

ASPECTOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS DA RESISTÊNCIA A DELTAMETRINA
EM POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

WELLINGTON MARQUES DA SILVA

(Sob Orientação do Professor César Auguste Badji)

RESUMO

Plutella xylostella (L.) é uma das principais pragas das culturas de *Brassica*. A infestações em áreas de cultivo de Pernambuco e outros estados do Brasil levaram os agricultores a pulverização de inseticidas com frequência. A evolução da resistência a inseticidas pode ser apontada como um dos principais problemas no controle desta praga. Esta resistência pode estar associada com a alteração do sítio alvo, especialmente para os piretróides. Além de que, outros fatores de resistência podem também estar relacionados com a ineficiência deste produto, tais como comportamento, onde os indivíduos resistentes são capazes de evitar a exposição a áreas onde o inseticida está presente. O objetivo dessa pesquisa foi verificar se existe relação entre a frequência da mutação L1014F nos canais de sódio e as razões de resistência a deltametrina em populações de *P. xylostella*, se elas possuem a capacidade de evitar a exposição a este inseticida. *P. xylostella* foram coletadas na região Agreste de Pernambuco e Rio Grande do Sul. As razões de resistência a deltametrina das populações de campo de *P. xylostella* foram comparados com a população de laboratório. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit. As populações de *P. xylostella* mostraram uma variável resposta e resistência significativa à deltametrina. A população Belo Jardim, PE mostrou maior índice de resistência (10 - vezes) comparados com a população de laboratório. Foi observado um aumento do genótipo RR

para a mutação L1014F como o aumento da resistência. As larvas de *P. xylostella* foram expostas a deltametrina na concentração de campo de (7,5 mg / L), e na sua CL_{99S} previamente determinada a partir de bioensaios, o comportamento de caminamento foi avaliado pelo sistema de rastreamento Viewpoint® tracking system. As populações de Belo Jardim, PE e Bezerros, PE apresentaram comportamento irritabilidade em todos os dos parâmetros comportamentais analisados.

PALAVRAS-CHAVE: Mutação, comportamento, deltametrina, canal de sódio.

GENETIC AND BEHAVIORAL ASPECTS OF RESISTANCE IN DELTAMETHRIN

POPULATIONS *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

By

WELLINGTON MARQUES DA SILVA

(Under the Direction of Professor César Auguste Badji)

ABSTRACT

Plutella xylostella (L.) is one of the major pests of *Brassica* crops. The infestations in cultivated areas of Pernambuco and other states in Brazil have led farmers to frequently spray insecticides. The evolution of insecticide resistance can be pointed as one of the main problems in the control of this pest. This resistance may be associated with the target site alteration, particularly to pyrethroids. Aside from that, other resistance factors may also be related to inefficacy of products such as behavior, where the resistant individuals are able to avoid exposure to areas where the insecticide is present. This research objective was to verify whether a relationship exists between the frequency of the L1014F mutation in the sodium channel and the deltamethrin resistance ratios in populations of *P. xylostella*, as well as whether they have the ability to avoid exposure to this insecticide. *P. xylostella* populations were collected in the Agreste region of Pernambuco and Rio Grande do Sul States. Deltamethrin resistance ratios of *P. xylostella* field populations were compared with a laboratory population. Mortality data were subject to Probit analysis. The populations of *P. xylostella* showed a variable response and significant resistance to deltamethrin. The Belo Jardim, PE population showed the highest resistance ratio (10 - times) compared with the laboratory population. It was observed an increase of the RR genotype for L1014F mutation as the resistance increased. *P. xylostella* larvae were

exposed to deltamethrin at field rate concentration (7.5 mg/L) and at their CL_{99s} previously determined from bioassays, and their walking behavior evaluated by the Viewpoint® tracking system. The populations of Belo Jardim, PE and Bezerros, PE showed irritability behavior across all of the walking behavioral parameters analyzed.

KEY WORDS: Mutation, behavior, deltamethrin, the sodium channel.

ASPECTOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS DA RESISTÊNCIA A DELTAMETRINA
EM POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

WELLINGTON MARQUES DA SILVA

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

RECIFE - PE

Fevereiro–2011

ASPECTOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS DA RESISTÊNCIA A DELTAMETRINA
EM POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

WELLINGTON MARQUES DA SILVA

Comitê de Orientação:

César Auguste Badji – UAG / UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

ASPECTOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS DA RESISTÊNCIA A DELTAMETRINA
EM POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

WELLINGTON MARQUES DA SILVA

Orientador: _____
César Auguste Badji – UFRPE

Examinadores: _____
Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

DEDICATÓRIA

*A minha amada madrinha **Maria José do Nascimento** (in memória) esta pessoa maravilhosa, que sempre esteve comigo desde os primeiros anos da minha vida. Quem disse que fada madrinha não existe? A minha existiu e se chamou Nina (Te amo para sempre). Ao meu querido padrinho **Antônio** pelo incentivo confiança e por sempre acreditar em mim.*

Dedico

*A minha amada mãe **Maria dos Prazeres**, essa mulher guerreira, que sempre esteve comigo em todos os pequenos e grandes passos da minha vida. Os meus sonhos se tornaram concretos graças a sua força e coragem. Te amo muito!*

Ofereço

*A **Deus** por está sempre comigo em todos os momentos de dificuldades, minha rocha e fortaleza. Muito obrigado por não me deixar desistir e está sempre comigo, estendendo-me a mão para que eu possa levantar.*

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de obtenção deste título.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, que me concedeu a bolsa, fato este que contribuiu para viabilização desta dissertação.

Aos meus amados pais Maria dos Prazeres e Luiz João pelo esforço contínuo para sempre me oferecer o melhor e pelos seus maravilhosos ensinamentos.

A Paulete Costa, minha noiva amada. Sou imensamente grato, privilegiado e feliz pelo seu apoio, carinho, compreensão e amor.

Aos meus vizinhos queridos Adi Gudes e Edmilson Guedes pela força, coragem e amizade, minha eterna gratidão.

A minha querida sobrinha Maria Luiza, pelos seus sorrisos que alegrara-me nas horas de tensão neste mestrado.

A minha querida Sogra Tereza Cristina pela alegria, espontaneidade, orações e os almoços no fim de semana.

A Tereza Cristina e Valdir de Queiroz, pelo privilégio de tê-los no caminho da minha formação profissional, mas principalmente pela sabia orientação e amizade.

A professora Valéria Wanderley Teixeira pela confiança e por ter sido a primeira pessoa acreditar em mim, em algo tão novo. Mostrando-me que sou capaz acima de tudo.

Ao professor César Auguste Badji pela oportunidade de orientar-me nessa trajetória.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pelo profissionalismo e desprendimentos em ajudar-me na construção deste trabalho.

Aos amigos do laboratório pelos momentos de descontração. Em especial: Andresa, Lillian, Glaucilane, Carolina, Jefferson, Mateus e Tadeu. Sou eternamente Grato.

Aos amigos Moisés, Cesar, Carlos e Wagner pela grande ajuda neste trabalho. Obrigado por está sempre disposto para me ajudar.

Aos meus amigos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães Fabiana Laura, Wagner, Vladimir, Paloma, Silvania, e Cristhian pela amizade e ajuda na realização deste trabalho. O meu muito obrigado.

A todo que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	02
Definição da Resistência	03
Mecanismos de Resistência.....	04
Monitoramento da Resistência	07
Inseticidas piretróides.....	07
Ação dos inseticidas piretróides no canal de sódio	08
Resistência Knockdown	09
Uso de PCR na detecção da Resistência	12
LITERATURA CITADA.....	13
2 RESISTÊNCIA KNOCKDOWN (<i>KdR</i>) EM POPULAÇÕES DE <i>Plutella xylostela</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	35

LITERATURA CITADA.....	35
3 RESISTÊNCIA COMPORTAMENTAL A DELTAMETRINA EM POPULAÇÕES DE <i>Plutella xylostela</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) DO AGRESTE DE PERNAMBUCO-BRASIL	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	54
AGRADECIMENTOS.....	57
LITERATURA CITADA.....	57

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), é uma das principais pragas das brássicas e de outras crucíferas em muitas áreas do mundo (Honda *et al.* 1992, Chapman *et al.* 2002). Esta espécie é de clima temperado e tropical, onde pode produzir mais de 20 gerações por ano e causar mais de 90% de perda na cultura (Verkerk & Wright 1996). Os motivos do seu sucesso são vários: ausência de inimigos naturais, comportamento críptico das larvas, ciclo de vida curto e frequentes aplicações de inseticidas (Mo *et al.* 2003). Este inseto tem desenvolvido resistência a muitas classes de inseticidas, devido ao uso indiscriminado, proporcionado a seleção de populações resistente. A praga tem um longo histórico de resistência à maioria dos inseticidas usados no seu controle (Talekar & Shelton 1993). Nas Filipinas, Barroga (1974) reportou para esta espécie, o desenvolvimento de resistência a mevinfos do grupo químico dos organofosforados. Posteriormente outros casos de resistência foram relatados no Japão, Austrália e América do norte. Georghiou & Lagunes-Tejada (1991) relataram que em 1989 já eram conhecidos 51 inseticidas químicos aos quais *P. xylostella* apresentava resistência. Há relato de resistência aos pesticidas espinosade, indoxacarbe e inseticidas microbianos a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Tabashnik *et al.* 2000, Sayyed & Wright 2006, Zhao *et al.* 2006). No Brasil existem relatos de resistência de *P. xylostella* aos inseticidas indoxacarbe, lufenuron e deltametrina (Castelo Branco & Amaral 2002, Oliveira *et al.* 2011, Santos *et al.* 2011).

Definição da Resistência

O uso abusivo de inseticidas acarreta o fenômeno da resistência, gerando um grande obstáculo no controle de inseto-pragas. Este problema é um fenômeno mundial e as estimativas atuais indicam que mais de 540 espécies de artrópodes desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas (Georghiou & Lagunes-Tejeda 1991). A resistência a inseticidas é então definida como a habilidade herdada de um organismo de tolerar as doses de um agrotóxico que seriam letais para a maioria dos indivíduos da espécie (Croft *et al.* 1988). No âmbito evolutivo da espécie resistente, conforme Dobzhansky (1951) a resistência a inseticidas caracteriza-se por ser pré-adaptativa genética e hereditária. No contexto agrícola a resistência tem sido identificada como uma das mais sérias ameaças ao desenvolvimento e manutenção de práticas do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Metcalf 1980, Labbe *et al.* 2005).

A evolução da resistência é uma consequência do controle inadequado de pragas. Muitas das práticas de manejo, tais como: controle químico, resistência de plantas a insetos e agentes de controle biológico são idealizadas e colocadas na prática com o objetivo de reduzir, a qualquer custo biológico, a população de uma praga mediante o aumento da mortalidade ou pela diminuição da fecundidade dos insetos. Deste modo, possíveis diferenças na sobrevivência e/ou fecundidade entre os indivíduos de uma população, após a utilização de alguma destas práticas de manejo, podem resultar na seleção de insetos resistentes a táticas de controle (Via 1990). Neste caso, a existência de suficiente variabilidade genética na população de insetos com relação a quaisquer características fisiológicas e/ou comportamentais que possibilitem os indivíduos sobrepujar as medidas de controle, implica em um processo inevitável de seleção de pragas mais adaptadas e difíceis de serem controladas (Gould 1988).

Dentre as consequências drásticas da evolução da resistência estão à aplicação mais frequente de pesticidas; aumento na dosagem do produto; uso de misturas indevidas e substituição

por outro produto, geralmente de maior toxicidade (Georghiou & Taylor 1977a). Esses fatores comprometem os programas de MIP em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, destruição de organismos benéficos, e elevação nos custos de controle da praga. Sabe-se também que a descoberta e o desenvolvimento de uma nova molécula química estão se tornando cada vez mais difíceis e caros (Denholm & Rolland 1992). Sendo assim, o manejo da resistência de artrópodes a produtos químicos tem se tornado um importante componente do MIP e vice-versa (Georghiou & Taylor 1977b, Denholm & Rolland 1992).

Mecanismos de Resistência

Os mecanismos de resistência são diversos e a sua caracterização poderá permitir a escolha de estratégias e táticas de controle mais adequadas para as populações de insetos em estudo. A resistência em um determinado organismo pode ser manifestada para dois ou mais compostos químicos distintos através da resistência cruzada ou resistência múltipla. A resistência cruzada refere-se aos casos em que um único mecanismo de resistência confere resistência a dois ou mais compostos químicos (produtos estes geralmente relacionados; por ex., deltametrina e permetrina que são produtos do grupo dos piretróides). Já a resistência múltipla ocorre quando pelo menos dois diferentes mecanismos de resistência coexistentes conferem resistência a dois ou mais compostos químicos (produtos estes geralmente não relacionados (Georghiou & Taylor 1977b).

Os principais mecanismos de resistência aos produtos químicos são: redução na penetração do inseticida, aumento na taxa de metabolismo do inseticida pela atividade de esterases, monooxigenases dependentes do citocromo P450 e glutathiona-S-transferases, ou por uma alteração no sítio de ação do produto (Dong & Dong 1997, Kostaropoulos *et al.* 2001, Baffi *et al.* 2008, Brooke 2008). A resistência por comportamento também tem sido identificada para

diversas espécies de artrópodes (Moore *et al.* 1989, Chareanviriyaphap *et al.* 1997, Kongmee *et al.* 2004, Jallow & Hoy 2005).

Resistência ocasionada pela redução na penetração de inseticidas parece ser fenômeno comum. Podendo estar relacionado com reservatório lipídico que retém o inseticida na cutícula, enzimas que degradam o inseticida ou, simplesmente, um tegumento mais grosso ou mais impermeáveis (Plapp 1976). Estudos bioquímicos indicaram que a cutícula de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a DDT continham mais proteínas e lipídios do que a espécie suscetível (Vinson & Law, 1971). A resistência a piretroide também pode ser atribuída a redução da penetração do inseticida. Ahmad *et al.* (2006) encontraram um atraso na penetração cuticular desempenhado um papel importante na resistência *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em populações do Paquistão. O tempo de absorção para deltametrina foi de uma hora na espécie suscetível e de seis horas na população resistente.

Outro mecanismo de resistência envolve a excreção ou uma possível metabolização do inseticida após o contato ou ingestão. Esta desintoxicação metabólica envolve uma variedade de enzimas que podem ser induzidas em contato com o inseticida (Sogorb & Vilanova 2002, Srinivas *et al.* 2006). A resistência metabólica é freqüentemente consequência do excesso de enzimas de desintoxicação, que são capazes de metabolizar os inseticidas, sendo por uma alta expressão dos genes que codificam as três principais enzimas envolvidas no metabolismo; a monooxigenase dependente do citocromo P450, a glutathione transferases (GSTs) e as esterases, (Kostaropoulos *et al.* 2001, Baffi *et al.* 2008).

Em relação à resistência comportamental, os insetos podem evitar comer plantas tóxicas, ovipositar em folhas com inseticidas além de serem capazes de detectar mudanças no ambiente através dos órgãos quimiorreceptores e mecanorreceptores localizados nas antenas e nas pernas (Gullan & Cranston 2007). Esta resistência é definida como comportamental uma vez que o inseto

desenvolve habilidade de evitar doses de inseticida que seriam letais. Esta forma de resistência seria devido a efeitos irritantes e repelentes dos inseticidas sobre indivíduos fisiologicamente suscetíveis, os quais alteram seu comportamento para evitar áreas tratadas (Yu & Nguyen 1992). A resistência comportamental é determinada por ações que influenciam a resposta do organismo a pressões seletivas exercidas por um determinado inseticida, aumentando a capacidade de uma população de insetos escaparem dos efeitos letais do inseticida, podendo estar relacionados à capacidade de aprendizagem do inseto (Hoy *et al.* 1998). Assim, a população conserva a sua susceptibilidade intrínseca ao inseticida, porém, muda o seu comportamento de forma a evitar o contato. Insetos com resistência comportamental respondem mais a baixas concentrações de inseticidas do que os insetos não resistentes, indicando que estes contêm receptores que detectam melhor o inseticida (Yu 2008). Larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes a carbaril foram capazes de evitar a alimentação em folhas tratadas com este inseticida, gerando baixa mortalidade quando comparada com as larvas suscetíveis (Young & Mcmillian 1979).

A alteração do sítio alvo do inseticida é outro tipo de resistência ocasionada por mutações em genes que codificam o sítio de ação do inseticida, impedindo e dificultando assim a ligação do inseticida com sua molécula-alvo. Estas alterações podem comprometer parcialmente ou integralmente a atividade inseticida em questão. A enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem, são exemplos de sítio-alvos envolvidos neste tipo de resistência (Hemingway *et al.* 1999, Lee *et al.* 2001, Hemingway *et al.* 2004).

Monitoramento da Resistência

Os programas de manejo da resistência são mais efetivos quando implementados de modo preventivo, ou seja, no início da evolução da resistência. Infelizmente, a maioria das pesquisas nesta área é iniciada somente após a constatação de falhas no controle de uma praga com o uso de um determinado produto químico (Tabashnik 1989).

O manejo da resistência pode ser feito por moderação, saturação e manejo por ataque múltiplo. O princípio básico no manejo por moderação está na redução da pressão de seleção para preservar os indivíduos susceptíveis em uma determinada população, mantendo áreas não tratadas para servir de refúgio aos indivíduos susceptíveis e aplicação do produto no estágio mais vulnerável da praga. O manejo por saturação tem por objetivo reduzir o valor adaptativo dos indivíduos resistentes através do uso de sinergistas ou de altas dosagens do produto. Os sinergistas podem bloquear a resistência metabólica; o butóxido de piperonila, por exemplo, bloqueiam a ação de enzimas oxidativas dependentes do citocromo P450. O manejo por ataque múltiplo envolve a utilização de dois ou mais produtos químicos não relacionados em rotação ou mistura (Georghiou & Taylor 1986). Dentre as várias condições para o sucesso da mistura estão: baixa frequência de resistência, ausência de resistência cruzada (Georghiou & Taylor 1986).

Inseticidas Piretróides

Estes inseticidas são derivados sintéticos das piretrinas presentes no extrato de piretro das espécies de crisântemo (Elliott 1977). Eles estão agrupados em duas categorias (tipo I e tipo II) com base em seus sintomas de envenenamento, efeitos sobre o sistema nervoso e suas estruturas químicas (Du *et al.* 2009, Gammon *et al.* 1981, Lawrence & Casida 1982) (Fig 1). Os piretróides do tipo I não possuem grupo α ciano, e provocam descargas repetitivas em resposta a um único

estímulo, enquanto os piretróides tipo II possuem o grupo α ciano e causam uma despolarização na membrana acompanhada por uma supressão do potencial de ação (Dong, 2007).

Os piretróides sintéticos têm sido empregados no controle de insetos ao longo de décadas, mas a utilidade dos primeiros piretróides sintéticos como aletrina, resmetrina e tetrametrina foram limitada pela sua instabilidade à luz do sol. A descoberta, em meados dos anos 1970 de permetrina e deltametrina, novos piretróides com atividade sem precedentes combinado com fotoestabilidade, tornou-se adequado para usos agrícolas, sendo amplamente utilizado. No entanto, o intensivo uso deste inseticida na agricultura selecionou populações de insetos pragas resistente a piretróides (Elliott 1989). A resistência aos piretróides (cipermetrina, β -cipermetrina, deltametrina, fenvalerato) foi observada em população de *P. xylostella* do Paquistão, Índia, China e Coréia (Kwon *et al.* 2004, Kahaliq *et al.* 2007, Balasubramani *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2010). No Brasil esta resistência a deltametrina foi relatada por (Castelo Branco & Amaral 2002) e (Oliveira *et al.* 2011).

Ação dos piretróides no Canal de Sódio

Em relação ao axônio onde acontecem as reações, o fluido extracelular que envolve as células nervosas contem uma elevada concentração de íons de sódio e uma concentração relativamente baixa de íons potássio. Já dentro das células nervosas existe uma alta concentração de íons de potássio e baixa concentração de sódio. Isto porque a membrana da célula nervosa é bastante permeável aos íons potássio (Bloomquist 1996, Dong & Dong 1997, Zlotkin 1999). Em condições de repouso, existe uma diferença de potencial (DDP) elétrico entre o interior e o exterior do neurônio (DDP-70 mV,) (Narahashi 1996, Zlotkin 1999). Um estímulo físico ou químico em uma determinada parte do neurônio promove uma alteração na configuração espacial nos canais de sódio. Com os canais abertos ocorre um rápido fluxo desses íons para dentro da

célula. Essa entrada altera a DDP que passa a ser de cerca de +20 mV, (Catterall 1992, Bloomquist 1996).

A entrada de íons sódio na membrana provoca uma entrada seqüencial desses íons ao longo da membrana do neurônio e uma saída seqüencial de íons potássio, pois na DDP de +20mV, os canais de potássio mudam sua configuração espacial, facilitando a saída desses íons. A saída de potássio retorna a DDP para a condição de repouso (-70 mV). Essa alteração no potencial elétrico da membrana, se propaga ao longo do neurônio/axônio, caracterizando o impulso nervoso ou potencial de ação. (Catterall 1992, Bloomquist 1996, Zhao *et al.* 2003, Nicholson 2007, Silver *et al.* 2010). Cada canal de sódio é composto de uma subunidade alfa de (~260 kDa), sendo composta de quatro domínios homólogos (I a IV), e cada um contém seis segmentos transmembrana (S1 a S6) (Soderlund & Knipple 2003) (Fig.2). Devido ao seu papel fundamental na excitabilidade da membrana, os canais de sódio são locais de ação de uma grande variedade de neurotoxinas e inseticidas como os piretróides (Dong & Dong 1997, Wang *et al.* 2003).

Resistência knockdown

Um importante mecanismo que confere resistência a piretróides é a insensibilidade nervosa, denominado de resistência knockdown (*KdR*). Este tipo de resistência foi relatado pela primeira vez em *Musca domestica* (L.) , (Diptera: Muscidae), (Bussyne,1951). O tipo mais grave da insensibilidade nervosa, denominado de super *KdR* também foi identificado neste inseto (Sawicki, 1978). Este tipo de resistência foi encontrado em diversas pragas agrícolas com base em padrões de resistência cruzada e ausência de sinergismo de compostos que inibem as atividades das enzimas esterases e citocromo P450, envolvidos no metabolismo de piretróides (Bloomquist, 1993; Soderlund, 1997; Soderlund & Knipple, 1999). A redução da insensibilidade neural a piretróides foi confirmado através de estudos de eletrofisiologia em *H. virescens*, *Spodoptera*

littoralis, (Boisduval) (Lepidoptera:Noctuidae), *Culex quinquefasciatus*, (Say) (Diptera: Culicidae) *Anopheles stephensi* (Liston) (Diptera: Culicidae), *Blattella germanica* (L.), (Blattodea: Blattellide) e *P. xylostella* (Bloomquist 1988; Bloomquist 1993; Schuler *et al.* 1998). Estes resultados sugerem que a insensibilidade neural representa um importante mecanismo de resistência a piretróides a um grande número de espécies pragas.

Análise molecular das seqüências de nucleotídeos do canal de sódio em *M. domestica* e *B. germanica* (Miyazaki *et al.* 1996, Williamson *et al.* 1996) demonstraram uma ligação genética entre a resistência por insensibilidade nervosa e substituições de aminoácidos no domínio II do canal. A primeira substituição de leucina para fenilalanina (L1014F) no domínio do segmento transmembrana IIS6 foi encontrada em *M. domestica*. A segunda substituição de metionina para treonina (M918T) foi identificada no domínio IIS4-IIS5 em *M. domestica*, caracterizando o super-*KdR* (Williamson *et al.* 1996). Estas substituições foram posteriormente relatadas em uma grande variedade de espécies de insetos. Além dessas substituições, uma série de outras foram encontradas fora do domínio II (Soderlund & Knipple 2003)

Estudos com outras espécies de artrópodes apresentaram mutação correspondente a L1014F nos canais de sódio, em pelo menos outras 14 espécies de artrópodes, fazendo esta mutação mais frequentemente associadas à resistência knockdown (Soderlund & Knipple 1999). Esta mutação foi identificada em *B. germanica*, *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidade), *M.domestica*, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Dong & Scott 1994, Miyazaki *et al.* 1996, Martinez-Torres *et al.* 1998a, Lee *et al.* 1999, Martinez-Torres *et al.* 1999). Em *M. domestica* e *B. germanica* a mutação de L1014F reduziu a sensibilidade do canal de sódio a deltametrina por 19 e cinco vezes respectivamente (Lee *et al.* 1999).

Estudos de resistência knockdown em populações resistente de *C. pipiens* e *Anopheles gambiae* (Giles) (Diptera:Culicidae) identificaram outra variação na posição 1014, com a substituição de leucina por serina (L1014S) (Martinez-Torres *et al.* 1999, Ranson *et al.* 2000a). No entanto, outras mutações estão relacionados com a resistência a piretróides, como as mudanças dos aminoácidos de valina para metionina na posição 410 (V410M), situado no segmento transmembrana IS6 e mudança de leucina para histidina na posição 1014 (L1014H) no domínio III encontrado em diferentes populações resistentes de *H. virescens*, (Park & Taylor 1997).

Também já foram relatadas outras mutações no canal de sódio relacionados com a resistência a piretróides. Em *Pediculus capitis* (De Geer) (Anoplura: Pediculidae) a substituições de treonina para isoleucina (T929I) no domínio II (Lee *et al.* 2000), em *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) as mudanças de fenilalanina para isoleucina (F1538I) (He *et al.* 1999), e em *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) foram identificados as alterações de metionina para valina (M818V) e leucina para isoleucina (L925I) (Morin *et al.* 2002).

Em *P. xylostella* esta resistência foi relacionado com diminuição da sensibilidade do sítio de ação do sistema nervoso, devido à presença de mutações na subunidade do canal de sódio (Schuler *et al.* 1998). As mutações foram encontradas no domínio II do canal de sódio de *P. xylostella* resistente a piretróides. A primeira substituição de leucina para fenilalanina (CTT→TTT) chamada de (L1014F) foi encontrada no domínio IIS6. A segunda substituição de treonina para isoleucina (ACC→ATC) no domínio IIS5, denominada de T928I (Fig.3) (Kwon *et al.* 2004)

Uso de PCR na detecção da Resistência

Historicamente, a caracterização dos mecanismos de resistência ocorre apenas após o comprometimento no controle de insetos. No entanto, a identificação das mutações que conferem resistência oferece a oportunidade de projetar ferramentas de diagnósticos moleculares capazes de detectar alelos que conferem resistência a insetos, facilitando a detecção precoce e acompanhamento de genes de resistência em populações sob pressão de seleção. A identificação da mutação L1014F em insetos resistentes levou ao desenvolvimento de vários teste diagnósticos (Guerrero *et al.* 1998, Jamroz *et al.* 1998, Martinez-Torres *et al.* 1998b, Kwon *et al.* 2004). Estas ferramentas são importantes na detecção de indivíduos resistentes com precisão e rapidez determinando a frequência dos alelos de resistência em populações de campo. Vários métodos baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase) são aplicáveis a detecção da mutação de ponto, que são responsáveis pela resistência a inseticidas. Estas técnicas foram utilizadas na detecção de mutações de ponto associados com a resistência em *A. gambiae*, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae), *M. persicae*, *C. quinquefasciatus*, *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae), *H. virescens*, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) e *P. xylostella* (Ranson *et al.* 2000b, Kwon *et al.* 2004, Cassanelli *et al.* 2005, Hawkes *et al.* 2005, Xu *et al.* 2006, Cho *et al.* 2008, Toda *et al.* 2008, Silva & Azeredo-Espin 2009).

Uma das técnicas moleculares utilizadas na identificação dos alelos de resistência é a técnica molecular PASA (amplificação do alelo específico) que possibilita identificar as mutações no canal de sódio e diferenciar os genótipos suscetíveis (SS) e resistentes (RR) e incluindo os heterozigotos (RS), possibilitando a verificação das frequências desses indivíduos na população de *P. xylostella* de uma determinada área, sendo assim, uma ferramenta que pode auxiliar no manejo da resistência (Kwon *et al.* 2004). As populações de *P. xylostella* do Brasil e de

Pernambuco são resistentes a deltametrina. Entretanto, informações sobre mecanismo de resistência desta praga no Brasil são escassos. Portanto, trabalho teve como objetivo averiguar a relação da resistência a piretróides com o aumento da frequência da mutação leucina para fenilalanina (CTT→TTT) do domínio II das regiões S6 de populações *P. xylostella* através da técnica molecular PASA e a resistência comportamental a deltametrina.

Literatura Citada

- Ahmad, M., Denholm I & R.H. Bromilow. 2006.** Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethrin-resistance strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manage. Sci.* 62: 805-810.
- Baffi, M.A., G.R.L.D. Souza, C.S.D. Sousa, C.R. Ceronb & A.M. Bonetti. 2008.** Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Mol. Biochem. Parasitol.* 160: 70–73.
- Balasubramani, V., A.H. Sayyed & N. Crickmore. 2008.** Genetic Characterization of Resistance to Deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from India. *J. Econ. Entomol.* 101:1911-1918.
- Bloomquist, J. 1996.** Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol* 41: 163-90.
- Brooke, B.D. 2008.** *KdR*: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 524-525.
- Cassanelli, S., B. Cerchiari, S. Giannini, D. Bizzaro, E. Mazzoni & G.C. Manicardi. 2005.** Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *KdR* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manage. Sci.* 61: 91-96.

- Castelo Branco, M. & P.S.T. Amaral. 2002.** Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal. *Hortic. Bras.* 20: 410-415.
- Catterall, W.A. 1992.** Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Rev. Pharmacol.* 72: 15-48.
- Chapman, J.W., D.R. Reynolds, A.D. Smith, J.R. Riley, D.E. Pedgley & I.P. Woiwod. 2002.** High-altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the U.K.: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. *Ecol. Entomol.* 27: 641-650.
- Chareanviriyaphap, T., D.R. Roberts, R.G. Andre, H. Harlan & M.J. Bangs. 1997.** Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus* Wiedeman. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 171-183.
- Cho, J., S. Park, C. Lim, Y.C. Park, J.H. Hur, S. Hong, T.M. Brown & S. Cho. 2008.** *KdR* allelic variation in a sodium channel gene from a population of South Carolina *Heliothis virescens* (Fabricius). *J. Asia-Pacific Entomol.* 11: 117-121.
- Croft, B.A., B.A. Roff & B. Van. 1988.** Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Exp. Appl. Acarol.* 4: 277-300.
- Denholm, I. & M.W. Rolland. 1992.** Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.* 37:92-112.
- Dobzhansky, T. 1951.** Genetics and the origin of species. 3rd ed. New York: Columbia Univ. Press. 364p.
- Dong, K. & J.G. Scott. 1994.** Linkage of *KdR*-Type resistance and the para-Homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 647-654.

- Dong, K. & K. Dong. 1997.** A single amino acid change in the para- sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*KdR*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 93-100.
- Du, Y., Y. Nomura, N. Luo, Z. Liu, J.-E. Lee, B. Khambay & K. Dong. 2009.** Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234: 266-272.
- Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1977a.** Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- Georghiou, G.P. & Taylor, C.E. 1977b.** Operational influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 653-658,
- Georghiou, G. P. & A. Lagunes-Tejeda. 1991.** The occurrence of resistance to pesticides. In arthropods. Roma, FAO, 318p.
- Gould, F. 1988.** Genetic engineering, integrated pest management, and the evolution of pests. *Trends Biotechnol.* 6: 15-19.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2007.** *The Insects: An outline of entomology.* London, Chapman and Hall, 491p.
- Guerrero, F.D., R.C. Jamroz, D. Kammlah & S.E. Kunz. 1998.** Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant hornflies, *Haematobia irritans*: identification of *KdR* and super-*KdR* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 745–755.
- Hawkes, N.J., R.W. Janes, J. Hemingway & J. Vontas. 2005.** Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (*Gmelin*). *Biochem. Physiol.* 81: 154–163.

- He, H., A.C. Chen, R.B. Davey, G.W. Ivie & J.E. George. 1999.** Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 558–561.
- Hemingway, J., J. Miller & K. Mumcuoglu. 1999.** Pyrethroid resistance mechanisms in the head louse *Pediculus capitis* from Israel: implications for control. *Med. Vet. Entomol.* 13:89-96.
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll & H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 653-665.
- Honda, K.I., Y. Miyahara & K. Kegasawa. 1992.** Seasonal abundance and the possibility of spring immigration of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), in Morioka City, northern Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 27: 517–525.
- Jallow, M.F.A. & C.W. Hoy. 2005.** Phenotypic variation in adult behavioral response and offspring fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in response to permethrin. *J. Econ. Entomol.* 98: 2195-2202.
- Jamroz, R., F. Guerrero, D. Kammlah & S. Kunz. 1998.** Role of the *KdR* and super-*KdR* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 1031-1037
- Kahaliq, A., M.N.R. Antique & A.H. Sayyed. 2007.** Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Bull. Entomol. Res.* 97: 191-200.
- Kongmee, M., A. Prabaripai, P. Akratanakul, M.J. Bangs & T. Chareonviriyaphap. 2004.** Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *J. Med. Entomol.* 41: 1055-1063.

- Kostaropoulos, I., A.I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala & E. Papadopoulou-Mourkidou. 2001.** Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 313–319
- Kwon, D.H., B.R. Choi, H.M. Park, S.H. Lee, T. Miyata, J.M. Clark & S.H. Lee. 2004.** Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 21-30.
- Labbe, P., T. Lenormand & M. Raymond. 2005.** On the world wide spread of an insect resistance gene: a role for local selection. *J. Evol. Biol.* 18: 1471-1484.
- Lee, S., D. Soderlund & S. Lee. 2001.** The V410M mutation associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* reduces the pyrethroid sensitivity of house fly sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 19-29.
- Lee, S.H., J.B. Dunn, J.M. Clark & D.M. Soderlund. 1999.** Molecular analysis of *KdR*-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem.* 63: 63–75.
- Lee, S.H., K.S. Yoon, M.S. Williamson, S.J. Goodson, L.M. Takano, J.D. Edman, A.L. Devonshire & J.M. Clark. 2000.** Molecular analysis of *KdR*-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 130–143.
- Martinez-Torres, C. D., F. M.S. Williamson, F. Darriet, Berge , D. J.B., A.L, P. Guillet, Pasteur, N & D. Pauron. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*KdR*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 7: 179–184.
- Martinez-Torres, D., C. Chevillon, A. Brun-Barale, B. J.B., N. Pasteur & D. Pauron. 1999.** Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55: 1012–1020.

- Metcalf, R.L. 1980.** Changing role of insecticides in crop protection. *Annu. Rev. Entomol.* 25: 219-256.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap & F. Matsumura. 1996.** Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *KdR*-resistant German cock-roaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen.* 252: 61–68.
- Mo, J., G. Baker, M. Keller & R. Roush. 2003.** Local Dispersal of the Diamondback Moth (*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Environ. Entomol.* 32: 71–79.
- Moore, A., B.E. Tabashnik & J.D. Stark. 1989.** Leg autotomy: a novel mechanism of protection against insecticide poisoning in the diamondback moth (Lepidoptera:Plutellidae). *J. Econ. Entomol* 82: 1295-1298.
- Morin, S., M.S. Williamson, S.J. Goodson, J.K. Brown, B.E. Tabashnik & T.J. Dennehy. 2002.** Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1781– 1791.
- Narahashi, T. 1996.** Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 78: 1–14.
- Nicholson, G.M. 2007.** Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon.* 49: 490-512.
- Oliveira, A.C., H.A. Siqueira, J.V. Oliveira, J.E. Silva & M. Michereff-Filho. 2011.** Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Sci. Agric.* 68: No prelo.
- Park, Y. & M.F.J. Taylor. 1997.** A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 9-13.
- Plapp, F. 1976.** Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 179–197

Ranson, H., B. Jensen, J.M. Vulule, X. Wang, J. Hemingway & F.H. Collins. 2000a.

Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9: 491–497.

Ranson, H., B. Jensen, J.M. Vulule, X. Wang, J. Hemingway & F.H. Collins. 2000b.

Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 9: 491-497.

Santos, V.C., H.A. Siqueira, J.E. Silva & M.J.D.C. Farias. 2011. Insecticide Resistance in

Populations of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from State of Pernambuco'. *Neotrop. Entomol.* no prelo.

Sayyed, A.H. & D.J. Wright. 2006. Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism

of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 62: 1045-1051.

Schuler, T.H., Martinez-Torres D., Thompson A.J., Denholm I., Devonshire A.L., Duce I.R.

& W. M.D. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 59: 169–182.

Silva, N.M.d. & A.M.L.d. Azeredo-Espin. 2009. Investigation of mutations associated with

pyrethroid resistance in populations of the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet. Mol. Res.* 8: 1067-1078.

Silver, K.S., W. Song, Y. Nomura, V.L. Salgado & K. Dong. 2010. Mechanism of action of

sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97: 87-92.

- Soderlund, D.M. & D.C. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563-577.
- Sogorb, M.A. & E. Vilanova. 2002.** Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128: 215-228.
- Srinivas, R., S.K. Jayalakshmi, K. Sreeramulu, N.E. Sherman & J. Rao. 2006.** Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 310-317.
- Tabashnik, B.E. 1989.** Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.
- Tabashnik, B.E., K.W. Johnson, J.T. Engleman & J.A. Baum. 2000.** Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1 in a strain of diamondback moth (*Plutella xylostella*) adapted to artificial diet. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 81-83.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol* 38: 275-301.
- Toda, Satoshi, Komazaki, Shinkichi, Izawa, Hiroki, Nakada, Ken, Kanazaki, Shuji, Souda, Eiichirou, Shigehara & Tomoko. 2008.** Development of molecular diagnostics of the two point mutations in acetylcholinesterase gene associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, (Homoptera: Aphididae) and a survey of genotypic frequency in field populations. *Appl. Entomol. Zool.* 43: 127-133.
- Verkerk, R.H.J. & D.J. Wright. 1996.** Multitrophic interactions and management of the diamondback moth: a review. *Bull. Entomol. Res.* 86: 205-216.

- Via, S. 1990.** Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 421-446.
- Wang, R., Z.Y. Huang & K. Dong. 2003.** Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 733-739.
- Young, J.R & Mcmiliam, W.W. 1979.** Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carabaryl treated surfaces, *J. Econ. Entomol.* 72:202-203.
- Yu, S.J. 2008.** Principles of pesticide metabolism. The toxicology and biochemistry of insecticides. Nova York, CRC, 276p.
- Yu, S.J. & S.N. Nguyen. 1992.** Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44:74-81.
- Xu, Q., H. Wang, L. Zhang & N. Liu. 2006.** *KdR* allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 774-780.
- Zhao, J.Z., H.L. Collins, Y.X. Li, R.F.L. Mau, G.D. Thompson, M. Hertlein, J.T. Andaloro, R. Boykin & A.M. Shelton. 2006.** Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. *J. Econ. Entomol.* 99: 176-181.
- Zhao, X., T. Ikeda, J.Z. Yeh & T. Narahashi. 2003.** Voltage-Dependent Block of Sodium Channels in Mammalian Neurons by the oxadiazine insecticide indoxacarb and its metabolite. *Neurotoxicol.* 24: 83-96.
- Zhou, L., J. Huang & H. Xu. 2010.** Monitoring resistance of field populations of diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) to five insecticides in South China: A ten-year case study. *Crop Prot.* 30:272-278.

Zlotkin, E. 1999. The Insect Voltage-gated sodium channel as target of Insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 429-55.

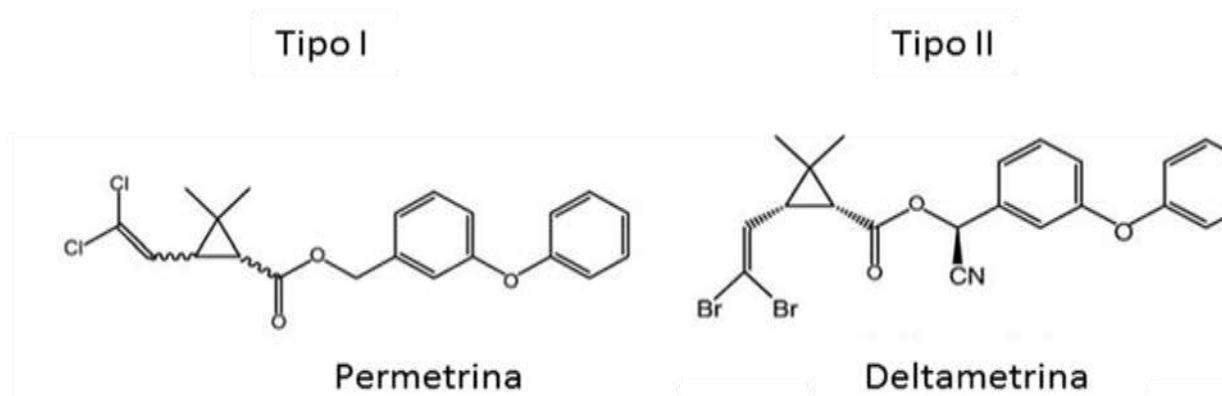


Figura 1. Estrutura química dos piretróides permetrina (tipo I) e deltametrina (tipo II) (Shuler *et al.* 1998).

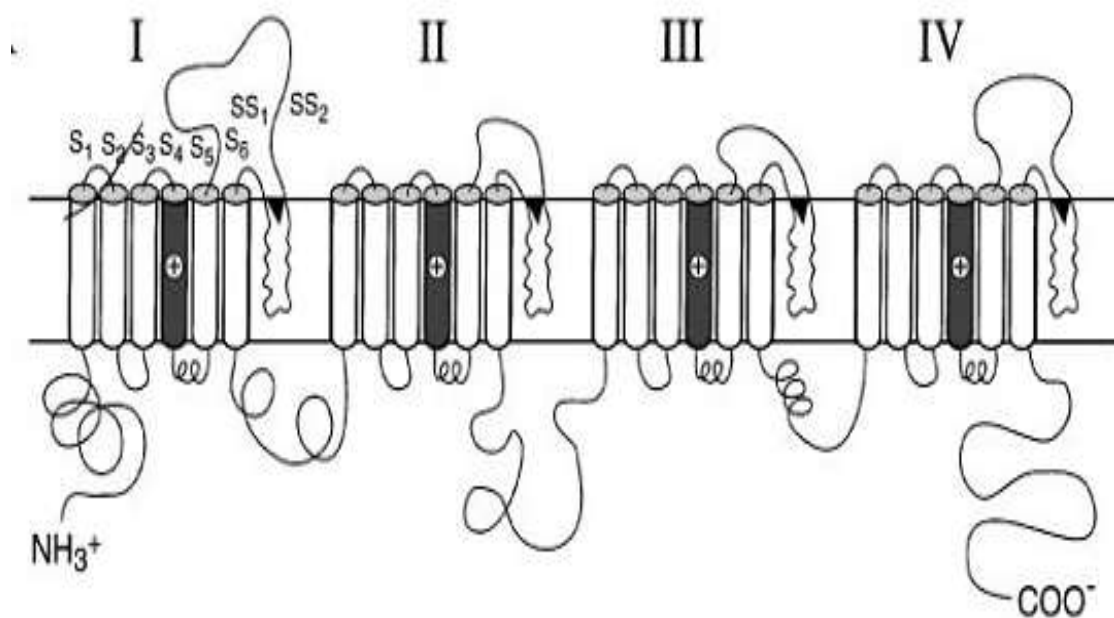


Figura 2. Estrutura da subunidade α do canal de sódio, composta de quatro domínios homólogos (I a IV), e os seis segmentos transmembrana (S1 a S6) (Zltkin 1999).

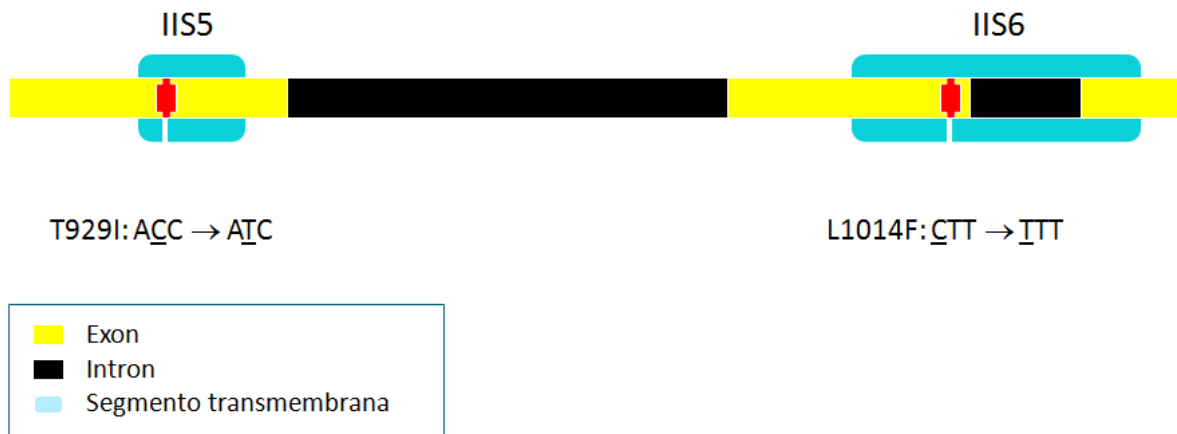


Figura 3. Diagrama da estrutura do exon e intron e localizações das mutações L1014F e T929I de *P. xylostella* (kwon *et al.* 2004).

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA KNOCKDOWN (*KdR*) EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)¹

WELLINGTON M. SILVA², CÉSAR A. BADJI³, VALDIR Q. BALBINO⁴, HERBERT A.A. SIQUEIRA²
TEREZA C.L. BALBINO⁵ & MOISÉS T.S. FREITAS⁴

²Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 52171-900 Recife, PE, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 52290-000 Garanhuns, PE, Brasil.

⁴Departamento de Genética; Universidade Federal de Pernambuco; 52171-900 Recife, PE, Brasil.

⁵Departamento de Departamento de Microbiologia; Centro de Pesquisa Aggeus Magalhães; 50.670-420 Recife, PE, Brasil.

¹Silva, W.M., C.A. Badji, V.Q. Balbino, H.A.A. Siqueira, T.C.L. Balbino & M.T.S. Freitas. Resistência knockdown (*KdR*) em populações Brasileiras de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). A ser submetido ao Journal of Pest Science.

RESUMO - A traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) é uma praga de expressão econômica em culturas da família *Brassicaceae* em muitas partes do mundo. As recorrentes infestações dessa praga em área de cultivo de Pernambuco e outros estados do Brasil têm levado os agricultores a pulverizações frequentes nas suas culturas com inseticidas. No entanto, falhas no controle de vários pesticidas como a deltametrina têm ocorrido. A hipótese mais plausível para essa resistência é a alteração do sítio alvo. Portanto, o objetivo deste estudo foi levantar a frequência de mutações do canal de sódio que conferem resistência a piretróides em populações de *P. xylostella*. Populações foram coletadas no Agreste Pernambucano e no Rio Grande do Sul, entre janeiro e abril de 2009. As razões de resistência a deltametrina de populações de campo *P. xylostella* foram comparadas com uma população de laboratório sem exposição a inseticidas há 12 anos. A população de Belo Jardim, PE apresentou o maior índice de resistência (10-vezes) quando comparado à população de laboratório. Foi observado um aumento do genótipo RR para locus L1014F como o aumento da resistência. Estes resultados mostraram que a resistência, associada com falhas no controle pela deltametrina, pode ser relacionada ao aumento na frequência da mutação L1014F do canal de sódio nestas populações.

PALAVRAS-CHAVE: Identificação alélica, deltametrina, traça-das-crucíferas, monitoramento da resistência, alteração do sítio alvo

KNOCKDOWN RESISTANCE (*KdR*) IN *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA:
PLUTELLIDAE) BRAZILIAN POPULATIONS

ABSTRACT - The moth diamondback, *Plutella xylostella* (L.) is an insect pest of great economic expression in Brassicaceae crops in many parts of the world. Recurrent infestations of this pest in growing areas of Pernambuco and other state from Brazil have led farmers to frequently spray their crops with insecticides. However, control failures by several insecticides such as deltamethrin have occurred and the most plausible hypothesis for this resistance is the target site alteration. Therefore, the objective of this study was to survey the frequency of sodium channel mutations that confer resistance to pyrethroids in Brazilian populations of *P. xylostella*. The populations were collected in the Agreste region of Pernambuco and Rio Grande do Sul state between January and April 2009. Mortality data were submitted to Probit analysis after correction. The *P. xylostella* populations showed variable response and significant resistance to deltamethrin. The deltamethrin resistance ratios of *P. xylostella* field populations were compared with that of a laboratory population without exposure to insecticide for twelve years. The population from Belo Jardim, PE showed the highest resistance ratio (10 - fold) when compared to the laboratory population. It was observed an increase of the RR genotype for L1014F mutation as the resistance increased. These results showed that resistance was associated with control failures of deltamethrin and that it was due to an increase in the frequency of the mutation L1014F sodium channel in the evaluated populations.

KEY WORDS: Allelic identification, deltamethrin, diamondback moth, resistance monitoring, target site alteration

Introdução

A *Plutella xylostella* (L.) é a principal praga das crucíferas no mundo. As larvas podem devastar as plantações, reduzindo a produção e a comercialização do produto (Talekar & Shelton 1993). Muitos fatores contribuem para o sucesso de *P. xylostella*, tais como: ciclo de vida curto; alta fecundidade, particularmente em climas quentes; migração; e comportamento críptico das larvas. Esta espécie destaca-se como uma das pragas de maior expressão econômica no cultivo de repolho, no Brasil e no mundo (Castelo Branco & Amaral 2002). No final da década de 1980, após uso generalizado de inseticidas, esta praga passou a apresentar resistência a todas as classes de inseticidas disponíveis no mercado, incluindo os piretróides (Talekar & Shelton 1993).

As lavouras de brássicas do Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil, têm sido alvo de pulverizações intensas de inseticidas pelos produtores que, por não disporem de acompanhamento técnico, conduzem de forma errônea as recomendações dos fabricantes, resultando na seleção de populações resistentes de traça-das-crucíferas (Santos *et al.* 2011). As populações de *P. xylostella* de Pernambuco foram consideradas resistentes à deltametrina, apresentando CL_{50} superiores a dose de campo recomendada - 7,5mg/L -(Oliveira *et al.* 2011). Muitas das ações de manejo de resistência são baseadas apenas em previsões teóricas, sem informação do mecanismo de resistência que possa estar envolvido no processo (Andow *et al.* 1998). Uma fato para essa resistência é a alteração do sítio alvo. A identificação do mecanismo de resistência é, portanto, uma informação de extrema relevância, para que as táticas de manejo de resistência possam ser eficientes.

A resistência a piretróides em *P. xylostella* foi relacionada com a diminuição da sensibilidade do sítio de ação no sistema nervoso, sendo conhecida como resistência knockdown (Hama *et al.* 1987; Schuler *et al.* 1998, Kwon *et al.* 2004) ocasionada por mutações na subunidade α do canal de sódio. A substituição de leucina para fenilalanina (CTT→TTT), denominada de

L1014F, foi encontrada no domínio IIS6. (Kwon *et al.* 2004). Esta mutação foi descrita pela primeira vez em populações de *P. xylostella* resistentes a piretróides na Coreia. No Brasil, apesar de já existirem relatos de resistência a piretróides, ainda não há conhecimento suficiente sobre o mecanismo de resistência relacionado a este inseticida. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resistência a piretróides em populações de campo e laboratório através de bioensaios, correlacionando o grau de resistência com a frequência da mutação L1014F determinada através da técnica de genotipagem PASA (amplificação do alelo específico).

Material e Métodos

Populações de *P. xylostella* e Manutenção. Os insetos foram coletados nos municípios de Belo Jardim, Sairé, Bezerros, Jupi e Capoeiras e Chã Grande, em Pernambuco, e no de Rio Grande, no Rio Grande do Sul. A população de Chã Grande é mantida no Laboratório de Interação Insetos - Tóxicos da Universidade Federal Rural de Pernambuco na ausência de pressão de seleção desde 1998. A criação de *P. xylostella* consistiu na metodologia descrita por Barros & Vendramim (1999).

Ensaio de Suscetibilidade de *P. xylostella* à deltametrina (Decis 25 CE) (Milenia Agrociências S/A). Foram utilizadas folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Após a lavagem das folhas, discos de 5cm de diâmetro foram cortados com o auxílio de tubo cilíndrico metálico e tratados por um minuto em oito concentrações do inseticida e controles. Tratamento inseticida (+ Triton X-100 como espalhante a 0,01%) e tratamento controle contendo água destilada com mesma concentração de Triton X-100. Após a secagem em temperatura ambiente, os discos foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm), contendo papéis de filtro (5 cm) umedecidos com água destilada. Em seguida, dez

lagartas de *P. xylostella* de terceiro ínstar foram transferidas para cada placa com auxílio de pincel. As placas de Petri foram mantidas em câmaras climáticas com temperatura de $27 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h. A mortalidade foi avaliada após 48 horas de exposição ao inseticida. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit utilizando o programa POLO – PC (LeOra Software 2005). As razões de toxicidade e seus intervalos de confiança a 95% foram calculados segundo método descrito por Robertson & Preisler (1992).

Extração do DNA Genômico. O DNA foi extraído de 15 larvas na geração (F1), exceto nas populações de Rio Grande (F3) e Chã Grande. As larvas foram maceradas com o auxílio de um pistilo, até o completo esmagamento; posteriormente foram homogeneizadas com 100µl de Chellex a 5% e os homogenatos foram incubados a 56°C por 60 min em banho- maria, e centrifugados a 13.000 g por seis minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram recuperados com auxílio de micropipeta acondicionados em tubos de 0,5 ml, quantificados por espectrofotometria e estocados a -80°C .

Deteção do Alelo Específico (PASA). Foi baseado segundo Kwon *et al* (2004). O par de primers foi designado para amplificar os amplicons de 132 pb do DNA genômico, dependendo da ausência ou presença do sítios da mutação L1014F. Para deteção do sítio de mutação L1014F, 40 ng de DNA foi adicionado ao mix contendo: 10 pmol de cada *primer* (3'CMLF-5'GAAATGTTGCATCCAAATCGTT), susceptível (L F- 5'ACCGTCGTCATTGGCAACC) ou resistente (L F-5'ACCGTCG TCATTGG CAAC T); 12,5 µl do *Green Master Mix GoTaq*; e 8,5 µl H₂O de água livre de nuclease da Promega, para um volume final de 25 µL da reação. O perfil de amplificação consistiu dos seguintes passos: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos (94°C por 30 s, $62,3^{\circ}\text{C}$ para suscetível e 60°C no alelo resistente, por 30 s e 72°C por 60 s, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com SyBR Safe.

Análise de Genética de Populações. Os dados das frequências genotípica do locus L1014F obtidos pela técnica de genotipagem PASA foram submetidos à análise de regressão, tendo como variáveis dependentes a razão de resistência dos indivíduos de cada população e como variável independente as porcentagens de indivíduos RR e RS da mutação L1014F, utilizando o programa estatístico SAS versão 8.02 (SAS Institute 2001). Para verificar se as populações estão em equilíbrio Hardy-Weinberg os dados foram submetidas ao programa Genepop V4.

Resultados

Os dados de mortalidade pelo inseticida deltametrina (Decis) obtidos com os bioensaios para as populações de traça-das-crucíferas ajustaram-se ao modelo de Probit (χ^2 significativo, $p > 0,05$). Todas as populações analisadas neste estudo foram consideradas resistentes com razões variando de 2,4 a 10,2 vezes quando comparadas com a população de Chã Grande (Tabela 1). As populações de Belo Jardim, Sairé e Jupi-PE foram as mais resistentes, com CL_{50} de 620mg/L, 540mg/L, 470 mg/L respectivamente (Tabela 1). A população de Chã Grande, por sua vez, foi a mais suscetível, apresentado CI_{50} de 60mg/L (Tabela 1).

Através da técnica molecular PASA (amplificação do alelo específico) foi possível detectar o amplicon do genótipo *KdR* de 132 pb para L1014F responsáveis pela resistência a deltametrina nas sete populações de *P. xylostella* analisadas (Figs. 1 e 2AB). Belo Jardim e Sairé apresentaram as maiores frequências do alelo resistência L1014F (86,6% e 73,3%, respectivamente). As populações de Chã Grande, Jupi e Rio Grande tiveram as menores frequências da mutação (13,3%, 13,3% e 6,67%) (Fig. 3A). Os indivíduos homozigotos suscetíveis para L1014F foram localizados apenas em Jupi e Sairé, ambos com frequências de 6,67% (Fig. 3). As populações de Rio Grande, Chã Grande e Jupi exibiram as maiores frequências de heterozigotos para a mutação (93,3%, 86,6% e

80,%) , enquanto que Belo Jardim, Sairé e Capoeiras apresentaram as menores frequências (13,3%, 20% e 46,7%) (Fig. 3).

O alelo R do locus L1014F apresentou as maiores frequências nas populações de Belo Jardim, Sairé e Capoeiras. Para o alelo S, as populações de Jupi e Rio Grande apresentaram as maiores frequências (Fig. 4). Os resultados obtidos através das análises de verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg indicam que as populações de Belo Jardim e Sairé, Capoeiras se encontram em equilíbrio para o locus L1014F, com nível de significância de $p < 0,05$. Nas populações de Jupi, Chã Grande, Bezerros e Rio Grande, por outro lado, foram detectados desvios do equilíbrio (Tabela 2).

Para investigar a correlação entre o nível de resistência a piretróides e frequência do alelo *KdR* encontrada nas populações de *P. xylostella* de campo e laboratório (Tabela 1), as razões de resistência foram plotadas com frequência de homocigoto (RR) gerando uma linha de regressão linear (Fig.5). A crescente presença da mutação L1014F foi correlacionada com o aumento dos níveis de resistência para deltametrina (Fig. 5) ($r^2=0,63$; $P=0,0032$).

Discussão

A análise da correlação do bioensaio e da genotipagem através do PASA indicou que a mutação L1014F esta associada à resistência à deltametrina em populações de *P. xylostella* de Pernambuco. As populações mais resistentes também apresentaram as maiores frequências de homocigotos RR para a mutação L1014F. Esta mutação também tem sido relatada em *Blattella germanica* (L.), (Blattodea: Blattellide), *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae), e *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae) (Dong *et al.* 1994, Miyazaki *et al.* 1996, Martinez-Torres *et al.* 1998, Martinez-Torres *et al.* 1999, Soderlund & Knipple 2003).

As populações de Rio Grande e de Jupi possuem uma baixa frequência de homocigotos resistentes. No entanto, a CI_{50} destas foi superior à dose de campo recomendada pelo fabricante (150mg/L e 470 mg/L respectivamente). Estes resultados, indicativos da presença da resistência nestas populações, sugerem que outros mecanismos de resistência devem estar envolvidos nas falhas de controle, tais como: enzimas metabólicas no processo de resistência, além do mecanismo de insensibilidade do canal de sódio nesta localidade. Apesar de já ter sido relatada a existência de uma correlação significativa entre insensibilidade do sítio alvo e o aumento da desintoxicação metabólica (Sonoda 2010), no presente trabalho apenas foi averiguada a relação da resistência a deltametrina com as mutações no canal de sódio.

O aumento das razões de resistência associado com alta frequência do genótipo RR para mutação L1014F nas populações de *P. xylostella* de Pernambuco, evidenciam que o genótipo RR está mais adaptado na presença do inseticida do que os demais genótipos. Refletindo assim a hipótese de que o genótipo RR possui uma maior taxa de sobrevivência do que outros genótipos na presença do inseticida.

Se as falhas de manejo com este inseticida persistirem nestas localidades, o genótipo resistente pode ser fixado na população. Esta situação foi observada na Coreia onde o intenso uso de piretróides nas culturas de crucíferas desde 1982 favoreceu a fixação do genótipo resistente nas populações de *P. xylostella* de campo e de laboratório deste país, (Kwon *et al.* 2004). Na ausência da pressão seletiva, as frequências dos genótipos suscetíveis podem aumentar nas populações, devido ao melhor custo adaptativo desses. Este fato está relacionado ao custo reduzido do fitness associado com *KdR* (Sayyed *et al.* 2008). Os custos do fitness incluem custo de sobrevivência reduzida, baixo peso de pupas e aumento do tempo de desenvolvimento ou fecundidade reduzida (Sayyed *et al.* 2008, Pathan *et al.* 2010). Estudos comportamentais com *Myzus persicae*, mostraram que a redução da resposta ao feromônios de alarme estava associada com os genótipos

KdR. Os indivíduos com genótipo suscetível apresentaram uma melhor resposta ao feromônio de alarme, do que os indivíduos heterozigotos e resistentes (Foster *et al.* 2003).

Apesar da população de Chã Grande apresentar a menor CL_{50} entre as populações estudadas, esta não pode ser considerada como padrão de suscetibilidade à deltametrina, uma vez que a dose de campo empregada é de 7,5 mg/L. Esta população é mantida em laboratório há mais de 12 anos sem pressão de seleção de inseticida. Este fato possivelmente indica, que uma vez introduzido o alelo R na população, ele dificilmente vai ser eliminado. Sendo assim, o manejo por ataque múltiplo seria o mais indicado para diminuir o custo adaptativo nas populações de campo. A população de Chã Grande possivelmente apresentava uma maior frequência desta mutação na população de campo. No entanto, devido ao custo reduzido do fitness a frequência do genótipo resistente pode ter reduzido com o passar do tempo na ausência de pressão de seleção. Situação semelhante foi relatada em populações naturais de *Culex pipiens*, onde a frequência do genótipo resistente do locus L1014F foi de 77,7% na presença do inseticida. Sem a pressão de seleção a frequência reduziu para 41,7% depois de 12 gerações, posteriormente com a pressão de seleção o genótipo foi fixado depois de 12 gerações (Chen *et al.* 2010). O custo do valor adaptativo associado com os genes de resistência também foi relatado em *Leptinotarsa decemlineata*, *Culex pipiens*. Os alelos resistentes a inseticidas possuem efeitos deletério, podendo desaparecer sem pressão de seleção do inseticida com o passar do tempo (Georghiou 1972, Zhu *et al.* 1996, Bourguet *et al.* 2002, Foster *et al.* 2007).

O aumento das frequências das mutações são conseqüências das falhas no manejo da resistência, onde no Brasil já existem registro de três pulverizações de inseticidas por semana, e no Agreste de Pernambuco duas a quatro (Castelo Branco & Amaral 2002, Santos *et al.* 2011). Além da falta de conhecimento do período de carência do produto e uso incorreto da rotação ou mistura de inseticidas. (Castelo Branco & Amaral 2002).

Estes resultados mostraram que a resistência foi associada com falhas no controle de *P. xylostella* devido ao uso inadequado de deltametrina e que tal resultado foi devido a um aumento na frequência da mutação L1014F do canal de sódio nestas populações, porém a resistência nas populações de Jupi e Rio Grande esta relacionada com outros mecanismos. Portanto, devido à alta frequência do genótipo resistente, os inseticidas piretróides devem ser evitados na região, uma vez que esta mutação confere resistência cruzada a todos os compostos químicos deste grupo.

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa de estudos ao primeiro autor. Ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio ao projeto.

Literatura Citada

- Andow, D.A., D.N. Alstad, Y.H. Pang, P.C. Bolin & W.D. Hutchison. 1998.** Using an F2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. 91:579–584.
- Barros, R. & J.D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolhos utilizados para a criação de *Plutella xylostella* (L.) no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley, (Hymenoptera: Trichogrammatidae). An. Soc. Entomol. Brasil 28: 469-476.
- Bourguet, D., T. Guillemaud, C. Chevillon & M. Raymond. 2002.** Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. Evol. Develop. 58: 128–135.
- Castelo Branco, M. & P.S.T. Amaral. 2002.** Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal. Hortic. Bras. 20: 410-415.

- Castelo Branco, M.A.L. 1990.** Controle da traça-das-crucíferas em repolho. *Hortic. Bras.* 8: 24-25.
- Chen, L., D. Zhong, D. Zhang, L. Shi, G. Zhou, M. Gong, H. Zhou, Y. Sun, L. Ma, J. He, S. Hong, D. Zhou, C. Xiong, C. Chen, P. Zou, C. Zhu & G. Yan. 2010.** Molecular ecology of pyrethroid knockdown resistance in *Culex pipiens pallens* mosquitoes. *PLoS ONE* 5: e11681.
- Dong, K., J. Scott & K. Dong. 1994.** Linkage of *KdR*-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 647-654.
- Foster, S.P., S. Young, M.S. Williamson, I. Duce, I. Denholm & G.J. Devine. 2003.** Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity.* 91: 98-106.
- Foster, S.P., M. Tomiczek, R. Thompson, I. Denholm, G. Poppy, A.R. Kraaijeveld & W. Powell. 2007.** Behavioural side-effects of insecticide resistance in aphids increase their vulnerability to parasitoid attack. *Anim. Behav.* 74: 621-632.
- Georghiou, G.P. 1972.** The evolution of resistance to pesticides. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3: 133–168.
- Hama, H., Y. Kono & Y. Sato. 1987.** Decreased sensitivity of central nerve to fenvalerate in the pyrethroid-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 22: 176–180.
- Kwon, D.H., B.R. Choi, H.M. Park, S.H. Lee, T. Miyata, J.M. Clark & S.H. Lee. 2004.** Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 21-30.

- Lee, S.H., J.B. Dunn, J.M. Clark & D.M. Soderlund. 1999.** Molecular analysis of *KdR*-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem.* 63: 63–75.
- Martinez-Torres, D., Chandre F, M.S. Williamson, F. Darriet, Berge, J.B., Devonshire, A.L, P. Guillet, Pasteur, N & D. Pauron. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*KdR*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* *Insect. Mol. Biol.* 7: 179–184.
- Martinez-Torres, D., C. Chevillon, A. Brun-Barale, B. J.B., N. Pasteur & D. Pauron. 1999.** Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55: 1012–1020.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap & F. Matsumura. 1996.** Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *KdR*-resistant German cock-roaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen.* 252: 61–68.
- Oliveira, A.C., H.A. Siqueira, J.V. Oliveira, J.E. Silva & M. Michereff-Filho. 2011.** Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Sci. Agric.* 68: No prelo.
- 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.
- Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods. San Diego, CRC Press, 127p.
- Santos, V.C., H.A. Siqueira, J.E. Silva & M.J.D.C. Farias. 2011.** Insecticide Resistance in Populations of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from State of Pernambuco'. *Neotrop. Entomol.* no prelo.

- Sayed, A.H., M. Ahmad & N. Crickmore. 2008.** Fitness Costs Limit the development of Resistance to indoxacarb and deltamethrin in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 101: 1927-1933.
- Schuler, T.H., D. Martinez-Torres, A.J. Thompson, I. Denholm I., A.L. Devonshire, I.R. Duce & M.S. Williamson. 1998.** Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Pestic. Biochem. Physiol. 59: 169–182.
- Soderlund, D.M. & D.C. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 563-577.
- Sonoda, S. 2010.** Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella*. Pest Manage. Sci. 66: 572-575.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.
- Zhu, K.Y., S.H. Lee & J.M. Clark. 1996.** A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. Pestic. Biochem. Physiol. 55: 100-108.

1 Tabela 1. Suscetibilidade de populações de *Plutella xylostella* ao inseticida deltametrina.

Populações	N ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	Inclinação ± EP ⁽³⁾	CL ₅₀ (IC 95%) mg/ L ⁻¹	CL ₉₉ (IC 95%)mg/L ⁻¹	χ ² ⁽⁴⁾	RR ⁽⁵⁾ (IC 95%) ⁽⁶⁾
Chã Grande, PE	245	6	2,34 ± 0,25	60 (50 – 80)	610 (390 – 1150)	2,65	
Rio Grande, RS	228	5	3,22 ± 0,39	150 (120 – 180)	770 (540 – 1340)	2,06	2,40 (1,92 - 2,99)
Bezerros, PE	361	4	2,49 ± 0,25	230 (160 – 300)	1940 (1130 – 5450)	5,94	3,68 (1,43 - 9,48)
Capoeiras, PE	239	6	3,07 ± 0,34	380 (310 – 460)	2180 (1530 – 3670)	4,77	6,21 (4,63 - 8,34)
Jupi, PE	211	5	3,42 ± 0,41	470 (410 – 540)	2240 (1630 – 3680)	2,11	7,64 (4,35 - 13,42)
Sairé, PE	215	5	3,68 ± 0,48	540 (450 – 640)	2300 (1640 – 3980)	4,28	8,77 (6,61 - 11,64)
Belo Jardim, PE	226	5	3,88 ± 0,53	620 (530 – 720)	2480 (1870 – 3930)	4,47	10,18 (7,80 - 3,29)

2 ¹Número total de insetos usados em cada bioensaio.

3 ²Graus de liberdade para teste de qui-quadrado.

4 ³Erro Padrão da Média.

5 ⁴Teste de qui-quadrado (P > 0,05).

6 ⁵Razão de toxicidade; razão das estimativas da CL50 entre a população resistente e suscetível, calculada através do método de
7 Robertson & Preisler (1992) e intervalo de confiança a 95% das estimativas da CL50.

8

9

10

Tabela 2. Frequência alélica do loco L1014F da subunidade α do canal de sódio de *Plutella xylostella*.

Populações	Frequência observada			Frequência esperada.			χ^2
	RR	RS	SS	RR	RS	SS	
Belo Jardim-PE	13	2	0	13,1	1,9	0,1	0,08
Sairé-PE	11	3	1	10,4	4,2	0,4	1,18
Jupi-PE	2	12	1	4,3	7,5	3,3	5,53 ¹
Capoeiras-PE	8	7	0	8,8	5,4	0,8	1,39
Bezerros-PE	5	10	0	6,7	6,7	1,7	3,75 ¹
Rio Grande-RS	1	14	0	4,3	7,5	3,3	11,48 ¹
Chã Grande-PE	2	13	0	4,8	7,4	2,8	8,77 ¹

11
12¹Qui-quadrado (P<0,05)

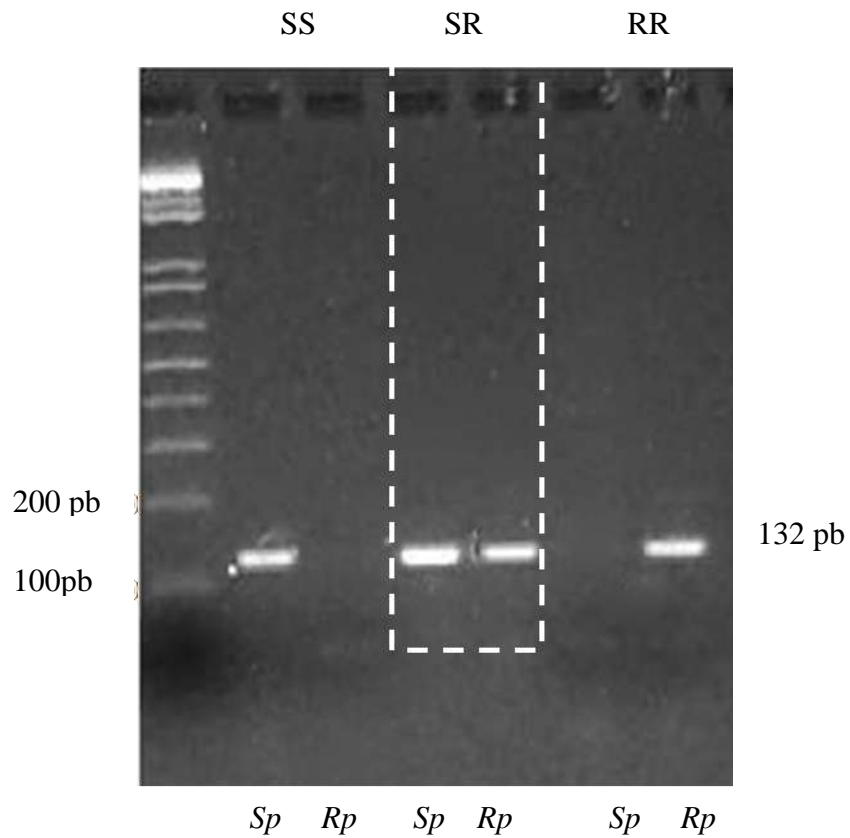


Figura 1. Gel representativo do padrão de bandas do PASA para detecção da mutação L1014F. Caracterizando o padrão de amplicons de 132 pb para L1014F. **SS**, DNA do homocigoto suscetível; **SR** DNA do heterocigoto; **RR**, DNA do homocigoto resistente. *Sp*, primer específico para o alelo suscetível. *Rp*, primer específico para o alelo resistente; **M**, DNA *ladder* 100 pb.

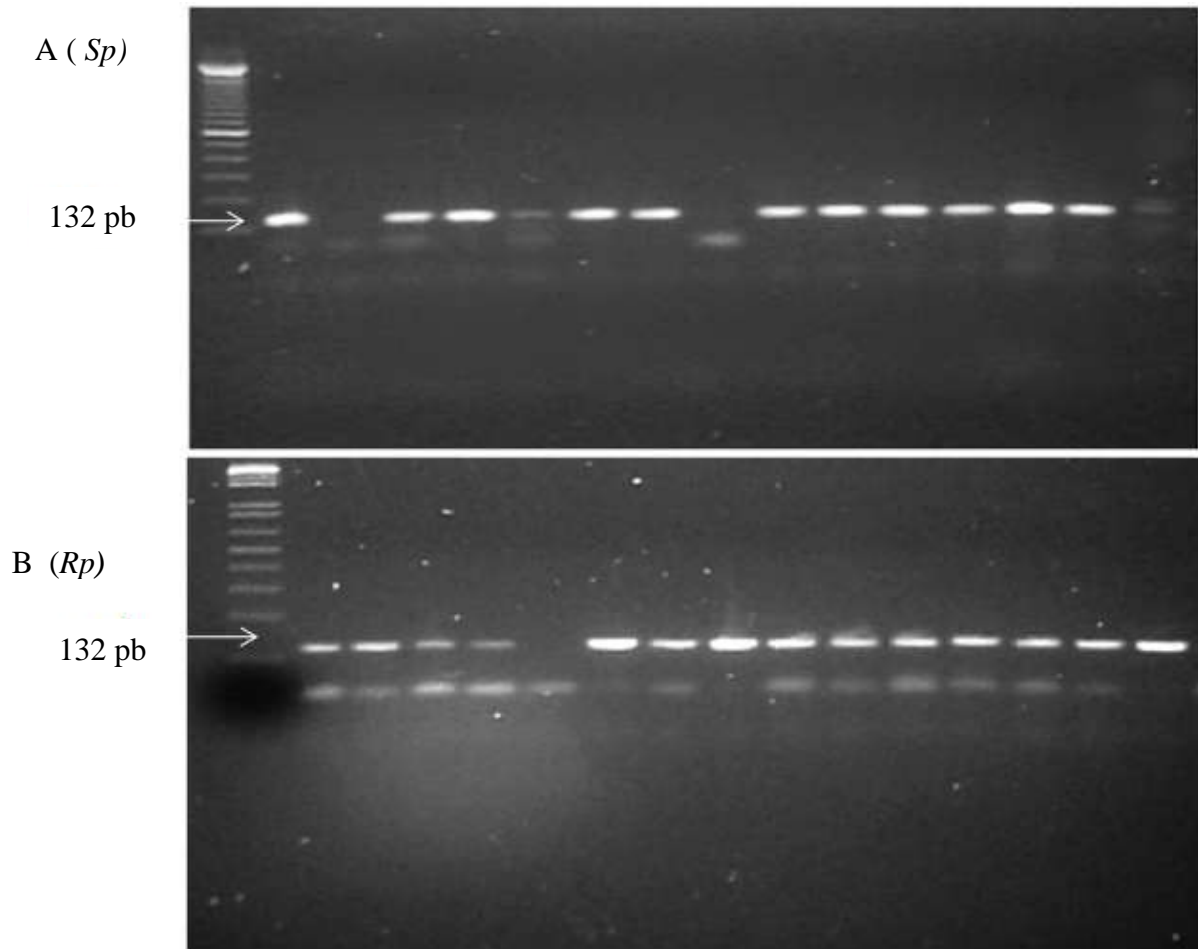


Figura 2. Gel representativo da caracterização do padrão de bandas do PASA para detecção da mutação L1014F. Caracterizando o padrão de amplicons de 132 pb para L1014F de *Plutella xylostella* de Jupi-PE. Amplificações com os primers suscetível *Sp* (A) e resistente *Rp* (B). Marcador de peso molecular: linha M (100 pb DNA *ladder*),. Linhas 1, 3, 4, 6, 7,9-15, heterozigotos (A, B); linha 2 e 8 resistente (A,B); linha 5 suscetível (A,B).

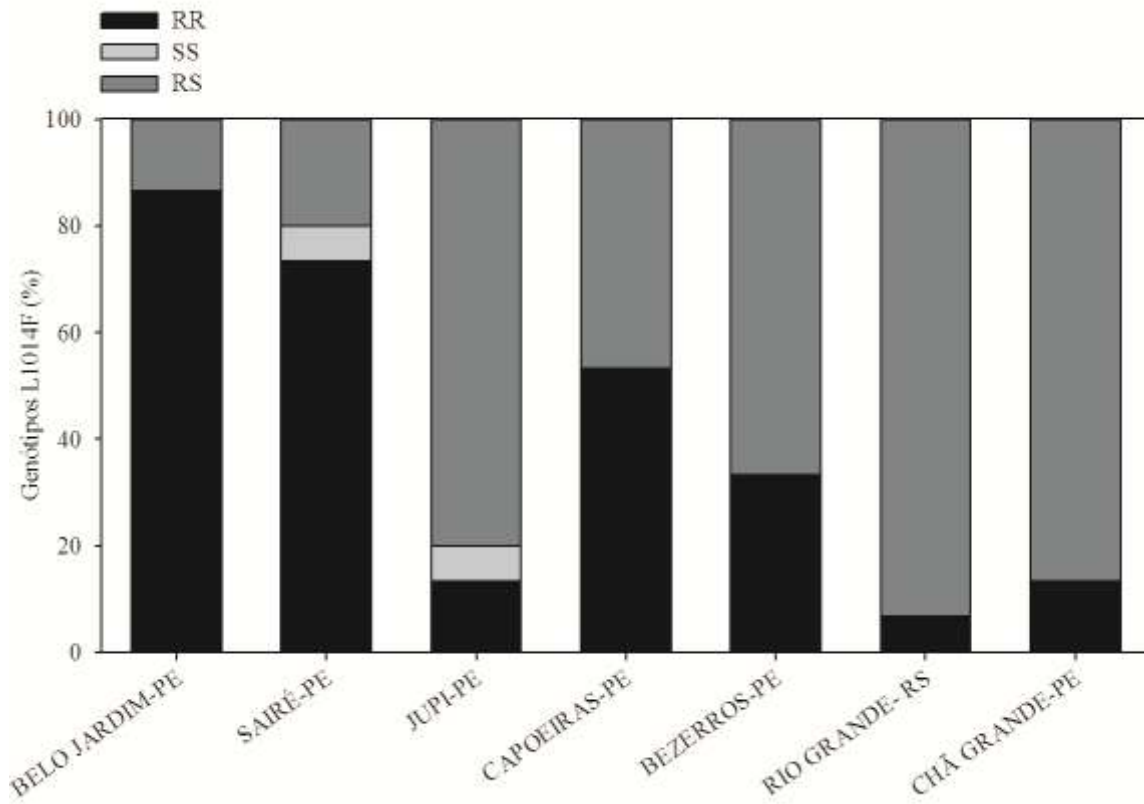


Figura 3. Frequencia dos genótipos *KdR* na presença ou ausência da mutação nas populações de *Plutella xylostella* de Pernambuco e Rio Grande - RS, Brasil.

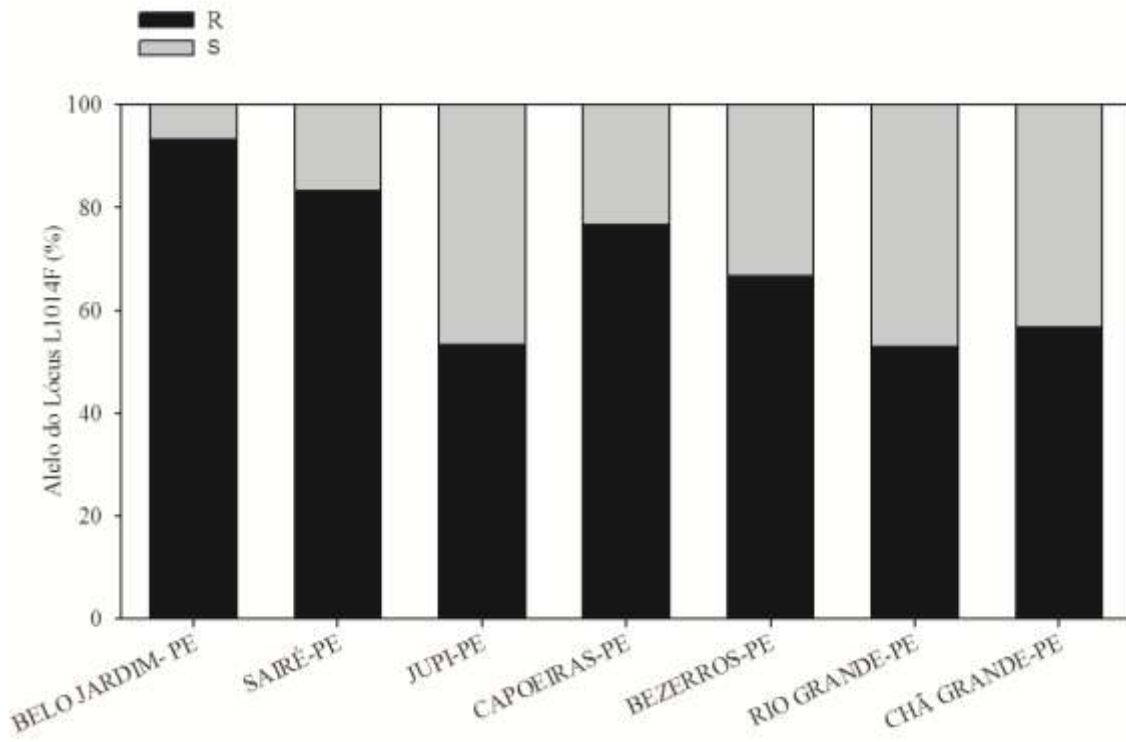


Figura 4. Frequência dos alelos S e R lócus L1014F encontradas nas populações de *Plutella xylostella* de Pernambuco e Rio Grande-RS, Brasil.

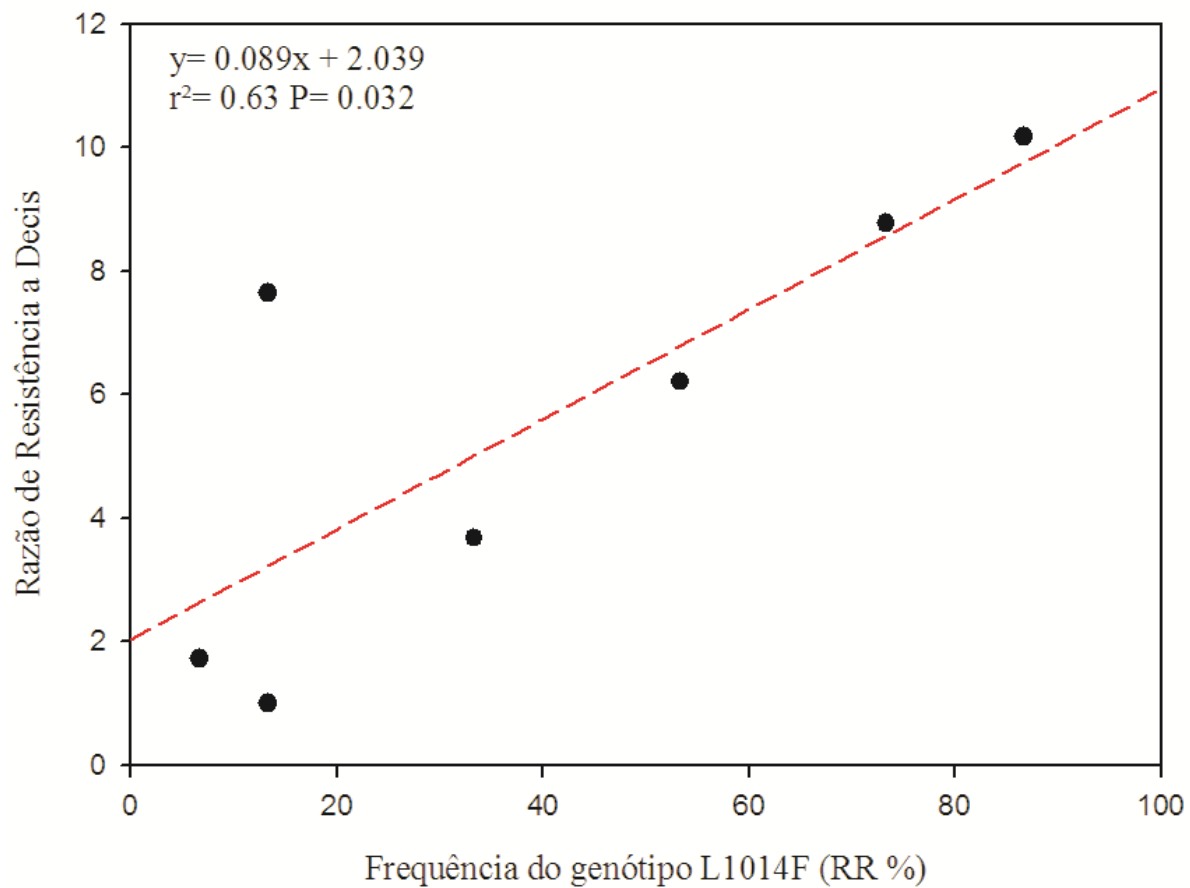


Figura 5. Correlação entre o nível de resistência a deltametrina e as frequências do alelo *KdR* para mutação L1014F. A razão de resistência foram plotadas com as frequências dos homozigotos resistentes.

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA COMPORTAMENTAL A DELTARMETRINA EM POPULAÇÕES DE
Plutella xylostella (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) DA REGIÃO AGRESTE DO
ESTADO DE PERNAMBUCO-BRASIL¹

WELLINGTON M. SILVA², CÉSAR A. BADJI³, HERBERT A. A. SIQUEIRA²-VALDIR Q. BALBINO⁴ & JOSÉ
W. S. MELO²

²Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 52171-900 Recife, PE, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 52290-000 Garanhuns, PE, Brasil.

⁴Departamento de Genética; Universidade Federal de Pernambuco; 52171-900 Recife, PE, Brasil.

¹Silva, W.M., C.A. Badji, H.A.A. Siqueira, V.Q. Balbino & J.W.S. Melo. Resistência comportamental a deltametrina em populações de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) da região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil. A ser submetido a revista Neotropical Entomology.

RESUMO - *Plutella xylostella* (L.) é considerada a praga que causa maiores perdas econômicas em cultivos de brassicas no mundo. O controle desta praga é realizado principalmente com inseticidas químicos. O uso indiscriminado destas moléculas acarreta uma grande pressão de seleção provocando o aparecimento de populações resistentes. Na resistência comportamental o inseto desenvolve habilidade de evitar doses de inseticida que seriam letais. O comportamento dos insetos em resposta ao contato com xenobióticos químicos é um dos grandes problemas no manejo da resistência. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar se as populações resistentes da praga possuem a capacidade de evitar a exposição à deltametrina. Larvas provenientes das populações resistentes foram expostas a resíduos secos de deltametrina (nas concentrações de campo (CC) de 7,5 mg/L e CL₉₉) e tiveram o comportamento de caminhamento analisado através do sistema viewpoints. A aplicação de diferentes concentrações de deltametrina (CC e CL₉₉) provocaram modificações no comportamento de *P. xylostella* na distância total de caminhamento, tempo de caminhamento, tempo de repouso, velocidade média de caminhamento e número de paradas foram os parâmetros utilizados. As larvas de terceiro instar das populações de Belo Jardim e Bezerros percorreram uma maior distância, permaneceram mais tempo em repouso e realizaram um maior número de paradas em arenas não tratadas com deltametrina do que em arenas contendo deltametrina (CC ou CL₉₉). Portanto estas populações possuem maior capacidade de detectar o inseticida, demonstrando que a resistência comportamental nestas localidades pode dificultar o controle desta praga.

PALAVRAS CHAVE: Comportamento de insetos, inseticidas, pressão de seleção

BEHAVIORAL RESISTANCE TO DELTAMETHRIN of *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) POPULATIONS IN AGRESTE REGION OF
PERNAMBUCO STATE

ABSTRACT - The *Plutella xylostella* (L.) is considered the pest that causes major economic losses in *Brassica* crops worldwide. Its control is primarily accomplished by using chemical insecticides. However, the indiscriminate use of these molecules causes a large selection pressure leading to evolution of resistant populations. The development of abilities by insects to avoid exposure to lethal insecticide doses is understood as behavioral resistance. This characteristic in insects, upon exposure to chemicals, is one of the major problems in resistance management. Therefore, this study aims to examine whether resistant *P. xylostella* populations have the ability to avoid exposure to deltamethrin. *P. xylostella* larvae from resistant and susceptible populations were exposed to deltamethrin at field rate concentration (7,5 mg/L) and at their CL₉₉s previously determined, and their walking behavior evaluated by the Viewpoint® system tracking. Exposure to both deltamethrin field rate and CL₉₉ caused alterations in the behavior of *P. xylostella*, regarding the walking total distance, walking spent time, resting time, walking average speed, and stop number. Third-instar larvae from Belo Jardim and Bezerros populations traveled a greater distance, rested for a long time and stopped more times at the untreated arenas than at deltamethrin-treated (at field rate or CL₉₉) arenas. Both populations were able to avoid insecticide doses, escaping from the treated arenas, which suggest that behavioral resistance in these locations may difficult the management of resistant populations.

KEY WORDS: Insect behavior, insecticides, selection pressure

Introdução

A traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*, (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) é considerada a praga que causa maiores perdas econômicas em cultivos de brassicas no mundo (Voice & Chapman 2000). Ciclo curto e alto potencial reprodutivo são características que possibilitam um grande número anual de gerações (Ulmer *et al.* 2002). No Brasil, sua ocorrência é constatada praticamente durante todo o ano nas regiões produtoras (Melo *et al.* 1994, Barros & Vendramim 1999, Castelo Branco & Amaral 2002). Esta praga tem desenvolvido resistência a muitas classes de inseticidas, ocasionado pelo uso indiscriminado proporcionando a seleção de populações resistentes e conseqüentemente, dificultando ainda mais o manejo (Medeiros *et al.* 2005). O controle desta praga é realizado principalmente com inseticidas químicos, no entanto, o uso indiscriminado destas moléculas ocasiona uma grande pressão de seleção provocando o aparecimento de populações resistentes (Talekar & Shelton 1993). Voice & Chapman (2000) relatam que *P. xylostella* apresenta resistência a cinquenta e um compostos sintéticos.

A resistência a inseticida pode ser causada por baixa penetração de inseticidas, aumento de enzimas metabólicas e da diminuição do sítio alvo ou modificações comportamentais no aprendizado que reduz a exposição ao inseticida (Georghiou 1972). Na resistência comportamental o inseto desenvolve habilidade de evitar doses de inseticida que seriam letais. Esta forma de resistência é causada por efeitos irritantes e repelentes dos inseticidas sobre indivíduos fisiologicamente suscetíveis, os quais alteram seu comportamento para evitar áreas tratadas (Hoy *et al.* 1998). Segundo Georghiou & Taylor (1977), o comportamento de uma praga na superfície tratada com inseticida é um fator biológico que pode influenciar a seleção para resistência. O comportamento dos insetos a repelentes químicos é um dos grandes problemas no manejo da resistência, pois a atividade tóxica de um inseticida pode ser limitada se o inseto evitar contato com o produto (Cochran 1995).

Fisiologicamente, os inseticidas piretróides interagem com o canal de sódio, modificam as funções normais devido à sua ação nesse canal, resultando em descargas repetitivas que rapidamente geram esgotamento nervoso, ocasionando paralisia e morte (Narahashi 1996). Este inseticida pode alterar o comportamento do inseto através da repelência e irritação (Hodges & Meik 1986). O estudo do mecanismo de resistência aos inseticidas químicos desempenha um papel fundamental no manejo integrado de pragas. Estudos detectaram falhas de controle em larvas de *P. xylostella* da Região Agreste de Pernambuco devido à resistência a deltametrina (Oliveira *et al.* 2011). Portanto o presente trabalho teve como objetivo analisar se as populações resistentes a deltametrina possuem capacidade de evitar o contato a exposição às moléculas desse inseticida.

Material e Métodos

Populações de *P. xylostella* e Manutenção. Os insetos foram coletados nos municípios de Belo Jardim, Sairé, Bezerros, Jupi e Capoeiras e Chã Grande em Pernambuco. A criação de *P. xylostella* consistiu na metodologia descrita por (Barros & Vendramim 1999).

Bioensaios de Resistência Comportamental. As larvas de *P. xylostella* foram realizados com larvas de terceiro instar em metade da placa tratada com resíduo seco do inseticida deltametrina nas concentrações da dose de campo (7,5 mg/L) e nas Cl_{99} de cada população obtidas através de bioensaio de suscetibilidade. Para confecções das arenas foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro). Metades dos discos de papel de filtro foram tratadas com uma solução de 0,5 ml de deltametrina e outra com 0,5 ml água destilada. Após a completa secagem os papéis foram colados com cola branca (base de resina sintética e água) (Göller, China) no fundo da placa de Petri. Para evitar o escape das larvas as paredes internas das placas de Petri foram untadas com

gel hidrossolúvel (Gel KY, Johnson & Johnson ®). Este sistema foi levado ao sistema Viewpoint® tracking. A placa de Petri foi deixada sob a câmera de vídeo, onde o experimento foi gravado por 5 minutos e repetido. Antes de iniciar a gravação, a larva foi colocada no centro da placa de Petri, entre as áreas tratadas e não tratadas e após um minuto iniciava-se o ensaio. O delineamento foi inteiramente casualizado com 10 repetições para cada população, onde cada repetição constituiu-se de um único inseto e a cada repetição, as placas de Petri foram substituídas. Nestes ensaios os parâmetros comportamentais analisados foram: Distância do tempo de caminhada (DTC), Tempo de caminhada (TC), Tempo de Repouso (TR), Velocidade Média (VM) e Número de Paradas (NP).

Análise Estatística. Os parâmetros comportamentais analisados foram submetidos ao teste de Scott & Knott 1974 ($P > 0,05$) (ASSISTAT 2010). Adicionalmente, o teste qui-quadrado para comparação dos parâmetros entre a área tratada e não tratada em cada população foi realizado.

Resultados

A dose de campo de 7,5 mg/L do inseticida deltametrina, foi capaz de provocar modificações comportamentais nas populações de *P. xylostella*. Houve diferenças entre as populações quanto a DTC ($F_{5, 54} = 2,815$; $P < 0,05$). A população de Sairé apresentou significativamente uma maior DTC, pelo teste de Scott Knott, comparativamente às demais populações, variando este parâmetro de $70,9 \pm 8,49$ a $42,8 \pm 3,28$. Porém, apesar das populações de Belo Jardim e Bezerros apresentarem menores DTC, estas foram capazes de distinguir entre as áreas tratadas com a dose de campo e a área não tratada, evitando as áreas tratadas e percorrendo uma maior distância nas áreas não tratadas ($\chi^2 = 6,569$; $P = 0,01$; $\chi^2 = 7,814$; $P = 0,005$, respectivamente) (Figs. 1A, I).

Quanto ao TC, foi também detectada diferenças entre populações ($F_{5, 54} = 6,970$: $P < 0,01$). Sairé foi à população que apresentou um valor significativamente maior para este parâmetro, variando este de $196,8 \pm 13,50$ a $112,7 \pm 12,19$ entre as populações testadas. Entre, as populações analisadas, as de Belo Jardim e Bezerros permaneceram por mais tempo sobre área não tratada ($\chi^2 = 21,389$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 18,893$, $P < 0,0001$, respectivamente) (Figs.1A, II).

Da mesma forma houve diferenças observadas entre populações quanto ao TR ($F_{5,54} = 5,735$: $P < 0,01$). Sairé foi à população que apresentou significativamente um menor TR. Este parâmetro variou de $184,8 \pm 13,70$ a $103,1 \pm 13,63$ entre as populações. Em relação a este parâmetro, além das populações de Belo Jardim Bezerros e população de Jupi permaneceu por mais tempo em repouso nas áreas não tratadas ($\chi^2 = 35,873$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 12,098$, $P = 0,0005$; $\chi^2 = 16,844$, $P < 0,0001$, respectivamente) as demais populações não apresentaram diferença ($P > 0,05$) (Figs. 1A, III).

As populações diferiram quanto a VM ($F_{5,54} = 2,413$: $P < 0,05$). As populações de Sairé, Jupi e Chã Grande foram as que apresentaram maiores valores de VM, do que as demais populações, variando este parâmetro de $0,3 \pm 0,03$ a $0,2 \pm 0,03$. Contudo, os valores de VM não diferiram entre áreas tratadas ou não tratadas para todas as populações ($P > 0,05$) (Figs.1A, IV).

O NP de cada população também foi diferente entre as populações testadas ($F_{5,54} = 2,834$: $P < 0,05$). As populações de Belo Jardim, Bezerros e Jupi foram as que apresentaram um número significativamente maior de paradas, estas também diferiram na quantidade de paradas, realizando um maior número de paradas nas áreas não tratadas ($\chi^2 = 167,941$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 79,844$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 37,439$, $P < 0,0001$, respectivamente). A população de Sairé realizou um menor número de paradas comparadas com as demais, no entanto, este comportamento foi realizado mais na área tratada ($\chi^2 = 4,788$, $P = 0,028$) (Fig. 1A,V).

Já para a CL₉₉ de cada população também ocasionaram modificações no comportamento de *P. xylostella*. Houve diferenças no DTC ($F_{5,54} = 3,2102$; $P < 0,05$). A população de Jupi apresentou uma DTC significativamente maior pelo teste de Scott Knott quando comparada com as demais populações, variando este parâmetro de $102,1 \pm 17,35$ a $49,9 \pm 6,39$. No entanto apenas as populações de Belo Jardim e Bezerros foram capazes de distinguir entre as áreas tratadas e área não tratada, percorrendo uma maior distância nas áreas não tratadas ($\chi^2 = 4,4929$, $P = 0,0340$; $\chi = 16,1420$, $P < 0,0001$, respectivamente) (Figs. 1B, I).

O TC entre as populações foi diferente ($F_{5,54} = 4,2153$; $P < 0,01$). As populações de Jupi e Sairé apresentaram um maior TC, variando este de $225,9 \pm 23,63$ a $143,5 \pm 11,55$ entre as populações analisadas. Nas populações de Belo Jardim e Bezerros foram observadas um maior TC sobre as áreas não tratadas ($\chi^2 = 12,9667$, $P = 0,0003$; $\chi^2 = 40,9021$, $P < 0,0001$, respectivamente), as demais populações não apresentaram diferença ($P > 0,05$) (Fig2B,II). As populações não diferiram, quando comparadas através do parâmetro TR ($F_{5,54} = 1,5370$; $P > 0,05$), variando este de $156,6 \pm 11,23$ a $110,5 \pm 8,13$. No entanto, as populações de Belo Jardim, Sairé e Bezerros permaneceram mais tempo em repouso nas áreas não tratadas. (Figs. 1B, III).

As populações diferiram quanto a VM ($F_{5,54} = 2,413$; $P < 0,05$). As populações de *P. xylostella* de Jupi, Belo Jardim, e Chã Grande apresentaram maiores valores de VM, variando de $0,4 \pm 0,03$ a $0,2 \pm 0,03$. Enquanto, Sairé e Capoeiras apresentaram os menores valores. Contudo, os valores de VM não diferiram entre áreas tratadas ou não tratadas para todas as populações ($P > 0,05$) (Figs. 1 B, IV).

As populações também diferiram quanto ao número de paradas ($F_{5,54} = 2,834$; $P < 0,05$). As populações de Belo Jardim, Bezerros, Sairé e Jupi foram as que apresentaram um maior número de paradas, variando este parâmetro de $889,3 \pm 67,04$ a $739,5 \pm 64,27$. Estas também diferiram na quantidade de paradas, realizando um maior número de paradas nas áreas não tratadas ($\chi^2 =$

78,3701, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 179,4446$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 20,5084$, $P < 0,0001$; $\chi^2 = 2,3567$, $P = 0,1247$, respectivamente). (Figs. 1B, V).

Discussão

As características comportamentais de caminhamento variaram entre as populações de *P. xylostella* tanto nas áreas tratada e não tratadas com a dose de campo e nas CL₉₉. As larvas de terceiro instar das populações de Belo Jardim e Bezerros percorreram uma maior distância e caminharam por mais tempo nas áreas não tratadas, nas duas concentrações usadas neste trabalho. Estas mesmas populações permaneceram por mais tempo em repouso nas áreas não tratadas em relação à dose de campo e na CL₉₉. Na população de Sairé, este comportamento foi observado apenas na CL₉₉ e na população de Jupí apenas na dose campo. A atividade locomotora é o primeiro sintoma observado em insetos tratados com piretróides, desempenhando um papel importante na exposição ao inseticida podendo ocasionar modificações no comportamento, onde o inseticida causa irritação nos indivíduos (Gammon 1978, Alzogaray *et al.* 1997).

Este fato sugere que tanto em concentrações baixas ou em altas doses do inseticida deltametrina, as populações de Belo Jardim e Bezerros são capazes de detectar a presença do inseticida mais facilmente do que as outras populações. A população de Sairé apenas apresenta esta característica nas doses mais altas demonstrando ter menor capacidade sensitiva para detectar o inseticida. A capacidade de detectar os xenobióticos através das sensilas é primordial para o comportamento de escape. Cordeiro *et al.* (2010) mostraram que a percepção de inseticidas através das sensilas foi reduzida na espécie *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) devido ao seu hábito de transportar grande quantidades de comida no seu corpo. Esta redução da sensibilidade tornou-a mais sensível a inseticidas (Cordeiro *et al.* 2010). Quanto menos sensíveis as sensilas, menor será a percepção de inseticidas. Portanto, os insetos que

passam menos tempo na área tratada, apresentam maior resistência comportamental. Este comportamento não foi observado nas populações de Chã Grande e Capoeiras.

Portanto Existem diferenças entre populações na habilidade de detectar doses de inseticidas e escapar da intoxicação. Isto ocorre devido a efeitos repelentes dos inseticidas sobre insetos, os quais alteram seu comportamento para evitar áreas tratadas (Yu & Nguyen 1992). Esta capacidade apresentada por estas populações, permitindo-lhes escaparem dos efeitos letais do inseticida, pode estar relacionada à capacidade de aprendizagem do inseto. Este comportamento é resultante das pressões seletivas exercidas pela deltametrina, que possibilita a sobrevivência de uma população de insetos, sendo determinada por ações que influenciam a resposta do organismo a pressões seletivas exercidas por um determinado inseticida, aumentando a capacidade de uma população de insetos escaparem dos efeitos letais do inseticida (Hoy *et al.* 1998).

As populações de Belo Jardim e Bezerros apresentaram comportamento de fuga da área tratada com deltametrina. A repelência a piretróides é frequentemente associada à piretróides devido aos seus efeitos no sistema nervoso do inseto (Bloomquist 1996). Em estudos realizados por Wang *et al.* (2004) as baratas evitaram se alimentar de iscas que continham inseticida piretróides. Watson *et al* (1997) também observaram que *Anthrenus verbasci* (L.) (Coleoptera: Dermestidae) procuraram fugir da área tratada para evitar o contato com o inseticida. Watson & Barson (1996) observaram que populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) evitaram áreas com inseticidas repelentes. As modificações no comportamento podem ser estímulos-dependentes, em que o inseticida pode causar irritação nos indivíduos e como isso, ocorre fuga da área tratada (Georghiou 1972). Prasifka *et al* (2010) colocaram ovos de *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) em milho transgênico contendo toxina *CryIAB* do *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae), após as eclosão um maior percentual das larvas resistente migraram para milho não transgênico, quando comparado com os indivíduos

suscetíveis. Situação semelhante aconteceu no presente trabalho onde populações resistentes de Belo Jardim e Bezerros, fugiram das áreas tratadas em todos os parâmetros comportamentais analisados no presente trabalho.

Quanto á Velocidade Média das populações de *P. xylostella*, tanto na metade da arena tratada e não tratada, não foi possível estabelecer uma relação entre este parâmetro com a resistência comportamental no presente trabalho. No entanto, alguns trabalhos como o de Beckel *et al* (2004) por exemplo, demonstram que indivíduos de *Rhyzopertha Dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) resistentes a deltametrina reduziram a velocidade sobre a superfície tratada com esse inseticida para evitar ou diminuir o contato. Entretanto alguns inseticidas podem estimular o comportamento de locomoção (Haynes 1998).

As populações de Belo Jardim, Bezerros, Sairé e Jupi realizaram menores quantidades de paradas na área com inseticida, ocasionando assim, menos contato com este químico. Este comportamento pode estar relacionado ao processo de repelência e irritabilidade dos inseticidas piretróides no sistema nervoso periférico dos insetos (Alzogaray *et al.* 1997). Sendo assim, a repelência e irritação química ocasionam o comportamento de fuga da área onde o inseto está exposto ao inseticida, aumentando capacidade sobrevivência (Desneux *et al.* 2007). Este comportamento foi detectado principalmente nas populações de Belo Jardim, Bezerros em todos os parâmetros comportamentais analisados. Portanto, a resistência comportamental diminui a ação do inseticida e como conseqüência dificulta a diminuição populacional da praga abaixo do nível de dano econômico nestas localidades no Estado de Pernambuco. Deste modo, é de extrema relevância determinar os mecanismos de resistência, para que as táticas de controle possam ser mais efetivas, de modo evitar custos desnecessários com inseticida, contaminação do meio ambiente e aumento dos resíduos de deltametrina nas brassicas.

Agradecimentos

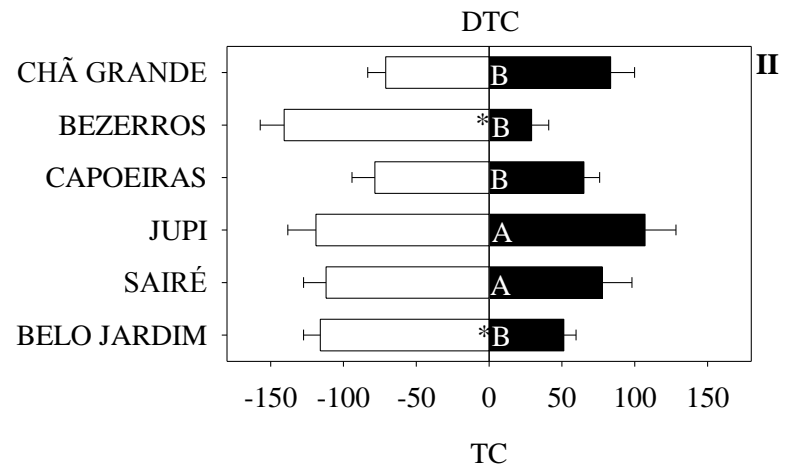
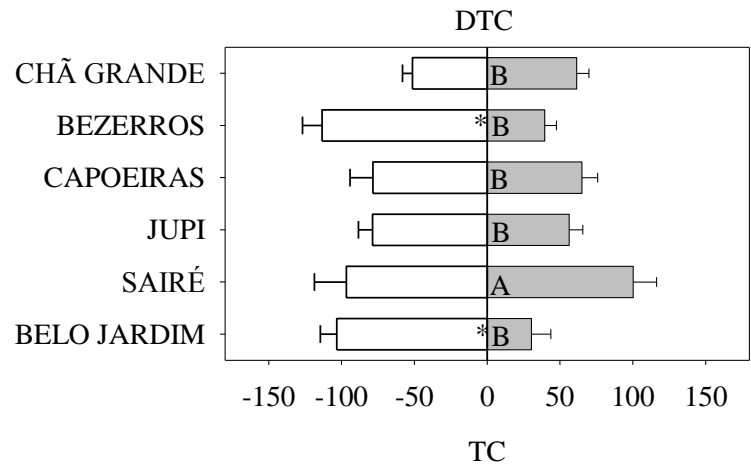
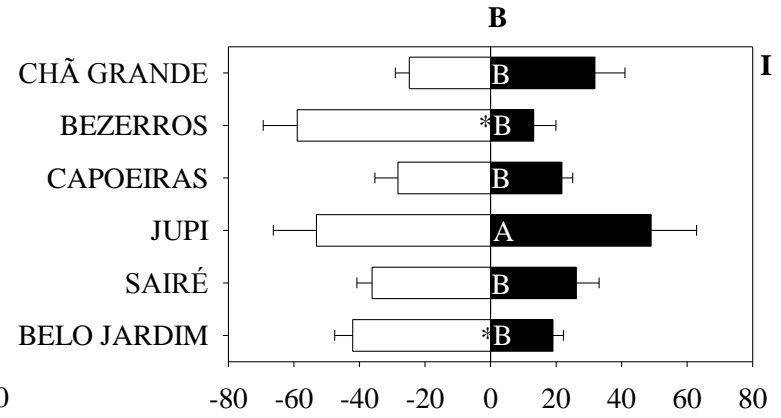
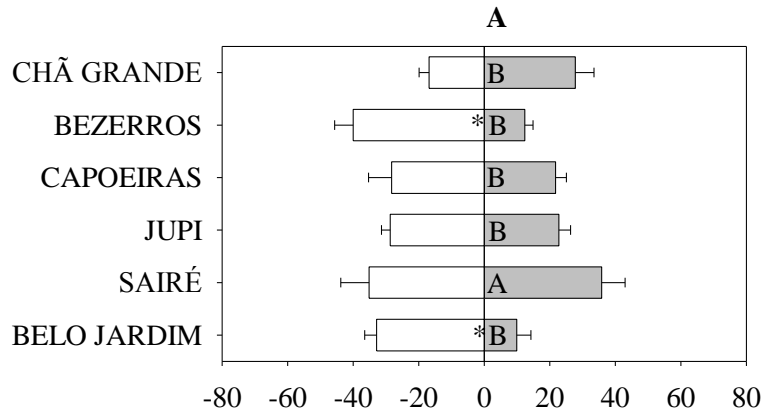
A CAPES pela bolsa de estudo ao primeiro autor e aos Laboratórios de Acarologia e Interação Inseto Tóxicos.

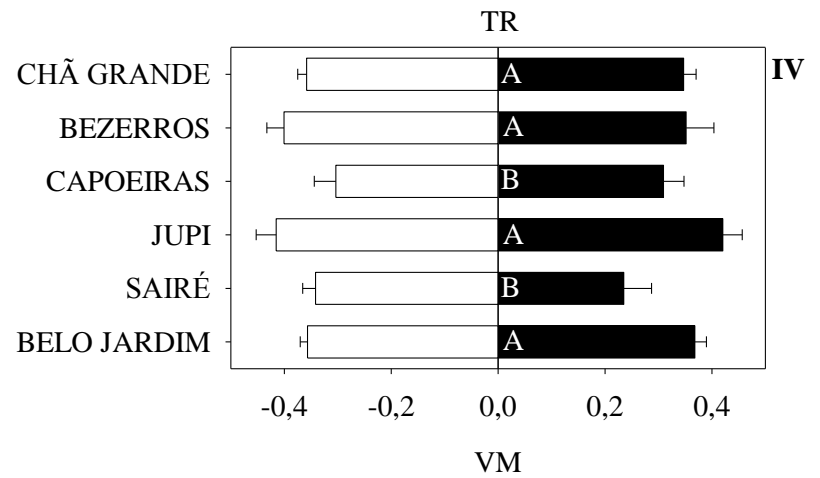
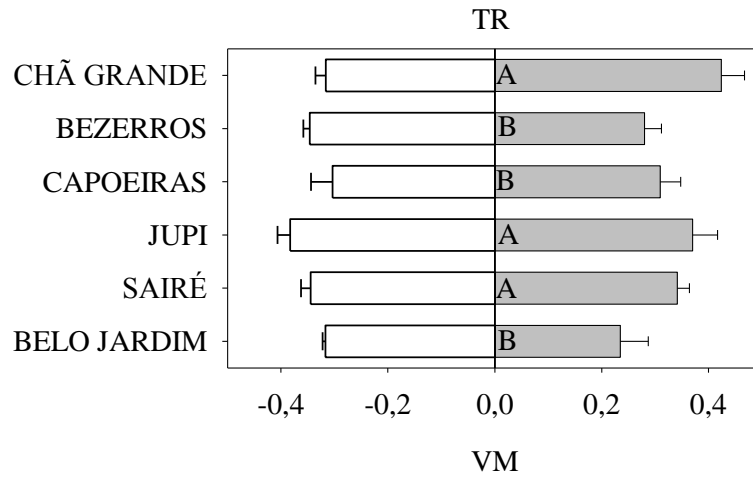
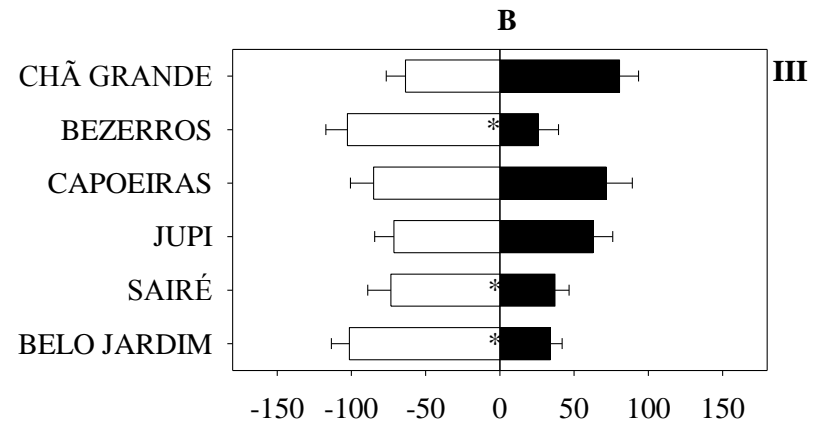
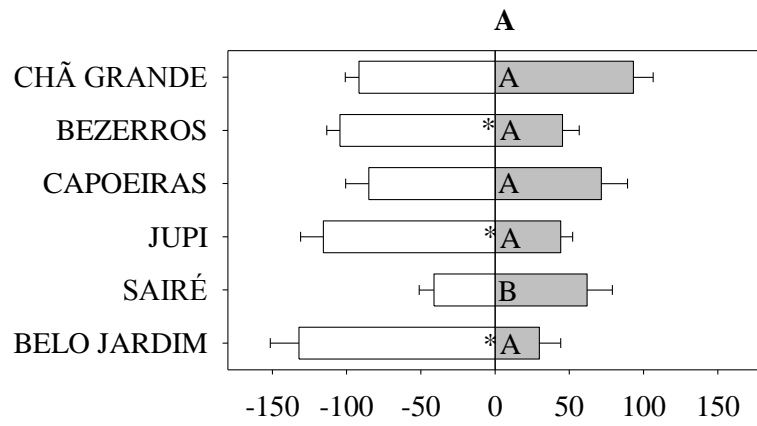
Literatura Citada

- Alzogaray, R., A. Fontán & E. Zerba. 1997.** Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Arch. Insect. Biochem. Physiol. 35: 323-333.
- Barros, R. & J.D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho utilizados para a criação de *Plutella xylostella* (L.) no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley, (Hymenoptera: Trichogrammatidae). An. Soc. Entomol. Brasil 28: 469-476.
- Beckel, H., I. Lorini & S.M.N. Lazzari. 2004.** Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltametrina. Rev. Bras. Entomol. 48: 115–118.
- Bloomquist, J. 1996.** Ion channels as targets for insecticides. Annu. Rev. Entomol. 41: 163-90
- Castelo Branco, M. & P.S.T. Amaral. 2002.** Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal. Hortic. Bras. 20: 410-415.
- Chapman, J.W., D.R. Reynolds, A.D. Smith, J.R. Riley, D.E. Pedgley & I.P. Woiwod. 2002.** High-altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the U.K.: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. Ecol. Entomol. 27: 641-650.
- Cochran, D.G. 1995.** Selection of Pyrethroid resistance in the German Cockroach *Blattella germanica* (L.) (Blattellidae : Dictyoptera:). J. Econ. Entomol. 80: 171-192
- Cordeiro, E.M.G., A.S. Corrêa, M. Venzon & R.N.C. Guedes. 2010.** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. Chemosphere 81: 1352-1357.

- Desneux, N., A. Decourtype & J.M. Delpuech. 2007.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Gammon, D.W. 1978.** Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32°C. *Pestic. Sci.* 9: 79-91.
- Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1977.** Operational influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 653-658.
- Georghiou, G.P. 1972.** The evolution of resistance to pesticides. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3: 133-168.
- Haynes, K.F. 1988.** Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 33: 33:149.
- Hodges, R.J. & J. Meik. 1986.** Lethal and sublethal effects of permethrin on Tanzanian strains of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Gnathocerus maxillosus* (F.) *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Insect Sci. Appl.* 7: 533–537.
- Hoy, C.W., G.P. Head & F.R. Hall. 1998.** Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 571–594.
- Medeiros, C.A.M., A.L.Boiça Junior & A.L. Torres. 2005.** Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. *Bragantia* 64: 227-232.
- Melo, P.E., B. Castelo & M. Madeira. 1994.** Avaliação de genótipos de repolho para a resistência traça das crucíferas. *Hortic. Brasil.* 12: 19-24.
- Narahashi, T. 1996.** Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 78: 1–14
- Prasifka, J., R. Hellmich, A. Crespo, B. Siegfried & D. Onstad. 2010.** Video-tracking and on-plant tests show Cry1Ab resistance influences behavior and survival of neonate *Ostrinia nubilalis* following exposure to Bt maize. *J. Insect Behav.* 23: 1-11.

- Scott, A.J. & M.A. Knott. 1974.** A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30: 507-512.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Ulmer, B., C. Gillott, D. Woods & M. Erlandson. 2002.** Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. *Crop Prot.* 21: 327-331.
- Voice, D.G. & R.B. Chapman. 2000.** Imported insecticide resistance in diamondback moth. NZ. *Pl. Prot. Conf.* 53: 83-86.
- Yu, S.J. & S.N. Nguyen. 1992.** Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44:74-81.
- Wang, C., M.E. Scharf & G.W. Bennett. 2004.** Behavioral and physiological resistance of the german cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 2067-2072.
- Watson, E. & G. Barson. 1996.** A laboratory assessment of the behavioral responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *J. Stored Prod. Res.* 32: 57-67.
- Watson, E., G. Barson, D.B. Pinniger, G. Roberts & A.R. Ludlow. 1997.** Evaluation of the behavioural responses of *Anthrenus verbaci* adults and larvae to permethrin using a computerized tracking system. *J. Stored Prod. Res.* 33: 335-346.





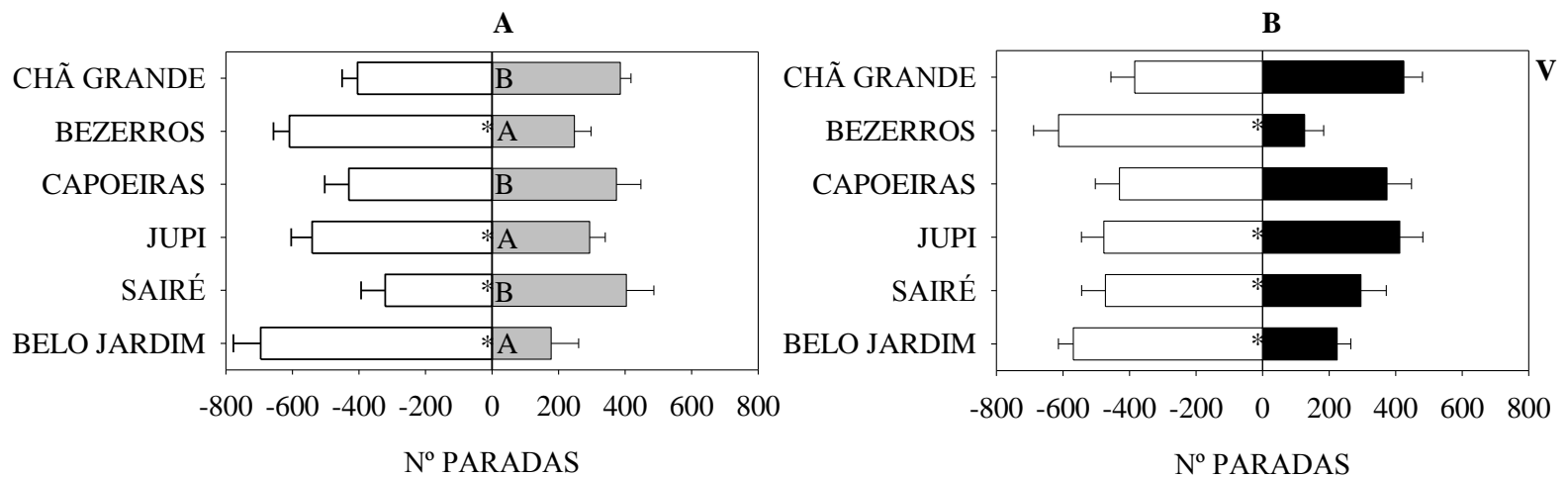


Figura 1. (A) dose de campo (B) CL₉₉. Média e erro padrão da distância total de caminhada (DTC), do tempo de caminhada (TC), do Tempo de repouso (TR), da Velocidade Média de caminhada (VM) e do Número de Paradas de *Plutella xylostella* em diferentes doses: (A) - Barras brancas = água, Barras cinzas = dose de campo e (B) barras pretas = CL₉₉. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as populações (Scott Knott) e asteriscos indicam diferenças entre a área tratada e não tratada para a população.