

## PROTEÇÃO DE PLANTAS

### Determinação da Concentração Diagnóstica de Pirimicarbe para a Detecção de Populações de *Myzus persicae* (Sulz.) (Homóptera: Aphididae) com Diferentes Níveis de Esterases

RUI S. FURIATTI<sup>1</sup> E SONIA M. N. LÁZZARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 84010-790, Ponta Grossa, PR. E-mail: furiatti@centerline.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Caixa postal 19020, 81531-990, Curitiba, PR. E-mail: lazzari@bio.ufpr.br

---

An. Soc. Entomol. Brasil 29(4): 731-738 (2000)

Determination of Pirimicarb Diagnostic Concentration in Order to Detect Populations of *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae) with Different Esterase Levels

**ABSTRACT** - Insecticide bioassays associated with colorimetric testes were used to determine the diagnostic concentrations of pirimicarb for insecticide resistance detection in *Myzus persicae* populations from potato crops. The aphids were randomly collected on potato plants of commercial crops in Curitiba, Piraí do Sul and Contenda, in Paraná State and Ibicoara in Bahia state, from 1994 to 1996. The LC<sub>50</sub> was estimated by submitting the aphids to bioassay with increasing concentrations of pirimicarb. Dead and live aphids from the 0.0125; 0.025; 0.05 and 0.1% (g/100ml) insecticide treatments were frozen after one hour of the bioassay and submitted to the evaluation of total esterase by colorimetric assays. Mortality was low at 0.0125%, but at 0.1% it reached 100% of the populations; thus, indicating that the diagnostic concentration is within this range. A significant difference was found between mortality caused by 0.025 and 0.05% pirimicarb in the same population, but not between populations collected from different areas. The 0.05% pirimicarb concentrations caused mortality of nearly 50% of high resistant individuals (R2), 72.0% of the moderately resistant populations (R1) and 89.7% of susceptible ones (S). The determination of this diagnostic concentration is useful for *M. persicae* resistance management programs because all individuals can be tested at this single appropriate concentration and low resistance frequencies can be detected in the population.

**KEY WORDS:** Insecta, green peach aphid, insecticide resistance, insecticide bioassays, colorimetric assays, pirimicarb, diagnostic concentration.

**RESUMO** - Resultados de bioensaios com pirimicarbe, associados aos níveis de esterases totais obtidos através de testes colorimétricos, foram utilizados nesta pesquisa para determinar concentrações diagnóstica para a avaliação da

resistência de populações de *Mysus persicae* a inseticidas em cultura de batata. Coletas de *M. persicae* foram feitas ao acaso em plantas de batata de plantações comerciais, na região de Curitiba, Piraí do Sul e Contenda, no Paraná, e Ibicoara na Bahia, durante o período de 1994 a 1996. A  $CL_{50}$  foi estimada submetendo-se os afídeos a bioensaios com concentrações (g/100 ml) de 0.0125; 0.025; 0.05 e 0,1% foram congelados uma hora após o tratamento e submetidos à avaliação das esterases totais, através de ensaio colorimétrico. Na concentração de 0,0125%, a mortalidade foi muito baixa, enquanto que a 0,1% a mortalidade atingiu 100% da população, indicando que a concentração diagnóstica encontra-se dentro desta faixa. A diferença foi significativa entre as mortalidades nas concentrações de 0,025 e 0.05% em cada população estudada, mas não entre as populações coletadas nas quatro regiões. A concentração de 0,05% de pirimicarbe causa a mortalidade de aproximadamente 50% dos indivíduos altamente resistentes (R2), 72% dos levemente resistentes (R1) e 89,7% dos suscetíveis (S), podendo ser utilizada para diagnosticar populações resistentes de *M. persicae*. A determinação desta concentração diagnóstica é importante nos programas de manejo da resistência da praga em cultivo de batata, pois os indivíduos podem ser avaliados quanto à resistência nesta única concentração e, assim, baixa frequência de resistência podem ser detectadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insecta, pulgão-verde-de-patata, resistência a inseticidas, ensaios colorimétricos, esterases totais, bioensaios com inseticidas, pirimicarbe.

O monitoramento de insetos resistentes a inseticidas tem sido feito, tradicionalmente, através de comparações de  $DL_{50}$ ,  $DL_{90}$ , ou da inclinação das retas de respostas a doses de inseticidas, entre populações de campo e populações suscetíveis de referência em laboratório. Embora adequados para a detecção da resistência em altas frequências, estes métodos são insensíveis a pequenas mudanças na frequência da resistência. Testes diagnósticos são mais eficientes para detectar frequências mais baixas (em torno de 10%) de resistência, porque todos os indivíduos são testados em dose apropriada. Além disso, menos insetos são requeridos para os ensaios pois não se aplicam doses ou concentrações menores, nas quais a porcentagem de mortalidade não é informativa (French-Constant & Roush 1990, Roush & Miller 1986).

O termo dose discriminante é usado quando se sabe que a dose causa diferentes respostas entre o genótipo da espécie

estudada; já o termo dose diagnóstica é menos rigoroso e é utilizado quando se quer monitorar a resistência, sendo, porém menos preciso que o primeiro (Halliday & Burnham 1990).

A determinação da dose ou concentração diagnóstica tem sido usada para o monitoramento da resistência em *Mysus persicae* (Silz.) pois é rápida, fácil de ser utilizada, inclusive por técnicos de campo, e não quer procedimentos sofisticados.

Sawicki *et al.* (1978) determinaram que 0,025% de pirimicarbe e 0,02% de demeton-S-metil são capazes de matar os indivíduos suscetíveis(S) e levemente resistentes (R1) de populações britânicas de *M. persicae*, porém, permitem a sobrevivência de indivíduos altamente resistentes (R2). Os R1 sobrevivem apenas ao demeton-S-metil e os S morrem com a aplicação de qualquer um dos dois inseticidas. Os autores concluíram que essas concentrações discriminantes não medem a abundância relativa dos indivíduos

resistentes ou sucessíveis dentro da população porque as respostas às concentrações para S e R1 se sobrepõem, servindo simplesmente para a detecção dos últimos. Estes autores complementaram satisfatoriamente seus estudos com a análise de esterases através de técnicas de eletroforese. Concluíram que a aplicação de 0,025% de pirimicarbe resulta em 100% de mortalidade dos variantes S, 93-100% dos R1 e 38-69% dos R2, podendo ser utilizada para a discriminação deste último variante.

Este trabalho foi realizado com objetivo de determinar a concentração diagnóstica de primicarbe para a avaliação dos níveis de resistência em populações de *Mysus persicae*, contribuindo para o estabelecimento de programas de manejo da resistência do afídeo na cultura da batata.

### Material e Métodos

Foram coletadas amostras de 14 populações de *M. persicae* em cultivos comerciais de batata: uma população em Curitiba (PR); uma em Piraí do Sul (PR), cinco em Contenda (PR) e sete em Ibicoara (BA), no período de 1994 a 1996. As colheitas foram feitas ao acaso, percorrendo-se a área em diagonal, e amostrando-se 400 plantas, distantes umas das outras pelo menos 2 m, para evitar populações clonais. Os afídeos foram coletados juntamente com os folíolos de cada planta sorteada, colocados em sacos plástico com papel absorvente para evitar o excesso de umidade, os quais foram etiquetados e levados ao laboratório para a realização dos testes.

**Bioensaios.** Os bioensaios foram realizados no mesmo dia das coletas, sendo a  $CL_{50}$  estimada. Foram feitas quatro repetições com o pirimicarbe em diversas concentrações e uma testemunha com água esterilizada.

A metodologia utilizada foi modificada de Sawicki et al. (1978). Para cada repetição foram colocadas 10 fêmeas vivíparas ápteras num cilindro de plástico transparente (2,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) com o fundo

coberto por uma tela de malha fina. O conjunto foi colocado sobre uma placa de Petri de vidro. Sobre os afídeos foram pipetados 2 ml de uma solução de pirimicarbe (Pi-RIMOR® 50PM, inseticida carbamato) nas concentrações de 0,0031; 0,0062; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1% em água (g/100 ml). Após o contato com a suspensão por 10 segundos os afídeos foram secos, colocando-se o fundo do cilindro sobre um papel filtro. Na parte superior do frasco foi colocada uma tampa com tela de malha fina, e o frasco foi invertido para que os afídeos caíssem para a tela limpa. Os frascos com os insetos foram colocados em câmaras com temperatura aproximada de 25°C e, após 1h, foram examinadas sob microscópio estereoscópico, anotando-se o número de indivíduos mortos. O afídeo foi considerado morto, quando sob a ação de um leve toque de um pincel fino (FAO 1979), não conseguiu levantar-se após ter caído de costas.

Os resultados foram submetidos a análise de Probit, através do programa POLO-PC (LeOra Software 1987), para estimar a  $CL_{50}$ . Foi aplicada análise de variância aos dados de porcentagem de mortalidade, transformados segundo arco seno da raiz de  $x/100$ , nas concentrações de 0,025 e 0,05% de primicarbe. A razão de resistência (RR) foi calculada pela divisão entre a  $CL_{50}$  da população resistente a  $CL_{50}$  da população Contenda 1, considerada suscetível devido à alta mortalidade e ao histórico de baixa pressão seletiva a campo.

Aproximadamente 200 afídeos, incluindo indivíduos mortos e vivos nos bioensaios, foram congelados 1h após o tratamento, a -15°C para a análise de esterases.

### Avaliação da Atividade Total das Esterases.

Para esta avaliação seguiu-se a metodologia proposta por Devonshire et al. (1992). Os afídeos congelados, todos com aproximadamente o mesmo tamanho, foram transferidos com um pincel fino para uma microplaca com 96 vasos de 150  $\mu$  de capacidade volumétrica cada. Os vasos continham 50  $\mu$ l de uma solução tampão de fosfato de sódio (0,02 M, pH 7,0) com 0,1%

de triton X-100 (tampão A). A placa era colocada sobre uma camada de gelo, e os afídeos macerados individualmente com um bastão de vidro. Foram aplicados 25 µl de cada amostra em cada poço de uma placa, os quais já continham 25 µl do tampão A. Em seguida adiciona-se 150 µl de a-naftil acetato (30 mM), em cada poço da microplaca, a qual foi deixada incubar por 5 min. a coloração foi feita com 25 ml de "fast blue B salt" (0,3% dissolvido em 15 ml de água e 35 ml de SDS 5%), adicionando em cada poço; a placa foi colocada no escuro por exatamente 20 min a 25°C. A leitura foi feita em leitor de microplaca (MR 600-Dynatech Product), com comprimento de onda de 630 nm. Os quatro primeiros vasos de microplaca receberam apenas os regentes e foram utilizados como padrão branco para o leitor eletrônico.

Os resultados do teste colorimétrico para os indivíduos mortos ou vivos nas concentrações 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1% de pirimicarbe foram agrupadas em diversas categorias, de acordo com os valores da absorbância, isso possibilitou a determinação da frequência de indivíduos suscetíveis e resistentes da amostra (FA) e a frequência de indivíduos vivos após o tratamento com primicarbe (FAT). Assim os indivíduos foram classificados (de acordo com os limites de absorbância indicados em nanômetros e modificado de Devonshire *et al.* 1992) em suscetíveis (S; 0-0,3 nm); suscetíveis ou levemente resistentes (S/R1; 0,31-0,4 nm); levemente resistentes (R1; 0,41-0,5 nm); levemente ou altamente resistentes (R1/R2, 0,51-0,8 nm); altamente resistentes (R2; 0,81-1,5 nm); e extremamente resistente (R3; >1,51 nm).

### Resultados e Discussão

As concentrações 0,0125% e 0,1% não foram analisadas com maior profundidade devido à baixa mortalidade de indivíduos suscetíveis (S) obtida na primeira concentração, e pela altíssima mortalidade de todos os resistentes e suscetíveis na segunda.

Na análise estatística realizada para comparar a mortalidade provocada por pirimicarbe entre as populações estudadas, consideraram-se apenas os resultados de CL50 com intervalo de confiança igual ou superior a 95%. Por essa razão as populações Ibicoara 7 e Contenda foram desconsideradas (Tabela 1).

Os resultados obtidos em 12 populações demonstraram que há diferença altamente significativa entre a mortalidade provocada pelas concentrações de 0,025 e 0,05% (F=51, 12; g.l.=1; P<0.00001). Contudo, para cada uma destas concentrações, não se obteve diferença significativa na mortalidade entre as populações das quatro regiões, isto é, não há interação entre as populações e as concentrações, pois, o comportamento de uma população assemelha-se ao de outra com relação à mortalidade (Tabela 1).

Devido a problemas no descongelamento das amostras apenas oito populações, das 14 estudadas, passaram pelo teste colorimétrico, cujos resultados estão contidos na tabela 2.

A análise da mortalidade de indivíduos resistentes e suscetíveis na concentração 0,05% mostrou que esta é significativamente mais eficaz contra *M. persicae* do que as demais, ocasionando alta mortalidade, tanto em populações com frequência elevada de indivíduos S (Ibicoara 1, 3 e 4), como em populações com baixa frequência destes (Ibicoara 2 e 5 e Contenda 5) (Tabela 2). Esse resultado é explicado pela mortalidade comparativamente alta de indivíduos resistentes, tanto na concentração 0,05% como 0,025%, provavelmente devido ao estresse ocasionado pela viagem entre o campo e o laboratório. Desta forma as duas concentrações indicam somente a presença de indivíduos resistentes na amostra, não estimando a frequência dos mesmos.

Na população Contenda 1, a mais suscetível encontrada nesta pesquisa, a mortalidade provocada pela concentração 0,05% foi de 86,7% contrastada com 48,6% da Ibicoara 6, a mais resistente. Com 0,025%, a mortalidade foi 72,4 contra 17,3%, para as duas populações, respectivamente. Apesar de

Tabela 1. Estimativa da  $CL_{50}$  (concentração de pirimicarbe; probabilidade de 95%) e a razão de resistência (RR) de populações de *M. persicae*, em campos de batatas nos Estados do Paraná e Bahia, no período de 1993 a 1996.

População	n <sup>a</sup>	$CL_{50}$ (g/100ml)	(IC) <sup>b</sup>	b ( $\pm$ EP) <sup>c</sup>	c <sup>2d</sup>	RR <sup>e</sup>
Contenda 1	168	0,006	(0,002-0,012)	0,75 $\pm$ 0,11	2,76	-
Contenda 2	241	0,012	(0,005-0,029)	3,16 $\pm$ 0,34	31,20	2,0
Contenda 3	249	0,040	(0,033-0,049)	2,70 $\pm$ 0,31	1,67	6,7
Contenda 4	252	0,044	(0,029-0,072)	1,99 $\pm$ 0,07	7,72	7,3
Curitiba	226	0,017	(0,012-0,022)	1,94 $\pm$ 0,26	2,36	2,8
Piraí do Sul	239	0,030	(0,024-0,037)	2,88 $\pm$ 0,40	2,43	5,0
Ibicoara 1	228	0,015	(0,011-0,019)	2,68 $\pm$ 0,35	3,74	2,5
Ibicoara 2	230	0,025	(0,020-0,031)	2,27 $\pm$ 0,25	3,97	4,1
Ibicoara 3	234	0,026	(0,022-0,030)	4,32 $\pm$ 0,62	0,70	4,3
Ibicoara 4	226	0,023	(0,017-0,028)	3,25 $\pm$ 0,55	1,76	3,8
Ibicoara 5	234	0,021	(0,018-0,026)	2,72 $\pm$ 0,29	2,35	3,5
Ibicoara 6	230	0,055	(0,044-0,071)	2,56 $\pm$ 0,34	2,20	9,2

<sup>a</sup>número de insetos testados

<sup>b</sup>intervalo de confiança (IC 95%)

<sup>c</sup>b coeficiente angular da reta; EP erro padrão

<sup>d</sup>teste  $\chi^2$  com 4 graus de liberdade

<sup>e</sup>RR =  $CL_{50}$  da população resistente /  $CL_{50}$  da população suscetível (Contenda 1)

as duas concentrações discriminarem significativamente as populações estudadas ( $F=6,56$ ; g.l.=10;  $P,0,00001$ ), a concentração mais elevada permite diagnosticar com maior precisão a presença de indivíduos resistentes na amostra, eliminando 89,7% dos S como demonstrado na Fig. 1. A mortalidade dos indivíduos resistentes e suscetíveis de *M. persicae*, apresentados na Fig.1, foi obtida pela soma dos indivíduos mortos nas concentrações 0,0125; 0,025 e 0,05%. Os valores da absorbância permitiram caracterizar os indivíduos de acordo com o níveis de atividade das esterases totais, os quais foram agrupadas em suscetíveis (S) e resistentes (R), incluindo na última categoria: R1 (levemente resistentes); R2 (altamente resistentes) R3 (extremamente resistentes) e as categorias intermediárias S/R1 (S ou levemente resistente) e R1/R2 (R1 ou altamente resistente), as quais não puderam

ser caracterizadas com precisão devido à sobreposição dos valores da absorbância.

Os resultados obtidos com a concentração 0,025% de pirimicarbe nesta pesquisa, onde a mortalidade chegou a 73,8% em S; 68,0% em R1 (levemente resistentes) e 25,39% em R2 (altamente resistentes), contrastam com o relatado por Sawicki *et al* (1978), que observaram mortalidade de 100; 93-100 e 38-69%, respectivamente, em populações britânicas de *M. persicae*. A concentração 0,05% de pirimicarbe resultou na mortalidade que mais se aproxima dos resultados encontrados por esses autores, com 89, 7; 72,0 e 53,7%, respectivamente (Fig.1). Portanto, a utilização da concentração 0,025% nas populações estudadas não discriminaria os R2, como preconizados pelos autores citados, uma vez que a sobrevivência de S e R1 seria muito elevada.

Assim, a concentração de 0,05% de

Tabela 2. Mortalidade total (M%) de *M. persicae* resistentes (R, soma dos indivíduos pertencentes a todas as categorias de resistentes) e suscetíveis (S) nas concentrações (g/100 ml) de 0,0125%; 0,025% e 0,05% de pirimicarbe, frequência dos indivíduos na amostra (FA) e frequência de indivíduos vivos após o tratamento com pirimicarbe (FAT), caracterizados pela atividade total das esterases pelo teste colorimétrico, em sete populações (P) coletadas em Ibicoara, BA e uma população coletada em Contenda, PR, em 1995.

p	M%	n	FA		FAT	
			S	R	S	R
0,0125%						
Ibicoara 1	27,3	22	7	15	4	12
Ibicoara 2	37,1	35	4	31	2	20
Ibicoara 3	8,1	37	3	34	2	31
Ibicoara 4	24,2	33	2	31	1	24
Ibicoara 5	26,3	38	5	33	3	25
Ibicoara 6	2,6	38	1	37	1	36
Ibicoara 7	30,0	30	9	21	2	19
Contenda 5	11,5	52	6	46	4	42
0,025%						
Ibicoara 1	65,9	20	9	11	1	8
Ibicoara 2	48,4	38	4	34	1	21
Ibicoara 3	52,7	35	4	31	2	15
Ibicoara 4	62,5	34	5	29	0	12
Ibicoara 5	51,9	38	2	36	0	19
Ibicoara 6	17,3	37	5	32	3	27
Ibicoara 7	39,4	33	9	24	3	17
Contenda 5	57,8	45	4	41	1	18
0,05%						
Ibicoara 1	92,7	26	19	7	2	1
Ibicoara 2	69,3	35	1	34	0	11
Ibicoara 3	85,7	35	12	23	0	5
Ibicoara 4	89,4	42	12	30	0	4
Ibicoara 5	82,7	35	5	30	1	5
Ibicoara 6	48,6	33	3	30	0	18
Ibicoara 7	45,2	31	14	17	4	13
Contenda 5	70,3	37	2	35	0	11

n: número de afídeos testados

pirimicarbe pode ser utilizada para diagnosticar populações resistentes de *M. persicae* nas regiões estudadas,

considerando que não diferença significativa na mortalidade de afídeos entre regiões. Essa concentração permite a sobrevivência de

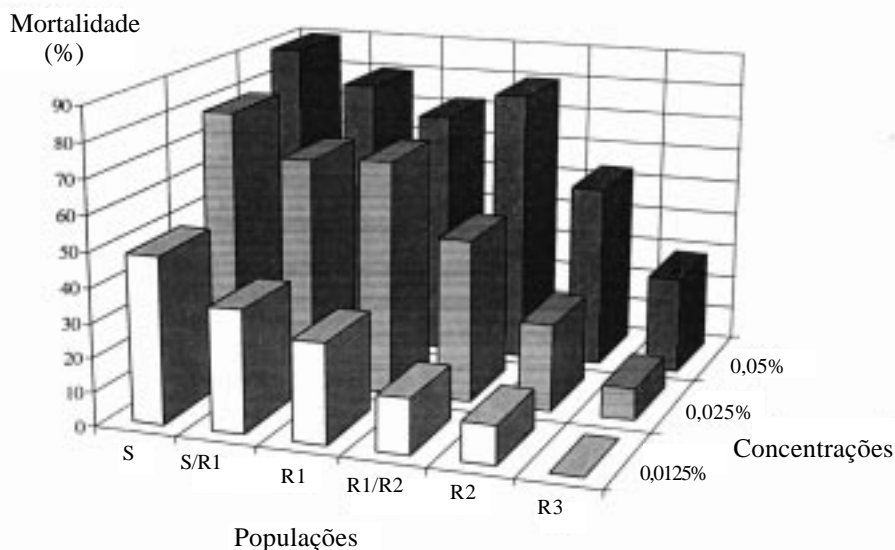


Figura 1. Mortalidade total de indivíduos suscetíveis e resistentes de *M. persicae* obtida após o tratamento com três concentrações de pirimicarbe (g/100 ml), em sete populações coletadas em Ibicoara, BA, e uma em Contenda, PR, no período de 1995 a 1996.

aproximadamente 50% do R2, variante importante na estimativa da  $CL_{50}$  em populações de campo deste afídeo.

A presença de indivíduos S vivos, 1 h após o mergulho na suspensão de pirimicarb a 0,05%, pode significar que esses indivíduos são portadores de outro mecanismo de resistência diferente daquele baseado na alta produção das esterases E4/FE4, devido à amplificação gênica. Essas enzimas degradam e sequestram inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides. Recentemente, Graham et al. (1994) registraram a ocorrência de acetilcolinesterase especialmente insensível ao pirimicarbe (AChE) em homozigotos e heterozigotos de *M. persicae*. Esse gene, em condições em condições de laboratório, aumentou do inseto a pirimicarbe em 15 vezes. Outros mecanismos de resistência, como redução na peneiração de inseticidas no corpo do inseto e alvo de ação

insensível podem estar envolvidos.

#### Literatura Citada

- Devonshire, A.L., G.J. Devine & G.D. Moores. 1992.** Comparison of microplate esterases assay and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Mysus persicae* (Homoptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. 82: 459-463.
- FAO. 1979.** Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Prot. Bull. 18: 16-18.
- French-Constant, R.H. & R.T. Roush. 1990.** Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, p. 5-

37. In: R.T. Roush & B.E. Tabashnik (ed.), Pesticide resistance in arthropods. New York and London, Chapman and Hall, 303 p.
- Graham, D.M., G.J. Devine & A.L. Devonshire. 1994.** Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Mysus persicae* and *Mysus nicotiniiana*. Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis. p. 413-418.
- Halliday, W.R. & K.P. Burnham. 1990.** Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 83: 1151-1159.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC: Auser's guide to Probit Or Logit analysis. LeOra Software, Berkely, CA.
- Roush, R.T. & G.L. Miller. 1986.** Consideration for design of insecticide resistance monitoring programs. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Sawicki, R.M., A.L. Devonshire, A.D. Rice, G.D. Moores, S.M. Petzing & A. Cameron. 1978.** The relation and distribution of organophosphorus and carbamate insecticide-resistant *Mysus persicae* (Slz.) in Britain in 1976. Pestic. Sci. 9: 189-201.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC: Auser's *Aceito em 05/09/2000.*
-