./L) ³	
IBI-PE	160	85,12 $\pm$ 0,62	96,61 $\pm$ 0,81	- 20,76
INHU-CE	160	98,40 $\pm$ 0,36	100	- 25,00
ARAP-AL	160	100	100	-25,00
BAR-RN	160	100	100	- 25,00
ICA-CE	160	100	100	- 25,00
JUAZ-BA	160	100	100	- 25,00
MSR I-RN	160	100	100	- 25,00
MSR II-RN	160	100	100	- 25,00
MSR III-RN	160	100	100	- 25,00
MSR IV-RN	160	100	100	- 25,00
SGTD-MG	160	100	100	- 25,00
TIAN-CE	160	100	100	- 25,00
POÇO-BA	160	100	100	- 25,00

¹ Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ² Porcentagem de mortalidade corrigida na concentração diagnóstica e Erro padrão. ³ Porcentagem de mortalidade corrigida na concentração de rótulo e Erro padrão. ⁴ Probabilidade de falha de controle calculado de acordo com Guedes (2017) – valores de PFC < 0 indica baixo risco de falha de controle.

Tabela 4. Mortalidades corrigidas (%) ($\pm$ EP) de larvas de segundo ínstar de populações de *Liriomyza sativae* expostas a concentrações diagnóstica e de rótulo do inseticida espinetoram. Temperatura: 25 ± 1 °C; Umidade Relativa: $65 \pm 5\%$ e Fotofase: 12 horas.

População	N ¹	% MC $\pm$ EP		PFC ⁴
		(10 mg i. a./L) ²	(50 mg i. a./L) ³	
INHU-CE	160	12,24 $\pm$ 0,74	72,40 $\pm$ 1,90	9,50
ARAP-AL	160	20,80 $\pm$ 0,73	35,47 $\pm$ 0,98	55,66
PETR-PE	160	25,18 $\pm$ 1,73	64,45 $\pm$ 0,86	19,44
TIAN-CE	160	94,74 $\pm$ 0,21	100	- 25,00
ICA-CE	160	100	100	- 25,00
IBI-PE	160	100	100	- 25,00
JUAZ-BA	160	100	100	- 25,00
MSR I-RN	160	100	100	- 25,00
MSR III-RN	160	100	100	- 25,00
MSR IV-RN	160	100	100	- 25,00
SGTD-MG	160	100	100	- 25,00
BAR-RN	160	100	100	- 25,00

¹ Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ² Porcentagem de mortalidade corrigida na concentração diagnóstica e Erro padrão. ³ Porcentagem de mortalidade corrigida na concentração de rótulo e Erro padrão. ⁴ Probabilidade de falha de controle calculado de acordo com Guedes (2017) – valores de PFC < 0 indica baixo risco de falha de controle.

Tabela 5. Suscetibilidade a ciromazina de larvas de segundo ínstar de populações brasileiras de *Liriomyza sativae*. Temperatura: 25 ± 1 °C; Umidade Relativa: 65 ± 5% e Fotofase: 12 horas.

Populações	N ¹	χ^2 (GL) (Prob.) ²	Inclinação ± EP ³	CL ₅₀ (IC95%) ⁴	RR ₅₀ (IC95%) ⁵
SGTD-MG	288	3,95 (7) (0,786)	0,67 ± 0,11	5,53 (2,55 – 10,63)	-
JUAZ-BA	288	2,18 (7) (0,949)	1,17 ± 0,12	6,44 (4,60 – 8,98)	1,17 (0,54 – 2,50)
IBI-PE	320	5,98 (8) (0,649)	1,64 ± 0,16	28,11 (21,62 – 37,16)	5,09 (2,43 – 10,64) *
MSR III-RN	288	1,99 (7) (0,960)	1,38 ± 0,16	32,76 (23,86 – 48,04)	5,93 (2,75 – 12,78) *
ICA-CE	320	2,31 (8) (0,970)	1,52 ± 0,14	38,90 (29,61 – 51,10)	7,04 (3,36 – 14,74) *
TIAN-CE	288	3,59 (7) (0,826)	1,54 ± 0,17	44,73 (33,20 – 60,13)	8,15 (3,76 – 17,63) *
MSR I-RN	288	2,03 (7) (0,958)	1,25 ± 0,11	56,57 (37,72 – 86,96)	10,24 (4,82 – 21,74) *
BAR-RN	320	5,45 (8) (0,709)	1,14 ± 0,11	57,86 (41,75 – 81,51)	10,47 (4,88 – 22,74) *
MSR II-RN	352	10,39 (9) (0,320)	1,24 ± 0,14	61,46 (38,09 – 95,62)	11,12 (5,11 – 24,18) *
ARAP-AL	320	3,46 (8) (0,902)	1,65 ± 0,16	72,88 (56,29 – 95,10)	13,19 (6,32 – 27,50) *
MSR IV-RN	320	5,38 (8) (0,716)	1,37 ± 0,13	86,61 (64,82 – 117,95)	15,67 (7,41 – 33,14) *

¹Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ²Qui-quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ³Inclinação das curvas e Erro padrão. ⁴CL₅₀ – concentração letal (mg de ciromazina/L) e Intervalo de confiança a 95%. ⁵Razão de resistência calculada por meio do método de Robertson et al. (2017) e limite de confiança a 95%. * Razão de resistência significativa a 5% de probabilidade se o intervalo de confiança não incluir o valor 1,0.

Tabela 6. Suscetibilidade a ciantraniliprole de larvas de segundo ínstar de populações brasileiras de *Liriomyza sativae*.
Temperatura: 25 ± 1 °C; Umidade Relativa: 65 ± 5% e Fotofase: 12 horas.

Populações	N ¹	χ^2 (GL) (Prob.) ²	Inclinação ± EP ³	CL ₅₀ (IC95%) ⁴	RR ₅₀ (IC95%) ⁵
BAR-RN	288	2,11 (7) (0,934)	1,46 ± 0,14	0,12 (0,09 - 0,16)	-
POÇO-BA	288	5,93 (7) (0,847)	4,04 ± 0,63	0,14 (0,12 - 0,17)	1,16 (0,83 – 1,62)
TIAN-CE	288	2,38 (7) (0,936)	1,54 ± 0,16	0,27 (0,20 – 0,36)	2,22 (1,49 – 3,33) *
INHU-CE	288	2,89 (7) (0,895)	2,35 ± 0,25	0,34 (0,28 – 0,43)	2,81 (1,96 – 4,02) *
SGTD-MG	283	1,28 (7) (0,989)	3,67 ± 0,66	0,34 (0,26 - 0,42)	2,79 (1,93 – 4,03) *
ARAP-AL	288	2,88 (7) (0,896)	1,55 ± 0,15	0,35 (0,26 - 0,46)	2,87 (1,97 – 4,27) *
MSR III-RN	288	0,89 (7) (0,996)	2,49 ± 0,33	0,37 (0,29 - 0,47)	3,05 (2,11 – 4,41) *
MSR I-RN	288	8,48 (7) (0,292)	8,29 ± 2,04	0,38 (0,27 - 0,48)	3,14 (2,25 – 4,46) *
MSR II-RN	288	5,96 (7) (0,544)	1,47 ± 0,15	0,40 (0,30 – 0,53)	3,29 (2,45 – 4,93) *
MSR IV-RN	288	6,29 (7) (0,506)	1,45± 0,14	0,48 (0,36 – 0,63)	3,88 (2,59 – 5,82) *
JUAZ-BA	250	6,18 (7) (0,519)	2,93 ± 0,48	0,57 (0,40 - 0,75)	4,67 (3,09 – 7,06) *
ICA-CE	280	1,19 (7) (0,991)	1,87± 0,24	0,66 (0,46 – 0,88)	5,35 (3,48 – 8,23) *
IBI-PE	320	2,73 (8) (0,950)	1,29 ± 0,12	0,91 (0,66 – 1,23)	7,45 (4,89 – 11,37) *

¹Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ²Qui quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ³Inclinação das curvas e Erro padrão. ⁴CL₅₀ – concentração letal (mg de clorantianiliprole/L) e Intervalo de confiança a 95%. ⁵Razão de resistência calculada por meio do método de Robertson et al. (2017) e limite de confiança a 95%. * Razão de resistência significativa a 5% de probabilidade se o intervalo de confiança não incluir o valor 1,0.

Tabela 7. Suscetibilidade a espinetoram de larvas de segundo ínstar de populações brasileiras de *Liriomyza sativae*. Temperatura: 25 ± 1 °C; Umidade Relativa: 65 ± 5% e Fotofase: 12 horas.

Populações	N ¹	χ^2 (GL) (Prob.) ²	Inclinação ± EP ³	CL ₅₀ (IC95%) ⁴	RR ₅₀ (IC95%) ⁵
MSR I-RN	288	2,29 (7) (0,942)	1,95 ± 0,25	0,03 (0,02 – 0,03)	-
SGTD-MG	291	7,28 (7) (0,400)	1,46 ± 0,28	0,11 (0,03 - 0,20)	3,47 (1,88 – 8,36) *
MSR III-RN	288	0,44 (7) (0,999)	2,55 ± 0,56	0,14 (0,08 - 0,19)	5,19 (3,19 – 8,43) *
JUAZ-BA	290	6,73 (7) (0,458)	2,12 ± 0,37	0,18 (1,11 – 0,24)	6,72 (4,25 – 10,62) *
ICA 1-CE	289	3,50 (7) (0,835)	1,65 ± 0,16	0,92 (0,71 – 1,19)	34,48 (23,63 – 50,32) *
TIAN CE	322	5,04 (8) (0,753)	1,50 ± 0,14	0,94 (0,71 – 1,23)	35,13 (23,80 – 51,85) *
IBI – PE	289	2,84 (7) (0,899)	1,50 ± 0,15	1,11 (0,84 – 1,47)	41,59 (28,17 – 61,41) *
MSR IV-RN	288	3,50 (7) (0,835)	1,54 ± 0,15	1,53 (1,17 – 2,02)	57,23 (38,86 – 84,30) *
BAR 1-RN	289	6,02 (7) (0,537)	1,42 ± 0,14	1,98 (1,49 – 2,68)	74,04 (49,59 – 110,54) *
ARAP-AL	320	2,79 (8) (0,947)	1,68 ± 0,16	17,78 (13,71 - 23,00)	665,80 (457,45 – 969,05) *
INHU-CE	320	2,89 (8) (0,941)	2,71 ± 0,32	44,16 (36,06 – 54,78)	1652,17 (1174,34 – 2324,43) *

¹Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ²Qui quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ³Inclinação das curvas e Erro padrão. ⁴CL₅₀ – concentração letal (mg de espinetoram/L) e Intervalo de confiança a 95%. ⁵ Razão de resistência calculada por meio do método de Robertson et al. (2017) e limite de confiança a 95%. * Razão de resistência significativa a 5% de probabilidade se o intervalo de confiança não incluir o valor 1,0.

1270

1271

1272 **CAPÍTULO 3**

1273 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA DA RESISTÊNCIA DE

1274 *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE) AO ESPINETORAM

1275

1276

1277 DANIEL L. PEREIRA¹

1278

1279

1280

1281

1282

1283 ¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua

1284 Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

1285

1286

1287

1288

1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

1298 ¹Pereira, D.L. Seleção e caracterização genética e bioquímica da resistência de *Liriomyza sativae*

1299 Blanchard (Diptera: Agromyzidae) ao espinetoram. A ser submetido ao Journal of Economic

1300 Entomology.

1301

RESUMO – *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) é uma praga polífaga que vem ganhando destaque no cenário mundial. Ataca plantas olerícolas, frutíferas e ornamentais. O espinetoram é o inseticida mais novo utilizado para o controle deste díptero fitófago. O seu uso em campo e em casa de vegetação tem apresentado um controle bastante efetivo. No entanto, relatos de falhas de controle estão sendo reportados. O objetivo do nosso estudo foi selecionar e desenvolver uma população para resistência a espinetoram e caracterizar a genética e bioquímica dessa resistência. As populações, MSR I-Sus e MSR II-Res, submetidas aos experimentos foram da região de Mossoró/RN e apresentaram variações significativas em resposta ao espinetoram, com razões de resistência baseadas nos valores das CL_{50} chegando a 4.219,80 vezes. Após pressões de seleção sucessivas com doses crescentes de espinetoram, a população resistente de Mossoró (MSR II-Res) mostrou o mais alto nível de resistência de 246,78 vezes até 46ª geração. A herdabilidade foi de 0,10 com aumento da resistência em 10 vezes de 18 gerações. A caracterização da resistência de *L. sativae* a espinetoram foi autossômica, incompletamente recessiva ou codominante e monofatorial ($\eta_E = 0,36 \pm 0,02$). Para que a resistência de *L. sativae* seja funcionalmente recessiva, recomendamos uma concentração de 60 mg espinetoram/L. Foi observado resistência cruzada com espinosade, porém a aplicação de espinetoram aumentou a toxicidade de cloridrato de cartape ($RR_{50} = 0,34$), indoxacarbe ($RR_{50} = 0,38$) e tiametoxam ($RR_{50} = 0,50$), indicando uma resistência cruzada negativa. Não houve uma associação direta dos níveis de resistência observados com a atividade enzimática de esterase e monooxigenases. Glutathione *S*-transferase parece estar envolvida com a resistência desta população de *L. sativae* a espinetoram.

PALAVRAS-CHAVE: Manejo integrado, controle químico, resistência genética, atividade enzimática, espinosina J e L.

ABSTRACT - *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) is a polyphagous pest that has been gaining prominence on the world stage. It attacks vegetable, fruit and ornamental plants. Spinetoram is the newest insecticide used to control this phytophagous dipteran. Its use in the field and in the greenhouse has shown very effective control. However, reports of control failures are being reported. The objective of our study was to select and develop a population for resistance to spinetoram and to characterize the genetics and biochemistry of this resistance. The populations, MSR I-Sus and MSR II-Res, submitted to the experiments were from the region of Mossoró/RN and showed significant variation in response to spinetoram, with resistance ratios based on CL_{50} values reaching 4,219.80-fold. After successive selection pressures with increasing doses of spinetoram, the resistant population from Mossoró (MSR II-Res) showed the highest resistance level of 246.78-fold up to 46th generation. Heritability was 0.10 with 10-fold increase in resistance from 18 generations. Characterization of *L. sativae* resistance to spinetoram was autosomal, incompletely recessive or codominant and monofactorial ($\eta E = 0.36 \pm 0.02$). For *L. sativae* resistance to be functionally recessive, a concentration of 60 mg spinetoram/L is recommended. Cross-resistance with spinosad was observed, but the application of spinetoram increased the toxicity of cartap hydrochloride ($RR_{50} = 0.34$), indoxacarb ($RR_{50} = 0.38$) and thiamethoxam ($RR_{50} = 0.50$), indicating negative cross-resistance. There was no direct association between the levels of resistance observed and the enzymatic activity of esterase and monooxygenases. Glutathione *S*-transferase seems to be involved in the resistance of this population of *L. sativae* to spinetoram.

KEYWORDS: Integrated management, chemical control, genetic resistance, enzymatic activity, spinosin J and L.

Introdução

As espinosinas, como espinosade e espinetoram, são moléculas inseticidas obtidas e fabricadas por fermentação da bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* e foram descobertos em 1997 e 2007, respectivamente (Mertz & Yao 1990). Atuam como moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos da acetilcolina (modo de ação único), com atividade baseada na ligação alostérica e agonista no receptor nicotínico da acetilcolina e também com efeito antagonista no receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) (Ramachanderan & Schaefer 2020). Elas têm apresentado resultados importantes no manejo de diversas pragas (Sparks *et al.* 2012). Casos de resistências, até o momento, já tinham sido relatados para o espinosade com 308 casos em 31 espécies de insetos e para espinetoram com 27 casos abrangendo sete espécies de insetos (APRD 2023). O espinetoram é o inseticida mais potente e com longa duração, porém não prejudicial para insetos não-alvo, tendo sido obtido pela síntese das espinosinas J e L (Ramachanderan & Schaefer 2020). Esta eficiência de espinetoram está ligada as características de solubilidade, hidrólise e fotólise, em que a espinosina J torna-se mais solúvel em água à pH 5,0 (423 mg/L) do que a espinosina L (1,63 mg/L), possuindo um tempo de vida de 154 dias dissolvido em água com pH variando até 7,0, porém o seu tempo de vida exposto em radiação solar em temperatura de 25°C é de aproximadamente 9 a 12 horas (IBAMA 2019). Neste cenário, o alto risco de evolução de resistência a espinetoram em função do uso frequente para o controle da mosca minadora ficou constatado neste trabalho (capítulo 2), quando os primeiros casos nesta espécie foram relatados em algumas populações, além de probabilidade de falhas de controle em 3 delas. O espinosade já possui 7 casos de resistência em moscas minadoras relatados por Ferguson (2004) no sul da Califórnia, e nenhum caso de resistência foi relatado para o espinetoram, que possui registro para *Liriomyza* spp. *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromizyidae) é conhecida como mosca minadora e suas injúrias e danos vêm aumentando drasticamente desde a década de 1940, quando o uso de

inseticidas sintéticos de largo espectro foram utilizados na América do Norte (Hills & Taylor 1951, Mason *et al.* 1987). Suas larvas podem causar perdas significativa de até 40% na produção (Fernandes 2004). Essas reduções na produção compreende plantios comerciais e tecnificados de hortaliças de elevado investimento financeiro, como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), melão (*Cucumis melo* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* L.), cebola (*Allium cepa* L.), melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) e alface (*Lactuca sativa* L.) (Guimarães *et al.* 2009, Costa-Lima *et al.* 2015).

O controle deste inseto-praga é realizado principalmente utilizando o controle químico logo no início do seu desenvolvimento biológico, implicando na redução das injúrias diretas e indiretas (Araujo *et al.* 2012). Até os anos de 1980, o número de pulverizações de inseticidas sintéticos para o controle de *Liriomyza* spp. não ultrapassava de três aplicações mensais, com intervalos de 7 a 10 dias para cada aplicação (Barbosa *et al.* 1983), sendo os inseticidas, o insumo que representa o maior custo por hectare em uma área de melão, superior a 21% do dispêndio (Brasil *et al.* 2007). Portanto, o aumento populacional de *L. sativae* têm relação direta com a sua elevada capacidade reprodutiva (Parrella *et al.* 1984) e a indiscriminada exposição frequente de inseticidas que contribui para o desenvolvimento mais acelerado da resistência (Fernandes 2004). Neste contexto, o inseticida espinetoram tem sido utilizado de forma frequente para mitigar e conter falhas de controle de *L. sativae* em diversas áreas de cultivos espalhadas pelo Brasil, pois representa uma importante ferramenta para compor um programa de manejo desta praga.

Fatores biológicos, genéticos e operacionais intensificam a evolução da resistência de insetos a inseticidas (Georghiou & Taylor 1977). Porém, uma vez controlados os fatores biológicos e operacionais, não existirá o fator genético. E quando negligenciados, poderá ocorrer um aumento na taxa da frequência de indivíduos resistentes quando há sobreposição de gerações. Logo, torna-se importante o conhecimento dos mecanismos da resistência e da situação da resistência cruzada

quando a resistência já tem evoluído (Keil & Parrella 1990). Portanto, a herança genética da resistência é fator importante para determinar se tem padrão de autossômica ou ligada a sexo, dominante ou recessiva e monogênica ou poligênica e bases bioquímicas que influenciam na evolução da resistência (Georghiou & Taylor 1977) em *L. sativae*. Para isso, uma população monitorada com espinetoram (MSR II-Res), em trabalhos de Santos (2020), foi separada com um baixo nível de tolerância e então selecionada para obtenção de altos níveis de resistência para este estudo.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi selecionar uma população de *L. sativae* resistente ao inseticida espinetoram, bem como demonstrar as bases genéticas e bioquímicas da resistência e as relações da resistência cruzada com outros grupos de inseticidas.

Material e Métodos

Criação e manutenção das populações. O modelo de criação foi adaptado utilizando a metodologia de Araujo *et al.* (2007), no qual os insetos foram acondicionados e mantidos no Laboratório de Interações Insetos – Tóxicos (LIIT) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife/PE) em gaiolas de 50 x 50 x 50 cm com tela antiafídeo onde as pupas e adultos emergidos de cada população foram liberados para acasalamento. Plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) foram utilizadas como hospedeiro alternativo para alimentação e oviposição, sendo retiradas e substituídas por plantas novas em um período de 24 horas, até o final de cada geração. Esponja embebida com solução de mel (10%) em recipientes de vidro foi fornecida aos adultos com esta fonte de alimento. As folhas infestadas com posturas foram acondicionadas em sala de criação durante a fase de desenvolvimento embrionário e estágio larval. As folhas foram cortadas com o auxílio de tesoura na região do pecíolo e colocadas em frasco âmbar contendo água

1419 e hipoclorito de sódio a 2% e foram acondicionadas em bandejas plásticas até a formação das pupas
1420 sob condições controladas com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h.

1421 **Inseticidas.** Espinetoram (Delegate[®] - 250 g i. a./Kg, grânulo dispersível, Corteva Agrisciences
1422 Industrial Ltda, São Paulo, Brasil), foi utilizado em todos os experimentos. Espinosade (Tracer[®] -
1423 480 g i. a./L, suspensão concentrada, Corteva Agrisciences Industrial Ltda, São Paulo, Brasil),
1424 abamectina (Vertimec 84 SC - 84 g i. a./L, suspensão concentrada, Syngenta Proteção de Cultivos
1425 Ltda, São Paulo, Brasil), azadiractina (Azamax - 12 g i. a./L, concentrado emulsionável, UPL do
1426 Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A., São Paulo, Brasil), cloridrato de
1427 cartape (Cartap BR 500 - 500 g i. a./Kg, pó solúvel, Sumitomo Chemical do Brasil Representações
1428 Ltda, São Paulo, Brasil), ciantraniliprole (Benevia[®] - 100g i. a./L, dispersão em óleo, FMC Química
1429 do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), ciromazina (Trigard[®] 750 WP - 750 g i. a./Kg, pó molhável,
1430 Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil), clorfenapir (Pirate[®] - 240 g i. a./L
1431 suspensão concentrada, Basf S.A., São Paulo, Brasil), clorpirifós (Klorpan 480 EC - 480 g i. a./L
1432 concentrado emulsionável, Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda, São Paulo, Brasil),
1433 fipronil (Regent[®] 800 WG - 800 g i. a./Kg grânulos dispersíveis, Basf S.A., São Paulo, Brasil),
1434 indoxacarbe (Avatar - 150 g i. a./L, concentrado emulsionável, FMC Química do Brasil Ltda, São
1435 Paulo, Brasil), lambdacialotrina (Karate Zeon 50 CS - 50 g i. a./L, suspensão de encapsulado,
1436 Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil), metoxifenoazida (240 g i. a./L, suspensão
1437 concentrada, Corteva, São Paulo, SP, Brasil) e tiametoxam (Actara[®] 250 WG - 250 g i. a./Kg
1438 granulado dispersível, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil) utilizados para o
1439 estudo do perfil de resistência cruzada (Tabela 1).

1440 **Adjuvante.** Para melhorar a eficiência dos inseticidas foi utilizado o adjuvante agrex'Oil[®]
1441 (Microquímica Tradecorp, Hortolândia, São Paulo, Brasil) a 0,05% (vol: vol) (óleo vegetal - 94%
1442 p/p). As folhas destinadas ao controle foram tratadas apenas com água + agrex'Oil[®].

1443 **Seleção de *L. sativae* a espinetoram.** A população denominada Mossoró II resistente - RN (MSR
1444 II-Res) foi exposta a concentrações crescentes do agroquímico espinetoram desde a quarta geração.
1445 A concentração inicial utilizada para seleção foi de 1 mg i. a./L. Esta concentração foi obtida em
1446 becker de 1 litro com água + 500 µL de Agrex'Oil® + 0,004 g do produto comercial Delegate®.
1447 Folhas, ainda em vasos, infestadas com larvas de *L. sativae* em estágio de segundo instar foram
1448 submetidas a seleção após 48 horas de retirada das gaiolas de criação. Em seguida, as folhas foram
1449 imersas na solução do inseticida durante cinco segundos até que todas as folhas e larvas fossem
1450 tratadas e colocadas para secar em temperatura ambiente e retornadas para a sala de criação, sendo
1451 esta seleção realizada a cada geração para obter uma nova concentração para pressão de seleção por
1452 meio de curvas concentração-resposta. Os indivíduos sobreviventes após os bioensaios de curva
1453 concentração-resposta retornavam para criação para dar continuidade a geração seguinte. O
1454 espinetoram é tóxico por contato e ingestão, mas aqui sua toxicidade foi testada apenas por contato.
1455 As médias das mortalidades da população MSR II-Res foram utilizadas da F₄ até F₄₆ para o cálculo
1456 da herdabilidade quando a pressão de seleção foi estabilizada em 160 mg espinetoram/L (0,64 g de
1457 Delegate®). A população referência de suscetibilidade (MSR I-Sus) foi mantida no laboratório após
1458 os estudos de suscetibilidade e sem exposição a inseticidas de qualquer grupo químico.

1459 **Bioensaios de concentração-resposta.** Os bioensaios foram conduzidos usando discos (2 cm
1460 diâmetro) de folhas de feijão de porco contendo uma larva de segundo instar de *L. sativae* conforme
1461 metodologia proposta por Santos (2020). As faixas de concentrações do inseticida espinetoram
1462 (Delegate®) foram estabelecidas para população resistente (0,625 a 640 mg i.a./L) e população
1463 sensível (0,0024 a 2,50 mg i. a./L) e foram diluídas com água + 0,05% de Agrex'Oil® e para o
1464 controle foi utilizada apenas água + 0,05% de Agrex'Oil®. Após o preparo das concentrações, discos
1465 de folhas de feijão de porco, contendo uma larva cada, foram excisados com perfurador (2 cm
1466 diâmetro), imersos então por cinco segundos em concentrações seriadas de inseticida e dispostos

em superfície plana revestida por folhas de papel até a secagem completa. Após a secagem, os discos foram transferidos com o auxílio de uma pinça para células de bandeja de bioensaio (*Bioassay tray*, modelo *Clear Rearing Tray*, Insectrearing, EUA), preenchidas previamente por discos de papel filtro umedecido com 150 µL de água potável. Uma bandeja com 32 células (repetição) compreendeu uma concentração e 9 a 10 concentrações foram usadas na maioria dos bioensaios, totalizando pelo menos 288 insetos por bioensaio. As bandejas foram vedadas com tampas de acetato transparentes A4 e microfilme plástico lateralmente para manter a turgidez das folhas. As bandejas de cada bioensaio foram acondicionadas em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura de 25 ± 1 °C, UR de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h. Após um período de 72 horas cada bandeja foi observado em lupa para verificação da mortalidade das larvas em cada disco de folha, seguindo o critério estabelecido no capítulo 2 deste estudo.

Genética da resistência de *L. sativae* ao espinetoram. Para caracterizar a herança da resistência de *L. sativae* ao espinetoram, larvas de segundo instar da população suscetível (MSR I-Sus) e resistente (MSR II-Res) foram submetidas a bioensaios de curvas concentração-resposta. Para testar se a herança desta resistência estava ligada ao sexo ou autossomal e se era dominante ou recessiva, cruzamentos recíprocos ($F_1 = \text{♀ RR} \times \text{♂ SS}$ e $F_1' = \text{♀ SS} \times \text{♂ RR}$) foram estabelecidos separando pupas das populações MSR II-Res e MSR I-Sus, individualizadas em microtubos de *Eppendorf* (500 µL de volume). Após a emergência, os adultos foram sexados com auxílio de uma lupa para visualização do ovíscaro da fêmea. Machos e fêmeas virgens das populações MSR II-Res e MSR I-Sus foram utilizados, perfazendo 500 (quinhentos) casais por cruzamento, dispostos em gaiolas separadas e identificadas (F_1 e F_1'). Larvas de 2º instar da geração F_1 e F_1' foram usadas para estimar curvas de concentração-resposta. Para testar se o modelo monofatorial estava associado à resistência ao espinetoram em *L. sativae*, dois retrocruzamentos (RC) foram conduzidos: o RC₁, 500 machos e 500 fêmeas virgens da progênie F_1 agrupado (F_1 e F_1') foram cruzados reciprocamente

com 500 fêmeas e 500 machos virgens da população parental resistente (MSR II-Res) e o RC₂, no qual a mesma quantidade de machos e fêmeas foram reciprocamente cruzados com o parental suscetível (MSR I-Sus). As larvas provenientes de RC1 e RC2 foram então expostas a concentrações (15) de espinetoram (mortalidade observada) iguais àsquelas usadas para estimar a mortalidade esperada (calculada pela fórmula $ME = \frac{1}{2} * (\%McF_1 + \%McP)$ em cada concentração, onde %McF₁ é a percentagem de mortalidade corrigida do heterozigoto e %McP é a percentagem de mortalidade corrigida do parental (suscetível ou resistente). Por fim, diferenças entre a mortalidade observada e esperada em cada concentração foram testadas usando Qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade com 1 grau de liberdade (teste direto). A dominância efetiva foi calculada utilizando doze concentrações (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 e 80 mg espinetoram/L) para a progênie F₁ e os parentais MSR II-Res e MSR I-Sus. As concentrações foram preparadas e diluídas em água juntamente com Agrex'Oil® a 0,05% e o tratamento controle com apenas água + agrex'Oil®. A mortalidade das larvas foi avaliada após 72 horas de exposição.

Resistência cruzada. A população Mossoró 2 selecionada para resistência (MSR II-Res) foi utilizada para estudar e verificar a existência de resistência cruzada com os inseticidas espinosade, abamectina, azadiractina, cloridrato de cartape, ciantraniliprole, ciromazina, clorfenapir, clorpirifós, fipronil, indoxacarbe, lambdacialotrina, metoxifenoizida e tiametoxam. Bioensaios para obtenção das curvas concentração-resposta foram conduzidos seguindo metodologia anterior usando larvas de 2º instar de *L. sativae*. Os dados de mortalidade foram analisados para estabelecer e comparar as concentrações letais médias (CL₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%)

Sinergismo da toxicidade do espinetoram. Testes preliminares com os inibidores enzimáticos, dietil maleato (DEM - 97%, dens. 1,067 g/mL, Sigma, Milwaukee, WI, EUA) para inibir glutathione S-transferase, butóxido de piperonila (PBO - 90%, dens. 1,059 g/mL, Sigma, Milwaukee, WI, EUA)

para inibir monooxigenases e trifetilfosfato (TPP - 99%, dens. 1,184 g/mL, Sigma, Milwaukee, WI, EUA) para inibir esterases, nas concentrações 100, 250, 500, 750 e 1000 mg/L, obtidos a partir de um estoque de 5000 mg/L para cada inibidor enzimático e o controle (água + adjuvante + acetona) foram realizados para definir a concentração final para os bioensaios de concentração-resposta para cada sinergista. A concentração encontrada nos testes foi de 750 mg/L para cada sinergista. Bioensaios como descritos acima foram realizados em seguida para investigar o envolvimento de enzimas destoxicativas na resistência de *L. sativae* ao espinetoram. Para tanto, larvas de 2º ínstar da população sensível (MSR I-Sus) e da resistente (MSR II-Res) foram expostas a bioensaios com espinetoram apenas e em associação: espinetoram + DEM, espinetoram + PBO e espinetoram + TPP. Os sinergistas foram primeiramente dissolvidos em acetona (10 mL) e em seguida diluídos na calda inseticida juntamente com agrex'Oil® a 0,05%. O tratamento controle compreendeu apenas sinergista + água + agrex'Oil®. Posteriormente, os discos de folhas de feijão de porco com larvas individualizadas foram imersos por cinco segundos em cada concentração contendo DEM, PBO ou TPP. Os dados de mortalidade foram avaliados após 72 horas de exposição com auxílio de um pincel e lupa microscópica, seguindo o critério e categorização estabelecido no capítulo 2 deste estudo.

Preparo de Amostras para Análise de Atividade Enzimática. Para avaliar o envolvimento de enzimas na metabolização do espinetoram, três amostras independentes das populações suscetível e resistente foram coletadas. Para avaliar atividade de esterases e glutathione *S*-transferases, 30 larvas de terceiro ínstar de *L. sativae* foram coletadas, enquanto para atividade de monooxigenases dependentes de citocromo P450 foram coletadas três amostras contendo 50 larvas cada, ambas populações. As amostras foram acondicionadas em microtubo (tipo *Eppendorf*) de 1,5 mL de capacidade. Para atividade de esterases, as larvas foram homogeneizadas em 400 µL de tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,2); para avaliar glutathione *S*-transferases as larvas foram

homogeneizadas em 400 µL tampão fosfato (0,1 M; pH 6,5) e para o ensaio de atividade de monooxigenases dependentes do citocromo P450, as amostras foram preparadas em 400 µL de tampão fosfato (0,1M; pH 7,5) + glicerol (20%) utilizando homogeneizador *Potter-Elvehjem* acondicionado em gelo. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos (16.000 ×g a 4°C) para esterases e glutathione *S*-transferases, e centrifugadas por 20 minutos (16.000 g a 4°C) para monooxigenases dependentes de citocromo P450. Em seguida, os sobrenadantes foram recuperados, aliquotados e preservados a -20°C até a determinação da atividade enzimática ou usados imediatamente. A proteína total de cada amostra foi determinada pelo método do ácido bicinonínico descrito por Smith *et al.* (1985) utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

Ensaio de esterase. A atividade de α-esterase e β-esterase foi determinada pelo método adaptado de Van Asperen (1962). Para reação foi utilizado 2 µL da solução estoque α-naftil acetato (25 mM) ou β-naftil acetato (25 mM) preparada em acetona, 10 µL de amostra e 188 µL de tampão fosfato de sódio por célula da microplaca. Em seguida, as amostras foram incubadas a 30°C por 15 minutos. A reação foi interrompida usando 33,2 µL de FAST Blue B a 0,3%. A absorbância foi lida em 595 e nm na leitora de microplaca (Elx800, BioTek®, Winooski, VT, USA). Cada amostra foi analisada em triplicata, as medidas ficaram compreendidas no total de nove repetições. A curva padrão foi preparada com α-naftol e β-naftol. A atividade de esterase foi expressa como $\mu\text{mol naftol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

Atividade de Conjugação por Glutathione *S*-transferases. Para esta avaliação foi utilizado o método empregado por Habig *et al.* (1974). A solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 150 mM) foi preparada em 1 mL de álcool etílico e a glutathione reduzida (10 mM) foi dissolvida em água ultrapura (usada no mesmo dia). Para a reação utilizou-se 138µL de tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,5), 10 µL da amostra e 150 µL de glutathione reduzida (10 mM). A pré-mistura ficou incubada

em banho maria a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, 2 µL de CDNB (150 mM) foi adicionado à reação e imediatamente a atividade de formação de 2,4-dinitrofenil-*S*-glutathiona foi analisada por espectrofotometria, a 340 nm. A reação passou por avaliação de 5 minutos com intervalo de leitura a cada 30s. Os dados de absorbância foram analisados em função do tempo de reação, após a adição do CDNB. A inclinação da reta (absorbância/min) foi transformada em unidade de concentração utilizando o coeficiente de extinção do CDNB (9,6 mM⁻¹.cm⁻¹).

Atividade de monooxigenases dependentes de citocromo P450 (*O*-desmetilase e *N*-desmetilase). A atividade de citocromo P450 foi determinada pela avaliação da *O*-desmetilação do substrato *p*-nitroanisol (O₂N-C₆H₄-O-CH₃) a *p*-nitrofenol. As reações foram realizadas por meio da mistura de 198,7 µL do tampão de ressuspensão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,5), 26,3 µL da amostra biológica, 2,5 µL de *p*-nitroanisol (150mM em etanol) e 12,5 µL de NADPH reduzido (9,6 mM). A mistura foi preparada em tubos tipo Eppendorf com capacidade volumétrica de 1 mL e incubada por 30 min a 30°C com 10 µL de HCl (1M) adicionado para a parada da reação e lidos a 405 nm em leitora de microplacas. Cada amostra foi analisada em triplicata. A atividade de citocromo P450 por amostra foi determinada baseada em curva padrão de *p*-nitrofenol e expressa como ηmol de *p*-nitrofenol.min⁻¹.mg de proteína. A atividade de citocromo P450 para determinar *N*-desmetilação foi realizada utilizando o substrato 4-cloro-*N*-metilanilina, pelo método de Kupfer & Bruggerman (1966), com adaptações. As reações foram realizadas por meio da mistura de tampão de ressuspensão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,5), amostra biológica da população MSR I-Sus e MSR II-Res, 2,5 µL de *p*-nitroanisol (150mM em etanol), 25 µL de NADPH reduzido (9,6 mM) e 25 µL de Tween 20⁺ a um volume de equivalente ao do substrato. A reação foi processada 16 min a 30°C com 10 µL de HCl (1M) adicionado para a parada da reação. A reação em mistura foi então centrifugada a 10.000 g por 15 min, e 200 µL do sobrenadante foram lidos a 450 nm em leitora de microplacas. Cada amostra foi analisada em triplicata. A atividade de citocromo P450 por amostra foi determinada

baseada em curva padrão de 4-cloro-anilina e expressa como nmol de 4-cloroanilina.min⁻¹.mg de proteína.

Análise dos dados. Em todos os experimentos nos quais foram feitos bioensaios de concentração-resposta, os dados de mortalidade de *L. sativae* foram submetidos a análise de Probit a $P > 0,05$ (Finney 1971) utilizando o programa Polo-Plus[®] (Leora-Software 2005) após correção pela mortalidade do tratamento controle usando a fórmula de Abbott (1925) e estimou-se as concentrações letais (CL_s). As razões de resistência e os respectivos intervalos de confiança (IC) a 95 % foram calculados de acordo com o método descrito por Robertson *et al.* (2017).

A herdabilidade foi estimada utilizando a fórmula $h^2 = R/S$, em que R é a resposta de seleção e S a seleção diferencial. A resposta de seleção (R) foi calculada pela fórmula $R = (L_f - L_i)/n$, onde L_f e L_i são os logaritmos das CL_{50s} das gerações F₃ e F₄₆ da população MSR II-Res e n corresponde ao número de gerações em seleção. A seleção diferencial (S) foi calculada pela fórmula $S = i \cdot \sigma_F$, em que i refere-se à intensidade de seleção e σ_F é o desvio padrão fenotípico. Para estimar o valor da intensidade de seleção utilizou-se o valor de p na tabela proposta por Falconer (1989) que corresponde ao percentual médio de sobreviventes ao longo da seleção. O desvio padrão fenotípico foi estimado utilizando a fórmula $\sigma_F = \frac{1}{2} \cdot (\beta_i + \beta_f)^{-1}$ (Finney 1971).

Para o cálculo do grau de dominância foi utilizado a fórmula (Tabashnik 1990):

$$D = \frac{(2\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} \text{ RS}) - \text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} \text{ RR}) - \text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} \text{ SS}))}{\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} \text{ RR}) - \text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} \text{ SS})}$$

Onde D é o grau de dominância, que pode variar de -1 a 1 (-1 = completamente recessiva e 1 = completamente dominante). Quando o valor do grau de dominância está entre $0 < D < 1$ a dominância é incompletamente dominante. Por outro lado, quando o valor do grau de dominância está entre $-1 < D < 0$ a dominância é incompletamente recessiva. Quando D é igual a 0, o heterozigoto suscetível é intermediário entre os valores de fenótipos homozigotos, não existindo

dominância (Stone 1968, Falconer & Mackay 1996). O erro padrão da dominância estimada foi calculado com base na fórmula da assíntota da variância das funções das variáveis aleatórias (Lehmann 1966), dessa forma, aplicando-se a raiz quadrada de:

$$\widehat{\text{var}}(D) = \frac{4}{(X_2 - X_1)^2} \left\{ \widehat{\text{var}}(X_3) + \frac{(X_3 - X_1)^2}{(X_2 - X_1)^2} \widehat{\text{var}}(X_2) + \frac{(X_3 - X_1)^2}{(X_2 - X_1)^2} \widehat{\text{var}}(X_1) \right\}$$

Onde X_1 , X_2 e X_3 é substituído na fórmula por $\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50})$ dos genótipos RR, RS e SS das populações de *L. sativae*, respectivamente. O erro padrão do grau de dominância foi usado para determinar se a dominância foi significativamente diferente de ± 1 (Preisler *et al.* 1990).

Para avaliar o número de genes (η_E) associados à resistência de *L. sativae* ao espinetoram foi utilizada a equação proposta pelo método de Lande (1981):

$$\eta_E = \frac{(\mu_{P2} - \mu_{P1})^2}{(8\delta s^2)} \leq \eta$$

Onde μ_{P1} e μ_{P2} são Log da CL_{50} da população suscetível (MSR I-Sus) e resistente (MSR II-Res), respectivamente. O número de gene é η e variância genética segregante extra do retrocruzamento da geração além do híbrido F_1 é δs^2 , que pode ser estimado por:

$$\delta s^2 = \delta^2_{B1} + \delta^2_{B2} - (\delta^2_{F1} + 1/2\delta^2_{P1} + 1/2\delta^2_{P2})$$

Onde δ^2_{B1} , δ^2_{B2} , δ^2_{F1} , δ^2_{P1} e δ^2_{P2} são a variância genéticas do retrocruzamento da população de *L. sativae* heterozigota (RS) e a população de *L. sativae* homozigota suscetível (SS), o retrocruzamento população de *L. sativae* heterozigota (RS) e a população de *L. sativae* homozigota resistente (RR), e a população parental da população de *L. sativae* heterozigota (RS) da F_1 , a população de *L. sativae* suscetível (SS) e população de *L. sativae* resistente (RR), respectivamente.

Os dados dos ensaios de atividade enzimática de esterase, glutathione *S*-transferase e monooxigenases dependentes de citocromo P450 foram analisados pelo software R 4.3.1 (R development core team 2019) utilizando o Teste t após verificar a normalidade dos dados com duas amostras não pareadas.

Resultados

Seleção e herdabilidade de *Liriomyza sativae* a espinetoram. A CL₅₀ da população MSR II-Res antes do início da seleção foi 0,36 mg espinetoram/L, após o estabelecimento da população em laboratório. Após as pressões de seleção que ocorreu a partir da quarta geração, observou-se aumentos crescentes na concentração de seleção até a quadragésima sexta geração (G46), a qual apresentou CL₅₀ de 88,27 mg espinetoram/L (Tabela 3). A razão de resistência aumentou em 246,78 vezes desde o início da seleção (Tabela 2). A herdabilidade senso curto (h^2) estimada para resistência de *L. sativae* ao espinetoram foi de 0,10. A resposta média geral estimada à seleção (R) por geração para *L. sativae* foi de 0,0556 (G = 18 gerações para um aumento de 10-vezes na CL₅₀) (Tabela 3).

Genética da resistência a espinetoram. As populações MSR II-Res e MSRI-Sus apresentaram respectivamente valores de CL₅₀ de 88,25 e 0,02 mg espinetoram/L e, portanto, a primeira apresentou uma razão de resistência de 4220 (2872 – 6201) vezes comparada à população suscetível. Os valores das CL₅₀ dos cruzamentos recíprocos, ou seja, da F₁ = ♀ RR x ♂ SS foi de 0,92 mg espinetoram/L e F₁' = ♀ SS x ♂ RR de 0,89 mg espinetoram/L. Portanto, valores de CL₅₀ não diferiram considerando a sobreposição dos intervalos de confiança (IC) (Tabela 4). As razões de resistência das progênes F₁ e F₁' também não diferiram com valores de 38,5 e 37,2 vezes, respectivamente. Para ambas as curvas, a hipótese nula de igualdade e paralelismo ($\chi^2 = 0,33$; G.L = 2 e $P > 0,05$ ($Prob. = 0,848$)) não foi rejeitada pelo teste conduzido no programa Polo-Plus®. A

mortalidade da progênie F₁ agrupado (F₁ + F₁') apresentou uma CL₅₀ de 0,90 mg i. a./L e uma razão de resistência de 37,85 (28,25 - 50,71) vezes (Tabela 4). Portanto, conclui-se que os genes ligados a resistência a espinetoram em *L. sativae* estão localizados nos cromossomos autossômicos (não está ligada ao sexo ou não possui origem maternal) (Tabela 4) (Figura 1).

Os valores dos graus de dominância dos cruzamentos recíprocos (F₁ e F₁') e da F₁ agrupada foram de -0,09, -0,10 e -0,10, respectivamente, indicando que a resistência da população MSR II-Res a espinetoram varia de incompletamente recessiva a codominante (Tabela 4) (Figura 1). Os dados apresentados da inclinação da reta para os retrocruzamentos, F₁ agrupado x MSR II-Res e F₁ agrupado x MSR I-Sus foram de $0,52 \pm 0,05$ e $0,73 \pm 0,06$, respectivamente, demonstrando diferenças significativas entre a população resistente MSR II-Res ($1,54 \pm 0,16$) e a suscetível MSR I-Sus ($1,84 \pm 0,22$) (Tabela 4).

O teste direto para estimar o modelo monofatorial da herança de *L. sativae* a espinetoram, utilizando valores de qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$) para as 14 concentrações testadas, possibilitou comparar a mortalidade observada e esperada dos indivíduos heterozigotos das progênies dos retrocruzamentos com os parentais, particularmente aquele fenotipicamente mais distante (MSR II-Res) (Tabela 5). A partir da concentração de 2,5 a 640 mg espinetoram/L a hipótese da herança monogênica não foi rejeitada, demonstrando valores de qui-quadrado não significativos para um efeito monogênico. Considerando as concentrações mais baixas, a mortalidade observada diferiu da esperada, sugerindo que nestas concentrações a sobrevivência de *L. sativae* pode também estar relacionada a um efeito poligênico. O número efetivo de genes que influencia a resistência de *L. sativae* ao espinetoram foi estimada em $\eta_E = 0,36 \pm 0,02$. A análise da dominância efetiva baseada nas concentrações testadas demonstrou que esta variou com as concentrações de espinetoram (Tabela 6), com a resistência tornando-se funcionalmente recessiva a partir da concentração de 60 mg espinetoram/L. A dose diagnóstica de 10 mg i. a./L e a dose de rótulo recomendada de 35 mg i.

a./L de espinetoram para controle de *L. sativae*, em meloeiro e tomateiro, apresentaram-se funcionalmente dominante ($h \geq 1,00$) (Tabela 6).

Perfil de resistência cruzada. A população resistente a espinetoram (MSR II-Res) mostrou uma baixa resistência cruzada com moléculas de grupos distintos de inseticidas (Tabela 7). A razão de resistência entre MSR II-Res e MSR I-Sus para espinetoram foi de 4220 vezes. A seleção com espinetoram revelou uma CL_{50} de 285,61 mg i. a./L para espinosade com um aumento na razão de resistência de 110,22 vezes quando comparado com a população sensível. Razões de resistência foram significativas para os inseticidas abamectina, metoxifenoazida, lambdacialotrina e ciantraniliprole (5,74; 4,20; 2,55 e 2,39 vezes, respectivamente), porém consideradas baixas resistências cruzadas com espinetoram. Por outro lado, razões de resistência significativamente menores que 1,0 foram encontrados para os inseticidas cartape (RR = 0,34 vezes), indoxacarbe (RR = 0,38 vezes) e tiametoxam (0,50 vezes), sugerindo uma resistência cruzada negativa. O mesmo ocorreu com os inseticidas azadiractina [0,73 (0,47 – 1,12)] e ciromazina [1,05 (0,71 – 1,55)], porém com valores não significativos, pois os limites de confiança compreendem o valor 1,0 (Tabela 7).

Sinergismo da toxicidade a espinetoram. Não houve diferença significativa na toxicidade *in vivo* de espinetoram com o acréscimo dos sinergistas PBO, TPP e DEM (0,030; 0,027; 0,023 e 0,027, respectivamente) para a população MSR I-Sus com razões de sinergismos entre 1,00 e 1,46 vezes (Tabela 8). No entanto, a população selecionada, MSR II-Res, apresentou valores de CL_{50} menores nos tratamentos espinetoram + inibidores enzimáticos (DEM = 50,16 mg i. a./L; TPP = 18,57 mg i. a./L e PBO = 9,58 mg i. a./L) em relação ao tratamento com apenas espinetoram (75,16 mg i. a./L), o que configura a ação dos sinergistas sobre o metabolismo destoxificativo de larvas de *L. sativae*. Os valores das razões de sinergismo para MSR II-Res foram de 7,85 vezes para PBO, 4,05 vezes para TPP e 1,05 vezes para DEM (Tabela 8). As razões de resistência sinergizadas de espinetoram + sinergistas (DEM; TPP e PBO) entre as populações MSR II-Res e MSR I-Sus foram de 1.890,

815 e 349 vezes, respectivamente, sugerindo que a resistência de *L. sativae* ao espinetoram está provavelmente associada ao metabolismo destoxificativo (Tabela 8).

Análise de atividade enzimática em *L. sativae*. Estatisticamente, a atividade *in vitro* de esterase com o substrato α -naftil acetato em *L. sativae* para as populações MSR I-Sus e MSR II-Res diferiram significativamente ($t = 3,62$; GL = 16 e $p = 0,002$). A atividade de esterase para o substrato β -naftil acetato para as populações MSR I-Sus e MSR II-Res, não diferiram entre si estatisticamente ($t = 1,63$; GL = 16 e $p = 0,122$). A atividade média específica de α -esterase para a população MSR I-Sus foi de 2,15 e para MSR II-Res foi de 1,56 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. A β -esterase, para a população MSR I-Sus, apresentou uma atividade média específica de 2,91 e MSR II-Res 2,54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Figura 2). A atividade da monooxigenase dependente do citocromo P450, *O*-desmetilase, para as populações MSR I-Sus e MSR II-Res não diferiram estatisticamente ($t = 0,51$; GL = 4 e $p = 0,635$), apresentando uma atividade média específica de 1,64 e 1,54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente (Figura 2). A atividade de *N*-desmetilase entre as populações MSR I-Sus e MSR II-Res não diferiram estatisticamente ($t = 0,03$; GL = 4 e $p = 0,980$) e apresentaram atividade média específica de 5,17 e 5,14 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente (Figura 2). A investigação da atividade de glutathione *S*-transferase apresentou uma atividade enzimática média específica de 118,61 e 139,22 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína para MSR I-Sus e MSR II-Res, respectivamente, demonstrando que estatisticamente são diferentes entre si ($t = -2,53$; GL = 16 e $p = 0,022$) (Figura 2).

Discussão

A resistência a inseticidas é atualmente um grande limitador da produção agrícola no mundo, porque sua evolução em campo tem sido cada vez mais frequente, o que causa falhas de controle de inseticidas frente às pragas. Com isso, as populações de praga atingem frequentemente o nível de dano gerando perdas na produção. Além disso, resistências prévias aumentam o risco de evolução para novas moléculas como o espinetoram, que é atualmente um dos principais inseticidas no manejo químico da *L. sativae* na cultura do meloeiro. Até o relato deste estudo (capítulo 2), a resistência desta praga não tinha sido reportada quando se observou níveis baixos de resistência a espinetoram nos primeiros levantamentos. Desta forma, seleção para resistência em população com baixo nível relativo de resistência foi conduzida em laboratório para uma avaliação dos riscos de evolução e posterior caracterização da resistência. A resistência a espinetoram evoluiu ao longo de 42 gerações alcançando aproximadamente 250 vezes comparado com a geração inicial de seleção. A herdabilidade realizada (h^2) estimada de 0,10; o que responde por 10% da variação genética aditiva (Falconer & Mackay, 1996), o que explica o desenvolvimento da resistência em laboratório, embora em número relativamente largo de gerações ($G = 18$, para um aumento de 10 vezes na resistência). Concentrações que matam por exemplo >90% das populações em campo são esperadas causar um aumento substancial na resistência em campo (Tabashnik, 1992) em *Leptinotarsa decemlineata* com $h^2 = 0,09$ após <15 gerações. Resultados semelhantes foram reportados em tripes que desenvolveram resistência ao espinetoram de 12 a 20 gerações em laboratório com herdabilidade estimada (h^2) em 0,13 e 0,25 (Fu *et al.* 2018, Fu *et al.* 2022). Desta forma, os resultados aqui observados sugerem expectativas similares, embora a variação ambiental entre dados de laboratório e campo dificulte a extrapolação de resultados ao campo. Mas, a herdabilidade realizada é importante por indicar o grau de risco de evolução para resistência em uma praga. Neste caso, aliado aos vários fatores ambientais na região Nordeste do Brasil, como altas temperaturas ao

longo do ano e aqueles associados à *L. sativae*, como alta fecundidade e ciclo de desenvolvimento, corroboram com a herdabilidade observada.

Quando comparada a resistência da população selecionada com a suscetível foi observado >4000 vezes, o que permitiu determinar suas bases genéticas. A resistência de *L. sativae* a espinetoram foi caracterizada como autossômica (sem efeitos maternos ou ligados ao sexo), variando de incompletamente recessiva a dominante e monofatorial. Este padrão de herança pode explicar a evolução de resistência relativamente rápida em condições de alta pressão. Resultado semelhante foi encontrado por Lira *et al.* (2020) em *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) que apresentou uma taxa de resistência de 1844 vezes e modo de herança autossômico e parcialmente recessivo, diferindo apenas no padrão poligênico para esta espécie. O espinetoram foi registrado no Brasil em 2014 e a resistência de *L. sativae* foi detectada em campo através de estudo numa população do município de Mossoró/RN, coletada em 2018, mas em nível baixo a moderado (Santos 2020). Desta forma, fatores como disponibilidade de refúgios na região de coleta e a dominância funcionalmente recessiva devido as concentrações de espinetoram aplicadas em campo podem ter contribuído para a evolução moderada no campo de melão. A dominância efetiva mostrou que a concentração 60 mg espinetoram/L torna a resistência de *L. sativae* funcionalmente recessiva, matando os heterozigotos (RS) e os homozigotos suscetíveis (SS). Então, sugere-se que a dose de 60 mg espinetoram/L seja utilizada como concentração discriminatória em programas de monitoramento da resistência ao espinetoram, identificando indivíduos fenotipicamente resistentes. O padrão de herança encontrado para as espinosinas pode variar em diferentes espécies de insetos de recessivo a dominante (Sparks *et al.* 2012), enquanto a recessividade favorece e mantém a eficácia do espinetoram no campo, o caráter dominante favorece a evolução da resistência, garantindo a sobrevivência de indivíduos heterozigotos resistentes logo após a aplicação dos inseticidas (Roush & McKenzie 1987).

Ao selecionar a população MSR II-Res e estudar sua resistência ao espinetoram, tornou-se importante obter informações que indique a relação desta resistência a mecanismo(s) de resistência para este inseticida, com o intuito de aprimorar um programa de manejo de resistência. De acordo com Sparks *et al.* (2012) a maioria dos estudos de resistência à espinosinas detalha mecanismo(s) relacionados ao sítio-alvo e destoxificação metabólica como os principais responsáveis por esta resistência e estar isolado para algumas espécies de insetos. Porém, de acordo com Scott (1999) e Scott (2023) uma classe inteira de inseticidas comercializados pode ser perdida se não houver uma compreensão das bases da evolução da resistência. Assim, é desejável uma adequada rotação de produtos tomando como informações o perfil de resistência cruzada (Sparks *et al.* 2012). Neste estudo, espinetoram apresentou resistência cruzada com espinosade, demonstrando que o uso comum destas duas espinosinas em conjunto é ineficaz para o manejo de populações resistentes de *L. sativae*. Além disso, isto sugere que um mecanismo principal pode estar associado à classe espinosinas, como alteração do sítio alvo ou metabolismo único a elas. Espinetoram não mostrou resistência cruzada com azadiractina, ciromazina, clorfenapir, clorpirifós e fipronil, mas baixas resistências cruzadas com abamectina, metoxifenoazida, ciantraniliprole e lambdacialotrina, o que pode estar associadas a metabolismo generalizado e aumentado com o processo de seleção. Este mesmo metabolismo pode estar associado ao aumento de toxicidade para outros inseticidas. Desta forma, a seleção com espinetoram de indivíduos de *L. sativae* para resistência aumentou a toxicidade dos inseticidas cloridrato de cartape, indoxacarbe e tiametoxam. Estas observações sugerem que a resistência selecionada na população MSR II pode estar associada a enzimas oxidativas e/ou hidrolíticas, usualmente associadas com a ativação destas moléculas (Wang *et al.* 2009). No entanto, o envolvimento enzimático na desintoxicação de espinetoram não ficou claro neste estudo, pois o sinergismo divergiu com as titulações das atividades enzimáticas. Portanto, pela natureza *in vivo* dos experimentos de sinergismo, o metabolismo oxidativo parece estar mais

envolvido com a resistência a espinetoram do que o hidrolítico que teria importância secundária. De acordo com Fahmy & Dahi (2009), esterases e GST não estão envolvidos no processo de desintoxicação do espinetoram. Fu *et al.* (2018) revelaram em experimento *in vivo* e *in vitro* que o mecanismo metabólico não está associado a resistência de *T. hawaiiensis* ao espinetoram. Embora a atividade de Glutathione *S*-transferase apresentou diferença significativa, mas divergiu do sinergismo. Apesar disto, esta diferença pode explicar a atividade de enzimas de fase I que podem produzir precursores para a atividade de GSTs e, portanto, não se pode descartar a importância de oxidases e esterases neste processo. Wei *et al.* (2013) descobriram o envolvimento glutathione *S*-transferase em populações de *L. sativae* resistentes a abamectina. Abamectina e espinetoram apresentaram a mais alta resistência cruzada depois do espinetoram, e essa atividade de GSTs pode estar associada com o fato de que elas compartilham estruturas similares como lactona macrocíclica (Lumaret *et al.* 2012).

A resistência de *L. sativae* à inseticidas pode se tornar uma grande ameaça para a região produtora e exportadora de melões do Brasil, tornando-se difícil o seu controle, reforçando a preocupação fitossanitária da rápida dispersão e disseminação de fenótipos de resistência. Com os resultados apresentados neste estudo, ferramentas de monitoramento como concentrações diagnósticas podem ser adotadas para precisar o momento adequado de rotacionar modos de ação. Por sua vez, inseticidas como azadiractina, ciantraniliprole, clorfenapir, hidrocloridrato de cartape e indoxacarbe seriam alternativas viáveis para controlar populações de *L. sativae* resistentes a espinosinas. Associado a estas práticas, fazer a manutenção de refúgios na região os quais sustentam populações suscetíveis da praga cujos fluxos são provavelmente altos na região para áreas tratadas devido às proximidades entre elas. Além disso, o uso de ferramentas de manejo integrado de pragas é importante para a manutenção das densidades no ponto geral de equilíbrio, e neste caso, uso de sistemas de amostragens, preservação de inimigos naturais, destruição imediata de restos culturais,

1824 implementação de vazios sanitários etc. pode reverter no longo prazo o *status* de praga chave na
1825 cultura do meloeiro, passando pela mitigação da evolução da resistência.

1827 Agradecimentos

1828 Agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), à fundação CAPES
1829 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Ministério da Educação) pelo
1830 suporte e concessão da bolsa, ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica e
1831 Desenvolvimento Tecnológico) pelo apoio na pesquisa.

1832 Literatura Citada

1833 **Abbott, W.S. 1925.** A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. J. Econ. Entomol.
1834 18: 265-267.

1835
1836 **APRD. 2023.** Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em:
1837 <https://www.pesticideresistance.org/>. Acesso em 15 de maio de 2023.

1838
1839 **Araujo, E.L., E.M. Costa, E.R. Moura Filho, C.H.F. Nogueira, & M.R.D. Santos. 2012.** Efeito
1840 de inseticidas sobre a mosca minadora (Diptera: Agromyzidae), quando aplicados durante a
1841 fase de ovo. J Agropecuária Científica no Semiárido 8: 18-22.

1842
1843 **Araujo, E.L., S.A.M. Pinheiro, L.D. Geremias, A.C.M. Netto, & L.P.M. Macedo. 2007.** Técnica
1844 de criação da mosca minadora *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). Rev.
1845 Campo Digital. 2: 22-26.

1846
1847 **Barbosa, S., F. França, & F. Puente. 1983.** Avaliação de germoplasma de batata (*Solanum*
1848 *tuberosum* L.) quanto a susceptibilidade ao ataque de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard.
1849 In: 23º Congresso Brasileiro de Olericultura, Rio de Janeiro, RJ.

1850
1851 **Brasil, A.M.S., K.C. de Oliveira, P.L. de Araújo Neto, & I.A. Nascimento. 2007.**
1852 Representatividade do custo de controle da mosca minadora na produção de melão: um
1853 estudo de caso na empresa Santa Júlia Agro Comercial Exportadora de Frutas Tropicais
1854 Ltda. In, Anais do 14º Congresso Brasileiro de Custos-ABC, João Pessoa, PB.

1855
1856 **Costa-Lima, T.C., A.C. SILVA, & J.R.P. Parra. 2015.** Moscas-minadoras do gênero *Liriomyza*
1857 (Diptera: Agromyzidae): aspectos taxonômicos e biologia. Embrapa Semiárido Documento
1858 268: 36 p.

- Fahmy, N. M., & H. F. Dahi. 2009.** Changes in detoxifying enzymes and carbohydrate metabolism associated with spinetoram in two field-collected strains of *Spodoptera littoralis* (Biosd.). J. Egypt. Acad. Biolog. Sci., F. Toxicol. & Pest. Control. 1: 17-26.
- Falconer, D.S. 1989.** Introduction to quantitative genetics, Longman, Scientific & Technical; Wiley, Burnt Mill, Harlow, Essex, England; New York. 187-208
- Falconer, D. S., & T. F. C. Mackay. 1996.** Introduction to Quantitative Genetics, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, Reino Unido. 4: 254-256.
- Ferguson, J.S. 2004.** Development and Stability of Insecticide Resistance in the Leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to Cyromazine, Abamectin, and Spinosad. J. Econ. Entomol. 97: 112-119, 118.
- Fernandes, O. 2004.** Melão: campo minado. Revista Cultivar 4: 26-27.
- Finney, D.J. 1971.** Probit Analysis, A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge, University Press, 333p.
- Fu, B., Q. Li, H. Qiu, L. Tang, D. Zeng, K. Liu, & Y. Gao. 2018.** Resistance development, stability, cross-resistance potential, biological fitness and biochemical mechanisms of spinetoram resistance in *Thrips hawaiiensis* (Thysanoptera: Thripidae). Pest. Manag. Sci. 74: 1564-1574.
- Fu, B., M. Tao, H. Xue, H. Jin, K. Liu, H. Qiu, S. Yang, X. Yang, L. Gui, Y. Zhang, & Y. Gao. 2022.** Spinetoram resistance drives interspecific competition between *Megalurothrips usitatus* and *Frankliniella intonsa*. Pest Manag Sci. 78: 2129-2140.
- Georghiou, G.P., & C.E. Taylor. 1977.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70: 319-323.
- Guimarães, J., M. Michereff Filho, V. Oliveira, R.S. Liz, & E.L. Araujo. 2009.** Biologia e manejo de mosca minadora no meloeiro. Brasília, Embrapa Hortaliças, 9 p. (Circular Técnica 77).
- 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.
- Hawkins, N.J., C. Bass, A. Dixon, & P. Neve. 2019.** The evolutionary origins of pesticide resistance. Biolog. Rev. 94: 135-155.
- Hills, O.A., & E.A. Taylor. 1951.** Parasitization of dipterous leaf miners in cantaloups and lettuce in the Salt River Valley, Arizona. J. Econ. Entomol. 44: 759-762.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2019.** Perfil Ambiental-Espinetoram CAS 935545-74-7. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e->

biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil_Espinetoram.pdf. Acesso em: 07 de julho de 2023.

Keil, C.B., & M.P. Parrella. 1990. Characterization of insecticide resistance in two colonies of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). J. Econ. Entomol. 83: 18-26.

Lande, R. 1981. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. Genetics 99: 541-553.

Lehmann, E.L. 1966. Testing statistical hypotheses. New York, Wiley: 369p.

LeOra-Software. 2005. POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOraSoftware, Petaluma, CA.

Lira, E.C., A. Bolzan, A.R. Nascimento, F.S. Amaral, R.H. Kanno, I.S. Kaiser, & C. Omoto. 2020. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. Pest. Manag. Sci. 76: 2674-2680.

Lumaret J.P., F. Errouissi, K. Floate, J. Römbke, K. Wardhaugh. 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. Curr. Pharm. Biotechnol. 13:1004-1060.

Mason, G.A., M.W. Johnson, & B. E. Tabashnik. 1987. Susceptibility of *Liriomyza sativae* and *L. trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to permethrin and fenvalerate. J. Econ. Entomol. 80: 1262-1266.

Mertz, F.P., & R.C. Yao. 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. J. Syst. Evolut. Microbiol. 40: 34-39

Orr, N., A.J. Shaffner, K. Richey, & G.D. Crouse. 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. Pestic. Biochem. Physiol. 95: 1-5.

Parrella, M., C.B. Keil, & J.G. Morse. 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii* (Leafminer, chrysanthemums). J. Calif. Agricul. 38: 22-23.

Preisler, H. K., M. A. Hoy, & J. L. Robertson. 1990. Statistical Analysis of Modes of Inheritance for Pesticide Resistance. J. Econ. Entomol. 83: 1649-1655.

Ramachanderan, R., & B. Schaefer. 2020. Spinosyn insecticides. ChemTexts 6: 20.

R Development Core Team. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. The R Foundation for Statistical Computing computer program, version By RDevelopmentCoreTeam, Vienna, Áustria.

Robertson, J. L., M. M. Jones, E. Olguin, & B. Alberts. 2016. Bioassays with Arthropods (3rd ed). CRC Press Taylor & Francis Group, 212 p.

1954
1955 **Roush, R. T., & J. A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance.
1956 na. Rev. Entomol. 32: 361-380.
1957
1958 **Santos, E. A. 2020.** Metodologia de bioensaio e avaliação da suscetibilidade de *Liriomyza sativae*
1959 Blanchard (Diptera: Agromyzidae) a inseticidas. Tese., Universidade Federal Rural de
1960 Pernambuco Programada de Pós-Graduação em Entomologia. 90 p.
1961
1962 **Scott, J. 2023.** Selection and Characterization of Spinetoram Resistance in Field Collected
1963 *Drosophila Melanogaster*. Pestic. Biochem. Physiol. 194: 105-508.
1964
1965 **Scott, J. G. 1999.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochem. Molec. Biol. 29:
1966 757-777.
1967
1968 **Smith, P. K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A. K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano,**
1969 **E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein
1970 using bicinchoninic acid. An. Biochem. 150: 76-85.
1971
1972 **Sparks, T.C., J.E. Dripps, G.B. Watson, & D. Paroonagian. 2012.** Resistance and cross-
1973 resistance to the spinosyns – A review and analysis. Pestic. Biochem. Physiol. 102: 1-10.
1974
1975 **Stone, B.F. 1968.** A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial
1976 inheritance of resistance to chemicals. Bull World Health Organ 38: 325-326.
1977
1978 **Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the Mode of Inheritance of Pesticide Resistance with
1979 Backcross Experiments. J. Econ. Entomol. 84: 703-712.
1980
1981 **Van Asperen, K. 1962.** A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method.
1982 J. Insect Physiol. 8: 401-416.
1983

1984 Tabela 1. Inseticidas utilizados no estudo.
1985

Inseticida	Grupo químico	Formulação	Grupo / Subgrupo	MoA ¹	Registro. ³
Espinetoram	Espinosinas	250 g i.a/Kg (WG)	5	Modulador alostérico de receptores nicotínicos da acetilcolina	Sim
Espinosade	Espinosinas	480 g i. a./L (SC)	5	Modulador alostérico de receptores nicotínicos da acetilcolina	Sim
Abamectina	Avermectina	84 g i. a./L (SC)	6	Modulador alostérico de canais de cloro mediados pelo glutamato	Sim
Azadiractina	Tetranortriterpenoide	12 g i. a./L (EC)	Desc.	Desc.	Não
Cartape	Análogo de nereistoxina	500 g i.a/Kg (SP)	14	Bloqueador de canais dos receptores nicotínicos da acetilcolina	Sim
Ciantraniliprole	Diamida	100 g i. a./L (OD)	28	Modulador de receptores de rianodina	Sim
Ciromazina	Triazinamina	750 g i.a/Kg (WP)	17	Disruptor da ecdise, Diptera	Sim
Clorfenapir	Análogo de Pirazol	240 g i. a./L (SC)	13	Desacoplador da fosforilação oxidativa via interrupção do gradiente próton	Sim
Clorpirifós	Organofosforado	480 g i. a./L (EC)	1B	Inibidor da acetilcolinesterase	Não
Fipronil	Fenilpirazol	800 g i.a/Kg (WG)	2B	Bloqueador de canais de cloro mediado pelo GABA	Não
Indoxacarbe	Oxadiazina	150 g i. a./L (EC)	22A	Bloqueador de canais de sódio dependente da voltagem	Não
Lambda-cialotrina	Piretroide	50 g i. a./L (CS)	3A	Modulador de canais de sódio	Sim
Metoxifenoazida	Diacilhidrazina	240 g i. a./L (SC)	18	Agonista de receptores de ecdisteroides	Não
Tiametoxam	Neonicotinoide	250 g i.a/Kg (WG)	4A	Modulador competitivo de receptores nicotínicos da acetilcolina	Não

1986 ¹ MoA – Modo de Ação, conforme o IRAC BR. ² Classificação toxicológica (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). ³ Registro no
1987 MAPA.

1988

Tabela 2. Seleção para resistência a espinetoram em *Liriomyza sativae* utilizando a população Mossoró II (MSR II-Res).

População (G)	N ¹	χ^2 (GL) (Prob.) ²	Inclinação $\pm$ EP ³	CL ₅₀ (IC95%) ⁴	CL ₉₉ (IC95%) ⁴	RR ₅₀ (IC95%) ⁵
MSR II (G3)	288	0,24 (7) (0,999)	2,38 $\pm$ 0,70	0,36 (0,09 – 0,56)	15,5 (9,1 – 37,2)	-
MSR II (G10)	288	7,46 (7) (0,383)	1,55 $\pm$ 0,15	1,18 (0,84 – 1,67)	37,0 (17,8 – 116,1)	3,2 (1,6 – 6,7) *
MSR II (G34)	288	6,16 (7) (0,521)	1,46 $\pm$ 0,17	11,9 (8,4 – 16,3)	471,4 (238,2 – 1350,6)	37,8 (15,8 – 90,5) *
MSR II (G36)	288	6,32 (7) (0,503)	2,03 $\pm$ 0,33	18,5 (11,8 – 25,2)	259,1 (149,9 – 701,3)	51,7 (24,0 – 111,5) *
MSR II (G37)	288	6,59 (7) (0,473)	2,52 $\pm$ 0,49	62,0 (42,9 – 79,7)	519,8 (303,4 – 1627,6)	173,3 (83,1 – 361,8) *
MSR II (G38)	288	3,56 (7) (0,829)	1,84 $\pm$ 0,23	75,0 (55,0 – 99,2)	1377,4 (768,0 – 3490,0)	209,0 (100,4 – 438,5) *
MSR II (G40)	288	3,72 (7) (0,811)	1,87 $\pm$ 0,19	83,5 (65,4 – 107,8)	1473,3 (857,4 – 3223,5)	233,6 (113,5 – 480,7) *
MSR II (G42)	288	3,93 (7) (0,788)	1,86 $\pm$ 0,19	85,2 (66,7 – 110,0)	1507,5 (875,2 – 3313,9)	238,3 (115,7 – 490,6) *
MSR II (G46)	288	3,41 (7) (0,845)	1,54 $\pm$ 0,16	88,3 (67,1 – 118,5)	2893,6 (1479,0 – 7733,4)	246,8 (118,4 – 514,5) *

1989

¹Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ²Qui quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ³Inclinação das curvas e Erro

1990

padrão. ⁴CL – concentração letal (mg de espinetoram/L) e Intervalo de confiança a 95%. ⁵Razão de resistência calculada por meio do

1991

método de Robertson *et al.* (2017) e limite de confiança a 95%. * Razão de resistência significativa a 5% de probabilidade se o intervalo

1992

de confiança não incluir o valor 1,0.

1993

1994 Tabela 3. Herdabilidade realizada (h^2) da resistência da população de *Liriomyza sativae* selecionada a espinetoram. (MSR II-
1995 Res).

Parâmetros	Gerações F3 – F46	
Estimativa da resposta diferencial	F3 – Log ₁₀ (CL ₅₀ inicial)	-0,444
	F46 – Log ₁₀ (CL ₅₀ final)	1,946
	Resposta de seleção (R) ¹	0,0556
Estimativa da seleção diferencial	Sobrevivência de indivíduos na dose de seleção (p%)	68
	Número de indivíduos testados na dose de seleção	100
	Intensidade de seleção (i) ²	1,118
	Inclinação Inicial	2,490
	Inclinação final	1,540
	Desvio padrão fenotípico (σ_p) ³	0,496
	Seleção diferencial (S)	0,555
	Gerações para aumento de 10 vezes na resistência (G)	18
	Herdabilidade senso curto (h^2)	0,100

1996 ¹ Resposta a seleção = Log da CL₅₀ final – Log da CL₅₀ inicial/número de gerações selecionadas. ² Intensidade de seleção (Falconer,
1997 1996). ³ Seleção diferencial = $\sigma_p \times i$.
1998

1999 Tabela 4. Toxicidade de espinetoram para população Suscetível (Sus), resistente (Res), dos cruzamentos recíprocos F1 (♀R x ♂S)
2000 e F1' (♀ S x ♂ R) e retrocruzamento (F1 agrupado x Res) e (F1 agrupado x Sus) de indivíduos de *Liriomyza sativae*.

População ¹	N ²	χ^2 (GL) (Prob.) ³	Inclinação $\pm$ EP ⁴	CL ₅₀ (IC 95%) ⁵	RR ₅₀ (IC _{95%}) ⁶	GD ₅₀ $\pm$ EP ⁷
MSR I-Sus	288	2,42 (7) (0,933)	1,84 $\pm$ 0,22	0,02 (0,01 – 0,03)	-	-
MSR II-Res	288	3,41 (7) (0,845)	1,54 $\pm$ 0,16	88,25 (67,05 – 118,9)	4219,8 (2871,6 – 6200,9)	-
♀R x ♂S (F ₁)	384	3,00 (10) (0,981)	1,32 $\pm$ 0,11	0,92 (0,69 – 1,23)	38,5 (27,0 – 55,0)	-0,09 $\pm$ 0,09
♀S x ♂R (F ₁ ')	384	10,21 (10) (0,422)	1,24 $\pm$ 0,10	0,89 (0,62 – 1,25)	37,2 (25,8 – 53,6)	-0,10 $\pm$ 0,09
F ₁ agrupado (F ₁ + F ₁ ')	768	9,48 (10) (0,487)	1,28 $\pm$ 0,08	0,90 (0,73 – 1,11)	37,9 (28,3 – 50,7)	-0,10 $\pm$ 0,09
F ₁ agrupado x MSR II-Sel	480	17,90 (13) (0,161)	0,52 $\pm$ 0,05	4,93 (2,40 – 10,13)	206,9 (115,0– 370,5)	-
F ₁ agrupado x MSR I-Sus	480	20,64 (13) (0,080)	0,73 $\pm$ 0,06	0,30 (0,17 – 0,54)	12,8 (8,1 – 20,2)	-

2001 ¹ Progenies resultantes dos cruzamentos recíprocos e retrocruzamento. ² Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ³ Qui
2002 quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ⁴ Inclinação das curvas e Erro padrão. ⁵ CL – concentração letal (mg de espinetoram/L) e
2003 Intervalo de confiança a 95%. ⁶ Razão de resistência calculada por meio do método de Robertson *et al.* (2017) e limite de confiança a
2004 95%. * Razão de resistência significativa a 5% de probabilidade se o intervalo de confiança não incluir o valor 1,0. ⁷ Grau de dominância.
2005

2006 Tabela 5. Teste direto para herança monogênica da resistência ao espinetoram em *Liriomyza*
 2007 *sativae*, comparando as mortalidades esperadas e observadas do retrocruzamento (F1 agrupado x
 2008 MSR II-Res).

Concentrações (mg/L)	Mortalidade observada (%)	Mortalidade esperada (%) ¹	χ^2
0,078	15,63	3,91	11,71 *
0,156	25,00	8,59	10,97 *
0,312	31,25	15,63	5,93 *
0,625	37,50	25,00	2,67 ^{ns}
1,25	46,88	30,47	4,07 *
2,5	50,00	37,50	2,13 ^{ns}
5	50,00	40,63	1,17 ^{ns}
10	53,13	49,22	0,20 ^{ns}
20	50,00	57,03	0,65 ^{ns}
40	50,00	64,06	2,75 ^{ns}
80	65,63	71,88	0,34 ^{ns}
160	81,25	81,25	0,05 ^{ns}
320	90,63	89,06	0,17 ^{ns}
640	100,00	96,88	1,03 ^{ns}

2009 ¹ Mortalidade esperada em cada concentração (mg/L) de espinetoram $x = 0,5$ (% mortalidade de F1
 2010 agrupado em $x +$ % mortalidade de MSR II-Res em x). ^{ns} não significativo e *significativo a 5% de
 2011 probabilidade. χ^2 , Qui-quadrado.
 2012

Tabela 6. Dominância efetiva para população suscetível (MSR I-Sus), resistente (MSR II-Sel), e progênie F₁ agrupado de populações de *Liriomyza sativae* submetidas a diferentes concentrações de espinetoram.

Concentrações (mg/L)	População ¹	N ²	Mortalidade (%) ³	Desempenho ⁴	(h) ⁵
10	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	0,00	1,00	1,00
	RR	32	0,00	1,00	-
15	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	0,00	1,00	1,00
	RR	32	0,00	1,00	-
20	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	9,40	0,91	1,17
	RR	32	21,80	0,78	-
25	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	9,40	0,91	1,21
	RR	32	25,00	0,75	-
30	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	15,63	0,84	1,17
	RR	32	25,00	0,75	-
35	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	15,63	0,84	1,17
	RR	32	28,10	0,72	-
40	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	18,75	0,81	1,23
	RR	32	34,40	0,66	-
45	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	37,50	0,63	0,95
	RR	32	34,40	0,66	-
50	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	84,40	0,16	0,24
	RR	32	34,40	0,66	-
60	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	100,00	0,00	0,00
	RR	32	43,75	0,56	-
70	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	100,00	0,00	0,00
	RR	32	43,75	0,56	-
80	SS	32	100,00	0,00	-
	RS	32	100,00	0,00	0,00
	RR	32	56,25	0,44	-

¹ SS, RS e RR são as populações suscetível (MSR I-Sus), heterozigota e resistente (MSR II-Res), respectivamente. ² Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ³ Mortalidade observada em cada bioensaio. ⁴ Desempenho corresponde a taxa de sobreviventes entre as populações suscetível (MSR I-Sus) e F₁ (RS), e a população resistente (MSR II-Res). ⁵ Valores de *h* variam entre 0 (recessividade completa) e 1 (dominância completa). A resistência é codominante ou aditiva se o valor de *h* corresponder a 0,5; incompletamente recessiva se estiver entre 0 < *h* < 0,5 e incompletamente dominante se estiver entre 0,5 < *h* < 1.

2025 Tabela 7. Perfil de resistência cruzada de espinetoram para a população suscetível (MSR I-Sus) e resistente (MSR II-Sel) de *Liriomyza*
2026 *sativae*.

População	Tratamento	N ¹	Inclinação ± EP ²	CL ₅₀ (CI95%) ³	χ ² (GL) (Prob.) ⁴	RR ₅₀ (CI95%) ⁵
MSR I-Sus	Espinetoram	288	1,84 ± 0,22	0,024 (0,01 – 0,03)	2,42 (7) (0,933)	-
	Espinosade	320	2,22 ± 0,24	2,59 (2,05 – 3,24)	3,86 (8) (0,870)	-
	Abamectina	320	1,26 ± 0,12	2,28 (1,68 – 3,11)	4,59 (8) (0,800)	-
	Azadiractina	288	1,17 ± 0,13	29,02 (20,57 – 40,35)	4,35 (7) (0,739)	-
	Cartape	320	1,51 ± 0,15	556,01 (422,61 – 744,52)	5,57 (8) (0,695)	-
	Ciantraniliprole	288	1,16 ± 0,17	0,20 (0,15 – 0,26)	1,99 (7) (0,960)	-
	Ciromazina	320	1,64 ± 0,15	33,40 (925,76 – 43,60)	5,66 (8) (0,685)	-
	Clorfenapir	320	1,05 ± 0,11	3,95 (2,76 – 5,60)	3,06 (8) (0,931)	-
	Clorpirifós	288	1,50 ± 0,18	0,24 (0,17 – 0,33)	2,75 (7) (0,907)	-
	Fipronil	288	2,42 ± 0,30	0,16 (0,19 – 0,30)	0,85 (7) (0,997)	-
	Indoxacarbe	288	1,37 ± 0,14	23,45 (17,49 – 31,85)	6,53 (7) (0,479)	-
	Lambdacialotrina	320	1,45 ± 0,13	260,67 (197,12 – 346,10)	6,41 (8) (0,601)	-
	Metoxifenoziata	288	1,22 ± 0,20	993,52 (604,06 – 2256,10)	1,99 (7) (0,960)	-
	Tiametoxam	320	1,44 ± 0,13	6,17 (4,66 – 8,27)	4,27 (8) (0,832)	-
MSR II-Res	Espinetoram	288	1,54 ± 0,18	88,25 (67,05 – 118,49)	3,41 (7) (0,845)	4220 (2872 – 6201) *
	Espinosade	320	2,18 ± 0,23	285,61 (228,13 – 359,67)	3,50 (8) (0,899)	110,22 (79,87 – 153,09) *
	Cartape	288	1,59 ± 0,16	191,47 (146,00 – 257,14)	6,93 (7) (0,436)	0,34 (0,23 – 0,51) *
	Indoxacarbe	320	1,25 ± 0,12	8,83 (6,45 – 12,01)	3,82 (8) (0,873)	0,38 (0,25 – 0,58) *
	Tiametoxam	320	1,47 ± 0,14	3,11 (2,16 – 4,39)	8,77 (8) (0,362)	0,50 (0,34 – 0,75) *
	Azadiractina	320	1,64 ± 0,16	21,14 (16,23 – 28,00)	4,51 (8) (0,808)	0,73 (0,47 – 1,12) <i>ns</i>
	Ciromazina	320	1,46 ± 0,14	35,09 (26,59 – 46,82)	4,05 (8) (0,853)	1,05 (0,71 – 1,55) <i>ns</i>
	Clorfenapir	320	1,46 ± 0,13	6,65 (5,04 – 8,77)	3,01 (8) (0,934)	1,68 (1,07 – 2,64) *
	Fipronil	320	1,85 ± 0,23	0,46 (0,34 – 0,60)	2,55 (8) (0,959)	1,89 (1,32 – 2,71) *
	Ciantraniliprole	288	2,07 ± 0,21	0,48 (0,38 – 0,60)	2,26 (7) (0,944)	2,39 (1,66 – 3,45) *
	Lambdacialotrina	416	1,63 ± 0,14	664,53 (522,17 – 871,93)	0,94 (8) (0,999)	2,55 (1,74 – 3,74) *
	Clorpirifós	288	2,08 ± 0,29	0,63 (0,45 – 0,81)	2,63 (7) (0,917)	2,57 (1,67 – 3,97) *
	Metoxifenoziata	288	1,07 ± 0,13	4173,65 (2834,86 – 6823,75)	2,99 (7) (0,886)	4,20 (1,98 – 8,93) *
	Abamectina	320	1,21 ± 0,12	13,06 (9,50 – 17,93)	5,98 (8) (0,649)	5,74 (3,68 – 8,95) *

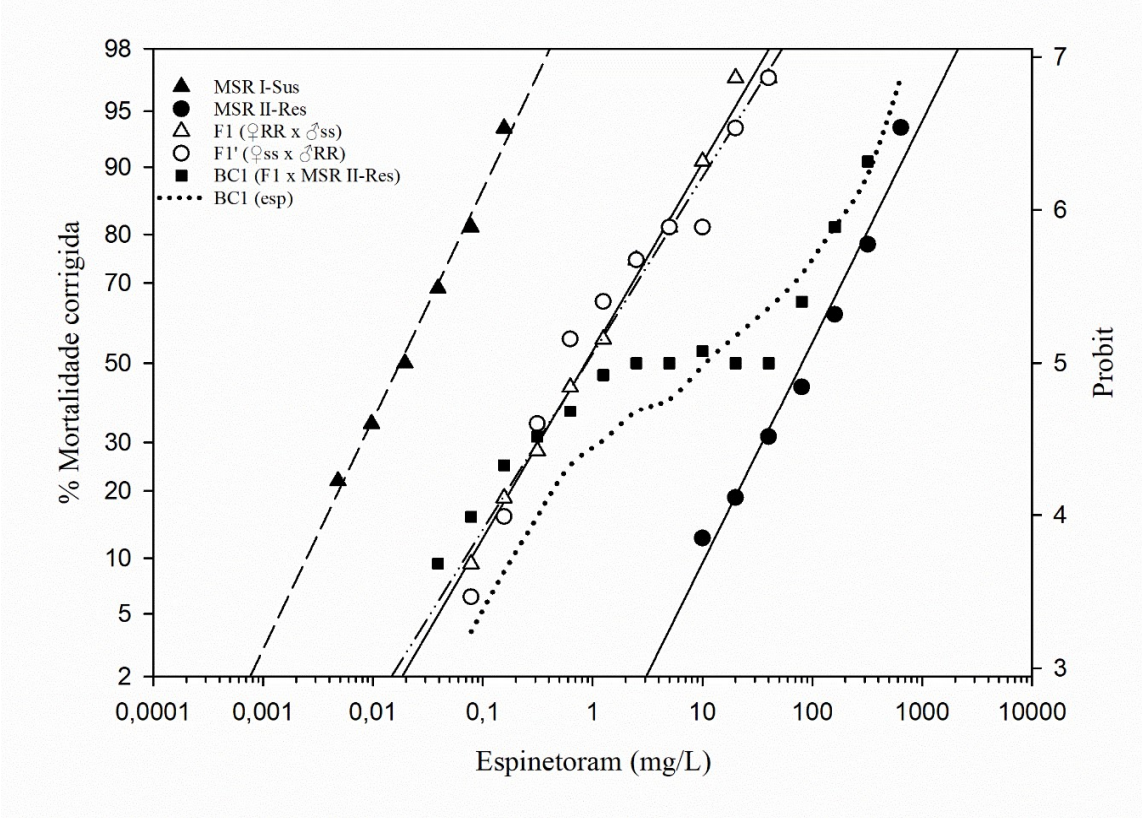
2027 ¹ Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ² Inclinação das curvas e Erro Padrão da média. ³ CL₅₀ – concentração letal (mg
2028 de i.a. espinetoram/Litro) que produz mortalidade. ⁴ Qui-quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ⁵ Razão de resistência: razão das
2029 estimativas da CL₅₀ entre a população resistente e suscetível, calculada pelo do método de Robertson *et al.* (2017) e limite de confiança
2030 a 95% das estimativas da CL₅₀. *Razão de resistência significativa, uma vez que limite de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 8. Sinergismo de espinetoram em população suscetível (MSR I-Sus) e resistente (MSR II-Res) de *Liriomyza sativae*.

População	Tratamento	N ¹	Inclinação ± EP ²	CL ₅₀ (IC95%) ³	χ ² (GL) (Prob.) ⁴	RS ₅₀ (IC95%) ⁵	RR _{S50} (IC95%) ⁵
MSR I-Sus	Espinetoram	320	1,28 ± 0,14	0,030 (0,020 – 0,040)	4,33 (8) (0,826)	-	-
	+ PBO	320	1,35 ± 0,15	0,027 (0,019 – 0,037)	2,80 (8) (0,946)	1,21 (0,76 – 1,92)	-
	+ TPP	320	1,34 ± 0,15	0,023 (0,016 – 0,031)	2,92 (8) (0,939)	1,46 (0,91 – 2,34)	-
	+ DEM	320	1,38 ± 0,15	0,027 (0,019 – 0,036)	4,11 (8) (0,847)	1,25 (0,79 – 1,98)	-
MSR II-Res	Espinetoram	320	2,06 ± 0,21	75,16 (59,68 – 95,17)	6,95 (8) (0,542)	-	2546 (1696 – 3821) *
	+ PBO	320	1,51 ± 0,17	9,58 (6,83 – 12,81)	2,41 (8) (0,966)	7,85 (5,32 – 11,59) *	349 (223 – 547) *
	+ TPP	352	1,51 ± 0,14	18,57 (14,17 – 24,46)	3,28 (9) (0,952)	4,05 (2,83 – 5,80) *	815 (527 – 1260) *
	+ DEM	320	1,33 ± 0,13	50,16 (37,34 – 68,24)	4,91 (8) (0,767)	1,50 (1,02 – 2,20) *	1890 (1218 – 2933) *

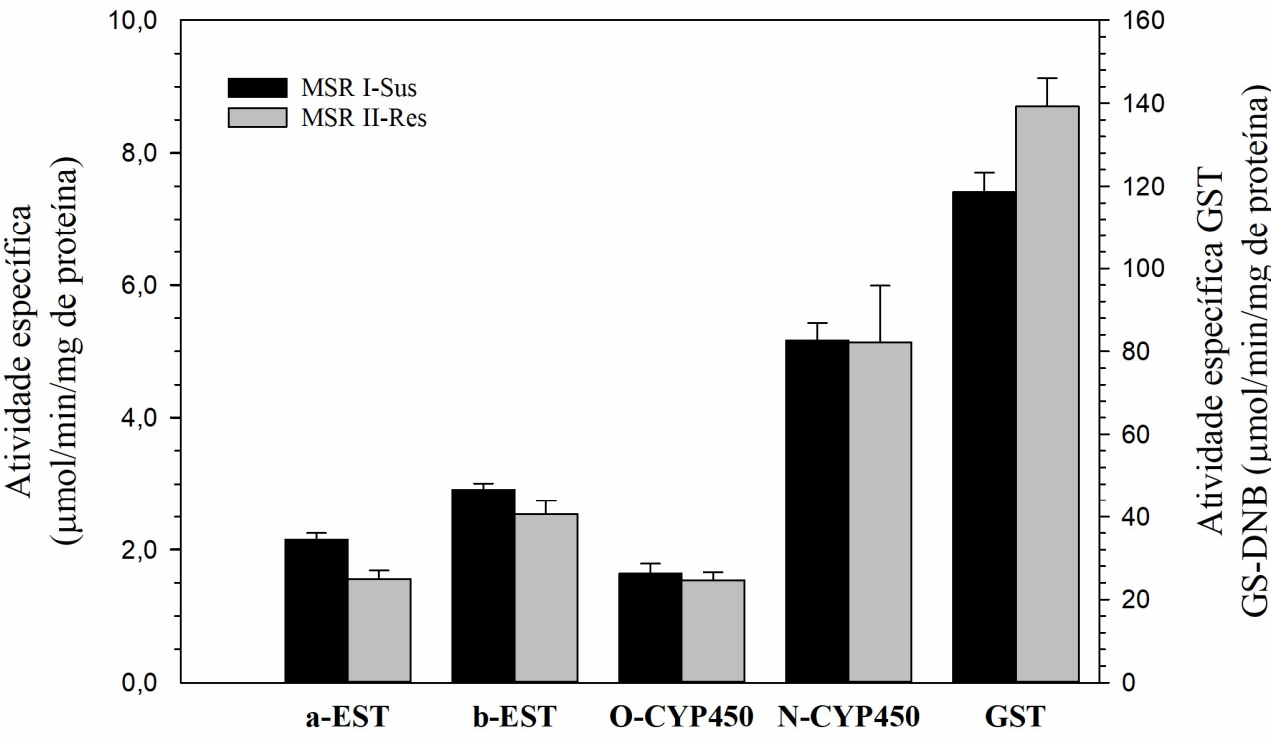
¹ Número total de larvas utilizadas em cada bioensaio. ² Inclinação das curvas e Erro Padrão. ³ CL₅₀ – concentração letal (mg de i.a. espinetoram/Litro) que produz mortalidade. ⁴ Qui-quadrado, Grau de Liberdade e Probabilidade. ⁵ Razão de sinergismo: relação entre a CL₅₀ não sinergizada e a CL₅₀ sinergizada para cada população e limite de confiança a 95%, calculado pelo método de Robertson *et al.* (2017). * Razão de sinergismo não significativo se o intervalo de confiança não inclui o valor 1,0. PBO – Butóxido de piperonila. TPP – Trifenilfosfato. DEM – Dietil maleato.

2038
2039
2040



2041
2042
2043
2044
2045
2046

Figura 1. Curva de concentração-resposta para as populações de *L. sativae* resistente (MSR II-Res), suscetível (MSR I-Sus) e progênie da F1 (♀RR x ♂ss e ♀ss x ♂RR) e mortalidades esperadas e observadas no retrocruzamento (F1 agrupado x MSR II-Res) quando submetidas ao espinetoram.



2048 Figura 2. Média ($\pm$ Erro Padrão) da atividade metabólica das enzimas de α -esterase ($t = 3,62$; GL
2049 = 16 e $p = 0,002$), β -esterase ($t = 1,63$; GL = 16 e $p = 0,122$), O -desmetilase ($t = 0,51$; GL = 4 e p
2050 = 0,635), N -desmetilase ($t = 0,03$; GL = 4 e $p = 0,980$) (escala a esquerda) e GST (Glutathione S -
2051 transferase) ($t = -2,53$; GL = 16 e $p = 0,022$) (escala a direita) das populações de *L. sativae*
2052 resistente (MSR II-Res) e suscetível (MSR I-Sus) à espinetoram.

2053

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de *Liriomyza sativae* no campo é realizado utilizando um número restrito de inseticidas registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Atualmente, o ciromazina, ciantraniliprole e o espinetoram são os mais utilizados. Populações deste inseto são constantemente pressionadas com inseticidas que usualmente são recomendados para outros insetos-praga em uma mesma área de cultivo, aumentando o risco de evolução para resistência. Isto ocorre devido ao descaso com a prática de rotação de inseticidas com modo de ação distintos, aplicações sucessivas e o uso de doses maiores que as recomendadas pela bula. Portanto, medidas devem ser tomadas para prolongar a eficiência das táticas de controle e aumentar vida útil destas moléculas. Assim, torna-se fundamental o uso de estratégias para monitorar continuamente a suscetibilidade, detectar níveis de resistências e estudos para caracterizar a resistência destas populações de *L. sativae* e para elaboração de um programa de manejo eficiente e proativo que integrem a conservação dos inimigos naturais no agroecossistema, a rotação de ingredientes ativos que não caracterize risco de resistência cruzada e utilização de áreas de refúgios para reestabelecimentos da suscetibilidade.

No nosso estudo foi utilizado métodos de bioensaios propostos por Santos (2020) para concentrações diagnósticas, concentrações recomendadas de rótulo e bioensaios com curvas de concentração-resposta para estimar a CL₅₀, e monitorar a resistência de *L. sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) a inseticidas (ciromazina, ciantraniliprole e espinetoram) no Brasil, além da caracterização das bases genéticas, resistência cruzada e o mecanismo bioquímico associados à resistência de *L. sativae* ao espinetoram, no qual uma das populações monitoradas apresentou um nível baixo de tolerância e foi selecionada e desenvolvida para resistência. Os dados referentes ao monitoramento da resistência de *L. sativae* aos inseticidas, demonstraram aumentos significativos na suscetibilidade das populações, apresentando altas porcentagens de sobrevivência nas

concentrações diagnóstica e nas concentrações de rótulo para os inseticidas ciromazina e espinetoram, exceto para ciantraniliprole em as populações testadas foram altamente suscetíveis. Estes inseticidas não apresentaram relação de resistência cruzada entre eles. Portanto, estratégias de manejo devem ser cuidadosamente adotadas com o objetivo de detectar possíveis falhas de controle e para mitigar a evolução da resistência e restabelecer a suscetibilidade. A herança genética da resistência de *L. sativae* ao espinetoram foi autossômica, incompletamente recessiva e monofatorial. Estas características podem favorecer uma rápida resistência. A concentração de 60 mg espinetoram/L é a que torna a resistência ao espinetoram funcionalmente recessiva, controlando indivíduos homozigotos suscetíveis e heterozigotos suscetíveis. A nossa pesquisa também averigou o possível perfil de resistência cruzada - quando indivíduos de uma população resistente são selecionados não somente por um inseticida - do espinetoram entre inseticidas de diferentes grupos químicos e ao espinosade, revelando apenas resistência cruzada com espinosade e resistência cruzada negativa com indoxacarbe, tiametoxam e cartape. Este espinosoide pode ser utilizado em associação com outras moléculas e outras táticas de controle.

Em virtude dos fatos, nossos resultados evidenciaram um alto risco de evolução da resistência e vale lembrar que, espinetoram, apesar do pouco tempo de uso, ainda representa uma excelente opção no manejo de *L. sativae*, porém não haviam estudos que caracterizassem a resposta desta molécula quanto à herança genética da resistência, metabolismo e resistência cruzada ou múltipla com outros inseticidas para *L. sativae*, porém, o monitoramento deve ser realizado de forma contínua para compreender a dinâmica da resistência.