

CROP PROTECTION

Seleção na Evolução de Resistência a Organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

DANIEL B. FRAGOSO, RAUL N.C. GUEDES E JAMILE A. LADEIRA

Depto. Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

Neotropical Entomology 32(2):329-334 (2003)

Selection in the Evolution of Resistance to Organophosphates in *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

ABSTRACT - Pesticide resistance is an increasingly worldwide phenomenon and a serious agriculture concern. From these perspectives, understanding of pesticide resistance is necessary to devise resistance management strategies to slow its development. Insecticide use and migration of resistant individuals can influence resistance evolution. The selection and dispersion of insecticide resistance were studied on the ten populations of *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) collected from different coffee producing regions of the State of Minas Gerais that were grouped together. Based on canonical variate analysis, a similar resistance pattern was observed in the populations from the “Zona da Mata Mineira” region. The increase of the frequency of resistant individuals was correlated with a larger number of organophosphate applications and likely dispersion of resistant individuals. Considerations on pattern of the resistance in coffee leafminer and implications for management are discussed.

KEY WORDS: Coffee leafminer, insecticide, migration, resistance management

RESUMO - Resistência a pesticidas é um fenômeno crescente e dos mais sérios problemas enfrentado atualmente pela agricultura. Por isso, há necessidade de estudo das populações resistentes para que se possa adotar medidas de manejo que retardem a evolução da resistência. Vários fatores podem influenciar a evolução da resistência, entre estes o padrão de uso de inseticidas e a migração de indivíduos resistentes. A seleção e a dispersão de resistência em dez populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville), provenientes de diferentes regiões produtoras de café, em Minas Gerais, foram investigadas neste trabalho. Com base na análise de variáveis canônicas foi verificado um padrão de agrupamento semelhante em termos de espectro de resistência para populações da Zona da Mata Mineira. O aumento da frequência de indivíduos resistentes foi correlacionado com o maior número de aplicações de organofosforados e provável dispersão de indivíduos resistentes. Considerações sobre padrão de resistência em bicho-mineiro-do-cafeeiro e implicações com relação ao manejo são discutidas.

PALAVRAS-CHAVE: Bicho-mineiro-do-cafeeiro, inseticida, manejo de resistência

Resistência a pesticidas pode ser considerada hoje um dos mais sérios problemas enfrentados pela agricultura. O surgimento de populações de insetos-praga resistentes normalmente leva o agricultor a aumentar a dose, o número de aplicações e, eventualmente, a substituir o produto ineficaz por um novo produto (Georghiou 1983, Guedes & Oliveira 2002). Além disso, o custo de desenvolvimento de novos inseticidas é geralmente alto, requerendo uma demanda de tempo apreciável, desde a síntese da molécula, testes toxicológicos, ensaios de campos, até chegar ao registro (Knight & Norton 1989). Neste contexto, se faz necessário o emprego de medidas que visem retardar o desenvolvimento da resistência, prolongando o tempo de uso dos atuais

produtos existentes no mercado.

O bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville), é considerado praga-chave da cafeicultura na maioria das regiões produtoras em função dos sérios prejuízos econômicos que causa (Souza *et al.* 1998). Os danos causados por essa praga são devidos à formação de galerias no interior das folhas, decorrente da alimentação do tecido parenquimático pelas larvas, causando necrose e diminuição da área fotossintética, acarretada pela queda das folhas, e redução da produção de frutos.

O controle químico tem sido o principal método empregado pelos cafeicultores para o controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro (Souza *et al.* 1998, Fragoso *et al.* 2002).

A contínua utilização de inseticidas tem provocado a perda da eficiência destes mediante seleção de populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro resistentes a esses compostos (Bardner & Mcharo 1988, Alves *et al.* 1992, Guedes & Fragoso 1999, Fragoso *et al.* 2002).

Populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro resistentes aos organofosforados fenitrotiom, fentiom, diazinom e clorpirifós foram constatadas na Tanzânia (Bardner & Mcharo 1988). Posteriormente, foram detectadas no Brasil, populações de *L. coffeella* com frequência baixa a moderada de indivíduos resistentes a organofosforados em regiões produtoras de café em Minas Gerais (Alves *et al.* 1992).

Estudo a respeito da ocorrência, mecanismos bioquímicos e a associação da resistência com o uso de inseticidas em populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro, mostrou que a maioria das populações estudadas apresenta resistência aos inseticidas dissulfotom, etiom e paratiom-metilico (Fragoso *et al.* 2002). Já com relação aos mecanismos bioquímicos, resultados baseados em estudo com os sinergistas sugerem que o complexo detoxificador das monooxigenases dependentes do citocromo P450 seja o mecanismo principal de resistência a organofosforados em populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro de Minas Gerais (Fragoso *et al.* 2002).

Vários fatores são capazes de influenciar a evolução da resistência a inseticidas atuando diferencialmente sob os processos evolutivos (mutação, seleção, fluxo gênico e deriva genética) (Roush & Daly 1990, Mallet 1993, Hoy *et al.* 1998). Dentre esses a frequência de aplicações inseticidas e migração de populações resistentes parecem ser de importância primária para o bicho-mineiro-do-cafeeiro.

Apesar de a detecção da resistência e do estudo dos mecanismos bioquímicos terem sido o foco principal de estudo em populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro (Guedes & Fragoso 1999, Fragoso *et al.* 2002), nenhum trabalho foi feito em relação à dispersão da resistência entre populações da espécie, informação importante para o delineamento de programas de manejo de populações resistentes. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o espectro e o padrão da resistência em populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro, em Minas Gerais, visando determinar o padrão de seleção e dispersão desse fenômeno em *L. coffeella*.

Material e Métodos

As dez populações de *L. coffeella* investigadas com relação ao espectro da resistência, foram coletadas nas regiões produtoras de café do Triângulo Mineiro, Alto do Jequitinhonha, Oeste e Sul de Minas Gerais (Tabela 1, Fig. 1). As populações foram criadas em gaiolas, em casas-de-vegetação, alimentadas com mudas de café cv. Catuaí. Em cada local de coleta foi preenchido um questionário para obtenção de informações a respeito do uso de inseticidas (Tabela 2). Coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram determinadas via "Global Position Satellite" (GPS 12 XL, Garmin, Olathe, Kansas, EUA), assim como a distância geográfica entre cada ponto de coleta.

Os inseticidas fosforados clorpirifós (96%), dissulfotom (97,1%), etiom (97,8%) e paratiom-metilico (80,7%), em grau técnico, foram utilizados nos bioensaios. Os compostos foram

Tabela 1. Localidades de coleta das populações de *L. coffeella*.

Nº código	Município	Região
1	Araguari	Triângulo Mineiro
2	Patrocínio	Triângulo Mineiro
3	São Gotardo	Triângulo Mineiro
4	BambuÍ	Oeste de Minas
5	Capelinha	Alto do Jequitinhonha
6	Cambuquira	Sul de Minas
7	Simonésia	Zona da Mata
8	Caparaó	Zona da Mata
9	Guiricema	Zona da Mata
10	Ponte Nova	Zona da Mata
11	Viçosa ¹	Zona da Mata

¹Padrão de susceptibilidade

diluídos em acetona em grau analítico. Bioensaios de concentração-mortalidade foram feitos com larvas do 3^o instar, com tamanho padronizado de $0,29 \pm 0,09$ cm, usando-se placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) e papéis-filtro impregnado com os compostos, que foram veiculados em acetona (solvente). Após a evaporação do solvente, os papéis-filtro foram colocados nas placas de Petri, que em seguida receberam 20 larvas/placa, com três repetições para cada concentração. As placas de Petri foram mantidas a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. de $70 \pm 5\%$, até o momento da avaliação da mortalidade. A mortalidade foi avaliada após um período de seis horas de exposição, que foi previamente determinado de acordo com a sobrevivência das larvas expostas apenas ao resíduo do solvente. Os insetos foram reconhecidos como mortos se incapazes de locomoverem-se mediante toque com pincel de ponta fina. Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de próbite, segundo Finney (1971), utilizando-se o procedimento PROC PROBIT do SAS (SAS Institute, 1997). A população susceptível, procedente de Viçosa (MG), foi usada para estimar as concentrações com probabilidades de causar 99% de mortalidade dos indivíduos (CL_{99}) (Fragoso *et al.* 2002).

As concentrações diagnósticas (CL_{99}) foram usadas para estimar a frequência de indivíduos resistentes através da exposição de 100 indivíduos, por meio de cinco repetições de 20 larvas/placa. Os resultados de mortalidade de cada inseticida relatados por Fragoso *et al.* (2002), foram corrigidos pela mortalidade da testemunha, utilizando-se a fórmula de Abbott (1925), transformados em $\arcsen(x/100)$ e submetidos à análise de variáveis canônicas (CVA), utilizando-se o procedimento PROC CANDISC do SAS (SAS Institute 1997), para verificar possíveis associações lineares da resistência a organofosforados entre as regiões em estudo. Os dados sobre uso de inseticidas foram transformados em $\log(x+1)$ para atender o pressuposto de normalidade, e usados em análise de correlação canônica (parcial) com o objetivo de testar a relação entre o uso de organofosforados e a frequência de indivíduos resistentes através do procedimento PROC CANCORR (SAS Institute 1997). Para verificar a influência da migração na evolução da resistência a organofosforados nas populações de bicho-

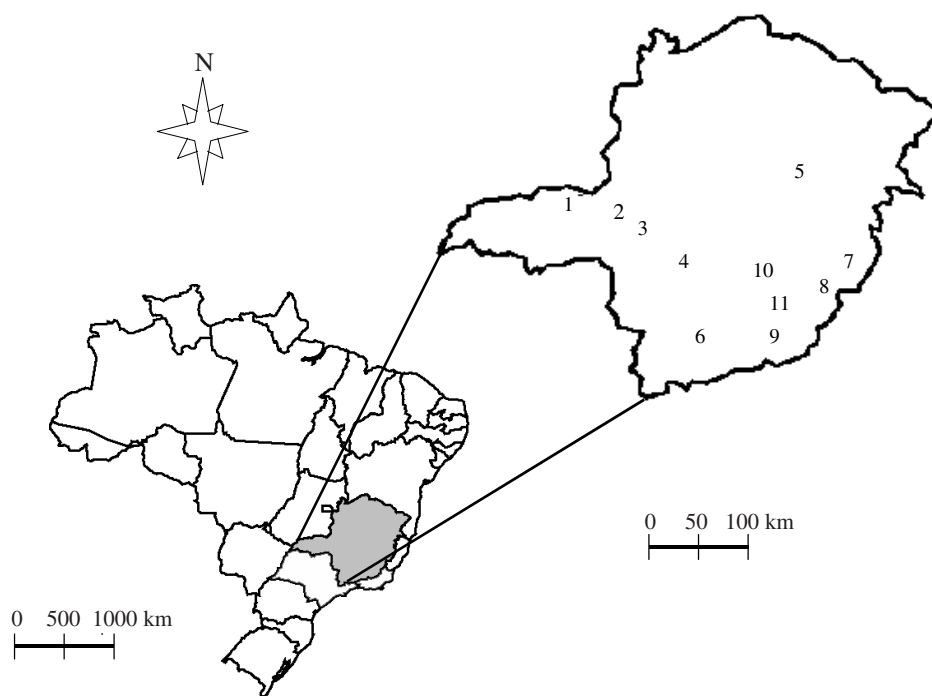


Figura 1. Locais de coleta de populações de *L. coffeella*. Os números correspondem aos municípios da Tabela 1.

Tabela 2. Levantamento de uso de inseticidas nas localidades de coletas das populações de campo nos anos agrícolas de 98 e 99.

Localidades	Número médio de aplicações de inseticidas/ano					Total de aplicações ²
	Clorpirifós	Dissulfotom	Etiom	Paratiom-metílico	Total de fosforados ¹	
1. Araguari	0	0	0	5	10	20
2. Bambuí	2	1	1	0	7	18
3. Cambuquira	0	1	0	0	1	1
4. Caparaó	0	0	0	0	0	0
5. Capelinha	1	1	0	0	2	2
6. Guiricema	0	0	1	3,5	4,5	4,5
7. Patrocínio	2	0	2,5	0	10	22
8. Ponte nova	0	0	0,5	0	0,5	0,5
9. São Gotardo	1	1	0	0	2	10
10. Simonésia	0	0	0	0	0	0

¹Corresponde ao número de aplicações dos inseticidas sob estudo mais o número de aplicações de outros fosforados.

²Corresponde ao número total de aplicações de fosforados mais o número de aplicações de outros inseticidas.

mineiro-do-cafeeiro, foi correlacionada a distância de Mahalanobis, estimada através da análise de variáveis canônicas entre o espectro de resistência a inseticidas de cada duas populações, com a respectiva distância geográfica entre as localidades de origem das populações, obtidas por GPS.

Resultados e Discussão

Existe correlação negativa e significativa entre mortalidade por clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico e o número de aplicações de inseticidas organofosforados ($r = -0,90$; $P = 0,022$). Tal resultado é proveniente da correlação canônica (parcial) entre o grupo de variáveis formado pela mortalidade causada por cada um

dos quatro inseticidas estudados (i.e., clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico) e uma variável única, o número de aplicações anuais de organofosforados (Tabela 3). A mortalidade causada por esses inseticidas diminuiu com maior número de aplicações de organofosforados, ou seja, aumentou a frequência de insetos resistentes a esses compostos. Isso foi particularmente verdadeiro para dissulfotom e etiom que são os principais constituintes do par canônico, baseado nos valores das correlações e coeficientes canônicos (Tabela 3). Análise complementar de redundância canônica indica ainda que o número de aplicações inseticidas prediz moderadamente a mortalidade causada por inseticidas, explicando 51% da variância nessa característica. A relação inversa é ainda mais consistente, explicando 83% da

Tabela 3. Correlação canônica (parcial) e par canônico entre mortalidade causada por diferentes inseticidas e número de aplicações anuais de inseticidas organofosforados (OF; média de 1998 e 1999).

Variáveis	Primeiro par canônico	
	Coefficiente	Correlação
Mortalidade por clorpirifós	0,0153	0,60
Mortalidade por dissulfotom	0,0171	0,90
Mortalidade por etiom	0,0155	0,87
Mortalidade por paratiom metílico	-0,0048	0,83
Número de aplicações anuais de OF	-2,4166	-1,00
r		- 0,90
F aproximado		6,77
Graus de liberdade (num.; den.)		4; 6

*Significativo a $P < 0,05$

variância. Estes resultados estão de acordo com os encontrados pela análise de trilha realizada por Fragoso *et al.* (2002).

A análise de variáveis canônicas (CVA), feita para verificar possíveis associações lineares da resistência a organofosforados entre as localidades, mostrou que os quatro eixos canônicos foram significativos, com os três primeiros eixos explicando 92,0% da variância total dos dados (Tabela 4). Os maiores valores absolutos dos coeficientes mostram quais foram os inseticidas que mais contribuíram para o padrão de divergência da resistência entre as diferentes localidades. Para o primeiro eixo canônico de maior peso na análise, os inseticidas etiom e paratiom-metílico apresentaram correlações positivas e maiores valores de coeficientes e, portanto, maior contribuição para as diferenças entre as populações resistentes (Tabela 4). Clorpirifós e dissulfotom, com relação oposta, contribuíram para o padrão de divergência do segundo eixo. A mesma forma de contribuição foi verificada com os inseticidas clorpirifós e etiom no terceiro eixo e etiom e paratiom-metílico no quarto eixo (Tabela 4).

Gráficos dessa análise foram feitos com os três primeiros eixos que explicaram 92% da variância total dos dados para mostrar o agrupamento entre as localidades (Tabela 4 e Fig. 2). Um padrão de agrupamento foi verificado para populações de Caparaó, Ponte Nova, Simonésia e Viçosa (Zona da Mata Mineira), não acontecendo o mesmo com as demais populações (Fig. 2). Este agrupamento para as localidades da Zona da Mata Mineira pode ser explicado pela baixa

utilização de inseticidas e a não constatação de problemas de resistência nas populações dessa região, exceção cabendo a Guiricema onde é mais freqüente o uso de inseticidas (Fragoso *et al.* 2002, Guedes & Oliveira 2002).

A seleção por aplicações contínuas de inseticidas organofosforados é importante na evolução da resistência a clorpirifós, etiom, dissulfotom e paratiom-metílico como discutido anteriormente. Entretanto, em complementação a essa informação, é importante saber se a migração de insetos resistentes de uma região para outra contribui também para evolução da resistência em populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro. Para testar essa hipótese, a distância de Mahalanobis (D^2) estimada entre o espectro de resistência a inseticidas de cada duas populações (Fig. 2) foi correlacionada com a respectiva distância geográfica entre as localidades obtidas por GPS. Os dados e a curva de regressão linear obtida são apresentados na Fig. 3. A regressão entre a distância de Mahalanobis e distância geográfica foi significativa ($P < 0,05$), mas a variância explicada pela relação é modesta ($R^2 = 0,10$). Por isso, pode ressaltar-se que a dispersão de insetos de uma localidade à outra é relevante na evolução de resistência a inseticidas, mas perde em importância para a intensidade de aplicações de inseticidas no local.

A seleção exercida por inseticidas e a capacidade de dispersão de uma espécie são informações importantes para a adoção de estratégias de manejo da resistência (Scott *et al.* 2000). Por exemplo, para *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), que tem apresentado resistência virtualmente a todos os inseticidas usados no seu controle, têm sido

Tabela 4. Eixos canônicos e coeficientes (agrupados na estrutura canônica) de mortalidades de *L. coffeella* causada por quatro inseticidas organofosforados.

Variáveis	Eixos canônicos			
	1	2	3	4
Mortalidade por clorpirifós	0,33	-0,68	-0,64	-0,03
Mortalidade por dissulfotom	0,45	0,70	-0,49	-0,21
Mortalidade por etiom	0,73	-0,28	0,56	-0,31
Mortalidade por paratiom metílico	0,66	0,00	0,00	0,74
F	26,20	17,46	16,40	16,65
Graus de liberdade (num.; den.)	40;157,32	27;123,30	16;86	7;44
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Correlação canonical ao quadrado	0,95	0,83	0,77	0,72

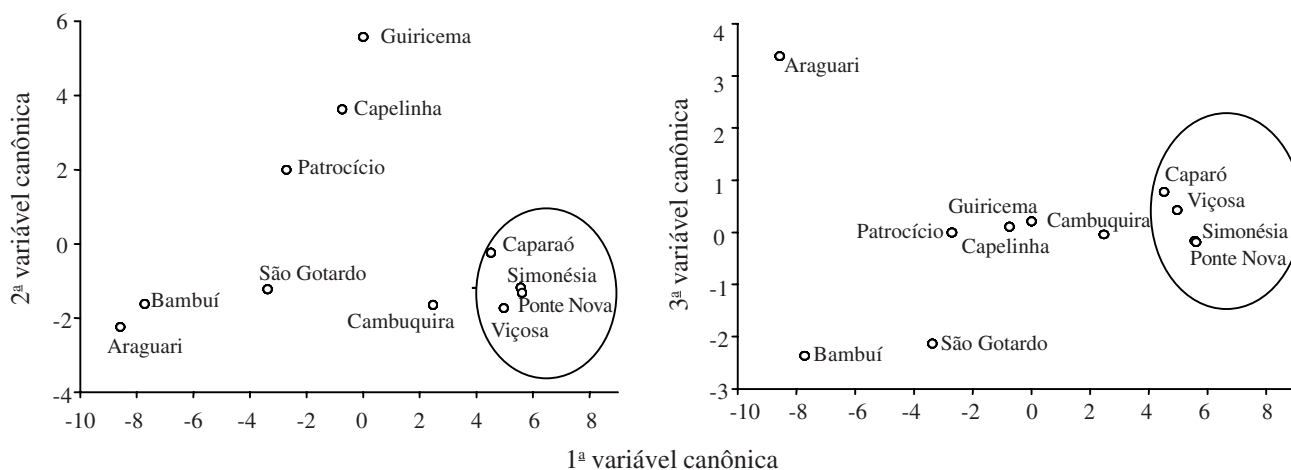


Figura 2. Diagrama de ordenação mostrando a discriminação entre populações de *L. coffeella* quanto à resistência a inseticidas. Os símbolos são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. Círculos largos indicam grupos de tratamentos sem diferença significativa entre eles (teste de F aproximado, $P < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre médias.

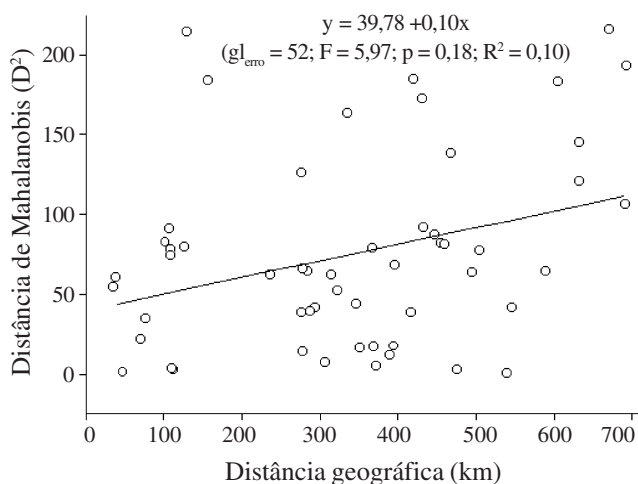


Figura 3. Relação entre distância geográfica entre localidades de coleta de populações de *L. coffeella* e a distância de Mahalanobis (D^2) estimada entre o espectro de resistência a inseticidas de cada duas populações (Fig. 1).

encontradas populações susceptíveis a poucos quilômetros de distância de localidades onde ocorrem populações com altos níveis de resistência, mostrando que a seleção exercida por inseticidas é o fator principal na evolução da resistência e que a capacidade de dispersão é tida como fator secundário. Essas informações têm tornado possível e facilitado o manejo nessa espécie (Tabashnik *et al.* 1987).

Regiões produtoras de café do Oeste de Minas e do Triângulo Mineiro apresentam sérios problemas com relação ao desenvolvimento de populações de bicho-mineiro-do-café resistente a organofosforados (Guedes & Fragoso 1999, Fragoso *et al.* 2002, Guedes & Oliveira 2002). O uso de inseticidas e a migração de indivíduos resistentes são fatores primariamente importantes no manejo da resistência a inseticidas nessas populações, pois a redução no ritmo de

uso, principalmente de inseticidas organofosforados, pode amenizar o problema. Contudo, tal medida só terá um maior sucesso se for conduzida em escala regional, pois em nível local a dispersão de populações, apesar de modesta, poderá comprometer o sucesso do manejo da resistência em populações de *L. coffeella*.

Agradecimentos

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café (CNP&D-Café). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) pelo suporte financeiro. À Bayer e Dow AgroSciences por terem fornecido os inseticidas em grau técnico utilizados nesse trabalho. Aos revisores pelo encorajamento e sugestões encaminhadas aos autores.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Alves, P.M.P., J.O.G. Lima & L.M. Oliveira. 1992.** Monitoramento da resistência do bicho-mineiro-do-café, *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetidae), a inseticidas, em Minas Gerais. *An. Soc. Entomol.* 21: 77-91.
- Bardner, R. & E.Y. Mcharo. 1988.** Confirmation of resistance of the coffee leafminer *Leucoptera meyricki* Ghesquière (Lepidoptera: Lyonetidae) to organophosphate insecticide sprays in Tanzania. *Trop. Pest Manag.* 34: 52-54.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge University, 333p.

- Fragoso, D.B. 2000.** Resistência e sinergismo a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* (Guèr-Ménev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Dissertação de mestrado, UFV, Viçosa, 35p.
- Fragoso, D.B., R.N.C. Guedes., M.C. Picanço & L. Zambolim. 2002.** Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). Bull. Entomol. Res. 92: 203-212.
- Georghiou, G.P. 1983.** Management of resistance in arthropods, p. 769-792. In G.P. Georghiou & T. Sato (eds.), Pest resistance to pesticides. New York, Plenum, .
- Guedes, R.N.C. & D.B. Fragoso. 1999.** Resistência a inseticidas: Bases gerais, situação e reflexões sobre o fenômeno em insetos-praga do cafeeiro, p. 99-120. In L. Zambolim (ed.), I Encontro sobre produção de café com qualidade. Viçosa, UFV, 259p.
- Guedes, R.N.C. & E.E. Oliveira. 2002.** Resistência a inseticidas-pragas do cafeeiro: Situação e perspectivas, p. 471-497. In L. Zambolim (ed.), O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, UFV, 568p.
- Hoy, C.W., G.P.Head & F.R. Hall. 1998.** Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. Annu. Rev. Entomol. 43: 571-594.
- Mallet, J. 1993.** The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? Trends Ecol. Evol. 4: 336-340.
- Roush, R.T. & J.C. Daly. 1990.** The role of population genetics in resistance research and management, p. 97-152. In R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. New York, Chapman & Hall, 303p.
- Scott, J.G., T.G. Alefantis, P.E. Kaufman & D.A. Rutz. 2000.** Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. Pest Manag. Sci. 56: 147-153.
- Souza, J.C., P.R. Reis & R.L.O. Rigitano. 1998.** Bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte, EPAMIG, 48p.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing & M.W. Johnson. 1987.** Diamondback moth (Lepidoptera: Plutelidae) resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance. J. Econ. Entomol. 80: 1091-1099.

Received 05/11/02. Accepted 05/05/03.