

ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA À LAMBDA-CIALOTRINA EM *Eriopis connexa*

(GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

ALICE SUTANA RODRIGUES

(Sob Orientação do Professor Jorge Braz Torres - UFRPE)

RESUMO

No presente trabalho, foi estudada a estabilidade da resistência de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae) à lambda-cialotrina. Uma subpopulação (R-NSEL), oriunda de população resistente, foi mantida sem pressão de seleção ao longo de oito gerações, tendo como referência as populações resistente (R-SEL) e suscetível (SUS). A razão de resistência (RR) reduziu 2,10x para R-NSEL em relação a R-SEL, na quarta geração sem pressão de seleção, porém mantendo sem alteração na oitava geração sem pressão de seleção. Também, na oitava geração foi observada redução da atividade de α e β esterases em R-NSEL. Contudo, a redução da resistência em R-NSEL não foi suficiente para caracterizá-la como suscetível, pois ainda exibiu RR de 39x em relação à SUS. Apesar da redução na RR e produção de esterases, a fecundidade de R-NSEL manteve-se ~50% menor que SUS. Ainda nesse estudo, a suscetibilidade de uma população de *E. connexa* recentemente coletada (SUS-C) foi caracterizada e avaliado o desempenho da progênie do cruzamento SUS-C×R-SEL. A população SUS-C foi ~200x mais suscetível que R-SEL. O desenvolvimento de larva a adulto para SUS-C foi prolongado, em média, 6 dias e os adultos produzidos foram menores que de R-SEL e da progênie de SUS-C×R-SEL. A fecundidade

monitorada durante 35 dias, não foi diferente estatisticamente, embora fêmeas SUS-C e das progênes dos respectivos cruzamentos produziram mais de 130 ovos que fêmeas R-SEL, neste período. A exposição ao resíduo seco de lambda-cialotrina resultou em 77,4 a 100% de sobrevivência para adultos das progênes de SUS-C×R-SEL e população de referência R-SEL, enquanto adultos SUS e SUS-C não sobreviveram. Os resultados mostram que a população R-SEL apresenta resistência estável após oito gerações sem pressão de seleção, e que o cruzamento de indivíduos R-SEL e SUS-C traz benefícios quanto a sobrevivência e reprodução comparado aos custos impostos pela resistência ao parental R-SEL, mas mantém sua característica de resistência ao inseticida.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência a inseticidas, piretroides, inimigo natural, custo adaptativo, seleção artificial.

STABILITY OF LAMBDA-CYHALOTHRIN RESISTANCE IN THE LADY BEETLE *Eriopis connexa* (GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

by

ALICE SUTANA RODRIGUES

(Under the Direction of Professor Jorge Braz Torres - UFRPE)

ABSTRACT

In the current study was investigated the stability of the resistance to lambda-cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). One resistant population (R-SEL) was maintained under selection pressure, while one subpopulation from R-SEL was reared without selection pressure (R-NSEL) during eight generations and compared with R-SEL and the population reference for susceptibility (SUS). The resistance ratio (RR) declined 2.10-fold for R-NSEL at 4th-generation after relieving the selection pressure, but maintained stable after when determined at 8th-generation compared to R-SEL. Likewise, alpha and β sterases activity measured at 8th-generation also declined in R-NSEL. The decreased in the resistance of R-NSEL observed at 8th-generation after relieving selection pressure was not enough to return to the susceptibility status (39-fold RR compared to SUS). The decline in the resistance level and activity of detoxifying enzymes did not reimburse the fecundity, which still being ~50% lower for females R-NSEL compared to females SUS. Yet, in the current study was characterized the susceptibility of a recently field-collected population of *E. connexa* (SUS-C), what allowed to investigating the performance of SUS-C \times R-SEL progenies. The RR was ~200-fold between R-

SEL and SUS-C. Furthermore, developmental time from larva to adult for SUS-C was 6 days delayed and adults were smaller compared to R-SEL and to the progenies from SUS-C×R-SEL. The egg production did not differ across parental populations and progenies, although numerically females from SUS-C and progenies from SUS-C×R-SEL produced more than 130 eggs, tallied during 35 days, than females R-SEL. Survival of adults from R-SEL and progenies from SUS-C×R-SEL, exposed to dried residues of lambda-cyhalothrin, varied from 77.4 to 100%, while adults from SUS and SUS-C exhibited null survival. Our data suggest that R-NEL exhibited stable resistance to lambda-cyhalothrin after eight generations without selection pressure. Furthermore, progenies from SUS-C×R-SEL gain benefits regarding development and reproductive output, and still owning resistance level enough to survive insecticide exposure similarly to their parental R-SEL.

KEY WORDS: Resistance to insecticides, pyrethroids, natural enemy, adaptive cost, artificial selection.

ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA À LAMBDA-CIALOTRINA EM *Eriopsis connexa*
(GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

ALICE SUTANA RODRIGUES

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

RECIFE – PE

Julho – 2019

ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA À LAMBDA-CIALOTRINA EM *Eriopsis connexa*

(GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

ALICE SUTANA RODRIGUES

Comitê de Orientação:

Jorge Braz Torres – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Raul Narciso Carvalho Guedes – UFV

ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA À LAMBDA-CIALOTRINA EM *Eriopis connexa*

(GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

ALICE SUTANA RODRIGUES

Orientador: _____
Jorge Braz Torres – UFRPE

Examinadores: _____
José Dijair Antonino de Souza Junior –UFRPE

Roberta Ramos Coelho – UFRPE

Agná Rita dos Santos Rodrigues – IF Goiano

Christian Sherley Araújo da Silva Torres – UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Paulo Rodrigues* e *Maria José Sutana da Trindade Rodrigues* pela
educação, criação e amor.

Dedico

A minha afilhada *Manuella Vitória Furtado Fernandes* e a *Penélope*.

*“Reconhecer, significa conhecer a mim mesmo. Eu preciso me ver naquilo que faço. Do
contrário eu não me realizo.”*

Mario Sergio Cortella

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa e financiamento de projetos, contribuindo para o desempenho da pesquisa no nosso país.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA).

A Deus, o qual agradeço todos os dias pela minha vida e pela vida da minha família. Por me dar forças para conseguir vencer mais uma etapa dos tantos objetivos que tracei.

A Nossa Senhora Aparecida, que por tantas vezes orei, pedindo forças, discernimento e paciência para continuar.

A meus pais, Paulo e Maria, por me acompanharem em mais um sonho, sempre priorizar a minha educação! Nós conseguimos, o maior presente que me deram é ser sua filha de vocês!

A Penélope, minha cachorrinha, pelo carinho, amor, travessuras e companhia aos longos dos anos em Recife-PE.

Aos meus primos Rafaella, Ramon e Ângelo que nos meus momentos de ausência, com meus pais, sempre me socorreram e solucionaram os problemas. E aos demais familiares da grande família Rodrigues.

As minhas amigas de longa data, Viviane Furtado e Bárbara Rezende pela amizade a mais de 20 anos e por me darem a honra de ser madrinha das minhas pequenas, Manuella e Amanda.

Ao professor, orientador e AMIGO, Jorge Braz Torres, um agradecimento especial pelos ensinamentos, confiança, dedicação e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico, em especial; Deividly Nascimento, Roberta Leme e Paulo Barbosa pela amizade e ajuda.

Aos professores do PPGA pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação e paciência, em especial ao professor Herbert Siqueira e a Professora Christian Torres.

As boas amizades que o PPGA me propiciou: Priscilla Costa, René Luna, Alessandra Guedes, Jonhosson Guilherme, Tamara Leal, Tayron Amaral, Lucas Arruda, Guilherme Rolim, Andrezo Santos, Rian Moraes, Daniel Passos, Nane Santos.

Ao professor Raul Guedes, pela orientação ao longo dos anos, pelo profissionalismo, dedicação e amizade e o grande “Team Raul” grupo de amigos e de trabalho do Laboratório de Eco toxicologia de Inseticidas, da UFV, coordenado pelo Prof. Raul Guedes. Pela amizade, troca de conhecimentos, resoluções de problemas, desde 2008, vocês são especiais em minha vida e contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal.

As minhas mentoras da Entomologia, Juliana Augustin, Priscilla Lara, Sharrine Oliveira e Karina Vilca, vocês me mostraram como o mundo dos insetos é fascinante. Obrigada por despertarem a minha paixão, por me ensinarem a fazer pesquisa e por torcerem tanto por mim.

Ao grupo seleta Meninas Super Poderosas, hoje, Mulheres Super Poderosas, pelos anos de amizade, companheirismo e encontros especiais na nossa querida Tocantins- MG.

Aos amigos, da amada Viçosa viciosa, especialmente: Natalia Tanure, Tiago Marques, Bruno Guimarães, Diego Gonzaga, Bethânia Barros, Carolina Castro, Linamara Moreira, Juliana Vieira. Sou muito grata pelos anos de diversão, viagens, encontros, companheirismo, comilança e amor. Vocês me ajudaram muito ao longo desses anos e cada reencontro foi mais que especial e inesquecível.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Resistência de insetos.....	4
Resistência de inimigos naturais a inseticidas.....	6
Joaninhas predadoras	8
Custo adaptativo associado à resistência.....	12
Relevância do trabalho	13
LITERATURA CITADA.....	15
2 A RESISTENCIA DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Eriopis connexa</i> (GERMAR) (COLEOPTERA:COCCINELLIDAE) À LAMBDA-CIALOTRINA ESTÁ ESTABILIZADA?	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	36
AGRADECIMENTOS.....	41
LITERATURA CITADA.....	41

3	DESEMPENHO DE <i>Eriopis connexa</i> (GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) DO CRUZAMENTO DE PARENTAIS SUSCETÍVEL E RESISTENTE A LAMBDA-CIALOTRINA	50
	RESUMO	51
	ABSTRACT	52
	INTRODUÇÃO	53
	MATERIAL E MÉTODOS	56
	RESULTADOS.....	61
	DISCUSSÃO.....	64
	AGRADECIMENTOS.....	68
	LITERATURA CITADA.....	68
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Embasados pela teoria de Malthus de 1789, de que a população humana iria se extinguir por falta de alimento, tivemos uma revolução na agricultura, principalmente nos EUA e na Europa, denominada de Revolução Verde. No Brasil, o pacote tecnológico proposto pela Revolução Verde chegou entre os anos 60 a 70 (Albergoni *et al.* 2007). Contudo, a adoção de práticas agrícolas intensas, como o uso de insumos químicos entre eles os agrotóxicos, deram os primeiros sinais de problemas no final dos anos 60. Entre esses problemas, pode-se citar os relacionados com o uso exacerbado do DDT e de outros organoclorados, relatados em todo o Hemisfério Norte, principalmente nos Estados Unidos. Entretanto, a comunidade científica começou a se preocupar somente após o lançamento do livro intitulado “Silent Spring” (Primavera Silenciosa) de Rachel Carson, em 1962, o qual abordava os efeitos negativos do DDT, principalmente sobre as populações de pássaros e peixes.

Nesta ocasião, a agricultura mundial passava por uma crise, já que os inseticidas não estavam mais mantendo as populações de pragas abaixo do nível de dano econômico. Os primeiros problemas referentes a resistência de pragas ao DDT e aos organoclorados foram identificados, sendo até hoje a resistência de pragas um dos principais problemas na agricultura moderna (APRD 2019).

Contratempos na eficiência do controle de pragas devido à resistência a inseticidas, o impacto ambiental oriundo do uso inadequado destes e os problemas sociais, provenientes da Revolução Verde, contribuíram para as premissas do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que

perduram até os dias atuais. A ideia do MIP foi mencionada por Hoskins *et al.* (1939), e pressupunha a existência de um controle natural imposto pelas condições ambientais, como as precipitações e variações de temperatura, que poderiam reduzir a população de insetos pragas, além do controle natural exercido por predadores e parasitoides nos sistemas de cultivo. Esse controle natural, alterava a dinâmica das populações de pragas. Porém, somente no final da década de 50, é que foi proposto de forma objetiva e concreta os conceitos que permeiam o MIP, fundamentados esses na combinação de diferentes métodos de controle, onde um dos pilares é o controle biológico de pragas (Stern *et al.* 1959).

O MIP é entendido como sendo o emprego de múltiplas práticas voltadas a monitorar e manter uma população de organismos considerados pragas, abaixo do nível de dano econômico para a cultura. A tomada de decisão em controlar ou não uma praga e qual o método a utilizar, isoladamente ou em conjunto com outro, será feito com base no custo/benefício, para os interesses dos produtores e redução dos impactos sociais e ambientais (Kogan 1998).

O controle biológico realizado por diversos grupos de inimigos naturais é importante no MIP, pois busca controlar a população das pragas, de forma a mantê-las em equilíbrio com o ambiente (Graves *et al.* 1978). Estudos diversos buscam a conservação e inserção dos inimigos naturais no MIP, mas sabe-se que esta prática é comumente incompatível com o outro método de controle fundamental para o MIP, o controle químico. Assim, uma maneira de torná-los compatíveis é promover a seletividade de inseticidas, que visa a recomendação de produtos específicos ou formas de utilização que maximizem o controle da praga alvo, com o mínimo de impacto sobre os inimigos naturais (Croft 1990).

Inseticidas seletivos são aqueles que provocam mortalidade para um grupo restrito de insetos, enquanto inseticidas não seletivos são os que resultam em efeitos letais e subletais em um grande espectro de insetos, dentre eles os inimigos naturais (Croft 1990, Torres & Bueno 2018). Dentre os

efeitos subletais, estão o prolongamento do período de desenvolvimento, redução da viabilidade de ovos/larvas, deformações, redução da fecundidade, da fertilidade e da longevidade das fêmeas, alterações na razão sexual, bem como no comportamento (Johnson & Tabashnik 1999, Desneux *et al.* 2007, Rodrigues *et al.* 2016).

Para reduzir o impacto de inseticidas a inimigos naturais devemos buscar o uso de inseticidas seletivos (Ruberson *et al.* 1998), a seletividade pode ser obtida basicamente de duas formas, a seletividade ecológica que envolve a logística de como o inseticida é utilizado visando minimizar a exposição do inimigo natural ao inseticida, e a seletividade fisiológica quando se busca uma suscetibilidade diferenciada, em que o inseticida é mais tóxico para a praga quando comparado com o inimigo natural (Ripper *et al.* 1951, Newson *et al.* 1976, Hull & Beers 1985). Infelizmente, existem muitas falhas na utilização de inimigos naturais no MIP, principalmente com a utilização de predadores, pois esses são insetos em sua grande maioria generalistas, que exploram diferentes presas e habitats. Alguns coccinelídeos, por exemplo, podem abandonar o local onde foram liberados e dispersar pela lavoura, com resíduo de inseticidas ou não, explorando o local de diferentes formas, na fase adulta especialmente através do voo e na fase larval caminhando pelo dossel das plantas. Em coccinelídeos, o comportamento de forrageamento (dispersão) é estimulado tanto quanto as joaninhas estejam saciadas ou quando ocorre a redução da presa (Hodek 1973).

A maioria dos inseticidas são neurotóxicos, como é o caso dos organofosforados, piretroides, neonicotinoides, portanto, não são seletivos devido ao seu modo de ação e sítios alvos, visto que atuam de forma semelhante nas pragas como nos inimigos naturais. A maioria desses produtos possuem efeito por contato e são aplicados diretamente na planta, facilitando o contato do predador ao forragear. O contato do inimigo natural pode ser diretamente, quanto o predador entra em contato com a área onde foi aplicado o inseticida durante a busca pela presa/hospedeiro, bem como

durante a sua manipulação e alimentação, ou indiretamente através da ingestão da presa que teve contato previamente com o inseticida ou um subproduto da planta contaminado, como o pólen e o néctar (Parra *et al.* 2002). Sendo assim, faz-se necessária a realização de estudos que visem contornar os efeitos dos inseticidas sobre as populações de inimigos naturais.

Resistência de insetos a inseticidas

A resistência a inseticidas tem sido um dos mais controversos e preocupantes fenômenos para a entomologia aplicada, a partir da grande utilização de inseticidas para o controle de pragas (Oliveira *et al.* 2005). A resistência está associada à presença de variação genética da espécie, e a prática de uso de inseticidas, ocasionando a seleção de populações resistentes.

Sendo assim a resistência, é uma característica pré-adaptativa, genética e hereditária (Dobzhansky 1951), a qual pode ser definida como sendo a habilidade herdada de um organismo em tolerar ou em evitar doses de um agente tóxico que seriam letais para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (WHO 1957, WHO 1960). Os indivíduos que sobrevivem em contato com o inseticida, ao se reproduzir, passam esta característica para a sua progênie (Dobzhansky 1951). Assim, Whalon & Ghaghey (1998), redefiniram a resistência a inseticida como um processo micro evolutivo, onde a adaptação genética resultante da pressão de seleção pelo uso de pesticidas produz populações de artrópodes com diferenciado e difícil modo de manejo. Além desses conceitos, o Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC) define resistência como sendo a seleção de uma característica herdada em uma população que resulta em repetidas falhas de um produto em fornecer o nível de controle pretendido, quando usado em conformidade com a recomendação.

São quatro os principais mecanismos ligados à resistência de insetos a inseticidas: a ineficiência da penetração do inseticida no tegumento no inseto, detoxificação metabólica do inseticida por enzimas, alteração na sensibilidade do sítio de ação inseticida, alterações

comportamentais frente à presença do inseticida (Oppenoorth 1985, Hemingway 2000). Os mecanismos de resistência a inseticidas descritos anteriormente podem conferir um amplo espectro de resistência, sendo esses combinados ou não (Hemingway *et al.* 2004).

Dentro deste contexto, há dois tipos de resistência: a resistência cruzada e a resistência múltipla. A resistência cruzada refere-se aos casos nos quais um único mecanismo de resistência confere resistência a inseticidas de dois ou mais compostos distintos. Em uma população de *Anopheles albimanus* (Meigan) (Diptera: Culicidae), da Guatemala, por exemplo, foi relatado resistência cruzada a DDT e a piretroides, a qual foi associada à alta atividade de esterases (Brogdon *et al.* 1999). Vale salientar, que tanto o DDT quanto os piretroides possuem o mesmo alvo no sistema nervoso do inseto atuando, mais especificamente nos canais de sódio, localizados nos axônios dos neurônios.

A resistência múltipla, por sua vez envolve pelo menos dois mecanismos de resistência diferentes, que levam a resistência a dois ou mais compostos geralmente não relacionados quanto ao mecanismo de ação (Milani 1963, Busvine 1968). A resistência múltipla tem sido observada em populações de *Anopheles gambiae* (Giles) (Diptera: Culicidae) e *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) de Benin, África, resistentes a DDT e a piretroides por exemplo. Estas duas populações possuem, simultaneamente de mutação do tipo “*kdr*” que é mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio e o aumento na capacidade de metabolizar estes compostos pelo acréscimo da expressão de enzimas de detoxificação (Corbel *et al.* 2007).

Estudos de detecção e caracterização da resistência procedem a partir de constatação de falhas de controle da praga alvo. Entretanto, a detecção em inimigos naturais é dificultada, pois não

seria comum essa observação sobre esses agentes de controle biológico. Esta é uma das hipóteses da baixa periodicidade de casos de resistência em inimigos naturais (Johnson & Tabashnik 1999).

A resistência é estudada empregando-se a relação da concentração letal ou dose letal (CL/DL) para matar 50% da população teste em relação aos valores calculados para uma população considerada como padrão de suscetibilidade (Croft & Morse 1979). Posteriormente, é necessário definir qual o mecanismo da resistência que está envolvido, modo de herdabilidade da resistência, se a resistência é ligada ao sexo, se está associada a mais de um produto resultando em resistência múltipla ou cruzada.

O conhecimento dessas características associado a resistência de insetos é fundamental para definir quais serão as táticas usadas no seu manejo. Além disso, aspectos diretamente relacionados a estabilidade da resistência nos sistemas agrícolas e o custo metabólico para a manutenção dos alelos para a resistência na população, são informações essenciais a serem conhecidas.

A espécie alvo do presente estudo, *E. connexa*, já possui a resistência ao piretroide lambda-cialotrina caracterizada como detoxificação metabólica (Rodrigues *et al.* 2014), sabe-se que é herdada de forma autossômica (Rodrigues *et al.* 2013b), e existe um custo reprodutivo associado a resistência. A resistência explica o “custo” ao seu desempenho reprodutivo com redução da produção de ovos em até 50% (Ferreira *et al.* 2013), mas ao cruzar com uma população suscetível, o indivíduo heterozigoto apresenta um incremento significativo de 1,31 a 2,29 e de 2,24 a 3,9× maior na sua fecundidade, dependendo do número de gerações em laboratório, relativo a população resistente e a população suscetível, respectivamente (Lira *et al.* 2016)

Resistência de inimigos naturais a inseticidas

A resistência em inimigos naturais, contrário àquela detectada em populações de espécies praga, é considerada benéfica, uma vez que permite a sobrevivência desses insetos nos

agroecossistemas submetidos à aplicação de inseticidas. Isso porque se espera que os indivíduos resistentes sobreviventes auxiliem no controle das pragas, que por sua vez, podem também ser resistentes aos inseticidas aplicados, permitindo a combinação simultânea dos controles químico e biológico (Torres & Bueno 2018). Fato este que corrobora com as pressuposições do MIP e do manejo de resistência de insetos pragas a inseticidas, onde devemos fazer o uso do controle químico somente quando a praga atingir o nível de controle e buscar formas de controle alternativas ao químico, combinando com controle biológico.

Na literatura, os registros de casos de resistência de inseticidas em inimigos naturais são poucos em relação aos registros de casos de resistência em pragas. (APRD 2019). Croft (1990) publicou uma revisão de estudos de casos em que a resistência foi registrada em mais 500 espécies de artrópodes. Naquela ocasião, somente 32 dessas espécies (6,4%) eram inimigos naturais (predadores ou parasitoides). Dessas, 11 espécies pertencem a Hymenoptera (Aphelinidae, Braconidae, Eulophidae, Trichogrammatidae, Aphidiidae), 12 ácaros (Phytoseiidae), um Dermaptera (Labiduridae), dois Hemiptera (Geocoridae e Nabidae), um Araneae (Clubionidae), um Neuroptera (Chrysopidae), um Diptera (Cecidomyiidae) e três Coleoptera (Coccinellidae). Relatos mais recentes incluíram mais seis casos de inimigos naturais apresentando resistência na “Arthropod Pest Resistance Database”, o APRD (<http://www.pesticideresistance.org>) (ARPD 2019), sendo quatro de Hymenoptera, um ácaro predador e um Coleoptera (Staphylinidae). E, após este estudo, outras três espécies de Coccinellidae predadoras foram adicionadas à base de dados, a partir da literatura científica como casos de resistência a inseticidas, que serão abordados a seguir.

Joaninhas predadoras

Entre os inimigos naturais comumente estudados no controle biológico, encontram-se os coleópteros denominados de joaninhas predadoras pertencentes à Coccinellidae. Esta família possui mais de 6000 espécies descritas, distribuídas em 360 gêneros (Vandenberg *et al.* 2002). Dessas, aproximadamente 2000 espécies encontram-se na região Neotropical (Almeida & Ribeiro-Costa 2009). Coccinellidae é dividida em sete subfamílias: Coccidullinae, Coccinellinae, Scymninae, Ortaliinae, Chilocorinae, Sticholotidinae todas essas predadoras, tendo como exceção Epilachninae que é herbívora (Kóvar 1996). Além das características morfofisiológicas, essas subfamílias são também caracterizadas pelo comportamento alimentar (Giorgi *et al.* 2009), a partir da preferência por presas. Espécies de Coccinellinae são predominantemente predadoras de pulgões, psilídeos; Coccidullinae de pulgões, cochonilhas e formigas; Chilocorinae de pulgões e cochonilhas; Ortaliinae de cigarrinhas, psilídeos e formigas; Sticholotidinae de pulgões e cochonilhas; Scymninae de ácaros, pulgões e cochonilhas (Giorgi *et al.* 2009).

Joaninhas predadoras ocorrem em diversos habitats, sendo normalmente associadas às infestações de suas presas, podendo ser empregadas nas formas de controle biológico, aplicado ou conservativo (Obrycki & Kring 1998). Tendo assim, espécies de Coccinellinae uma contribuição especial no controle biológico por conservação, uma vez que apresentam ampla capacidade de dispersão, porém, possui algumas dificuldades de criação em laboratório, como canibalismo, ausência de dietas alternativa e artificial, bem como logística da criação em larga escala para comercialização (Michaud *et al.* 2007, 2012, 2018), dificultando sua maior adoção no controle biológico aplicado. Assim, a preservação das populações naturalmente ocorrendo nos agroecossistemas é essencial para o controle biológico com joaninhas.

A contribuição das joaninhas para o MIP é inquestionável, mas é necessário maior conhecimento para a sua preservação no ambiente, uma opção para a sua conservação é a

resistência a inseticidas, pois dentre as espécies de joaninhas predadoras, algumas espécies têm sido caracterizadas como resistentes. No estudo de Croft (1990), as joaninhas *Stethorus punctum* (LeConte) e *Stethorus punctillum* (Weise) são citadas como resistentes ao inseticida azinfós-metil na cultura da maçã a partir dos estudos de Hull & Starner (1983) e Pasqualini & Malavolta (1985), além dessas também na cultura da maçã, *Stethorus gilvifrons* (Muls.) foi caracterizada como resistente a bifentrina (Kumral *et al.* 2011). A resistência em populações de *Coleomegilla maculata* (De Geer) foi citada para o DDT e paration metil (Head *et al.* 1977, Graves *et al.* 1978), bem como a *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) todas coletadas em algodão, sendo a última caracterizada como sendo até 308× mais resistente ao inseticida lambda-cialotrina (Rodrigues *et al.* 2013a). Ainda, em estudos com uma população de *H. convergens*, da mesma região, foi caracterizada com resistência múltipla (lambda-cialotrina e dicrotofós) (Barbosa *et al.* 2016). Também, em *Adalia bipunctata* (L.), obtida de laboratório comercial, foi identificada alta tolerância a cinco diferentes inseticidas e consideradas como resistente pelos autores Garzon *et al.* (2015). Por fim, *Propylaea japonica* (Thunberg), coletada em plantios de brássicas foi caracterizada possuindo resistência a abamectina e ao imidacloprido (Tang *et al.* 2015).

A espécie *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae: Coccinellinae) está comumente associada a infestações de pulgões e psilídeos, mas também consome outros tipos de presas, como moscas-brancas, ovos de lepidópteros, ácaros, e outras. Apresentando-se como uma das principais espécies de joaninhas predadoras no Brasil, que também inclui *Cycloneda sanguinea* (L.) (Araujo-Siqueira & Almeida 2006), *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville), *Coleomegilla maculata* (De Geer), *Olla v-nigrum* (Mulsant), *Scymnus* sp., *Brachyacantha* sp. e, recentemente, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Gassen 1986, Gravena 2005, Torres *et al.* 2009, Harterreiten *et al.* 2012).

Uma população de *E. connexa* coletada em brássicas exibiu razão de resistência de 21× ao inseticida lambda-cialotrina (Rodrigues *et al.* 2013b, 2014) e, posteriormente, diversas populações dessa espécie, proveniente de diferentes agroecossistemas e locais de coleta apresentaram razões de resistência variando de 1,98 a 884,04× à lambda-cialotrina (Costa *et al.* 2018), com destaque para aquelas populações oriundas de cultivos de hortaliças.

Estudos sobre a evolução da resistência a inseticidas em inimigos naturais são raros e incompletos sendo que, na maioria das vezes é relatada somente a resistência, faltando conhecimento que a caracterizem, se a resistência é dominante ou recessiva, completa ou incompleta, ligada ao sexo, monogênica ou poligênica e sua estabilidade na população. Uma resistência em inimigos naturais estável pode favorecer sua utilização de maneira integrada nos agroecossistemas, não sendo mais necessário executar pressão de seleção ao longo de todas as gerações de criação, em laboratório. Todavia, estudos mais avançados devem ser realizados, para que possamos usar esses inimigos naturais resistentes no controle de pragas, como proposto com ácaros predadores pertencentes a Phytoseiidae, *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt), com resistência a carbaril, metomil e a permetrina sob seleção artificial (Hoy 1985, 1987).

As joaninhas predadoras podem apresentar respostas variáveis quando estão em contato com inseticidas, sendo uma delas a morte por contato direto ou indireto, além de efeitos na sua biologia e comportamento advindos de efeitos subletais (Tillman & Mulrooney 2000, Gusmão *et al.* 2000, Wang *et al.* 2003, Liu & Stansly 2004, Galvan *et al.* 2005, Cosme *et al.* 2007, Rocha *et al.* 2010, Rodrigues *et al.* 2016 D'Ávila *et al.* 2018). Porém, a utilização de inimigos naturais no MIP encontra algumas dificuldades, entre elas a difícil obtenção e alto custo de produção para a maioria dos casos (Michaud 2018). Além disso, se o inimigo natural for resistente, há que ser levar em consideração o custo adaptativo associado a resistência, e como ele reflete na reprodução. Trabalhos com uma população de *E. connexa* resistente ao lambda-cialotrina mostraram que existe

um custo associado a resistência, tendo um efeito negativo na reprodução (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016), na voracidade (Rodrigues *et al.* 2016), e capacidade de forrageamento (D'Ávila *et al.* 2018).

Também, deve-se estudar como é a estabilidade dessa resistência, uma vez que a pressão de seleção poderá não estar em todos os agroecossistemas explorados pelos indivíduos resistentes. Sendo importante destacar que a resistência tende a ser perdida ao longo de gerações, se estiver diretamente ligada à pressão de seleção (Bortoli *et al.* 2002, Rodrigues *et al.* 2013b).

O conhecimento acerca da estabilidade da resistência ao longo do tempo, sem pressão de seleção, traz grandes contribuições principalmente em populações de inimigos naturais. Assim, em campo, na ausência da pressão de seleção e quando não houver acasalamento com indivíduos suscetíveis, a população continuaria resistente e sobreviveria a futuras pulverizações. Por outro lado, ao acasalar com indivíduos suscetíveis, a perda da resistência após sucessivas gerações é esperada independente da estabilidade. Em inimigos naturais, já se tem relatado a estabilidade da resistência à piretroides em *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) (Queiroz *et al.* 2016), e em populações de *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) a deltametrina (Sayyed *et al.* 2010).

A população de *E. connexa* usada neste estudo apresenta resistência à lambda-cialotrina herdada de forma autossômica e com dominância incompleta (Rodrigues *et al.* 2013b). Por isso, indivíduos heterozigotos, apresentam fenótipo de resistência, mas essa pode ser perdida na progênie das gerações subsequentes ao acasalarem com indivíduos suscetíveis. Estima-se, que na quarta geração a população se torna predominantemente suscetível (Lira *et al.* 2016).

Custo adaptativo associado à resistência

O termo custo adaptativo foi mencionado pela primeira vez por Crow (1957) e, refere-se ao menor desempenho das populações de insetos resistentes comparado a populações suscetíveis. O custo associado à resistência pode ser expresso na população resistente de diversas formas, mas em sua maioria, ligados a reprodução (Gazave *et al.* 2001, Ferreira *et al.* 2013). O menor desempenho dos indivíduos resistentes de uma população é devido aos custos fisiológicos impostos pela resistência, denominado custo adaptativo, assim sendo os genes responsáveis pela resistência devem ser considerados e estudados, uma vez que podem alterar os processos fisiológicos e afetar a história de vida dos insetos (Gazave *et al.* 2001).

O tamanho corporal reduzido, também pode estar relacionado ao custo adaptativo em populações de insetos resistentes, em especial em fêmeas de joaninhas, estando diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo (Honěk 1993, Kajta & Evans 2010). Em um trabalho com *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) resistentes ao piretroide deltametrina, foi demonstrado que indivíduos resistentes, apresentavam um aumento significativo em sua massa corporal, sugerindo que seria necessária uma maior demanda de consumo de oxigênio e de enzimas detoxificativas (Oliveira *et al.* 2005). Além de que, é esperado que o peso do corpo tem papel fundamental na resposta de insetos a inseticidas, sejam resistentes ou não. Fato que a unidade básica da mensuração da resposta a toxicidade de inseticidas é dada por peso corporal (dose letal, quantidade de ingrediente ativo por indivíduo ou peso).

O aumento de consumo de presa pode estar associado à necessidade de maior energia para metabolizar o inseticida. Assim, a resposta relativa ao custo adaptativo é variável e dependente da variável mensurada, da espécie em estudo, possivelmente controlado pela fisiologia e bioquímica do inseto (processos metabólicos e detoxificativos) e pela herança da resistência. Em *C. carnea* foi encontrada taxa de predação superior na população resistente a deltametrina, em comparação com

indivíduos suscetíveis (Pathan *et al.* 2010). Desse modo, o resultado é relativo, podendo estar relacionado ao tamanho do inseto, a taxa de consumo de presas, modo de detoxificação, a herança da resistência da população e a reprodução da espécie, não podendo ser generalizado. Uma vez que o custo adaptativo da resistência parece variar entre diferentes espécies de inimigos naturais e entre as variáveis quantificadas.

Relevância do trabalho e problematização

O controle químico é o principal método de controle usado no MIP pela eficácia imediata, usualmente disponível para uso contra várias espécies de pragas, de relativo fácil manuseio e baixo custo (Omoto *et al.* 2000). Estas características, entretanto, estão mais próximas de produtos considerados mais antigos e de amplo espectro de ação. O MIP preconiza a integração de métodos de controle, sendo os controles químico e biológico os mais citados como passíveis de manipulação pelo usuário. Os sistemas agrícolas de produção que buscam o uso do controle químico e a conservação e/ou uso aplicado do controle biológico se deparam com a incompatibilidade dos inseticidas de amplo espectro de ação com MIP, visto que não existe diferença no mecanismo de ação desses inseticidas e, conseqüentemente, não há diferença do processo de detoxificação dos mesmos pelos insetos. Assim a regra geral é a suscetibilidade diferenciada entre o predador e a presa, tolerância e resistência do predador.

Mesmo que exista um grande número de estudos relativo à seletividade de inimigos naturais, poucos caracterizam verdadeiramente um inseticida sintético como seguro, devido principalmente às características de história de vida dos inimigos naturais (Torres & Bueno 2018). Predadores tem como comportamento, o intenso forrageamento em busca de alimento, com a ingestão de várias presas de diferentes espécies ou não, que podem ou não terem sido expostas ao

inseticida previamente deixando o predador em contato com o inseticida durante toda a sua história de vida, podendo essa suscetibilidade ser aumentada através da resistência do predador (Poletti *et al.* 2003, Torres *et al.* 2015).

Desse modo, os conhecimentos gerados sobre a resistência de *E. connexa* à lambda-cialotrina sustentam um aprofundamento no estudo sobre estabilidade da resistência, na ausência de pressão de seleção. Além disso, acompanhar informações de desempenho reprodutivo ao longo deste processo, situação que poderá ocorrer em campo após a liberação do inimigo natural resistente. Apesar disso, a lambda-cialotrina, como os demais piretroides apresentam restrições de recomendação contra insetos sugadores e ácaros, em diversos agroecossistemas. O manejo de pragas é desafiado pela infestação simultânea de insetos sugadores como pulgões, psílídeos e moscas-brancas, e os desfolhadores, exigindo a recomendação de um inseticida de amplo espectro para controlar as diferentes espécies de pragas, bem como rotação de modo de ação. Neste contexto que a resistência de *E. connexa* a piretroides, e a seletividade de inseticidas como pimetozina, IGRs, bactérias, vírus, espinosinas e diamidas a esta joaninha (Torres *et al.* 2015, Barros *et al.* 2018), são pontos favoráveis ao seu uso no manejo integrado de pragas.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade da resistência de *E. connexa* à lambda-cialotrina, após sucessivas gerações sem pressão de seleção e, também, quantificar a resposta da população resistente sem pressão de seleção quanto a características biológicas, enzimáticas e na razão de resistência. Ainda, gerar resultados sobre o desempenho da descendência de *E. connexa*, a partir do acasalamento da população referência de resistência, mantida por 78 gerações sobre pressão de seleção, com indivíduos de uma população de campo recém coletada, após ser caracterizada como suscetível à lambda-cialotrina.

LITERATURA CITADA

- Albergoni, L. & V. Palaez. 2007.** Da revolução verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? *Rev. Econ.* 33: 31-53.
- Almeida, L.D. & C.S. Ribeiro-Costa. 2009.** Coleópteros Predadores (Coccinellidae), p. 931-968. In A.R. Panzzi & J.R.P. Parra. *Bioecologia e nutrição de insetos: Base Para o manejo integrado de pragas.* Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1163p.
- APRD. 2019.** Arthropod Pesticide Resistance Database disponível em: www.pesticideresistance.com. Acesso em: 14/02/2019
- Araújo-Siqueira, M. & L.M. Almeida. 2006.** Estudos das espécies brasileiras de *Cycloneda Crotch* (Coleoptera, Coccinellidae). *Rev. Bras. Zool.* 23: 550-568.
- Barbosa, P.R.R., J.P. Michaud, A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2016.** Dual resistance to lambda-cyhalothrin and dicotophos in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere* 159: 1-9.
- Barros, E.M., C.S.A. Silva-Torres, J.B. Torres & G.G. Rolim. 2018.** Short-term toxicity of insecticides residues to key predators and parasitoids for pest management in cotton. *Phytoparasitica* 46: 391-404.
- Bortoli, S.A., R.J. Ferreira, J.E. Miranda & J.E.M. Oliveira. 2002.** Suscetibilidade de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) a Karate® (Lambda-cialotrina) em Condições de Laboratório. *Bol. San. Veg. Plagas* 28: 577-584.
- Brogdon, W.G., J.C. McAllister, A. M. Corwin & C. Cordon-Rosales. 1999.** Oxidase-based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic. Biochem. Phys.* 64: 101-111.
- Busvine, J. R. 1968.** Cross and multiple resistance in mosquitoes. *Cahiers O.R.S.T.O.M.*, 6:3-4.
- Carson, R. 1962.** *Silent Spring*. 1a. ed. Local, Houghton Mifflin, 328p.
- Corbel, V., R. N'guessan, C. Brengues, F. Chandre, L. Djogbenou, T. Martin,... & M. Rowland. 2007.** Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta tropica*, 101: 207-216.
- Cosme, L.V., G.A. Carvalho & A.P. Moura. 2007.** Efeitos de inseticidas botânico e sintéticos sobre ovos e larvas de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) em laboratório. *Arq. Inst. Biol.* 74: 251-258.
- Costa, P.M.G., J.B. Torres, V.M. Rondelli & R. Lira. 2018.** Field-evolved resistance to λ -cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bull. Entomol. Res.* 108: 380-387.

- Croft, B.A. & J.G. Morse. 1979.** Recent advances in natural enemy–pesticide research. *Entomophaga* 24: 3-1.
- Croft, B.A. 1990.** Arthropod biological control agents and pesticides. New York, John Wiley & Sons, 723p.
- Crow, J.F. 1957.** Genetics of insecticide resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 2: 227-246.
- D’Ávila, V.A., W.F. Barbosa, L.C. Reis, B.S. Gallardo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2018.** Lambda–cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot.* 107: 41-47.
- Desneux, N., A. Decourye & J–M. Delpuech. 2007.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Dobzhansky, T. 1951.** Genetics and the origin of species. Third ed., New York, Columbia University Press, 364p.
- Ferreira, E.S., A.R.S. Rodrigues, C.S.A. Silva-Torres & J.B. Torres. 2013.** Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agric. For. Entomol.* 15: 168-177.
- Galvan, T.L., R.L. Koch & W.D. Hutchison. 2005.** Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 34: 108-114.
- Garzon, A., P. Medina, F. Amor, E. Vinuela & F. Budia. 2015.** Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere* 132: 87-93
- Gassen, D.N. 1986.** Parasitos, patógenos e predadores e insetos associados à cultura do trigo. Passo Fundo, Embrapa Trigo, Circular Técnica, 186p.
- Gazave, E., C. Chevillon, T. Lenormand, M. Marquine & M. Raymond. 2001.** Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87:441-448.
- Giorgi, J.A., N.J. Vandenberg, J.V. McHugh, J.A. Forrester, S.A. Ślipiński, K.B. Miller, L.R. Shapiro & M.F. Whiting. 2009.** The evolution of food preferences in Coccinellidae. *Biol. Control* 51: 215-231.
- Gravena, S. 2005.** Manual Prático de manejo ecológico de pragas dos citros. Jaboticabal, Gravena Ltda, 372p.
- Graves, J.B., R.B. Mohamad & D.F. Clower. 1978.** Beneficial insects also developing “resistance”. *LA. Agric.* 22: 10-11.

- Gusmão, M.R., M. Picanço, G.L.D. Leite & M.F. Moura. 2000.** Seletividade de inseticidas a predadores de pulgões. *Hortic. Bras.* 18: 130-133.
- Harterreiten-Souza, E.S., P. Togni, P. Milane, K. Cavalcante, M.A. Medeiros, C.S.S. Pires & E.R. Sujii. 2012.** Seasonal fluctuation in the population of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) and co-occurrence with other coccinellids in the Federal District of Brazil. *Pap. Avulsos Zool.* 52(11).
- Head, R., W.W. Neel, C.R. Sartor & H. Chambers. 1977.** Methyl parathion and carbaryl resistance in *Chrysomela scripta* and *Coleomegilla maculata*. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 17: 163-164.
- Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30: 1009-1015.
- Hemingway, J., N.J.Hawkes, McCardle & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34: 653-665.
- Hodek, I. 1973.** *Biology of Coccinellidae.* Hague, Prague & W. Junk, 260p.
- Honěk, A. 1993.** Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66: 483-492.
- Hoskins, W.M., A.D. Borden & A.E. Michelbacher. 1939.** Recommendations for a more discriminating use of insecticides. *Proc. 6th Pac. Sci. Congr.* 5:119-23.
- Hoy, M.A. 1985.** Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. *Annu. Rev. Entomol.* 30: 345-370.
- Hoy, M.A. & Y.L. Ouyang. 1987.** Toxicity of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 507-511.
- Hull, L.A. & E.H. Beers. 1985.** Ecological selectivity: Modifying chemical control practices to preserve natural enemies, p. 103-122. In M.A. Hoy & D.C. Herzog (eds.), *Biological control in agricultural IPM systems.* New York, Academic Press Inc., 589p.
- Hull, L.A. & V.R. Starner. 1983.** Impact of four synthetic pyrethroids on major natural enemies and pests of apple in Pennsylvania. *J. Econ. Entomol.* 76: 122-130.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2011.** Resistance management for sustainable agriculture and improved public health. 2nd edition. IRAC CropLife, 71p.
- Johnson, M.W. & B.E. Tabashnik. 1999.** Enhanced biological control through pesticide selectivity, p. 297-317. In T.S. Bellows & T.W. Fisher (eds.), *Handbook of biological control.* San Diego, Academic Press, 1046p

- Kajita, Y. & E.W. Evans. 2010.** Relationships of body size, fecundity, and invasion success among predatory lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) inhabiting alfalfa fields. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103: 750-756.
- Kogan, M. 1998.** Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 243-270.
- Kovár, I. 1996.** Phylogeny. Pp. 19 -31. In: i. Hodek & a. Honěk. (eds.). *Ecology of Coccinellidae*. Academic Publishers, Dordrecht. 464p. Kluwer.
- Kumral, N.A., N.S. Gencer, H. Susurluk & C. Yalcin. 2011.** A comparative evaluation of the susceptibility to insecticides and detoxifying enzyme activities in *Stethorus gilvifrons* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae). *Int. J. Acarol.* 37: 255-268.
- Lira, R., Rodrigues, A.R.S. & J.B. Torres. 2016.** Fitness advantage in heterozygous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar) resistant to lambda-cyhalothrin. *Neotrop. Entomol.* 45: 573-579.
- Liu, T.X. & P.A. Stansly. 2004.** Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Biol. Control* 30: 298-305.
- Michaud, J.P. 2007.** Relative toxicity of six insecticides to *Cycloneda sanguinea* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Entomol. Sci.* 37: 83-93.
- Michaud, J.P. 2012.** Coccinellids in biological control. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. John Wiley & Sons, Chichester, 488-519.
- Michaud, J.P. 2018.** Problems inherent to augmentation of natural enemies in open agriculture. *Neotrop. Entomol.* 47: 161-170.
- Milani, R. 1963.** Genetical aspects of insecticide resistance. *Bull. World. Health. Org.* 29: 77-87.
- Newsom, L.D., R.F. Smith & W.H. Whitcomb. 1976.** Selective pesticides and selective use of pesticides, p. 565-591. In C.B. Huffaker & P.S. Messenger (eds.), *Theory and practice of biological control*. New York, Academic Press, 788p.
- Obrycki, J.J. & T.J. Kring. 1998.** Predaceous Coccinellidae in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 295-321.
- Oliveira E.E, N.C.R. Guedes, S.A. Corrêa, L.B. Damasceno & T.C. Santos. 2005.** Pyrethroid resistance vs susceptibility in *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): is there a winner? *Neotrop. Entomol.* 34: 981-990.
- Omoto, C. 2000.** Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. Bases e técnicas de manejo de insetos, Santa Maria, Editora UFSM, 248p.

- Oppenoorth, F.J. 1984.** Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 187-193.
- Parra, J.R.P. 2002.** Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. Tamboré, Editora Manole Ltda, 609 p.
- Pasqualini, E. & C. Malavolta. 1985.** Possibility of natural limitation of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) on apple in *Emilia-Romagna*. *Boll. Ist. Entomol. "Guido Grandi" Stud. Bologna* 39: 221-230.
- Pathan, A.K., A.H. Sayyed, M. Aslam, T.X. Liu, M. Razzaq & W.A. Gillani. 2010.** Resistance to pyrethroids and organophosphates increased fitness and predation potential of *Chrysoperla carnae* (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Econ. Entomol.* 103: 823-834.
- Poletti, M. & C. Omoto. 2003.** Resistência de inimigos naturais a pesticidas: Exploração de inimigos naturais a pesticidas em programas de manejo integrado de pragas. *Biotecnol. Ciênc. Desenvol.* 6: 16-26.
- Queiroz, M.C.V. & E.M. Sato. 2016.** Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. *Exp. Appl. Acarol.* 68: 71-82.
- Ripper, W.E., R.M. Greenslade & G.S. Hartley. 1951.** Selective insecticides and biological control. *J. Econ. Entomol* 44: 448-459.
- Rocha, L.C.D., G.A. Carvalho, A.P. Moura, V.F. Moscardini, D.T. Rezende & O.M. Santos. 2010.** Seletividade fisiológica de inseticidas utilizados em cultura cafeeira sobre ovos e adultos de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant. *Arq. Inst. Biol.* 77: 119-127.
- Rodrigues, A.R.S., A.F. Spindola, J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & F. Colares. 2013a.** Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96: 53-60.
- Rodrigues, A.R.S., J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & D.P.A. Lacerda 2013b.** Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 64: 217-224.
- Rodrigues, A.R.S., H.A.A. Siqueira & J.B. Torres. 2014.** Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 110: 36-43.
- Rodrigues, A.S., L. Botina, C.P. Nascimento, L.M. Gontijo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2016.** Ontogenic behavioral consistency, individual variation and fitness consequences among lady beetles. *Behav. Processes* 131: 32-39.

- Ruberson, J.R., H. Nemoto & Y. Hirose. 1998.** Pesticides and conservation of natural enemies in pest management, p. 207-220. In P. Barbosa (ed.), Conservation biological control, New York, Academic Press, 397 p
- Sayyed, A.H., A.K. Pathan & U. Faheem. 2010.** Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. Pestic. Biochem. Physiol. 98: 325-332
- Stern, V.M., R.F. Smith, R. van den Bosh & K.S. Hagen. 1959.** The integrated control concept. Hilgardia 29:81-101
- Tang, L., B. Qiu, A.G.S. Cuthbertson & S. Ren. 2015.** Status of insecticide resistance and selection for imidacloprid resistance in the ladybird beetle *Propylaea japonica* (Thunberg). Pestic. Biochem. Physiol. 123: 87-92.
- Tillman, P.G. & J.E. Mulrooney. 2000.** Effect of selected insecticides on the natural enemies *Coleomegilla maculata* and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), and *Bracon mellitor*, *Cardiochiles nigriceps*, and *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) in cotton. J. Econ. Entomol. 93: 1638-1643.
- Torres, J.B., C.S. Bastos & D. Pratisoli. 2009.** Controle biológico de pragas com uso de insetos predadores. Inf. Agropec. 30: 17-32.
- Torres, J.B, A.R.S. Rodrigues, Barros E.M. & D.S Santos. 2015.** Lambda-cyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) confers tolerance to other pyrethroid. J. Econ. Entomol. 108: 60-68.
- Torres, J.B. & A.F. Bueno. 2018.** Conservation biological control using selective insecticides—a valuable tool for IPM. Biol. Control 126:53-64
- Vandenberg, N. J. 2002.** “93. Coccinellidae Latreille 1807”. Arnett, RH Jr, Thomas, MC, Skelly, PE & J.H. Fra. (Eds). American Beetles. 2:371-389.
- Wang, X., Z. Shen, W. Xu & J. Lu. 2003.** Sublethal effects of insecticides on fecundity of multicolored Asian ladybird *Harmonia axyridis*. J. Appl. Ecol. 14: 1345-1348.
- Whalon, M.E. & W.H. McGaughey. 1998.** *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management, p. 106-137. In I. Ishaaya & D. Deheele (eds.), Insecticides with novel modes of action, mechanism and application. New York, Springer-Verlag, 304p
- WHO. 1957.** Expert committee on insecticides: seventh report. Geneva, Technical Report Series 125, 31p.
- WHO. 1960.** Insecticide resistance and vector control. Geneva, Technical Report Series 191, 98p.

CAPÍTULO 2

A RESISTÊNCIA DE UMA POPULAÇÃO DE *Eriopis connexa* (GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) À LAMBDA-CIALOTRINA ESTÁ ESTABILIZADA?

ALICE S. RODRIGUES¹

²Departamento de Agronomia - Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Rua Dom Manoel de Medeiros, Recife, PE, 52171-900, Brasil.

¹Rodrigues, A.S. A resistência de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae) à lambda-cialotrina está estabilizada? Entomologia Experimentalis et Applicata.

RESUMO – Inimigos naturais resistentes a inseticidas podem auxiliar no controle de pragas que suportam à pulverização do inseticida, consequentemente prevenindo perdas na produção e seleção para resistência de pragas a inseticidas. A resistência da joaninha predadora *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae) à lambda-cialtrina foi caracterizada e aumentada através de seleção em laboratório. Assim, neste trabalho, foi estudada a estabilidade desta resistência, sua relação com a produção de enzimas relacionadas a detoxificação e o desempenho biológico do predador. Uma subpopulação resistente de *E. connexa* foi criada sem pressão de seleção (R-NSEL) por oito gerações e comparada com as populações, padrão de referência para suscetibilidade (SUS) e resistência (R-SEL). Ao longo das gerações, sem pressão de seleção foi observado em R-NSEL redução de (~50%) na razão de resistência entre a primeira e a quarta geração, entretanto a resistência é mantida estável entre a quinta e a oitava geração usando como referência a R-SEL, além disso a R-NSEL, ainda apresentou razão de resistência de ~39× maior quando comparada com a população SUS. Ao estudar a expressão de esterases, a redução do nível de resistência em R-NSEL foi acompanhada por redução na produção de esterases relativo a R-SEL, mas se manteve superior a SUS. A ausência da pressão de seleção e redução na produção de enzimas de detoxificação não levaram ao aumento no desempenho biológico de R-NSEL, em especial, quanto a fecundidade que foi ~2,7× inferior àquela encontrada para a SUS. Os resultados mostram que a resistência à lambda-cialtrina em R-SEL torna-se estável após retirada a pressão de seleção, que o nível de resistência está associado a produção de esterases e, por isto, o custo sobre a fecundidade foi mantido em R-NSEL.

PALAVRAS-CHAVE: Piretroide, resistência, inimigo natural, custo adaptativo, estabilidade

STABILITY OF THE RESISTANCE TO LAMBDA-CYHALOTHRIN IN THE LADYBIRD

BEETLE *Eriopis connexa*

ABSTRACT – Natural enemies resistant to insecticides are expected to help control the remaining arthropod pests after insecticide application. Field-evolved resistance to lambda-cyhalothrin exhibited by the lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) has been characterized and enhanced under laboratory selection. In this study, we investigated the stability of the resistance and its relationship with detoxification enzyme activity and biological performance, which are important for a biological control agent. One subgroup of the resistant population of *E. connexa* was established without selection pressure (R-UNSEL) during eight generations, and compared to either a susceptible (SUS) or its parental resistant (R-SEL) population. The resistance ratio in R-UNSEL was reduced by 50% compared to R-SEL between the 1st- and 4th-generations without selection pressure, but stayed stable after, from the 5th- to 8th-generation. Despite eight generations without selection pressure and reduction in the resistance level, the resistance ratio in R-UNSEL was still $\sim 39\times$ greater than the SUS population. The reduced resistance in R-UNSEL correlated to reduction in esterase activity, but the R-UNSEL maintained greater activity than in SUS group. The absence of selection pressure and reduction in enzyme activity in R-UNSEL did not mitigate the adaptive costs with $\sim 2.7\times$ lower egg production compared to SUS females. These findings indicate that resistance to lambda-cyhalothrin in R-UNSEL has already been stabilized in the population. Although the resistance ratio and detoxifying enzymes were reduced in R-UNSEL, the impact on fecundity was maintained. Furthermore, the absence of crossing with wild SUS individuals will allow the R-UNSEL offspring to retain the resistance allowing survival to lambda-cyhalothrin even when used at the highest recommended field rate.

KEY WORDS: Pyrethroid, resistance stability, natural enemy, adaptive cost

Introdução

A resistência a inseticidas é caracterizada como sendo uma resposta fisiologia, com o genótipo para resistência selecionado na população, em função da pressão de seleção imposta pelo inseticida Whalon & Ghaghey (1998), este fenômeno ocorre independentemente de a população do inseto ser praga ou inimigo natural. Entretanto, a resistência tem sido pouco explorada em inimigos naturais, tanto no contexto de caracterização da resistência, quanto na forma de aplicação no MIP. Assim, entre pragas e inimigos naturais ocorre dois aspectos contraditórios sobre a resistência a inseticidas.

No contexto aplicado, a evolução da resistência a inseticidas em pragas dificulta o controle, ao passo que a instabilidade da resistência é favorável para o seu manejo no campo, em contra partida, nos inimigos naturais, a resistência oferece benefícios, permitindo a sobrevivência desses indivíduos quando expostos ao inseticida, contudo a instabilidade não é desejada, pois acarretará a perda deste fenótipo na ausência da exposição contínua ao inseticida. Na maioria dos casos de resistência de pragas a inseticidas citados na literatura, o nível de resistência é reduzido, ou mesmo, perdido por completo, após a ausência da pressão de seleção (Campos *et al.* 2014, Askari-Saryazdi *et al.* 2015).

As principais hipóteses para a instabilidade da resistência, na população resistente, estão relacionadas ao custo metabólico para detoxificação sobre a constante pressão de seleção imposta pelo inseticida, também conhecido como custo adaptativo associado (Crow 1957, Gazave *et al.* 2001, Sayyed *et al.* 2010), ao modo de herança da resistência e ao número de genes envolvidos. Ao passo, que a fixação da resistência (i.e., estabilidade) se dá pela contínua pressão de seleção retirando todos os alelos suscetíveis da população ao longo do tempo (Sayyed *et al.* 2010, Askari-Saryazdi *et al.* 2015). Populações resistentes de insetos podem apresentar um desempenho inferior

quando comparado a população suscetível devido a energia dispendida para a manutenção da resistência (Crow 1957).

Na joaninha predadora Neotropical, *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae), isto foi caracterizado pela redução da fecundidade (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016, Rodrigues *et al.* 2016, D'Ávila *et al.* 2018). Essas características, que resultam em menor desempenho da população resistente, fazem com que haja uma sobreposição dos fenótipos resistentes presentes na população pelos suscetíveis ao longo de várias gerações (Crow 1957, Okuma *et al.* 2018). Portanto, o principal fator ligado à manutenção da resistência é a pressão de seleção, a qual depende de fatores associados à exposição, mecanismos de ação dos inseticidas, detoxificação entre outros. Assim, o resultado do fenótipo na ausência da pressão de seleção é um menor nível de resistência, o que tem sido verificado tanto em trabalhos de campo, quanto em laboratório (Carrière & Tabashnik 2001), complementarmente, a resistência têm sido determinada por alelos resistentes na população, o cruzamento com indivíduos carregando alelos de suscetibilidade acarretará, após algumas gerações, o retorno ao status de suscetibilidade, como observado em *E. connexa*, onde a resistência foi definida como autossômica e incompletamente dominante (Rodrigues *et al.* 2013a) e que na terceira geração de retrocruzamentos controlados com indivíduos suscetíveis, 75% da progênie tornou-se em indivíduos suscetíveis (Lira *et al.* 2016).

Neste contexto, a *E. connexa* apresentam resistência ao piretroide lambda-cialotrina para populações de campo no Brasil (Rodrigues *et al.* 2013b, Costa *et al.* 2018), e com alto nível de tolerância estendida a outros piretroides (Torres *et al.* 2015), visto que, foi possível aumentar o nível de resistência à lambda-cialotrina sob pressão de seleção, em laboratório, a partir de uma razão de resistência inicial de ~21x maior, àquela determinada originalmente para uma população de campo por Rodrigues *et al.* (2013a). A exposição, à DL₅₀, inicialmente determinada em

subsequentes gerações foi estimada com um aumento de 10x na razão resistência em 54 gerações (Rodrigues *et al.* 2013a). A partir da exposição e determinação de novas curvas dose-mortalidade até o presente momento, estimou-se na 78^a geração, um acréscimo da razão de resistência de ~80x maior, exibindo uma DL₈₀ de 13,52 mg i.a./mL, mesmo usando lambda-cialotrina em grau técnico, sendo 93x superior à máxima dosagem recomendada do produto formulado (0,2 mg i.a./mL) para pulverização, em campo (AGROFIT 2019), no entanto foi aferido que, a partir da 60^a geração a DL₅₀ pouco se altera, mesmo sobre pressão de seleção, sugerindo uma possível estabilização no aumento do nível de resistência.

Desse modo, com base no conhecimento gerado até o momento, propomos a hipótese que esta população da joaninha predadora *E. connexa*, após as sucessivas gerações sob pressão de seleção, apresenta resistência estável, mas a um nível inferior sem a pressão de seleção comparada aquela sob contínua pressão de seleção devido ao custo adaptativo. Contudo, espera-se que a resistência na população resistente e sem pressão de seleção seja mantida em nível suficiente para a população sobreviver às aplicações de dosagens recomendadas do produto no campo, caso não tenha cruzamento com indivíduos suscetíveis. Trabalhos avaliando a estabilidade da resistência e o custo adaptativo associado em inimigos naturais são poucos, tendo como exemplos apenas ácaros predadores (Queiroz *et al.* 2016) e *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Sayyed *et al.* 2010). Portanto, torna-se importante estudar a estabilidade da resistência em *E. connexa*, na ausência da pressão de seleção.

Assim, o presente trabalho avaliou a resistência na população de *E. connexa* resistente à lambda-cialotrina sem pressão de seleção, ao longo de oito gerações. E ainda, foram determinadas as características biológicas das populações com pressão de seleção do inseticida e sem a pressão de seleção, em comparação a população referência de suscetibilidade. Sendo também determinada

a produção de esterases (α e β), responsáveis pela detoxificação da lambda-cialotrina na população R-SEL, R-NSEL, em comparação populações de referência de suscetibilidade SUS.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Controle Biológico e Ecologia de Insetos e Interação Inseto-Tóxicos, no Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As populações de *E. connexa* (ovos, larvas e adultos) foram mantidas em sala climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de ~70% e fotoperíodo de 12 horas.

Obtenção e Criações das Populações de *Eriopsis connexa*. O experimento iniciou em agosto de 2016, quando as populações SUS e R-SEL encontravam-se na 68^a e 70^a geração, respectivamente. O presente estudo foi conduzido com três populações de *E. connexa*: A população resistente (R-SEL) mantida sob pressão de seleção; a subpopulação resistente não selecionada (R-NSEL) oriunda da população resistente e a população suscetível (SUS). Ambas as populações (resistente e suscetível) são mantidas em laboratório desde 2009. A população R-SEL é mantida sob pressão de seleção, com aplicação da DL₅₀ no abdome dos adultos, a cada geração, enquanto a população SUS é mantida sem exposição a nenhum inseticida.

Assim sendo, o início do experimento se deu coletando posturas da população SUS na 67^a geração e posturas da população R-SEL na 69^a geração, criando as larvas e os adultos (n = 200 adultos). Dessa forma, após a emergência, os adultos da população R-SEL, foram utilizados para manter a população e iniciar a subpopulação R-NSEL, a partir desta geração. Inicialmente a população R-SEL foi submetida ao ensaio de dose-resposta na 70^a geração, que será detalhando

posteriormente, e determinada uma DL_{50} de 5,68 mg i.a./mL, assim a partir desta geração, foi separada uma subpopulação e mantida, desde então, sem pressão de seleção R-NSEL.

A criação das três populações se deu de forma semelhante, diferenciando somente quanto à aplicação ou não do inseticida. Os adultos foram criados em gaiolas de acrílico (60 × 30 × 30cm, comprimento, largura e altura) e alimentados com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) ofertados em abundância, mais uma mistura de mel com levedura (1:1) e psilídeos ou pulgões, quando disponíveis para estimular a oviposição dos adultos. No interior da caixa de criação, foi adicionado papel toalha amassado, como substrato para a oviposição de forma a facilitar a coleta das posturas. As posturas, coletadas foram transferidas para recipientes de plásticos de 80 mL permanecendo até a eclosão das larvas. Após a eclosão, as larvas eram criadas nos mesmos recipientes, porém na densidade de três larvas por recipiente e alimentadas com ovos de *A. kuehniella*, no interior dos recipientes, foram colocados pedaços de papel toalha de ~2cm², para reduzir o canibalismo entre as larvas e fornecer substrato para pupação. A manutenção foi feita a cada dois dias com reposição de alimento e assepsia até a muda para pupa, quando foi deixado apenas uma pupa no recipiente.

Aplicação do Inseticida. A aplicação do produto técnico, lambda-cialotrina em grau técnico (99,5%; Chem Service, West Chester, PA, EUA) diluído em acetona, nos adultos das populações (R-SEL, R-NSEL e SUS) foi realizada, com a deposição de 0,5µl da dose estipulada para cada população, na parte ventral do abdome dos insetos com o auxílio de uma seringa Hamilton™ (Hamilton Company, Reno, NV, USA) de 25µL de volume acoplada a um aplicador de repetição controlada. Após a aplicação das doses, os adultos foram mantidos em placas de Petri de vidro (10 x 1,5 cm) e alimentados com ovos de *A. kuehniella* e a mortalidade aferida após 48 horas.

Bioensaio de Estabilidade da Resistência à Lambda-Cialotrina e Curva Dose-Resposta. O monitoramento da resistência para indivíduos da população R-SEL foi realizado mediante a

aplicação da DL_{50} calculada previamente para esta mesma população (5,68 mg i.a./mL). Um mínimo de 60 insetos (30 machos e 30 fêmeas) com idades entre 5 a 7 dias, foi utilizado a cada geração em que foi aplicado o inseticida. Este mesmo procedimento foi realizado ao longo de oito gerações e os resultados de mortalidade foram utilizados para testar a hipótese de igualdade de mortalidade esperada (50%) e mortalidade observada dos indivíduos R-SEL através do teste de qui-quadrado à 5% de probabilidade, empregando o Proc Freq do SAS (SAS Institute 2002).

Curvas de dose-mortalidade foram feitas na 74^a geração nas doses: 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 mg i.a./mL e na 78^a geração com as seguintes doses: 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg i.a./mL de lambda-cialotrina em grau técnico. Para monitorar o nível de resistência na subpopulação R-NSEL, um mínimo de 60 insetos (30 machos e 30 fêmeas) foram mantidos por geração. Sendo determinada uma curva de dose-mortalidade a cada quatro gerações, com a determinação da curva na 4^a geração, nas doses: 1,0; 2,0; 3,0 ;4,0; 6,0 e 8,0 mg i.a./mL e na 78^a geração, com as seguintes doses: 1,0; 2,0; 3,0 ;4,0; 6,0 e 8,0 mg i.a./mL de lambda-cialotrina em grau técnico. Paralelamente, foi testado a hipótese de igualdade de mortalidade esperada (50%) e mortalidade observada dos indivíduos R-NSEL submetidos a DL_{50} da população R-SEL, através do teste de qui-quadrado à 5% de probabilidade, empregando o Proc Freq do SAS (SAS Institute 2002).

Nos bioensaios de dose-resposta foram utilizados adultos sem distinção de sexo com 5 a 10 dias de idade, as doses empregadas na determinação de cada curva eram no mínimo, duas doses acima e outras duas doses abaixo da DL_{50} de cada população (R-SEL, R-NSEL e SUS). A curva dose-resposta da população SUS foi realizada na 76^a geração, com as seguintes doses: 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 i.a./mL de lambda-cialotrina em grau técnico. A aplicação do inseticida foi realizada conforme descrito anteriormente. Após o tratamento, os insetos foram mantidos em

placas de Petri de vidro (1,5 × 10cm de altura e diâmetro), forradas com papel de filtro de mesmo diâmetro. Após 2h foi aferido à contaminação mediante o efeito “*knockdown*”, que é o efeito de rápida paralisa nos insetos. A mortalidade, para fins de determinação da curva dose-mortalidade foi àquela registrada 48h após a aplicação.

Dessa forma, o bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com no mínimo seis tratamentos (doses de inseticida e testemunha), com 20 insetos por tratamento. Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para calcular as DLs e seus respectivos limites de confiança a 95% de probabilidade, empregando o Proc Probit do SAS (SAS Institute 2002). No final do monitoramento, mediante a razão de resistência calculada após Robertson & Preisler (1992), bem como adotado a regra de diferenças pela sobreposição do limite de confiança, a 95% de probabilidade, foi determinada a diferença estatística das DL₅₀ determinadas ao longo das gerações para as populações em estudo (R-SEL, R-NSEL e SUS).

A estabilidade da resistência, foi determinada mediante a resposta a seleção (R), a qual pode ser calculada pela diferença na DL₅₀ determinada entre as gerações sem pressão de seleção. Assim, a resposta a seleção foi definida pela fórmula $R = (\text{LogDL}_{50f} - \text{LogDL}_{50i}) / n$; onde, LogDL_{50f} e LogDL_{50i} são os logaritmos das DL₅₀ da geração final e inicial para R-SEL e R-NSEL, considerando o número de gerações testado (n). A resistência não é estável se a resposta a seleção for negativa (R<0).

Quantificação da Atividade Enzimática Envolvidas na Resistência. De acordo com os resultados de Rodrigues *et al.* (2014), a população R-SEL na 10^a geração apresentou atividade 4,16x e 4,03x maior atividade de esterases em resposta a formação de α -napftol e β -naftol, em relação a população SUS. Assim, neste bioensaio, foi testada a hipótese de que, a maior atividade de enzimas detoxificativas está associada ao custo reprodutivo como a redução da fecundidade das fêmeas R-Sel.

Para tanto, na 8^a geração da população R-NSEL, 78^a e 78^a gerações das populações R-SEL e SUS respectivamente, foram submetidas a análise de avaliação enzimática de α e β esterases. De cada população foram retiradas três amostras de 10 adultos de *E. connexa*. Em seguida, cada amostra foi composta de 10 abdômes retirados com auxílio de pinça entomológica, e imediatamente transferidos para microtubos contendo 1mL da solução tampão fosfato de sódio (0,02M, pH 7,2) e armazenados a -20°C. As amostras foram processadas, com o auxílio de um pistilo, os abdômes foram macerados e obtidos assim um homogeneizado. Esse material foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Amostras de 500 μ L do sobrenadante foram coletadas sem perturbar o precipitado e armazenadas a -20 °C.

Assim, três amostras de cada população (R-SEL, R-NSEL e SUS) foram utilizadas, tendo um total de nove sub-amostras. Após o preparo das amostras foi feita a quantificação de proteínas totais em todas as amostras, esta quantificação foi realizada através do método de ácido bicinconínico (Smith 1985) usando albumina de soro bovino (BSA), como padrão. Para o ensaio de quantificação de proteína total, nove sub-amostras de 100 μ L cada foram coletadas do material descongelado em gelo e completadas para o volume total de 200 μ L com tampão fosfato de sódio (0,02M, pH 7,2) usado no preparo das amostras. A curva padrão foi composta de BSA diluída em cloreto de sódio nas concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 2,0mM/mL. Após a transferência das amostras para os poços na placa de ELISA, esta foi incubada por 30 minutos a 37 °C para a quantificação da proteína total. Após este período, a placa foi levada ao espectrofotômetro e utilizado o Software “GEN5” para leitura na densidade óptica a 562nm (Elx800[®], BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

Para a quantificação da atividade de α e β carboxilesterases, foi usada a metodologia adaptada de van Asperen *et al.* (1962) e de Rodrigues (2014). As amostras foram analisadas em

triplicata, sendo utilizados 10 μ L de cada amostra/população de abdômes de *E. connexa* na diluição 1:100, a qual continha, em média, 2,58 μ g de proteínas totais. Soluções concentradas (250mM) dos substratos α -naftol-acetato e β -naftol-acetato foram preparadas em acetona para a construção da curva padrão nas concentrações 0,023; 0,046; 0,093; 0,187; 0,375, 0,75 e 1,5mM/mL. As amostras foram incubadas a 30 °C por 15 minutos para que fosse quantificado a atividade média. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de amostra, 2 μ L de α -naftil-acetato ou β -naftil-acetato (25nM) e 188 μ L de tampão fosfato de sódio (0,02M, pH 7,2) por poço da placa de ELISA. As amostras foram então incubadas por 15 minutos a 30 °C e a reação paralisada após 15 minutos adicionando 33,2 μ L de FAST Blue B a 0,3% em 3,5% de SDS. Terminada a reação, a placa foi levado ao espectrofotômetro e utilizado o Software “GEN5” para a leitura da absorbância a 600nm para α -esterase e a 550nm para β -esterase (Elx800[®], BioTek 768 Instruments, Winooski, VT, USA).

Os resultados da absorbância das carboxilesterases (α e β) foram submetidos, separadamente, aos testes de normalidade, homogeneidade, e análise de variância (ANOVA). As médias entre populações foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

Desempenho Biológico. De acordo com os resultados de Ferreira *et al.* (2013) e Lira *et al.* (2016), foi demonstrado uma redução da fecundidade em até 50% para fêmeas da população sob pressão de seleção R-SEL, quando esta população encontrava-se na 9^a e 40^a geração de criação em laboratório, tendo como referência a população SUS. Com base na redução do nível de resistência e produção de enzimas detoxificativas pelos indivíduos da subpopulação sem pressão de seleção R-NSEL, este estudo testou a hipótese de que a redução da resistência estaria relacionada a um possível retorno do desempenho reprodutivo. Assim, o desempenho reprodutivo das populações SUS e R-SEL e R-NSEL foi determinado nas gerações 77^a, 79^a e 9^a, respectivamente.

O estudo foi iniciado com a coleta de posturas das fêmeas R-SEL sobreviventes após o tratamento da seleção (geração 78^a), de fêmeas resistente não selecionada R-NSEL (8^a geração)

após retirada a pressão de seleção e de fêmeas da população suscetível SUS (80^a geração). As posturas coletadas, dos respectivos tratamentos (R-SEL, R-NSEL e SUS), foram incubadas e 150 larvas neonatas por população, foram individualizadas em recipientes plásticos de 80mL e criada até a fase adulta alimentadas em abundância com ovos de *A. kuehniella*. Larvas e pupas foram monitoradas para a obtenção das datas de pupação, emergência e peso de adultos com até 24h de idade, viabilidade larval e pupal, duração da fase larval e de pupa. Em seguida, esses adultos foram criados isoladamente durante oito dias. Aqueles da população R-SEL foram submetidos ao tratamento referente a pressão de seleção, com a aplicação a tóxico do inseticida. Assim, após 48h do tratamento, 15 casais sobreviventes e com 10 dias de idade foram estabelecidos para a obtenção da sobrevivência e reprodução durante 35 dias de observação, o que representa mais de 50% da fase adulta das populações R-SEL e SUS, e compreende o pico de reprodução para a espécie nas condições de laboratório (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016). De forma similar, a sobrevivência e reprodução de adultos R-NSEL e da população SUS foram estudados. Para tanto, adultos com 10 dias de idade foram pareados formando 15 casais (repetições), que foram monitorados durante 35 dias para obter a produção e viabilidade dos ovos, e a sobrevivência das fêmeas neste período.

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para normalidade e homogeneidade, respectivamente e transformados quando necessários. Em seguida, os resultados foram e submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias das três populações feita através do teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade, para as diferentes características avaliadas.

Resultados

Estabilidade da Resistência à Lambda-Cialotrina. Ao longo do estudo as populações, R-SEL, R-NSEL e SUS foram submetidas à bioensaios dose-resposta, tendo os dados de mortalidade

assumido o modelo de Probit ($P > 0,05$), independente da geração e da população testada, demonstrando que os valores das DLs calculados e, seus respectivos limites de confiança, são verdadeiros.

Entre as populações, foi observado aumento de aproximadamente $1,27\times$ na DL_{50} da população R-SEL durante as oito gerações (Tabela 1). Fato que, a resposta de seleção (R) manteve-se positiva. Assim, na geração atual do estudo, a população R-SEL apresentou uma razão de resistência de $\sim 80\times$ maior quando comparada a população SUS. Por outro lado, ocorreu redução na DL_{50} da população R-NSEL comparada a população R-SEL, ao longo das oito gerações sem pressão de seleção de $2,10\times$ e $2,04\times$ nos bioensaios realizados na quarta e oitava geração (R-NSEL, F4 e F8), respectivamente. Nota-se assim uma redução na razão de resistência de 52,5% na quarta geração e 51,0% na oitava geração da população R-NSEL. Contudo, na oitava geração da população R-NSEL, a razão resistência relativa à população SUS foi de $\sim 39\times$ maior, caracterizando que a população R-NSEL mantém o status de população resistente a lambda-cialotrina.

Em relação a estabilidade da resistência, a resposta a seleção (R) tornou-se negativa para a população R-NSEL, caracterizando-a como instável, entre a geração inicial e a quarta geração sem pressão de seleção ($R = -0,058$). A continuidade da ausência de pressão entre a quinta e oitava gerações, no entanto, demonstra estabilidade da resistência a partir da quarta geração. nesta população, sendo positiva a resposta a seleção ($R = 0,0073$) (Tabela 1).

A mortalidade dos adultos, expostos a DL_{50} para a população R-SEL indicou como estava a resposta desta população ao longo das gerações, e a necessidade de um novo bioensaio de determinação de uma nova curva (Tabela 2). Assim como, que o uso da DL_{50} determinada para R-SEL, ao final do estudo, ocasionou maior mortalidade para adultos da R-NSEL em $\sim 50\%$ (68% vs

32%, Tabela 2), ratificando a redução do nível de resistência para os indivíduos sem pressão de seleção. E, por outro lado, adultos da população R-SEL apresentou resposta de 73,34% de sobrevivência ao tratamento com 6 mg de i.a./mL de lambda-cialotrina, em grau técnico, na 78ª geração.

Quantificação da Atividade Enzimáticas de Enzimas Envolvidas na Resistência. A atividade de esterases diferiu significativamente tanto para α -esterase ($F_{2, 24} = 43,64$; $P < 0,0001$), como para β -esterase ($F_{2, 24} = 22,42$; $P < 0,0001$) (Fig. 3). A atividade de ambas as esterases foi reduzida significativamente em indivíduos da subpopulação sem pressão de seleção, em comparação aqueles indivíduos mantidos sob pressão de seleção, e ambas R-SEL e R-NSEL produzem mais esterases que SUS. A atividade de α -esterases foi, em média, $0,285 \pm 0,020$; $0,170 \pm 0,009$ e $0,105 \pm 0,008$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para R-SEL, R-NSEL e SUS, respectivamente. A atividade de β -esterases foi de $0,162 \pm 0,01$; $0,097 \pm 0,0067$ e $0,003 \pm 0,001$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para SUS, respectivamente.

Desempenho Biológico. Estudos prévios desmontaram redução de fecundidade em até 50% para fêmeas da população sob pressão de seleção R-SEL, quando a população estava na geração 9ª e 40ª geração de criação, em laboratório (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016).

Na 78ª geração da população R-SEL e na 8ª geração da população R-NSEL, o desenvolvimento, peso de adultos e a fecundidade de *E. connexa* foram variáveis (Tabela 3 e Figs. 1 e 2). Larvas da população R-SEL e da população R-NSEL tiveram o tempo o desenvolvimento reduzido em ~2 dias comparado a população SUS. Contudo, a duração de pupa não seguiu este mesmo padrão sendo mais rápido em R-SEL e SUS, e mais longo em R-NSEL. Desta forma, o desenvolvimento de larva a adulto foi mais rápido apenas para R-SEL. O peso de adultos recém-emergidos foi também variável sendo, em média, superior 2mg (~20%) para população R-SEL

quando comparados aos da população SUS. Adultos R-NSEL apresentaram peso intermediário não diferindo de R-SEL ou SUS.

Por outro lado, não houve diferença entre as populações, na viabilidade da fase de larva ($F_{2, 42} = 0,52$; $P = 0,5966$) variando de 90,7 a 93,3% e para a viabilidade da fase de pupa ($F_{2, 42} = 0,37$; $P = 0,6940$), variando de 99,3 a 100%. Ao avaliar os parâmetros reprodutivos das populações estudadas, verificou-se que a fecundidade anotada durante 35 dias da fase adulta, variou drasticamente. Fêmeas resistentes tanto da população R-SEL quanto da R-NSEL produziram, em média, 47,2 a 63% menos ovos na média cumulada no período de avaliação (Fig. 2). A viabilidade desses ovos depositados, por sua vez, não diferiu estatisticamente ($F_{2, 33} = 2,14$; $P = 0,1318$).

Discussão

Os resultados encontrados mostram que o nível de resistência da população de *E. connexa* R-SEL é expressiva, e que traz consigo o benefício da sobrevivência a doses elevadas do produto técnico lambda-cialotrina, em exposição tópica. Resultado que também tem carreado benefícios quando expostas a outros piretroides (Torres *et al.* 2015). Neste caso, a sobrevivência advém da detoxificação metabólica da lambda-cialotrina por esterases, o que exige um custo metabólico no desempenho da população com redução na sua fecundidade (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016, Rodrigues *et al.* 2016, D'Ávila *et al.* 2018).

Ainda, a pressão de seleção mantida com lambda-cialotrina sobre essa população estudada R-SEL detectada em campo por Rodrigues *et al.* (2013b) e, posteriormente, também constatada em várias outras populações de campo coletadas em diversas regiões do Brasil (Costa *et al.* 2018), está fixada na população R-SEL após as 80 gerações mantidas em laboratório. Mesmo após oito gerações sem pressão de seleção, a população R-NSEL apresentou razão de resistência de ~39x relativo a população SUS, e demonstra uma certa estabilidade com base na resposta à seleção após

quatro gerações sem pressão de seleção. Contudo, a população R-NSEL exibiu uma redução de ~50% na razão de resistência relativo à sua população parental R-SEL, bem como na produção de enzimas detoxificativas. Esses resultados corroboram, portanto com a hipótese de que a resistência da população de *E. connexa* já está fixa na população R-SEL, e que mesmo na população R-NSEL ela pode estar fixa, mas em um nível inferior.

A estabilidade da resistência na população R-NSEL a lambda-cialotrina pode estar associada ao longo período de submissão a pressão de seleção, tornando-a altamente homogênea. Observa-se que os coeficientes angulares (i.e., inclinações) das equações dose-resposta para R-SEL e R-NSEL (Tabela 1), são maiores comparados àquele determinado para a população suscetível, caracterizando uma alta homogeneidade de resposta desses indivíduos.

Usualmente, é esperado que a resistência em insetos, em especial quando associada a processos fisiológicos, que afetam negativamente as características da história de vida, sejam reduzidos na ausência da pressão de seleção (Kristensen *et al.* 2000, Abbas *et al.* 2015). Campos *et al.* (2014) obtiveram razão de resistência superior a 5000 com apenas sete gerações de pressão de seleção de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ao espinosade. Contudo, esses mesmos autores encontraram que a resistência reduz na proporção de 10× a cada 1,57 gerações e que atingiu novamente o status de suscetibilidade após oito gerações sem pressão de seleção.

Em *Liriomyza sativa* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) resistente ao clorpirifós conferida por meio de detoxificação metabólica (mediada por esterases), após a retirada da pressão de seleção por 13 gerações, reduziu em 80% o nível de resistência (Askari-Saryazdi *et al.* 2015). Da mesma forma, a resistência de *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) a permetrina e ao clorpirifós declinou ~250 e ~25 para 3,5× e 2,0×, respectivamente, após 15 gerações na ausência da pressão de seleção (Parrella & Trumble 1989).

Para *E. connexa* população R-NSEL, o presente estudo mostrou que a ausência da pressão de seleção resultou em redução na razão de resistência de ~50% após quatro gerações, mas tornou-se estável após 8 gerações, mantendo uma razão de resistência significativa. De forma similar a *E. connexa*, resistente a lambda-cialotrina, *Chrysoperla carnea* (Stephen) (Neuroptera: Chrysopidae) resistente a permetrina reduziu a razão de resistência aproximadamente três vezes, mantida em laboratório entre 1981 a 1985 (Pree *et al.* 1989). Ainda, *C. carnea* resistente à lambda-cialotrina, alfametrina e deltametrina demonstrou redução na razão de resistência de 15 a 36,2% ao longo de quatro gerações sem pressão de seleção ($R < 0$), com esses inseticidas (Sayyed *et al.* 2010).

Contudo, manteve por exemplo alto nível de resistência com razão de resistência a lambda-cialotrina de 92 após quatro gerações sem pressão de seleção, a partir de uma razão inicial de resistência de 137, apesar de não testarem a manutenção deste nível de resistência em gerações futuras, os autores consideraram a resistência como estável.

A estabilidade da resistência em uma população poderá estar associada a vários fatores, mas dois são principais: superior desempenho biológico na população resistente quando comparada com a suscetível (i), e uma extensiva pressão de seleção reduzindo a heterogeneidade na população (ii). Com base nos resultados de desempenho biológico, medido pela duração e viabilidade de desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos adultos das populações R-SEL e R-NSEL, descarta-se o fator principal, visto que a população se manteve com a maioria das características avaliadas compatíveis a população suscetível, mas com significativa redução na fecundidade.

Ecologicamente, entretanto a população R-SEL não será tão competitiva quanto comparada a população SUS na ausência da pressão de seleção. De acordo com Crow (1957), a partir do custo adaptativo associado a resistência, o fenótipo para resistência será diluído e perdido ao longo do tempo em condições naturais, por outro lado, em condições de pressão de seleção com exposição ao inseticida no agroecossistema, a população resistente seria apenas mantida devido a pressão de

seleção. Assim, a estabilidade observada em indivíduos da população R-NSEL de *E. connexa* nesse estudo parece estar associada a longa seleção a qual a população R-SEL tem sido exposta até o início do seu estabelecimento, que ocorreu quando a população encontrava-se na 70^a geração com intensa pressão de seleção e com crescente aumento da DL₅₀ (i.e., 0.21 na F1 para 5.68 mg i.a./mL na 70^a geração) ocasionando em uma redução da heterogeneidade da população. A redução do nível de resistência após ausência da pressão de seleção poderia estar relacionada à contribuição de genes secundários selecionados durante a pressão de seleção artificial (McKenzie 2000).

Este fato foi comprovado por meio dos altos coeficientes angulares das equações dose-resposta indicando homogeneidade de resposta (Tabela 1). Costa *et al.* (2018), testaram 12 populações de *E. connexa*, coletadas em campo, com a primeira e segunda geração de criação em laboratório e obtiveram inclinações das equações ajustadas de dose-resposta variando de 0,62 a 2,44 e razões de resistência variando de 1,88 a 884,08 relativo à população referência para suscetibilidade SUS, também usada neste estudo. Dessa maneira, a heterogeneidade observada nas populações recém coletadas de campo, no trabalho de Costa *et al.* (2018) mesmo apresentando alto nível resistência, pode ser reduzida após sucessivas gerações de criação sob pressão de seleção, o que pode ter levado a resistência de *E. connexa*, população R-SEL, aproximado da fixação. Portanto, sob o ponto de vista prático de utilização desta população R-SEL, em campo, mesmo na ausência a pressão de seleção ela manterá níveis de resistência que permitem sobreviver à aplicação da lambda-cialotrina na dosagem recomendada (400mL do produto comercial/ha; 0,2mg i.a./mL). Por outro lado, como já determinado anteriormente (Lira *et al.* 2016), após três gerações de cruzamento e retrocruzamento com indivíduos suscetíveis, o status de suscetibilidade é retornado.

Quanto aos parâmetros ligados a história de vida, como esperado houve diferença ente as populações R-SEL, R-NSEL e SUS. Além da menor fecundidade, os indivíduos adultos oriundos das populações resistentes (R-NSEL e R-SEL) foram mais pesados quando comparados aos da população SUS. Este resultado corrobora àqueles de Oliveira *et al.* (2005), que observaram indivíduos mais pesado de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) resistentes a piretroides, mostrando que o maior peso do inseto pode estar associado a maior taxa respiratória e enzimas produzidas para metabolizar o xenobiótico.

A resistência de inimigos naturais a inseticidas é pouco estudada e difundida, visto ser uma característica, quando naturalmente detectada, tratar de populações oriundas de habitat sobre grande pressão de aplicação inseticida (Sayyed *et al.* 2010, Costa *et al.* 2018), o que deveria ser evitado empregando medidas mais sustentáveis de controle de pragas.

A resistência de inimigos naturais a inseticidas pode ser direcionada em laboratório, embora apresente certa desconfiança, sob a justificativa de que irá permitir e estimular mais o uso de inseticidas, visto que o inimigo natural irá sobreviver a exposição. Esta preocupação não tem fundamento, pois a aplicação de inseticidas somente deverá ser realizada quando a densidade populacional atingir nível de controle.

Contudo, estudos mais detalhados com inimigos naturais resistentes a inseticidas e que demonstre a sua viabilidade de aplicação, podem auxiliar no processo de utilização. Entre eles, a oferta de uma população de inimigo natural resistente que poderá sobreviver uma eventual necessidade de pulverização para o controle de uma praga não alvo do inimigo natural, como testado por Spindola *et al.* (2013) e Lira *et al.* (2019), bem como permitir a sua multiplicação sem a necessidade de continua pressão de seleção a cada geração, como constatado no presente estudo com a população de *E. connexa*, resistente a lambda-cialotrina.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Literatura Citada

- Abbas, N., M. Ijaz, A.S. Shad & H. Khan. 2015.** Stability of field–selected resistance to conventional and newer chemistry insecticides in the house Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Neotrop. Entomol.* 44: 402-409.
- AGROFIT. 2019 (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários).** Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 25/02/2019.
- Askari-Saryazdi, G., M.J. Hejazi, J.S. Ferguson & M.R. Rashidi. 2015.** Selection for chlorpyrifos resistance in *Liriomyza sativae* Blanchard: cross-resistance patterns, stability and biochemical mechanisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 124: 86-92.
- Campos, M.R., A.R.S. Rodrigues, W.M. Silva, T.B.M. Silva, V.R.F. Silva, R.N.C. Guedes & H.A.A. Siqueira. 2014.** Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLoS ONE* 9: e103235.
- Carrieré Y. & E.B. Tabashnik. 2001.** Reversing insect adaption to transgenic insecticidal plants. *Biol. Sci.* 268:1475-1480.
- Costa, P.M.G., J.B. Torres, V.M. Rondelli & R. Lira. 2018.** Field-evolved resistance to λ -cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bull. Entomol. Res.* 108: 380-387.
- Crow, J.F. 1957.** Genetics of insect resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 2: 227-246.
- D'Ávila, V.A., W.F. Barbosa, L.C. Reis, B.S. Gallardo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2018.** Lambda–cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot.* 107: 41-47.
- Ferreira, E.S., A.R.S. Rodrigues, C.S.A. Silva–Torres & J.B. Torres. 2013.** Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agric. For. Entomol.* 15: 168-177.
- Gazave, E., C. Chevillon, T. Lenormand, M. Marquine & M. Raymond. 2001.** Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87:441-448.
- Kristensen, M., M. Knorr, A. G. Spencer & J. B Jespersen. 2000.** Selection and reversion of azamethiphos-resistance in a field population of the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), and the underlying biochemical mechanisms. *J. Econ. Entomol.* 93: 1788-1795.

- Lira, R., D.V. Nascimento, J.B. Torres & H.A.A. Siqueira. 2019.** Predation on diamondback moth larvae and aphid by resistant and susceptible lady beetle, *Eriopis connexa* (Germar). Neotrop. Entomol. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00702-8>
- Lira, R., Rodrigues, A.R.S. & J.B. Torres. 2016.** Fitness advantage in heterozygous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar) resistant to lambda-cyhalothrin. Neotrop. Entomol. 45: 573-579.
- McKenzie, J.A. 2000.** The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype. Bull. Entomol. Res. 90: 3-7.
- Okuma, D. M., D. Bernardi, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, A. P Silva & C. Omoto. 2018.** Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. Pest. Manag. Sci.74:1441-1448.
- Oliveira E.E, N.C.R. Guedes, S.A. Corrêa, L.B. Damasceno & T.C. Santos. 2005.**Pyrethroid resistance vs susceptibility in *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): is there a winner? Neotrop. Entomol. 34: 981-990.
- Parrella, M.P. & J. Trumble. 1989.** Decline of resistance in *Liriomyza trifoli* (Diptera: Agomyzidae) in the absence of insecticide selection pressure. J. Econ. Entomol. 82: 365-368.
- Pree, D.J., D.E. Archibald & R.K. Morrison. 1989.** Resistance to insecticides in the common green lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) in Southern Ontario. J. Econ. Entomol. 82: 29-34.
- Queiroz, M.C.V. & E.M. Sato. 2016.** Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. Exp. Appl. Acarol. 68: 71-82.
- Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide Bioassays with Arthropods. 1st ed. Boca Raton, CRC, Press, 127p
- Rodrigues, A.R.S, A.F. Spindola, J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & F. Colares. 2013b.** Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. Ecotoxicol. Environ. Saf. 96: 53-60.
- Rodrigues, A.R.S, H.A.A. Siqueira & J.B. Torres. 2014.** Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Pestic. Biochem. Physiol. 110: 36-43.
- Rodrigues, A.R.S, J.B. Torres, H.A.A Siqueira & D.P.A Lacerda. 2013a.** Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). Biol. Control 64: 217-224.
- Rodrigues, A.S., L. Botina, C.P. Nascimento, L. M Gontijo, J.B. Torres, & R.N.C. Guedes. 2016.** Ontogenic behavioral consistency, individual variation and fitness consequences among lady beetles. Behav. Proc. 131: 32-39.

- SAS Institute. 2002.** SAS/STAT user's guide, version 9.00 (TS MO). SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sayyed, A.H., A.K. Pathan & U. Faheem. 2010.** Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. Pestic. Biochem. Physiol. 98: 325-332
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using Bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85
- Spíndola, A.F., C.S.A. Silva-Torres, A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2013.** Survival and behavioural responses of the predatory ladybird beetle, *Eriopis connexa* populations susceptible and resistant to a pyrethroid insecticide. Bull. Entomol. Res. 103:485-494.
- Torres, J.B, A.R.S. Rodrigues, Barros E.M. & D.S Santos. 2015.** Lambda-cyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) confers tolerance to other pyrethroid. J. Econ. Entomol. 108: 60-68.
- van Asperen, K. 1962.** A study of house esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.
- Whalon, M.E. & W.H. McGaughey. 1998.** *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management, p. 106-137. In I. Ishaaya & D. Deheele (eds.), Insecticides with novel modes of action, mechanism and application. New York, Springer-Verlag, 304p.

Tabela 1. Suscetibilidade de *Eriopsis connexa* a lambda-cialotrina referente as populações: suscetível (SUS), resistente (R-SEL) e resistente não selecionada (R-NSEL), por oito gerações.

População/ Geração	N ¹	Coefficiente angular ± EP	DL ₅₀ ² (95% LC)	DL ₉₀ ² (95% LC)	$\chi^{2(3)}$	GL ⁴	P ⁵	RR ₅₀ ⁶	R ⁷
SU F76 ^a	129	1,14 ± 0,20	0,09 (0,048 – 0,146)	0,12 (0,060 – 4,33)	2,07	4	0,72	-	
R-SEL F70 ^a	125	1,71 ± 0,41	5,68 (3,61 – 7,78)	31,90 (18,5 – 131,11)	1,77	3	0,62	62,86 (23,73 – 166,54)	0,022 ^a
R-SEL F74 ^a	134	4,19 ± 0,70	6,97 (5,89 – 7,93)	14,10 (11,69 – 20,15)	6,52	4	0,16	77,10 (30,37 – 195,78)	0,004 ^b
R-SEL F78 ^a	105	3,09 ± 0,54	7,23 (5,82 – 9,04)	18,75 (13,79 – 33,02)	2,56	4	0,63	79,96 (31,24 – 204,67)	0,013 ^c
R-NSEL F4 ^a	129	6,85 ± 1,39	3,31 (2,93 – 3,80)	5,09 (4,30 – 7,22)	0,31	3	0,96	36,61 (14,43 – 92,90)	-0,058 ^d
R-NSEL F8 ^a	125	3,51 ± 0,56	3,54 (2,98 – 4,19)	8,22 (6,44 – 12,85)	6,29	4	0,18	39,19 (15,42 – 99,61)	0,007 ^e

¹Número de adultos testados; ²Dose letal para matar 50% ou 90%, e respectivos limites de confiança a 95% de probabilidade; ³Teste de ajuste de qui-quadrado; ⁴Grau de liberdade; ⁵Valor de P do teste de qui-quadrado de ajuste de Probit; ⁶Razão de resistência e respectivo limite de confiança calculado de acordo com Robertson & Preisler (1992); ⁷ R, resposta a seleção [= (Log_r-Log_i)/ng]. Resposta à seleção: ^aF74-F70; ^bF78-F74; ^cF78-F70; Estabilidade: ^dR-NSEL_{F4} – R-SEL_{F74}; ^eR-NSEL_{F8} – R-NSEL_{F4}.

Tabela 2. Porcentagens de mortalidade (Mort.) e sobrevivência (Sob.) de adultos de *Eriopis connexa* ao longo das gerações do estudo tratadas com a dose 6 mg i.a./mL de lambda-cialotrina, em grau técnico.

Gerações	N ¹	R-SEL		$\chi^2(2)$	N ¹	R-NSEL		$\chi^2(2)$
		Mort.	Sob.			Mort.	Sob.	
F71	138	55,79	44,21	0,67 ^{P=0,41}		- ⁴	-	-
F72	177	25,42	74,58	12,76 ^{P<0,001}		-	-	-
F73	188	38,46	61,52	2,69 ^{P=0,10}		-	-	-
F74 ³	61	19,51	80,48	20,49 ^{P<0,001}	64	59,09	40,91	1,66 ^{P=0,20}
F75	115	42,60	57,39	1,09 ^{P=0,29}		-	-	-
F76	106	47,16	52,84	0,16 ^{P=0,68}		-	-	-
F77	164	33,54	66,46	5,56 ^{P=0,02}		-	-	-
F78 ³	65	26,66	73,34	11,52 ^{P<0,001}	65	68,00	32,00	6,69 ^{P=0,01}

¹Número de adultos tratados em cada geração, ou com a respectiva dose na determinação da curva dose-resposta.

²Teste de qui-quadrado para a hipótese de igualdade entre mortalidade e sobrevivência com adultos tratados com a dose 6 mg i.a./ml do produto técnico.

³Determinação de novas curvas de dose-resposta.

⁴Resultado não determinado, pois a população estava sem pressão de seleção.

Tabela 3. Duração do desenvolvimento (dias) e peso de adultos (mg) de populações de *Eriopis connexa*: resistente (R-SEL), resistente sem pressão de seleção (R-NSEL) por oito gerações e suscetível (SUS).

Características	Populações			<i>F; P</i> G.L. = 2, 409
	R-SEL (n=139)	R-NSEL (n=138)	SUS (n=135)	
Duração de larva	13,5 ± 0,17 b	13,3 ± 0,14 b	15,1 ± 0,28 a	24,04; 0,0001
Duração de pupa	5,2 ± 0,07 b	6,8 ± 0,05 a	5,1 ± 0,09 b	148,91; 0,0001
Larva-adulto	19,7 ± 0,11 b	21,1 ± 0,17 a	21,2 ± 0,28 a	17,27; 0,0001
Peso de adultos	10,4 ± 0,92 a	9,4 ± 0,16 ab	8,4 ± 0,14 b	4,54; 0,0112

¹Médias (\pm EP) seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey HSD ($\alpha < 0,05$).

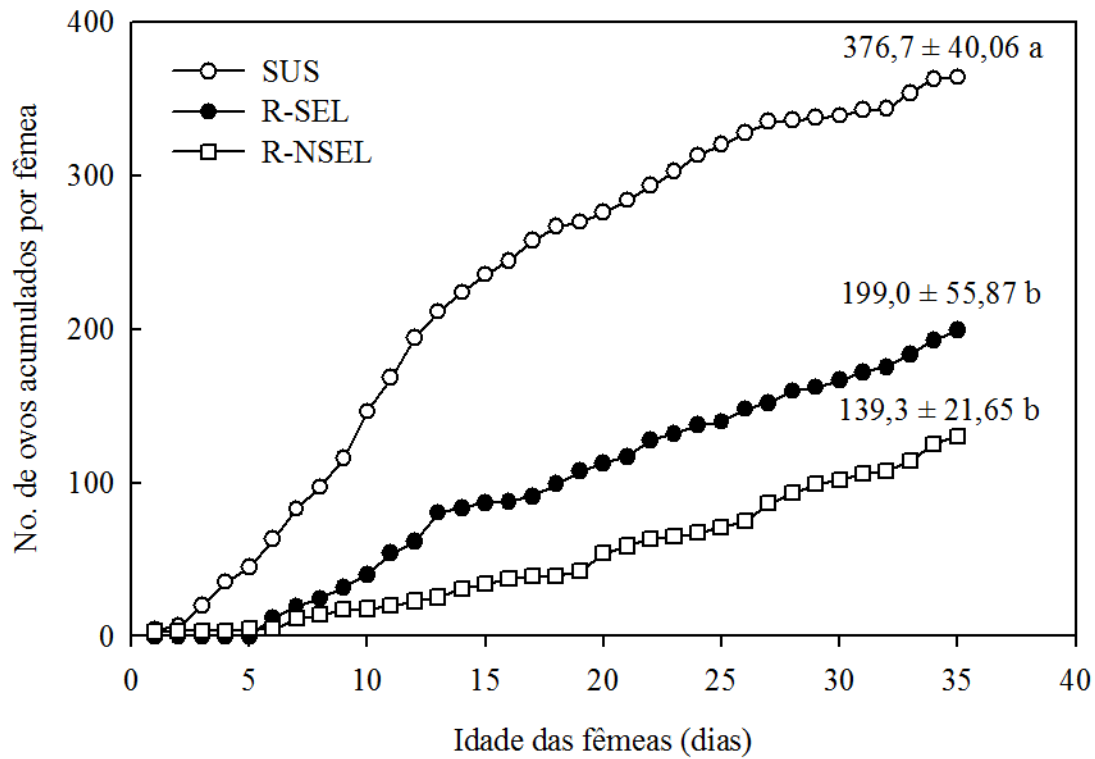


Figura 1. Número médio de ovos acumulados por fêmea das populações suscetível (SUS), resistente selecionada (R-SEL) e resistente não selecionada (R-NSEL), ao longo de 35 dias após o acasalamento. Nota: Valores representam a média no período (\pm EP), que seguidos de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey HSD ao nível de 5% de probabilidade.

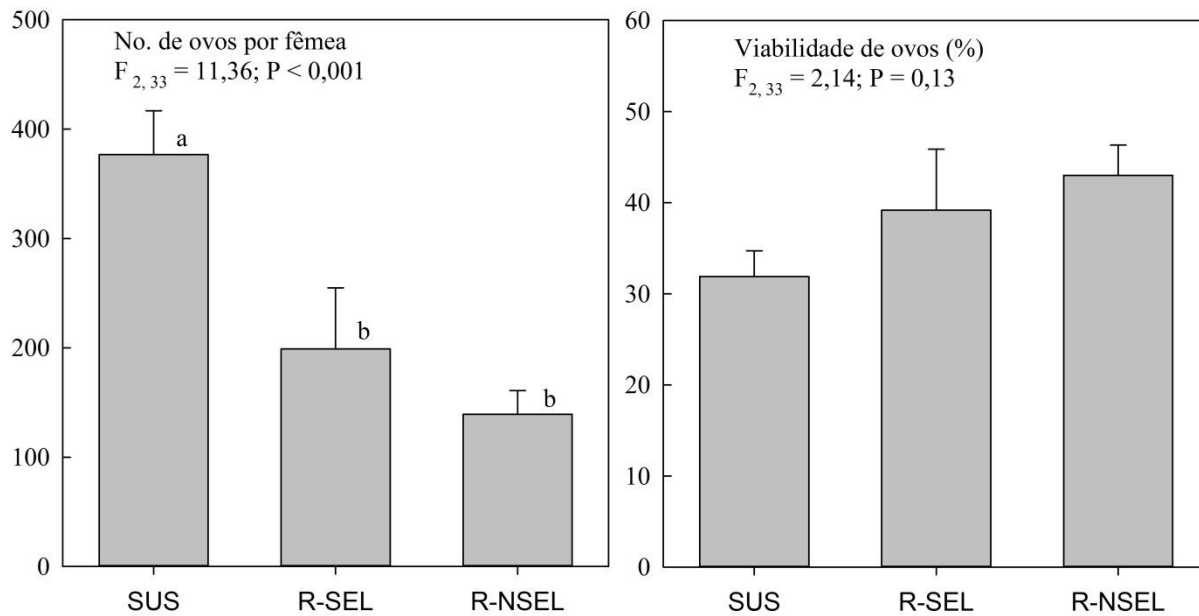


Figura 2. Médias (+EP) da fecundidade e viabilidade de ovos produzidos por indivíduos das populações suscetível (SUS), resistente (R-SEL) e resistente sem pressão de seleção (R-NSEL) após oito gerações. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, entre as populações pelo teste de Tukey HSD ao nível de 5% de probabilidade.

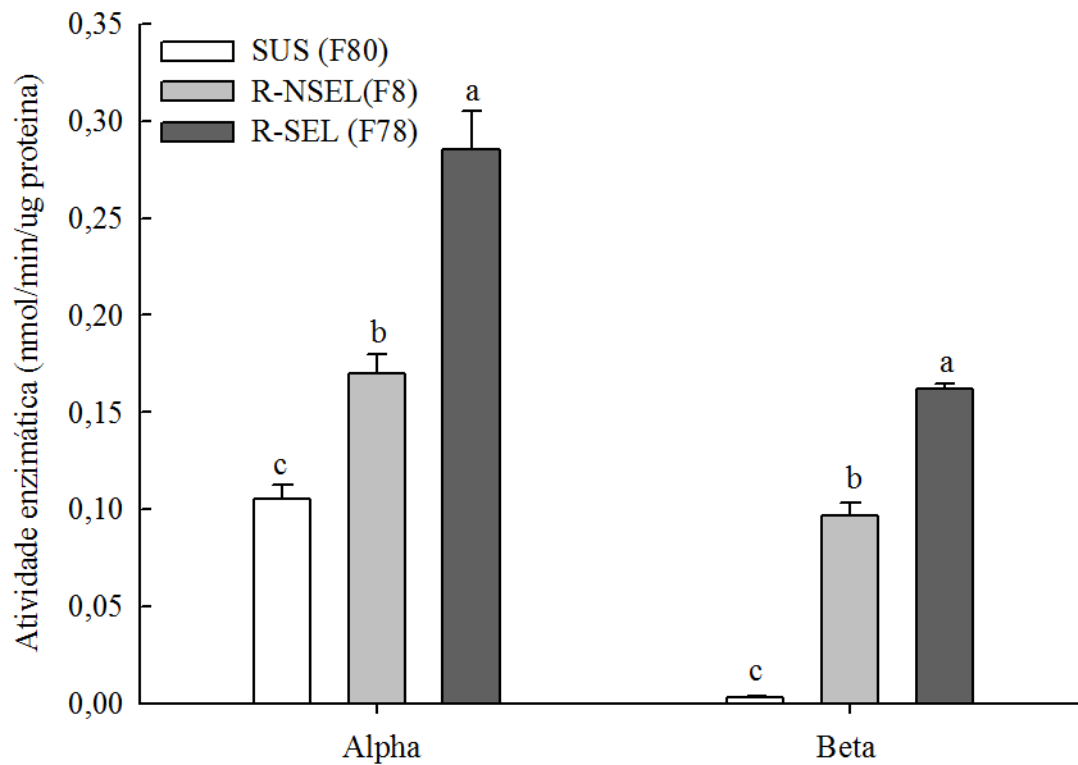


Figura 3. Médias (+EP) da atividade enzimática de α e β esterases para indivíduos das populações suscetível (SUS), resistente com pressão de seleção (R-SEL) e resistente sem pressão de seleção (R-NSEL) após oito gerações. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, entre as populações pelo teste de Tukey HSD ao nível de 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 3

DESEMPENHO DE *Eriopis connexa* (GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)
DO CRUZAMENTO DE PARENTAIS SUSCETÍVEL E RESISTENTE A LAMBDA-
CIALOTRINA¹

ALICE S. RODRIGUES²

²Departamento de Agronomia - Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manoel de Medeiros, Recife, PE, 52171-900, Brasil.

¹Rodrigues, A.S. O desempenho de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae) pode ser afetado pela suscetibilidade parental? A ser submetido.

RESUMO – A conservação da joaninha predadora, *Eriopis connexa* (Germar), resistente à lambda-cialotrina, após a liberação dependerá do desempenho de sua progênie. A partir do cruzamento entre uma população de *E. connexa* resistente à lambda-cialotrina em campo, com pares suscetíveis é esperado produzir uma progênie que seja também resistente, visto que o modo de herança de herança da resistência, ser autossômica nessa população. Neste trabalho foi caracterizada a suscetibilidade de uma nova população de *E. connexa* (SUS-C) e o desempenho da progênie do cruzamento desta população com uma população resistente (R-SEL). A população de campo caracterizada como suscetível, (SUS-C) foi ~200x mais suscetível que R-SEL. Adultos virgens de R-SEL e SUS-C foram cruzados, e sua progênie estudada quanto ao desenvolvimento e reprodução além da sobrevivência dos adultos, quando expostos as dosagens recomendadas de lambda-cialotrina. R-SEL. A duração do desenvolvimento de larva a adulto da progênie SUS-C foi aproximadamente 6 dias mais longa e os adultos produzidos foram mais leves que R-SEL e as progênies (F1) de SUS-C×R-SEL(F1). A fecundidade, aferida durante 35 dias, não foi diferente estatisticamente, embora fêmeas SUS-C e da progênie dos respectivos cruzamentos produziram mais de 130 ovos comparada as fêmeas R-SEL. A exposição ao resíduo seco de lambda-cialotrina resultou em 77,4 a 100% de sobrevivência para adultos da progênie de SUS-C×R-SEL e R-SEL, enquanto adultos SUS e SUS-C não sobreviveram as dosagens recomendadas. Os resultados mostram que o cruzamento de indivíduos R-SEL e SUS-C traz benefícios quanto ao seu desempenho biológico comparado ao custo reprodutivo pela resistência no parental R-SEL e mantém sua característica de sobreviver ao inseticida nas doses de campo recomendadas. Um ponto crucial, para a adoção do controle biológico inundativo visando a liberação da população R-SEL.

PALAVRAS-CHAVE: Piretroide, inimigo natural, controle biológico aplicado, resistência a inseticida, estabilidade da resistência.

PERFORMANCE OF *Eriopis connexa* (GERMAR) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)
FROM CROSSES OF SUSCEPTIBLE AND RESISTANT PARENTALS TO LAMBDA-
CYHALOTHRIN

ABSTRACT - The conservation of the predatory lady beetle, *Eriopis connexa* (Germar), resistant to lambda-cyhalothrin, after their release also relies on the performance of their progenies. Resistant individuals either from releasing or field-evolved when mating with susceptible pairs in the field is expected to produce a resistant progeny following the autosomic mode of the resistance inheritance to lambda-cyhalothrin. The susceptibility of a field-collected population (SUS-C) was characterized and determined the performance of their progenies mated with resistant parental (R-SEL). Virgin adults from SUS-C and R-SEL were paired, and determined the development, reproduction and survival of adults of their progenies when exposed to dried-residues of lambda-cyhalothrin at field rates. Adults from SUS-C population was ~200-fold more susceptible than R-SEL. Developmental times for SUS-C from larva to adult was delayed ~6 days, and produced adults smaller than R-SEL and their progenies. Egg production, did not differ across parental and progenies, but females from SUS-C and progenies SUS-C×R-SEL produced more than 130 eggs in comparison to females R-SEL during 35 days within adulthood period. Exposure to lambda-cyhalothrin resulted in 77.4 to 100% survival for adults from progenies R-SEL×SUS-C and parentals R-SEL, while SUS and SUS-C parental did not survive the insecticide exposure. These findings indicates that field crosses between R-SEL and SUS-C will improve the biological performance of their progenies compared to the parental R-SEL, and will maintain high survival rate to lambda-cyhalothrin.

KEY WORDS: Pyrethroid, natural enemy, physiological selectivity, resistance stability

Introdução

A resistência de artrópodes a piretroides é conspícua nos agroecossistemas. Trazendo diversas consequências econômicas, diretas e indiretas seja para o produtor, devido a falha de controle dos inseticidas nos campos de produção, seja para a empresa detentora a não recomendação do produto, uma vez que sua eficiência foi perdida. Uma das principais causas da alto índice de resistência a piretroides encontradas no campo, está associada ao modo de sua herança, sendo comum a autossomal, em que tanto machos quanto as fêmeas conferem resistência a progênie, a qual varia de incompletamente dominante a incompletamente recessiva (Collins 1998, Hardstone *et al.* 2007, Balasubramani *et al.* 2008, Cardozo *et al.* 2010, Sayyed *et al.* 2010, Rodrigues *et al.* 2014). Entretanto, variações, podem ocorrer em relação à ligação ao sexo (McDonald & Schmidt 1987, Guedes *et al.* 1994, Follet *et al.* 1995) e o número de genes ligados a resistência (Scott & Georghiou 1986, Raymond *et al.* 1989, Bouvier *et al.* 2001, Hardstone *et al.* 2009). Sendo comumente a detoxificação metabólica o mecanismo mais comum da resistência a piretroides (Pree *et al.* 1989, Oliveira *et al.* 2005, Rodrigues *et al.* 2014).

Similarmente ao que ocorre com insetos herbívoros, mas em menor proporção, insetos predadores têm sido submetidos constantemente a seleção para a resistência a piretroides, em campo. Por exemplo, o crisopídeo, *Chrysoperla carnea* (Stephens), é citado como resistente aos piretroides α -cipermetrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, lambda-cialotrina e permetrina (Pree *et al.* 1989, Pathan *et al.* 2008, Sayed *et al.* 2010) e, *Chrysoperla externa* Hagen à lambda-cialotrina (Bortoli *et al.* 2002, Luna *et al.* 2018). Em coccinelídeos, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville e *Eriopis connexa* têm sido caracterizadas como resistentes à lambda-cialotrina (Rodrigues *et al.* 2013b, 2014, Barbosa *et al.* 2016). *Stethorus gilvifrons* Mulsant à bifentrina (Kumral *et al.* 2011) e *Propylaea japonica* Thunberg ao fenvalerato (Wu *et al.* 2018).

Para *E. connexa*, espécie alvo desse estudo, além da resistência à lambda-cialotrina, conjuntamente ela apresenta uma alta tolerância a diversos outros piretroides (Torres *et al.* 2015). A resistência à lambda-cialotrina detectada nessa população, foi caracterizada a partir de uma população de campo de indivíduos adultos coletados em um cultivo de brássicas em Viçosa-MG em 2009, apresentando inicialmente uma razão de resistência de ~21x, sendo essa resistência mantida em laboratório sobre pressão de seleção, a cada geração. Seguindo essa linha de investigação, posteriormente a esse estudo, 21 novas populações de *E. connexa*, coletadas em campo, nos mais diferentes agroecossistemas foram testadas quanto a suscetibilidade à lambda-cialotrina, sendo que 50% delas, apresentaram algum grau de resistência, variando de 1,88x a 884,08x em relação a população referência de suscetibilidade (Costa *et al.* 2018).

Resultados demonstraram que a herança da resistência nesta população de *E. connexa* é autossômica e incompletamente dominante (Rodrigues *et al.* 2013b, 2014), sendo o mecanismo da resistência metabólico com a utilização de enzimas detoxificativas, α - β esterases (Rodrigues *et al.* 2014). Entretanto essa alteração fisiológica nos indivíduos resistentes demonstrou-se associada a um custo reprodutivo resultando na redução de ~50% na fecundidade de *E. connexa* (Ferreira *et al.* 2013, Rodrigues *et al.* 2016). Entretanto, quando indivíduos da população resistente foram cruzados com indivíduos suscetíveis da população referência de laboratório, a fecundidade da progênie F1 foi aumentada, demonstrando um ganho no desempenho após o cruzamento dessas populações criadas em laboratório (Lira *et al.* 2016). Além disso, devido ao modo de herança autossômica da resistência, a progênie F1 apresentou sobrevivência similar àquela observada para a população parental resistente, quando exposta à lambda-cialotrina. Esses resultados mostram o potencial de sobrevivência da progênie a partir da liberação de indivíduos resistentes acasalando com indivíduos suscetíveis, em campo.

Com base no exposto, este trabalho investigou o ganho no desempenho da progênie de *E. connexa*, a partir do acasalamento da população referência de resistência (R-SEL) e mantida a 78 gerações sobre pressão de seleção, com indivíduos de uma população de campo recém coletada (SUS-C), após ser caracterizada como suscetível à lambda-cialotrina. O desempenho dessa descendência é de grande interesse visto que irá determinar o sucesso da manutenção da população exibindo resistência, em campo.

A lambda-cialotrina, como os demais piretroides, é um inseticida de largo espectro recomendado contra várias espécies desfolhadoras. Contudo, possui baixa eficácia contra pulgões e outros insetos sugadores, isso dificulta o manejo dessas pragas pois a aplicação deste inseticida apresenta impacto negativo aos seus inimigos naturais, resultando comumente em surtos de pulgões após a sua aplicação (Kerns & Gaylor 1993, Hardin *et al.* 1995, Kidd *et al.* 1996; Kidd & Rummel 1997, Godfrey *et al.* 2000). Logo, tanto o desempenho da população, SUS, R-SEL como da progênie do acasalamento da população R-SEL com a população SUS-C, é importante para o manejo integrado de pragas. Para isto, foram determinadas e estudadas características como duração e viabilidade do desenvolvimento (larva e pupa), peso de adultos, fecundidade e viabilidade de ovos, bem como a sobrevivência dos adultos da progênie F1, quando expostos as dosagens recomendadas do produto formulado com a lambda-cialotrina, em comparação aos seus parentais.

As questões propostas para este estudo foram estudadas a partir da coleta e caracterização da suscetibilidade da população de *E. connexa* de campo “selvagem”, através de um bioensaio de dose-resposta à lambda-cialotrina em grau técnico, cruzamentos entre as populações resistente e suscetível de campo, e o monitoramento das características de desenvolvimento e reprodução da

progênie (F1), bem como determinada a sobrevivência desta progênie as dosagens mínima e máxima recomendadas do produto comercial a base de lambda-cialotrina.

Material e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As populações de *E. connexa* (ovos, larvas e adultos) foram mantidas em sala climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de ~70% e fotofase de 12 horas.

Obtenção dos Insetos e Caracterização da Suscetibilidade da População de Campo de *Eriopsis connexa*. Adultos foram coletados em restos culturais de soja e grão-de-bico em maio de 2018, no Núcleo Rural Vargem da Benção localizado na Rodovia BR 060/Km9, Gama, DF (Coordenadas 15° 55' 0,05" S e 48° 8' 17,41" O). A partir desses adultos, foram obtidas posturas para realizar a primeira geração de laboratório e condução dos estudos. O estudo envolveu a população recém coletada de campo e outras duas populações criadas em laboratório desde 2009, denominadas de população referência de suscetibilidade (SUS) e referência de resistência (R-SEL) respectivamente. A população R-SEL é mantida sob pressão de seleção a cada geração de adultos, e na geração do estudo, encontrava-se com a DL₅₀ equivalente a 6,0 mg de i.a./mL de lambda-cialotrina, em grau técnico, diluída em acetona. Por outro lado, a população SUS é criada sob as mesmas condições de laboratório, porém sem exposição a inseticidas.

A criação das três populações foi semelhante, diferenciando somente quanto a exposição ao inseticida. Assim os adultos foram criados em gaiolas de acrílico (60 × 30 × 30 cm, comprimento, largura e altura) e alimentados com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep.: Pyralidae) em abundância, uma mistura de mel e levedura (1:1), e presa natural de campo quando disponível. As presas naturais (psilideos e pulgões) eram ofertadas aos adultos para estimular a oviposição. No

interior da caixa de criação foi adicionado papel toalha amassado como substrato para a oviposição. As posturas eram coletadas e transferidas para recipientes de plásticos de 80 mL até a eclosão das larvas. Estes foram criadas nos mesmos recipientes, porém na densidade de três larvas por recipiente e alimentadas com ovos de *A. kuehniella* com reposição de alimento e assepsia foi realizado a cada dois dias, até e a emergência dos adultos.

A suscetibilidade da população de campo foi determinada mediante bioensaio de curva dose-resposta à lambda-cialotrina em grau técnico (99,5%; Chem Service, West Chester, PA, EUA), diluída em acetona. Um bioensaio preliminar foi realizado com as doses de 0,01, 0,3 e 0,7 mg i.a./mL de lambda-cialotrina com aproximadamente 100 adultos, sem distinção de sexo e com 10 dias de idade.

A partir dos resultados foi estabelecida na geração F2 um bioensaio com a utilização de seis doses seriadas de lambda-cialotrina (0,01; 0,02; 0,03; 0,035; 0,04 e 0,05 mg i.a./mL), além da testemunha. Cada dose foi testada com o mínimo de 10 adultos por dose, sendo o bioensaio foi repetido duas vezes (n = 20 adultos no mínimo por dose). A aplicação da lambda-cialotrina diluída em acetona foi realizada com 0,5µL da respectiva dose na parte ventral do abdome de cada inseto com auxílio de uma seringa Hamilton™ (Hamilton Company, Reno, NV, USA) de 25µL de volume acoplada a um aplicador de repetição controlada. Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para calcular as DLs e seus respectivos limites de confiança, a 95% de probabilidade, empregando o Proc Probit do SAS (SAS Institute 2002).

Desenvolvimento e Desempenho Reprodutivo da Progenie F1. Estudos anteriores demonstraram redução na fecundidade em até 50% na população resistente sobre pressão de seleção (R-SEL) (Ferreira *et al.* 2013, Lira *et al.* 2016, D'Ávila *et al.* 2018). Com base nos resultados do bioensaio anterior, a população de campo foi caracterizada como sendo suscetível e denominada de SUS-C.

Assim, esta população SUS-C foi empregada nos ensaios de cruzamento com a população R-SEL, e comparada com as populações de referência para suscetibilidade (SUS) e resistência (R-SEL).

O cruzamento teve por objetivo testar a hipótese de que a redução da fecundidade estaria relacionada com a resistência e que a descendência do cruzamento de R-SEL com SUS-C manteria a progênie resistente, considerando o modo herança da resistência autossômico definida para *E. connexa* à lambda-cialotrina. Entretanto, o impacto na fecundidade da progênie oriunda do cruzamento seria amenizado devido ao efeito da heterose (Lira *et al.* 2016).

Foram realizados cruzamentos entre SUS-C e R-SEL: ♀R-SEL × ♂SUS-C, ♂R-SEL × ♀SUS-C e padrão para comparação: ♂×♀ SUS-C, ♂×♀ R-SEL e ♂×♀ SUS. Cada cruzamento correspondeu a um tratamento (n = 5) e constou de 15 casais (repetições), exceto para o cruzamento ♂×♀ SUS que foi conduzido com 10 casais. Para os pareamentos foram utilizados adultos virgens (♂ e ♀) com 7 a 10 dias de idade após a emergência, quando é possível definir o sexo das fêmeas pela dilatação do abdome, bem como permitir o tratamento de seleção da população R-SEL. Adultos da população R-SEL foram usados após a recuperação da seleção com lambda-cialotrina, aplicada nos adultos com 5 dias de idade. Os casais foram monitorados diariamente para obter a produção e viabilidade dos ovos e a sobrevivência das fêmeas durante 35 dias, após o pareamento.

A partir da segunda e terceira postura, ovos foram coletadas dos respectivos tratamentos e as características da fase imatura foram monitoradas. Um total de 60 larvas neonatas, de cada progênie e parentais, foi monitorada diariamente, obtendo assim as datas de pupação, emergência, peso de adultos com até 24h de idade sem alimentação, viabilidade larval e pupal e durações de larva e pupa.

Os dados da fase adulta relativo a produção diária de ovos, produção de ovos durante os 35 dias de observações e viabilidade de ovos, bem como os dados do desenvolvimento e sobrevivência da descendência e peso dos adultos, oriundos dos respectivos tratamentos, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente, e transformados quando necessários. Em seguida, os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade, para as diferentes características anotadas empregando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute 2002).

Sobrevivência da Descendência ao Resíduo Seco de Lambda-Cialotrina. Adultos provenientes dos tratamentos (cruzamentos) (Tabela 1), foram expostos ao resíduo seco em superfície inerte tratada com a lambda-cialotrina, na formulação comercial Karate Zeon 50SC, na diluição de 100 e 400 mL/ha em 150L de água correspondendo a 5 e 20 g i.a./ha (AGROFIT 2019). Para tanto, tampas e fundos de placas de Petri de vidro (9 × 1,2 cm, diâmetro e altura) foram pulverizadas com um total de 2 mL da calda inseticida nas dosagens de 100 e 400 mL/ha e deixadas em capela por ~2 h, para evaporação da calda. Adultos oriundos dos tratamentos foram transferidos para as placas tratadas contendo ovos de *A. kuehniella* como presa e oferecido na tampa da placa, uma porção da dieta suplementar composta de mel e levedura (1:1).

Assim, o bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5×2), sendo cinco tratamentos (descendência dos cruzamentos) e dois fatores representados pelas duas dosagens, totalizando 10 tratamentos. Cada tratamento constou de três repetições (placas de Petri tratadas) contendo de 11 a 25 adultos cada (n = 33 a 75 adultos avaliados por tratamento), dependendo da disponibilidade de adultos com idade ideal para o estudo. As placas contendo os insetos foram mantidos nas mesmas condições de criação, em

laboratório, e os adultos confinados avaliados quanto ao efeito de *Knockdown* após 2h de confinamento. A sobrevivência foi anotada 48h após o confinamento. Após esta avaliação, os adultos sobreviventes foram transferidos para potes plástico de 500 mL de volume possuindo tampa com abertura de ~6cm de diâmetro e fechada com tela anti-afídeo para permitir ventilação. Nesses potes, os adultos foram alimentados à vontade e a mortalidade monitorada durante 20 dias.

As porcentagens de sobrevivência após 48h de confinamento no resíduo seco foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente, sendo os dados transformados em arco seno da raiz(x/100). Em seguida, os resultados foram submetidos à ANOVA em esquema fatorial (5 × 2) empregando o Proc ANOVA do SAS e as médias de tratamentos comparadas pelo teste de Tukey HSD e entre dosagens pelo teste de Fisher da ANOVA, a 5% de probabilidade (SAS Institute 2002). Os dados de sobrevivência ao longo do tempo, 20 dias, foram empregados para cálculo de curvas de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank, empregando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute 2002).

Retrocruzamento Com o Resistente. Fêmeas virgens, com idade de 7 a 10 dias, obtidas dos cruzamentos F1 ♀R-SEL × ♂SUS-C e F1 ♂R-SEL × ♀SUS-C foram novamente pareadas (retrocruzadas) com machos virgens R-SEL (Tabela 1), formando 15 casais para cada retrocruzamento. Os casais foram monitorados diariamente, para obter a produção e viabilidade dos ovos e a sobrevivência das fêmeas diariamente por 35 dias após pareamento. Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para normalidade e homogeneidade, respectivamente, e transformados quando necessários. Em seguida, os resultados foram submetidos a ANOVA e interpretados pelo teste de Fisher para os parâmetros de fertilidade, fecundidade e produção diária de ovos empregando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute 2002).

Sobrevivência da Descendência do Retrocruzamento. Adultos com 7 a 10 dias de idades, oriundo dos retrocruzamentos (Tabela 1), foram submetidos ao teste de suscetibilidade à lambda-cialotrina em formulação comercial Karate Zeon 50SC, como descrito anteriormente. Assim, o bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×2) tendo dois tratamentos (descendentes dos dois retrocruzamentos) e duas dosagens recomendadas do Karate Zeon 50SC 100 e 400 mL/150L, correspondente a 5 e 20 g i.a./ha (AGROFIT 2019). Cada tratamento constou de três repetições com no mínimo 20 insetos por repetição (n = 60 insetos avaliados por tratamento). Os dados de sobrevivência ao longo do tempo, 20 dias, foram empregados para cálculo de curvas de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank empregando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute 2002).

Resultados

Caracterização da Suscetibilidade da População de Campo de *Eriopsis connexa*. O resultado de mortalidade obtido através do bioensaio dose-reposta para as três populações em estudo (R-SEL, SUS e SUS-C) assumiram o modelo de Probit ($P > 0,05$), indicando que os valores das DLs calculados e, seus respectivos limites de confiança a 95% de probabilidade, são verdadeiros. A partir dos resultados para a população de campo, esta pode ser caracterizada como suscetível à lambda-cialotrina com valores de DLs inferiores àqueles calculados para população referência de suscetibilidade (SUS) (Tabela 2). Assim, esta população de campo pode ser denominada como população suscetível de campo (SUS-C) e, utilizada para avaliar o desempenho biológico e o custo adaptativo da progênie do cruzamento da população resistente (R-SEL) e suscetível de campo (SUS-C).

Desempenho Reprodutivo e Desenvolvimento da Progenie F1. As características avaliadas durante 35 dias da fase adulta para as fêmeas da população SUS-C, das populações de referência SUS e R-SEL e as duas populações de cruzamentos foram similares quanto a fecundidade ($F_{4, 48} = 1,59$; $P = 0,1920$), ovos produzidos por dia ($F_{4, 48} = 1,58$; $P = 0,1917$) e taxa de eclosão de larvas ($F_{4, 48} = 0,84$; $P = 0,5075$). A fecundidade (média \pm EP) neste período de 35 dias foi de $395,0 \pm 59,10$ e $340,1 \pm 42,63$ ovos para as populações suscetíveis de campo (SUS-C) e laboratório (SUS), respectivamente. Fêmeas da população resistente (R-SEL) e dos cruzamentos (R-SEL \times SUS-C) produziram, em média, $235,7 \pm 47,94$; $373,7 \pm 43,60$ e $399,7 \pm 55,43$ ovos, respectivamente. Por fim, a taxa de eclosão de lavas variou de 35 a 63%, sem diferença significativa entre as populações e progênies.

Quanto ao desenvolvimento, a população SUS-C prolongou em ~ 6 dias a fase de larva em comparação as populações de referência R-SEL e SUS, e ~ 7 dias relativo as larvas das progênies dos cruzamentos desta com as populações R-SEL e SUS ($F_{4, 252} = 108,94$; $P < 0,0001$; Tabela 3). Também, a duração total de larva a adulto foi prolongada para indivíduos SUS-C ($F_{4,252} = 122,39$; $P < 0,0001$). Além da maior duração da fase imatura, o peso de adultos da população SUS-C foi inferior aos parentais R-SEL e da F1 do cruzamento $\text{♂SUS-C} \times \text{♀R-SEL}$ ($F_{4,252} = 7,71$; $P < 0,0001$). Por outro lado, as viabilidades da fase larval e pupal foram similares entre as populações e progênies, e variaram de 81,6 a 95% e de 96,2 a 100%, respectivamente.

Sobrevivência da Descendência ao Resíduo Seco de Lambda-cialotrina. A exposição de adultos ao resíduo seco da lambda-cialotrina, diferenciou a suscetibilidade das populações e das progênies dos respectivos cruzamentos ($F_{4, 20} = 409,85$; $P < 0,0001$), com sobrevivência variando de 0 a 100% (Fig. 1). A população de referência R-SEL apresentou 100% de sobrevivência, independente das dosagens mínima e máxima de lambda-cialotrina (Fig. 1). Por outro lado, as populações suscetíveis

de laboratório e campo não exibiram sobrevivência independente da dosagem utilizada. Assim, demonstrando uma resposta apenas entre populações, não caracterizando interação de populações e dosagens de lambda-cialotrina ($F_{4, 20} = 0,09$; $P = 0,9841$) (Fig. 1). As progênes, no entanto, diferiram quanto a sobrevivência com aquela oriunda do cruzamento ♂R-SEL×♀SUS-C exibindo menor sobrevivência (77,4% e 81,1% nas dosagens mínima e máxima) comparado as sobrevivências da população R-SEL e do cruzamento ♀R-SEL×♂SUS-C (Fig. 1).

O monitoramento dos indivíduos sobreviventes, durante 20 dias, após o confinamento por 48h sobre o resíduo seco da lambda-cialotrina, resultou em sobrevivência acima de 80%, para todas as populações e progênes (Fig. 2). Contudo, é observada variação nesta sobrevivência ($\chi^2 = 42,43$; $GL = 5$; $P < 0,0001$), a qual é caracterizada por mortalidade até 5 dias de confinamento resultando em menor sobrevivência (80,9%), para a progênie do cruzamento ♂R-SEL×♀SUS-C ($\chi^2 = 4,30$; $GL=1$; $P = 0,0381$), quando expostos na maior dosagem do inseticida.

Retrocruzamento com o Resistente e Sobrevivência da Descendência ao Resíduo Seco de Lambda-Cialotrina. Para as características avaliadas durante 35 dias da fase adulta não houve diferença para as fêmeas usadas nos retrocruzamentos F1 (♀ R-SEL × ♂SUS-C) e F1 (♂R-SEL ×♀ SUS-C) (Tabela 1). Sendo a média da fecundidade acumulada ao longo do tempo para F1 (♀ R-SEL × ♂SUS-C) de $457,07 \pm 43,10$ ovos e F1 (♂R-SEL ×♀ SUS-C) de $368,93 \pm 57,90$ ovos. Assim as fêmeas dos retrocruzamentos foram semelhantes quanto a fecundidade ($F_{1,28} = 2,61$; $P = 0,1175$), oviposição diária ($F_{1, 28} = 2,48$; $P = 0,1270$) e taxa de eclosão de larvas ($F_{1, 28} = 2,64$; $P = 0,1175$). Quanto a exposição dos adultos provenientes dos retrocruzamentos ao resíduo seco de lambda-cialotrina, não houve diferença na suscetibilidade ($F_{1, 10} = 2,00$; $P = 0,1881$), com resultado variando de 93,3 a 100% de sobrevivência, independente da dose testada. Com relação ao

monitoramento dos indivíduos sobreviventes do retrocruzamento, durante 20 dias, após o confinamento por 48h sobre o resíduo seco de lambda-cialotrina, a sobrevivência foi superior a 93%, independente da dosagem do inseticida, não sendo observada diferença significativa ($\chi^2 = 1,2173$; GL = 3; P = 0,7489).

Discussão

A população coletada para este estudo apresentou alta suscetibilidade a lambda-cialotrina, sendo mais suscetível que a população de laboratório, referência de suscetibilidade (SUS), mantida por 76 gerações sem exposição à lambda-cialotrina. Apesar de recentemente coletada, esta população, pode ser também caracterizada como sendo uma população de resposta altamente homogênea a lambda-cialotrina requerendo concentrações muito próximas no bioensaio de dose-resposta, resultando em alto coeficiente de inclinação comparado as populações SUS e R-SEL, bem como um limite de confiança a 95% de probabilidade para a DL_{50} de 0,031 a 0,035. Os resultados obtidos permitem, assim, inferir que as duas populações SUS-C e R-SEL estudadas representam bem os dois extremos entre suscetibilidade e resistência a lambda-cialotrina. Além disso, os resultados obtidos representam claramente o esperado para as suas progênes. Por exemplo, as progênes oriundas dos cruzamentos SUS-C×R-SEL sobreviveu entre 77,4 a 97,7% ao resíduo seco das dosagens mínima e máxima recomendadas de lambda-cialotrina, mesmo padrão observado na população R-SEL. A progênie apresentou duração do desenvolvimento similar as populações R-SEL e SUS e inferior a população SUS-C, e com adultos de tamanho similar àqueles da população R-SEL, e superiores as populações SUS e SUS-C.

Além disso, houve um ganho numérico de mais de 130 ovos por fêmea das progênes, durante os 35 dias de avaliação, em relação à população resistente, corroborando com os resultados de Lira *et al.* (2016), que encontraram grande recuperação da fecundidade da progênie do

cruzamento de parentais resistente e suscetível, em laboratório. Desta maneira, as progênies dos cruzamentos entre SUS-C e R-SEL apresentam maior produção de descendentes que R-SEL e sobrevivem ao tratamento com dosagens recomendadas do inseticida, similar a R-SEL. Ainda, entre as populações suscetíveis, nota-se que a população criada por várias gerações em laboratório (SUS) está adaptada as condições de criação, apresentando desenvolvimento mais rápido e adultos mais pesados que a população recentemente coletada (SUS-C). Este fato corroborado com os resultados obtidos com a população R-SEL, também, criada por 78 gerações, nas mesmas condições de laboratório e alimentação.

A alta suscetibilidade da população de campo (SUS-C) pode estar associada ao fator operacional relativo à ausência da pressão de seleção por piretroides na área de coleta. Em uma mesma região podemos coletar populações suscetível e resistente de *E. connexa* (Costa *et al.* 2018), o que justifica a seleção para a resistência como um processo microevolutivo (Ffrench-Constant *et al.* 2004). Populações de *E. connexa* oriundas de agroecossistemas com grande utilização de inseticidas como algodão e milho, podem ser caracterizadas como suscetíveis, mas também possuindo altos níveis de resistência à lambda-cialotrina (Costa *et al.* 2018). Fatores comuns como temperatura e disponibilidade de presas, favorecem maior número de gerações e populações com grande número de indivíduos, o que interage com o histórico do uso de inseticidas para maximizar a pressão de seleção para resistência. Isto porque a resistência de uma população de insetos a inseticida está relacionada a pressão de seleção imposta e governada por fatores genéticos e fisiológicos (Winteringham 1969, Croft 1990).

Entretanto, uma clara separação entre ausência e presença da pressão de seleção, em campo, para coccinelídeos torna-se complexa, visto a capacidade de dispersão de adultos entre ambientes podendo resultar na redução, à exposição ao resíduo dos inseticidas. A resistência múltipla de *H.*

convergens a lambda-cialotrina e dicrotofós, caracterizada por Barbosa *et al.* (2016), foi justificada pelo histórico de contínuas exposições a piretroides e organofosforados nos agroecossistemas de algodão, fumo, noz pecan e outros, na mesma área, cultivados simultaneamente ou em sequência. Fato, também, observado para fitófagos quando não há rotação de culturas e modos de ação dos inseticidas utilizados, resultando em sucessivas exposições ao mesmo ingrediente ativo (Huseth *et al.* 2015).

No que se refere à sobrevivência das progênes expostas às dosagens de lambda-cialotrina, observa-se que houve um pequeno pico de mortalidade nos primeiros dias de exposição não ultrapassando 15% mortalidade (Fig. 2). Após este período a sobrevivência se manteve com resultado final variando entre 80,9 a 98,5%. A sobrevivência da progênie seguiu o padrão proposto para um fenótipo heterozigoto que expressa a resistência, oriundo do cruzamento de parentais resistente e suscetível com herança autossômica (Tabashnik 1991, Lira *et al.* 2016). Rodrigues *et al.* (2013b) caracterizaram a resistência para a população, em estudo, de *E. connexa* à lambda-cialotrina após 10 gerações de seleção como sendo monogênica, mas com potencial de influência de genes secundários. Contudo, sucessivas gerações sobre pressão de seleção reduz a variabilidade imposta por esses genes secundários (Roush & McKenzie 1987), o que pode explicar sobrevivência de até 98,5% da progênie, mas também sobrevivência de 77,4%, a qual está dentro do resultado de 75% de sobrevivência esperada para as progênes de SUS-C×R-SEL.

Com base nos resultados dos cruzamentos SUS-C×R-SEL podemos inferir sobre as progênes: o efeito da heterose promoveu desenvolvimento mais rápido observado na população parental que na população parental SUS-C, maior produção de ovos que R-SEL durante o período que provavelmente compreende o período de sobrevivência dos adultos em campo, submetidas às condições variáveis de temperatura e presa, e alta sobrevivência as dosagens recomendadas de lambda-cialotrina similares a R-SEL. Contudo, a conservação da população R-SEL, bem como de

sua progênie do acasalamento com pares suscetíveis, não somente dependerá da resistência à lambda-cialotrina, visto que outros inseticidas são requeridos visando o controle de espécies pragas, bem como rotação de modos de ação. No caso de recomendação de piretroides, que não a lambda-cialotrina, R-SEL exibe também alta sobrevivência a permetrina, cipermetrina, deltametrina e fenvalato, e baixa sobrevivência a fenproprina e bifentrina, sendo esses dois últimos não recomendados (Torres *et al.* 2015). Na busca pela recomendação empregando-se diferentes modos de ação e espécies praga, alguns inseticidas tem mostrado nenhuma ou baixa toxicidade aguda para *E. connexa*. Entre eles, podemos destacar pimetrozina, chlorantraniliprole e espinosade (Barros *et al.* 2018), piriproxifem e teflubenzurom (Fogel *et al.* 2016), e espinetoram (dados não publicados).

Além desses, formulações de *Bacillus thuringiensis*, bem como de vírus entomopatogênicos, devido à especificidade no modo de ação, não é esperado impacto negativo para *E. connexa*. Assim, a utilização de *E. connexa* resistente à lambda-cialotrina, bem como apresentando tolerância a outros piretroides, deve também ser combinada com a recomendação de outros inseticidas com modos de ação diferentes, quando necessária, de conhecida eficácia e especificidade para a praga alvo visando o manejo da resistência. De maneira geral, inseticidas específicos apresentam nenhum ou baixo impacto sobre inimigos naturais e, portanto, devem ser priorizados no manejo integrado de pragas (Torres & Bueno 2018). Assim, casos de resistência de inimigos naturais a inseticidas, como observado para R-SEL e progênie F1 de *E. connexa*, potencialmente, a ser obtida em campo do cruzamento de R-SEL e pares suscetíveis, favorecem a seletividade fisiológica.

A liberação e conservação de inimigos naturais têm sido preconizadas nos programas de manejo integrado de pragas. Diversas espécies de parasitoides e predadores são empregadas em

programas de controle biológico (van Lenteren *et al.* 2018). Essas espécies podem ser melhoradas para características desejadas como adaptação às condições de clima, especialmente temperaturas extremas, indução ou quebra de diapausa, resistência a inseticidas, entre outras (Hoy 1984, Routray *et al.* 2016). Muitas dessas espécies não produzem o sucesso, como desejado, devido a fatores como má adaptação às condições climáticas e suscetibilidade a inseticidas aplicados para o controle de espécies pragas, não alvo do inimigo natural. Novamente, a disponibilidade de inseticidas naturalmente apresentando seletividade fisiológica, bem como a compatibilidade criada pela seleção para resistência em inimigos naturais, pode contribuir para o uso e conservação dos mesmos. Assim, ao optar pela liberação de um inimigo natural, a oferta de populações da espécie desejada que apresentem características adicionais selecionadas para aumentar a sua eficiência ou sua conservação após liberação, como a resistência apresentada por *E. connexa* vem potencializar os resultados. Por fim, conforme demonstrado neste estudo, quando adultos de *E. connexa* liberados, ou de campo, apresentando resistência à lambda-cialotrina, acasalarem com indivíduos suscetíveis, a progênie resultante em sua maioria será de indivíduos também resistentes, e com menor custo adaptativo associado a resistência.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES - PROEX) pela concessão de bolsa de estudo a ASR.

Literatura Citada

AGROFIT. 2019 (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários). Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 25/02/2019.

- Barbosa, P.R.R., J.P. Michaud, A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2016.** Dual resistance to lambda-cyhalothrin and dicotophos in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere* 159: 1-9.
- Barros, E.M., C.S.A. Silva-Torres, J.B. Torres & G.G. Rolim. 2018.** Short-term toxicity of insecticides residues to key predators and parasitoids for pest management in cotton. *Phytoparasitica* 46: 391-404.
- Bortoli, S.A., R.J. Ferreira, J.E. Miranda & J.E.M. Oliveira. 2002.** Suscetibilidade de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) a Karate® (Lambda-cialotrina) em Condições de Laboratório. *Bol. San. Veg. Plagas* 28: 577-584.
- Bouvier, J.C., R. Buès, T. Boivin, L. Boudinhon, D. Beslay & B. Sauphanor. 2001.** Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: 456-462.
- Bouvier, J.C., R. Buès, T. Boivin, L. Boudinhon, D. Beslay & B. Sauphanor. 2001.** Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: 456-462.
- Collins, P.J. 1998.** Inheritance of resistance to pyrethroid insecticides in *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 34: 395-401.
- Costa, P.M.G., J.B. Torres, V.M. Rondelli & R. Lira. 2018.** Field-evolved resistance to λ -cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bull. Entomol. Res.* 108: 380-387.
- Croft, B.A. 1990.** Arthropod biological control agents and pesticides. New York, John Wiley & Sons, 723p.
- D'Ávila, V.A., W.F. Barbosa, L.C. Reis, B.S. Gallardo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2018.** Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot.* 107: 41-47.
- Ferreira, E.S., A.R.S. Rodrigues, C.S.A, Silva-Torres & J.B. Torres. 2013.** Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agric. For. Entomol.* 15: 168-177.
- Ffrench-Constant, R.H., P.J. Daborn & G.L. Goff. 2004.** The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20: 163-170.
- Fogel, M.N., M.I. Schneider, F. Rimoldi, L.S. Ladux, N. Desneux & A.E. Ronco. 2016.** Toxicity assessment of four insecticides with diferente modes of action on pupae and adultos of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the neotropical region. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 14918-14926.
- Follet, P.A., F. Gould & G.C. Kennedy. 1995.** High-realism model of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) adaptation to permethrin. *Environ. Entomol.* 24: 167-178.

- Godfrey, L., J.A. Rosenheim & P.B. Goodell. 2000.** Cotton aphid emerges as major pest in SJV cotton. *Calif. Agric.* 54: 26-29.
- Guedes, R.N.C., J.O.G. Lima, J.P. Santos & C.D. Cruz. 1994.** Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *Int. J. Pest Manag.* 40: 103-106.
- Hardin, M.R., B. Benrey, M. Coll, W.O. Lamp, G.K. Roderick & P. Barbosa. 1995.** Arthropod pest resurgence: an overview of potential mechanisms. *Crop Prot.* 14: 3-18.
- Hardstone, M.C., C. Leichter, L.C. Harrington, S. Kasai, T. Tomita & J.G. Scott. 2007.** Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross-resistance in the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89: 175-184.
- Hardstone, M.C., C.A. Leichter & J.G. Scott. 2009.** Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, *kdr* and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *J. Evol. Biol.* 22: 416-423.
- Hoy, M.A. 1984.** Genetic improvement of a biological control agent: multiple pesticide resistance and nondiapause in *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Phytoseiidae), p. 673-679. In D.A. Griffiths & C.E. Bowman (eds.), *Acarology VI, Volume 2*. New York, Ellis Horwood Ltd., 1296p.
- Huseth, A.S., Petersen J.D., Poveda, K., Szendrei, Z., Nault, B.A., Kennedy, G.G. & Groves, L.R. 2015.** Spatial and temporal potato intensification drives insecticide resistance in the specialist herbivore, *Leptinotarsa decemlineata*. *PlosONE* 10: e0127576.
- Kerns, D.L. & M.J. Gaylor. 1993.** Induction of cotton aphid outbreaks by insecticides in cotton. *Crop Prot.* 12: 387-393.
- Kidd, P.W. & D.R. Rummel. 1997.** Effect of insect predators and a pyrethroid insecticide on cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, population density. *Southwest. Entomol.* 22: 381-393.
- Kidd, P.W., D.R. Rummel & H.G. Thorvilson. 1996.** Effect of cyhalothrin on field populations of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in the Texas High Plains. *Southwest. Entomol.* 21: 293-301.
- Kumral, N.A., N.S. Gencer, H. Susurluk & C. Yalcin. 2011.** A comparative evaluation of the susceptibility to insecticides and detoxifying enzyme activities in *Stethorus gilvifrons* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae). *Int. J. Acarol.* 37: 255-268.
- Lira, R., A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2016.** Fitness advantage in heterozygous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar) resistant to lambda-cyhalothrin. *Neotrop. Entomol.* 45: 573-579.

- Luna, R.F., L.R. Bestete, J.B. Torres & C.S.A. Silva-Torres. 2018.** Predation and behavioral changes in the neotropical lacewing *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) exposed to lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicology* 27: 689-702.
- Oliveira, E.E., R.N.C. Guedes, A.S. Corrêa, B.L. Damasceno & C.T. Santos. 2005.** Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor. *Neotrop. Entomol.* 34: 981-990.
- Pathan, A.K., A.H. Sayyed, M. Aslam, T.-X. Liu, M. Razzaq & W.A. Gillani. 2008.** Evidence of field-evolved resistance to organophosphates and pyrethroids in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 1676-1684.
- Pathan, A.K., A.H. Sayyed, M. Aslam, T.X. Liu, M. Razzaq & W.A. Gillani. 2010.** Resistance to pyrethroids and organophosphates increased fitness and predation potential of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Econ. Entomol.* 103: 823-834.
- Pree, D.J., D.E. Archibald & R.K. Morrison. 1989.** Resistance to insecticides in the common green lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) in Southern Ontario. *J. Econ. Entomol.* 82: 29-34.
- Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide Bioassays with Arthropods. 1st ed. Boca Raton, CRC, Press, 127p.
- Rodrigues, A.R.S., A.F. Spindola, J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & F. Colares. 2013a.** Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96: 53-60.
- Rodrigues, A.R.S., H.A.A. Siqueira & J.B. Torres. 2014.** Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 110: 36-43
- Rodrigues, A.R.S., J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & D.P.A Lacerda 2013b.** Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 64: 217-224.
- Rodrigues, A.S., L. Botina, C.P. Nascimento, L. M. Gontijo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2016.** Ontogenic behavioral consistency, individual variation and fitness consequences among lady beetles. *Behav. Processes* 131: 32-39.
- Roush, R.T. & J.A. McKenzie. 1987.** Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Routray, S., D. Dey, S. Baral, A.P. Das & B. Mahantheshwara. 2016.** Genetic improvement of natural enemies: A review. *Agric. Rev.* 37: 325-332.
- SAS Institute. 2002.** SAS/STAT User's guide, release 9.0. Cary, SAS Institute.

- Sayed, A.H., A.K. Pathan & U. Faheem. 2010.** Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. Pestic. Biochem. Physiol. 98: 325-332
- Tabashnik, B.E. 1991.** Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. J. Econ. Entomol. 81: 703-712.
- Torres, J. B. & A. D. F Bueno. 2018.** Conservation biological control using selective insecticides—a valuable tool for IPM. Biol. Control 126:53-64.
- Torres, J.B, A.R.S. Rodrigues, Barros E.M. & D.S Santos. 2015.** Lambda-cyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) confers tolerance to other pyrethroids. J. Econ. Entomol. 108: 60-68.
- Van Lenteren, J.C., K. Bolckmans. J. Köhl, W.J. Ravensberg & A. Urbaneja. 2018.** Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl 63:39-59.
- Winteringham, F.P.W. 1969.** Mechanisms of selective insecticidal action. Annu. Rev. Entomol. 14:409-442.
- Wu, G., Y. Wang, J. N. Wang, X. Z Chen, Q. X. Hu, Y. F. Yang & Q. Q. Liu. 2018.** Vitality and stability of insecticide resistance in adult *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). J. Insect Sci, 18:6- 16.

Tabela 1. Cruzamentos programados entre as populações suscetível de campo (SUS-C), suscetível de laboratório (SUS) e resistente selecionada (R-SEL).

Cruzamentos	Parentais	
	♀	♂
Controles – referências		
♀SUS-C × ♂SUS-C	Campo	Campo
♀R-SEL × ♂R-SEL	Resistente	Resistente
♀SUS × ♂SUS	Suscetível	Suscetível
Cruzamentos		
♀R-SEL × ♂SUS-C	Resistente	Campo
♀SUS-C × ♂R-SEL	Campo	Resistente
Retrocruzamentos		
♀F1 _[♀R-SEL×♂SUS-C] × ♂R-SEL	[♀ Resistente × ♂ Campo]	Resistente
♀F1 _[♀SUS-C×♂R-SEL] × ♂R-SEL	[♀ Campo × ♂ Resistente]	Resistente

Tabela 2. Suscetibilidade de *Eriopis connexa* à lambda-cialotrina para a população de campo, e populações referência para suscetibilidade (SUS) e resistência (R-SEL).

Populações (geração)	N (gl) ¹	Coefficiente angular ± EP	DL ₅₀ (95% LC)	RR ₅₀ (95% LC)	χ^2 Valor de P
SUS (F76)	129 (4)	1,14 ± 0,20	0,090 (0,048- 0,146)	-	2,0752 0,7219
SUS-C (F2)	195 (4)	11,10 ± 1,59	0,033 (0,031 - 0,035)	0,36 (0,11-1,25)	0,1599 0,9970
R-SEL (F78)	105 (4)	3,09 ± 0,54	7,23 (5,82 - 9,04)	200,96* (165,96243,32)	2,5632 0,6334

¹N, número de indivíduos testados e respectivo grau de liberdade (gl); Doses letais (DL) para matar 50% da população, e seus respectivos limites de confiança a 95% de probabilidade; valores de razões de resistência (RR) significativos (*) quando o LC a 95% não inclui o valor 1,0 (Robertson & Preisler 1992); teste de qui-quadrado (χ^2) para ajuste do modelo de Probit e respectivo valor de probabilidade (P).

Tabela 3. Duração do desenvolvimento (dias) e peso de adultos (mg) para as progênies dos cruzamentos SUS-C×R-SEL, parentais suscetível de campo (SUS-C) e populações de referência para resistência (R-SEL) e suscetibilidade (SUS) de *Eriopis connexa*.

Características ¹	Populações (geração)					F; P G.L. = 4, 252
	Progênies		Parentais (referências)			
	♀R-SEL×♂SUS-C (F1)	♂R-SEL×♀SUS-C (F1)	♂×♀SUS-C (F2)	♂×♀R-SEL (F82)	♂×♀SUS (F83)	
Duração de larva (d)	12,7 ± 0,29 c	13,5 ± 0,19 bc	20,5 ± 0,44 a	13,8 ± 0,22 bc	14,3 ± 0,30 b	108,94; < 0,0001
Duração de pupa(d)	8,1 ± 0,18 a	4,5 ± 0,09 d	5,2 ± 0,11 c	4,4 ± 0,12 d	5,9 ± 0,08 b	139,40; < 0,0001
Larva-adulto(d)	21,8 ± 0,31 b	19,0 ± 0,18 c	26,7 ± 0,37 a	19,1 ± 0,26 c	21,3 ± 0,23 b	122,39; < 0,0001
Peso de adultos(mg)	8,5 ± 0,27 ab	9,2 ± 0,25 a	7,8 ± 0,28 b	9,4 ± 0,21 a	8,2 ± 0,22 b	7,71; <0,0001

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra, na linha, não diferem pelo teste de Tukey HSD (P > 0,05).

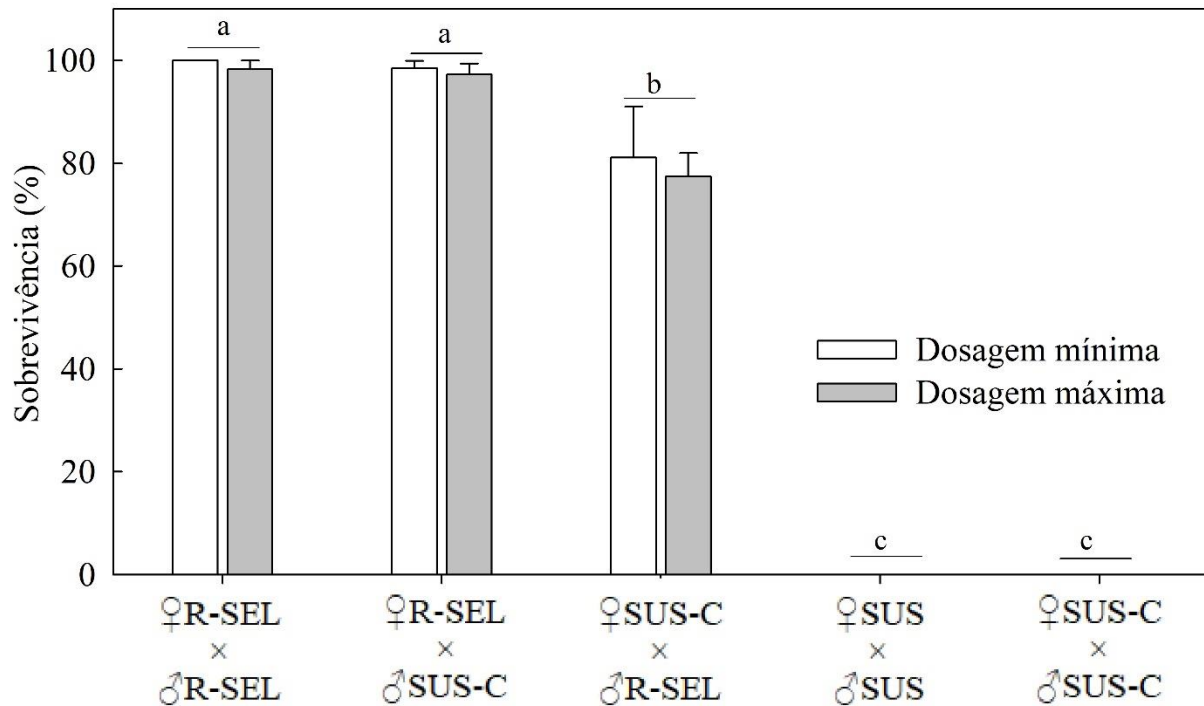


Figura 1. Sobrevivência de adultos de *Eriopsis connexa* confinados no resíduo seco de lambda-cialotrina empregando o produto comercial Karate Zeon 50CS na dosagem mínima (100 mL/há) e máxima (400 mL/ha) recomendadas. Nota: Não houve significância (ANOVA, $P > 0,05$) para os efeitos principais de dosagem e interação dosagem e população. Assim, barras com letras diferentes comparam apenas resultados de populações e seus respectivos cruzamentos (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

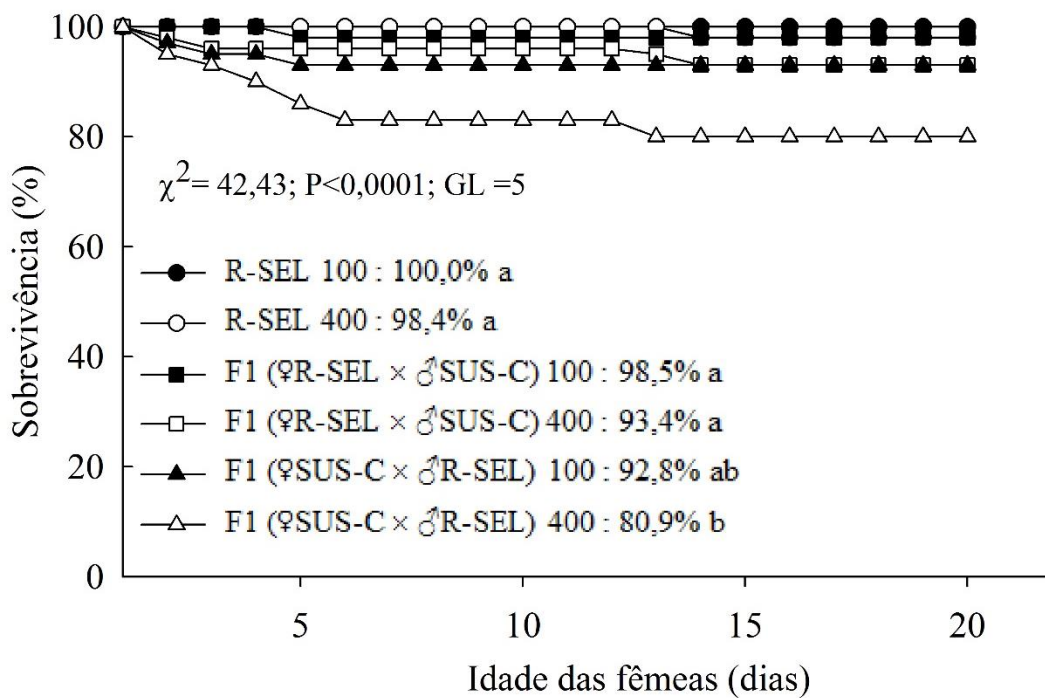


Figura 2. Curvas de sobrevivência da população resistente (R-SEL) e progênie F1 do cruzamento da população R-SEL e população de campo e suscetível (SUS-C) de *Eriopis connexa* durante 20 dias da fase adulta após confinamento sobre resíduo seco de lambda-cialotrina empregando dosagens mínima e máxima (100 e 400mL/ha) recomendadas. Nota: Curvas estimadas pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de insetos predadores para o controle de pragas de forma aumentativa, data antes da síntese dos inseticidas sintéticos. Após a disponibilidade dos inseticidas, como ferramenta para o controle de pragas, o interesse pelo controle biológico, em todas as suas modalidades (conservativo, aumentativo e clássico) foi reduzido. Contudo, com as falhas de controle resultante do uso inadequado dos inseticidas, e surgimento de populações resistentes, o controle biológico voltou a ser importante, e parte fundamental, para o sucesso dos programas de manejo integrado de pragas.

A conservação de inimigos naturais é a modalidade mais simples, prática e de menor custo para a obtenção do controle biológico. Contudo, apenas um inimigo natural, ou mesmo, apenas o controle biológico não irá solucionar a maioria dos problemas de pragas, em especial nos agroecossistemas com múltiplas espécies, comumente estabelecidos nas regiões subtropicais e tropicais. Assim, os inseticidas continuam sendo e serão ferramentas importantes para o controle de pragas, mas quando utilizado impõem limitações ao controle biológico. Embora, inseticidas e inimigos naturais possam ser usados de forma complementar quando compatíveis, a ação de inimigos naturais resistentes tem o papel de reduzir as chances de ressurgência de pragas, bem como de retardar o aparecimento de populações da praga alvo resistente ao inseticida. Isto, porque o inimigo natural resistente ao sobreviver à aplicação inseticida irá atuar sobre as pragas não alvo, mas também sobre aqueles indivíduos da praga alvo escapando do controle.

Com base nos resultados de nosso estudo, a criação da população de *E. connexa*, coletada em campo e apresentando uma razão de resistência inicial de $\sim 21\times$, teve sua razão de resistência

aumentada com pressão de seleção em torno de $\sim 80\times$ (F78), porém pouco alterada a partir da F60 demonstrando estabilidade (Capítulo 2). Assim, os estudos foram conduzidos para gerar informações sobre a estabilidade dessa resistência em *E. connexa*, bem como estudos de laboratório sobre a possível manutenção desta resistência, em campo, após acasalamento entre população resistente e suscetível. Os resultados mostraram que:

- Populações de *Eriopsis connexa*, em campo, pode exibir alta suscetibilidade a lambda-cialotrina, caracterizando-a como um inseticida não seletivo;
- Contudo, populações também podem exibir resistência a lambda-cialotrina, a qual pode ser aumentada através de pressão de seleção. Assim, ela sobrevive as dosagens recomendadas do inseticida aplicado em campo;
- A população resistente de *E. connexa*, sem pressão de seleção durante oito gerações, mostrou declínio no nível de resistência na quarta geração relativo a população parental resistente. Contudo, o mesmo nível de resistência, apresentado na quarta geração, foi mantido na oitava geração demonstrando estabilidade na resistência. Isto permite a criação da população resistente sem pressão de seleção, a cada geração, e com nível de resistência que sobrevive as dosagens recomendadas do inseticida;
- A população sem pressão de seleção, apesar de reduzir o nível de resistência e a produção de enzimas detoxificativas, manteve-se com menor fecundidade comparada a população suscetível;
- O acasalamento de indivíduos resistentes com suscetíveis resulta em progênie F1 resistente e que sobrevive as dosagens recomendadas de lambda-cialotrina. Além disso, a progênie apresenta ganho no desempenho reprodutivo comparado aos parentais resistentes.

A partir desses resultados, podemos manter a população resistente sem pressão de seleção, como é atualmente feita a cada geração. Contudo, o nível de resistência deverá ser checado ou a população submetida a pressão de seleção a cada oito ou menos gerações.

São necessários ainda, mais estudos sobre a manutenção da resistência e seu custo reprodutivo relativo as progênies de potenciais cruzamentos, em campo, entre resistentes e suscetíveis. Estudos esses com as progênies do retrocruzamento da progênie F1 (oriundas do cruzamento de indivíduos resistente e suscetíveis de campo) com indivíduos suscetíveis para prever o desempenho biológico e sobrevivência a exposição inseticida.