

CROP PROTECTION

Relação Entre a Atividade de Esterases e a Resistência de *Myzus persicae* (Sulz.) (Sternorrhyncha: Aphididae) a Pirimicarbe

RUI S. FURIATTI¹ E SONIA M.N. LAZZARI²

¹Depto. Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Estadual de Ponta Grossa, C. postal 992, 84100-970, Ponta Grossa, PR

²Depto. Zoologia, Universidade Federal do Paraná, C. postal 19020, 81531-980, Curitiba, PR

Neotropical Entomology 32(4):693-697 (2003)

Relationship Between Esterases Activity and the Resistance of *Myzus persicae* (Sulz.) (Sternorrhyncha: Aphididae) to Pirimicarb

ABSTRACT - The objective of this research was to evaluate the relationship between the total activity of carboxylesterase and the resistance of *M. persicae* populations to pirimicarb. The aphids were collected on potato plants in Contenda and Pirai do Sul, PR and Ibiçara, BA, Brazil. For the bioassay, five replicates for each concentration were prepared with 10 aphids placed in plastic vials with a fine fabric mesh on the bottom, and dipped into pirimicarb concentrations (%) at 0.0031; 0.0062; 0.0125; 0.025; 0.05, and 0.1%, during 10 seconds, then dried on filter paper. After 1h inside a 25°C chamber, the aphids were examined under a stereomicroscope, recording the number of dead insects. The carboxylesterase activity was assessed by *in vitro* colorimetric technique. A simple correlation was established between the results of the LC₅₀ bioassay and the frequency of *M. persicae* resistant variants. According to the absorbance level, the aphids were classified as variants S; S/R1 (S or R1); R1; R1/R2 (R1 or R2); R2 and R3, respectively susceptible; partially resistant, resistant and highly resistant. It was found a significant positive correlation between the LC₅₀ and the frequency of R2 forms and a significant negative correlation between LC₅₀ and the frequency of S and S/R1 forms. The colorimetric data supported the bioassay results, indicating that the bioassay was precise enough to determine either populations with high frequency of susceptible individuals or population with high proportion of resistant and highly resistant individuals.

KEY WORDS: CL₅₀, green peach aphid, pirimicarb resistance

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a atividade total das esterases e a resistência de indivíduos de *M. persicae* a inseticidas em populações coletadas em plantas de batata, em Contenda e Pirai do Sul, PR e Ibiçara, BA. No bioensaio, os afídeos foram colocados em recipientes de plástico transparente com o fundo coberto por uma tela de malha fina, em cinco repetições de 10 indivíduos para cada concentração. O conjunto foi mergulhado em concentrações (%) de pirimicarbe a 0,0031; 0,0062; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1%, durante 10 segundos e depois secos em papel filtro. Após uma hora em câmaras a aproximadamente 25°C, os afídeos foram examinados sob microscópio estereoscópico, anotando-se o número de insetos mortos. A atividade de carboxilesterase foi medida através de ensaio colorimétrico *in vitro*. De acordo com os níveis de absorvância, os afídeos foram classificados em S; S/R1 (S ou R1); R1; R1/R2 (R1 ou R2); R2 e R3 (suscetível; suscetível/ levemente resistente; levemente resistente; levemente resistente/ altamente resistente; altamente resistente e extremamente resistente, respectivamente). Foi efetuada uma correlação simples entre os resultados das CL₅₀ obtidas no bioensaio e a frequência desses indivíduos. Encontrou-se uma correlação positiva entre a CL₅₀ e R2, mas negativa entre a CL₅₀ e S e S/R1. O bioensaio, apoiado pelo teste colorimétrico, mostrou-se como uma ferramenta capaz de estimar com precisão tanto uma população com alta frequência de indivíduos suscetíveis quanto outra com elevada proporção de indivíduos resistentes e altamente resistentes.

PALAVRAS-CHAVE: CL₅₀, resistência a pirimicarbe, pulgão

A resistência do afídeo *Myzus persicae* (Sulz.) foi registrada em 31 países, envolvendo o total de 69 inseticidas diferentes, entre piretróides e organofosforados (Georghiou

1990). Está ligada principalmente à amplificação gênica na produção da esterase 4 (E4) ou da sua isoenzima FE4, as quais detoxificam ou sequestram a molécula do inseticida

(Devonshire & Moores 1982). Outro mecanismo de resistência identificado, recentemente, em *M. persicae* por Graham *et al.* (1994), caracteriza-se pela presença de acetilcolinesterase (AChE) insensível ao pirimicarbe, com o aumento da resistência de até 15 vezes, em condições de laboratório.

A detecção da resistência pode ser feita através de bioensaios, envolvendo comparações de doses ou concentrações letais ou de inclinações das retas de respostas a doses ou concentrações de um determinado ingrediente ativo. Os testes bioquímicos também podem ser utilizados e incluem a detecção da atividade enzimática em homogeneizados do inseto, usando substratos modelos, ou antissoros específicos para isolar a atividade da enzima que confere a resistência, ou ainda, a detecção da sequência específica do DNA (French-Constant & Roush 1990).

As técnicas de bioensaios com afídeos utilizadas pelos pesquisadores para estudos da resistência são muito variadas. Devonshire & Rice (1988) realizaram uma revisão bibliográfica sobre o assunto, levantando as vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas. Entre essas, a técnica de imersão dos indivíduos recomendada pela FAO (1979), é a mais simples, considerando o equipamento, o custo mais baixo e a rapidez para a obtenção dos resultados. Essa técnica garante o contato de todos os afídeos testados com o inseticida, e mediante esse processo, foi possível identificar 90% dos indivíduos resistentes e suscetíveis de *M. persicae* coletados na Inglaterra em 1976, incluindo cinco amostras que só possuíam formas suscetíveis. Esses resultados foram confirmados pela técnica de eletroforese por Sawicki *et al.* (1978).

Os bioensaios são muito efetivos para a detecção da resistência, estimando a frequência de indivíduos resistentes, quando a ocorrência destes é relativamente alta. Entretanto, quando a proporção é baixa, em particular quando a resposta dos indivíduos resistentes e suscetíveis se sobrepõe nas curvas de concentração-resposta, a determinação de uma concentração discriminante é difícil de ser estabelecida através dos bioensaios convencionais. Em tais circunstâncias a detecção da resistência através de métodos bioquímicos é valiosa (Sawicki *et al.* 1977), desde que se consiga amostrar os indivíduos resistentes.

Os testes bioquímicos mais utilizados na caracterização de variantes de *M. persicae* resistentes a inseticidas são a eletroforese, o teste de imunidade e o teste colorimétrico que mede a atividade total das esterases. A separação das formas através da eletroforese é demorada e a interpretação das bandas das esterases E4/FE4 é subjetiva, já o teste de imunidade requer a purificação das esterases, a separação da imunoglobulina (IgG) e um controle rigoroso do teste. A avaliação colorimétrica da atividade total das carboxilesterases, embora com poder discriminatório inferior ao teste de imunidade, é um método robusto e acessível para estimar a resistência de *M. persicae* no campo (Devonshire *et al.* 1992), minimizando as dificuldades associadas à avaliação subjetiva da intensidade das bandas no gel de eletroforese (Sawicki *et al.* 1978).

A frequência de indivíduos resistentes ou suscetíveis de *M. persicae* em uma determinada população deve estar relacionada com a estimativa da CL_{50} . Porém, Devonshire & Needham (1975) não encontraram relação consistente entre a

atividade total das carboxilesterases e os resultados do bioensaio. Esses autores sugeriram que as discrepâncias observadas resultaram da insensibilidade da técnica do bioensaio para medir as pequenas diferenças na suscetibilidade desses afídeos e à heterogeneidade da população, considerando apenas as formas suscetíveis ou resistentes.

A detecção da forma resistente que mais interfere na estimativa da CL_{50} das populações de campo de *M. persicae* é importante na determinação da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência desta espécie. Nesta pesquisa utilizou-se um bioensaio de imersão com o inseticida pirimicarbe, calibrado com os resultados da avaliação da atividade total das carboxilesterases, para medir a intensidade da resistência e avaliar a relação entre a frequência de indivíduos resistentes/suscetíveis de *M. persicae* com a CL_{50} de populações de campo de batata, nos estados do Paraná e Bahia.

Material e Métodos

Foram coletadas duas populações de *M. persicae* em Contenda, PR uma em Pirai do Sul, PR e seis populações em Ibicoara, BA (Tabela 1), em campos comerciais de batata, no período de 1993 a 1995. Foram selecionadas 400 plantas em cada amostragem, distantes umas das outras em pelo menos 2 m para evitar colônias clonais. Os afídeos foram coletados juntamente com os folíolos de cada planta sorteada, colocados em sacos plásticos com papel absorvente para evitar excesso de umidade, etiquetados e levados ao laboratório.

Os bioensaios com inseticida foram realizados no mesmo dia da coleta; enquanto que os afídeos destinados ao teste colorimétrico foram mantidos em freezer a -15°C . O número de afídeos congelados, dependia do tamanho da população, procurando-se armazenar em torno de 200 indivíduos para cada local de coleta.

A metodologia utilizada no bioensaio foi modificada de Sawicki *et al.* (1978). Para cada concentração de pirimicarbe foram feitas quatro repetições de 10 afídeos adultos, colocados em recipientes de plástico transparente com o fundo coberto por uma tela de malha fina, presa por uma tira de borracha. O conjunto foi mergulhado em concentrações (g i.a./L) de pirimicarbe a 0,0031; 0,0062; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1%, durante 10 segundos e depois secos em papel filtro. Após 1h em câmaras com temperatura entre 20°C e 25°C , os afídeos foram examinados sob microscópio estereoscópico. A avaliação da atividade total das esterases - teste colorimétrico - seguiu a metodologia proposta por Devonshire *et al.* (1992). Ambas estão descritas em Furiatti & Lazzari (2000a, b).

Os resultados obtidos através da técnica da imersão foram submetidos à análise de Probit para estimar a CL_{50} , utilizando o programa POLO-PC (LeOra Software 1987). Foi efetuada uma correlação simples entre os resultados da CL_{50} e a frequência de cada um das variantes de *M. persicae* caracterizadas pelo teste colorimétrico das carboxilesterases totais.

A razão de resistência (RR) foi calculada pela divisão entre a CL_{50} da população resistente e a CL_{50} da população suscetível (Contenda 1), utilizando-se o programa estatístico SANEST.

Tabela 1. Estimativa da CL_{50} (probabilidade de 95%) e a razão de resistência (RR) de populações de *M. persicae*, em campos de batata nos estados da Bahia e Paraná, estudadas no período de 1993 a 1995.

População	N ¹	CL50 (g/100 ml)	(IC) ²	b (\pm EP) ³	χ^2 ⁴	RR ⁵
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
Pirai do Sul	239	0,03	(0,024-0,037)	2,88 \pm 0,40	2,43	5,0
Contenda 3	249	0,04	(0,033-0,049)	2,70 \pm 0,31	1,67	6,7
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	4,17
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

¹Número de insetos testados

²Intervalo de confiança (IC 95%)

³Coefficiente angular da reta e erro padrão

⁴Teste χ^2 com 4 graus de liberdade

⁵RR= CL_{50} da população resistente/ CL_{50} da população suscetível (Contenda 1)

Resultados e Discussão

De acordo com os níveis de absorvância, os afídeos foram classificados em S; S/R1 (S ou R1); R1; R1/R2 (R1 ou R2); R2 e R3 (susceptível; susceptível/ levemente resistente; levemente resistente; levemente resistente/ altamente resistente; altamente resistente e extremamente resistente, respectivamente), modificando-se os níveis propostos por Devonshire *et al.* (1992), pois, considerou-se que nos resultados da avaliação das esterases totais, há formas que se sobrepõem em determinadas faixas de comprimento de onda em função do maior ou menor grau de resistência (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação das formas S; S/R1 (S ou R1); R1; R1/R2 (R1 ou R2); R2 e R3 (susceptível; susceptível/ levemente resistente; levemente resistente; levemente resistente/ altamente resistente; altamente resistente e extremamente resistente, respectivamente), de acordo com o nível de absorvância (em nm), caracterizados pela atividade total das carboxilesterases, comparada com a classificação proposta por Devonshire *et al.* (1992).

Variantes	Nível de absorvância(nm)	
	Devonshire	Furiatti
S	0-0,4	0-0,3
S/R1	-	0,3-0,4
R1	0,3-0,8	0,4-0,5
R1/R2	-	0,5-0,8
R2	0,5-1,5	0,8-1,5
R3	>1,5	>1,5

Ffrench-Constant *et al.* (1988) observaram alta frequência de indivíduos de *M. persicae* intermediários entre R1 e R2 em colza e entre R2 e R3 em batata, em áreas onde se usou inseticidas repetidamente, porém essas formas não receberam denominação especial. Os resultados encontrados para a colza são semelhantes aos observados neste trabalho, no qual se

utilizou uma adaptação dos níveis de absorvância para os resultados do teste com as esterases, originalmente proposto por Devonshire *et al.* (1992), no qual, como já foi discutido anteriormente, ocorre a sobreposição de S/R1 e R1/R2.

Numa comparação entre o teste com as esterases totais e o teste de imunidade, Devonshire *et al.* (1992), demonstraram que todos os variantes são caracterizados perfeitamente no teste de imunidade, porém, com o teste das esterases totais, o S se sobrepõe ao R1 na faixa de 0,3 a 0,4 nm, e o R1 e R2 se sobrepõem na faixa de 0,5 a 0,8 nm.

Parte dos indivíduos R1/R2 (R1 ou R2) detectados nesta pesquisa e classificados segundo proposta adaptada de Devonshire *et al.* (1992), podem ser formas intermediárias entre R1 e R2, concordando com Ffrench-Constant *et al.* (1978), os quais constataram alta frequência de indivíduos moderadamente resistentes pelo teste de imunidade. Outro fato que reforça esta conclusão é a resposta diferenciada dos R1/R2 à seleção dos mesmos, após a aplicação do inseticida pirimicarbe.

As CL_{50} s estimadas demonstraram grande variação na resistência das populações estudadas. Essa variação foi confirmada pela frequência de variantes resistentes do inseto determinada pela medição da atividade total das esterases (Tabela 3). Para o cálculo da razão da resistência (RR), usou-se como referência a população suscetível Contenda 1 que foi a mais suscetível e que foi coletada no outono de 1993 em horta caseira, onde não havia aplicação de inseticidas. Pela Tabela 1, observa-se que a RR variou de 2,0 a 9,2 entre as populações.

A população Contenda 2, apesar do χ^2 significativo ($P < 0,001$), indicando que os resultados do bioensaio não se enquadram no modelo de Probit por tratar-se de população altamente heterogênea, foi a única população com alta frequência de S e foi analisada bioquimicamente.

O coeficiente de correlação entre a CL_{50} e a frequência de cada uma das variantes para a resistência são apresentados na Tabela 4, onde se observa que a correlação foi positiva com a forma R2 e negativa com a forma S e S/R1,

Tabela 3. Proporção (%) de indivíduos variantes (n = número de indivíduos analisados) quanto à resistência de *M. persicae* caracterizados pela atividade total das esterases, coletados em campos de batata nos estados do Paraná e Bahia no período de 1994 e 1995. (Ver Tabela 2)

População	n	Variantes					
		S	S/R1	R1	R1/R2	R2	R3
Contenda 2	49	69,40	20,40	4,10	6,10	0	0
Contenda 3	83	0	0	2,40	15,70	63,80	18,00
Pirai do Sul	31	0	6,40	6,40	25,80	58,00	3,20
Ibicoara 1	175	36,57	11,42	12,00	20,00	17,70	2,28
Ibicoara 2	250	8,40	10,40	10,00	34,40	33,20	3,60
Ibicoara 3	248	16,20	5,64	5,64	25,40	37,90	9,27
Ibicoara 4	252	17,06	8,73	6,34	26,98	34,12	6,74
Ibicoara 5	253	9,88	5,92	7,50	30,83	36,75	9,09
Ibicoara 6	236	6,80	4,24	4,24	21,2	48,30	15,25

Tabela 4. Coeficiente de correlação entre a CL_{50} e a frequência de variantes resistentes de *M. persicae*, caracterizados pela atividade total das esterases, em populações coletadas em campos de batata, nos estados do Paraná e Bahia, no período de 1994 a 1995. (Ver Tabela 3)

	Variantes					
	S	S/R1	R1	R1/R2	R2	R3
CL ₅₀	-0,65	-0,72	-0,50	0,072	0,74	0,17
Teste t	*	*	ns	ns	*	ns

ns - Não significativo

*Significativo a 5% de probabilidade

demonstrando que R2 tem maior influência na estimativa da CL_{50} das populações de *M. persicae*.

Os afídeos caracterizados como R1/R2, que podem ser R1 ou R2 ou intermediários entre essas formas, mostraram relação não significativa com a CL_{50} , provavelmente devido à presença das três formas caracterizadas nesta classificação.

O bioensaio de imersão foi capaz de discriminar com certa precisão, confirmada pelo teste colorimétrico, uma população com alta proporção de S e ausência de R2 e R3 (população Contenda 1) e uma população com alta proporção de R2 e R3 e ausência de S (população Ibicoara 6), conforme se observa na Tabela 1.

Devonshire & Needham (1975) não encontraram relação consistente entre a atividade total das esterases e os resultados do bioensaio com o inseticida demeton-S-metil, aplicado topicamente nos indivíduos de *M. persicae*. Segundo os autores, esse resultado negativo estaria ligado à insensibilidade da técnica do bioensaio utilizado para medir pequenas diferenças na suscetibilidade do afídeo e à heterogeneidade da população, na qual uma baixa proporção de indivíduos com um aumento da E4/FE4 não poderia ser revelada.

Com base nos resultados desta pesquisa conclui-se que há uma relação positiva entre a frequência de indivíduos resistentes R2 de *M. persicae* e a CL_{50} de populações de campo em plantas de batata, e que a relação é negativa para a forma suscetível do afídeo. A detecção das formas R2 tem grande importância na estimativa da CL_{50} da população de *M. persicae*, a qual deve ser visada no monitoramento da resistência da espécie.

Literatura Citada

- Devonshire, A.L. 1989.** Resistance of aphids to insecticides, p. 123-139. In A.K. Minks & Harrewijn (ed.), *Aphids, their biology, natural enemies and control*, volume C, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., 312p.
- Devonshire, A.L. & A.D. Rice. 1989.** Aphid bioassay techniques, p.119-128. In A.K. Minks & P. Harrewijn (eds.), *Aphids, their biology, natural enemies and control*, volume C. Amsterdam, Elsevier Publishers B. V., 312p.
- Devonshire, A.L. & G.D. Moores. 1982.** A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 235-246.
- Devonshire, A.L., G.J. Devine & G.D. Moores. 1992.** Comparison of microplate esterases assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 82: 459-463.
- Devonshire, A.L. & P.H. Needham. 1975.** Resistance to organophosphorus insecticides of peach-potato aphid (*Myzus persicae*) from sugar beet in 1975. *Proceedings 8th British Insecticide and Fungicide Conference* p.15-19.
- FAO. 1979.** Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Prot. Bull.* 18: 16-18.
- ffrench-Constant, R.H., R. Harrington & A.L. Devonshire. 1988.** Effect of repeated applications of insecticides to potatoes on numbers of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) and on frequencies of insecticide-resistant variants. *Crop Prot.* 7: 55-61.
- ffrench-Constant, R.H. & R.T. Roush. 1990.** Resistance detection and documentation: the relative roles of

- pesticidal and biochemical assays. In R. T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), *Pesticide resistance in arthropods*. New York and London, Chapman and Hall, 303p.
- Furiatti, R.S. & S.M.N. Lazzari. 2000a.** Determinação da concentração diagnóstica de pirimicarbe para a detecção de populações de *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae) com diferentes níveis de esterases. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 731-738.
- Furiatti, R.S. & S.M.N. Lazzari. 2000b.** Efeito da aplicação de pirimicarbe sobre populações de campo de *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae) com diferentes níveis de esterases. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 739-747.
- Georghiou, G. 1990.** Overview of insecticide resistance, p.18-41. In M.B. Green, H.M. LeBaron & W.K. Moberg (eds.), *Managing resistance to agrochemicals from fundamental research to practical strategies*. Washington, American Chemical Society, 483p.
- Graham, D.M., G.J. Devine & A.L. Devonshire. 1994.** Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotiniana*. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases p.413-418.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC: An user's guide to Probit Or Logit analysis. LeOra Software, Berkely, CA.
- Sawicki, R.M., A.L. Devonshire & A.D. Rice. 1977.** Detection of resistance to insecticides in *Myzus persicae* Sulz. *Med. Fac. Ladbouw. Rijksuniv. Gent*. 42: 1403-1409.
- Sawicki, R. M., A.L. Devonshire, A.D. Rice, G.D. Moores, S. M. Petzing & A. Cameron. 1978.** The detection and distribution of organophosphorus and carbamate insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulz.) in Britain in 1976. *Pestic. Sci.* 9: 189-201.

Received 15/07/03. Accepted 10/10/03.
