PROTEÇÃO DE PLANTAS

Detecção e Monitoramento da Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) ao Dicofol

CELSO OMOTO, EVERALDO B. ALVES E PAULO C. RIBEIRO

ESALQ/USP, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Caixa postal 09, 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: celomoto@carpa.ciagri.usp.br

An. Soc. Entomol. Brasil 29(4): 757-764 (2000)

Detection and Monitoring of Resistance in *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) to Dicofol

ABSTRACT - A residual bioassay technique was used to characterize the resistance of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to the acaricide dicofol. Different concentrations of dicofol were sprayed on citrus leaf disks with a Potter spray tower. After treatment, each leaf disk was placed on an agar-water solution at the concentration of 2.3% in a petri dish. Adult mites were transferred onto the arena and bioassay dishes were kept at 25±1°C, relative humidity of 70±10% and photoperiod of 14h. The mortality was assessed 24h after mite infestation. The estimated LC₅₀s for susceptible and dicofol-resistant strains were 7.44 μg of dicofol / ml of distilled water [ppm (A.I.)] (95% CI 6.74 - 8.23) and 422.45 ppm (A.I.) (95% CI 369.41 - 482.80), respectively. The resistance ratio derived from LC₅₀s was about 57-fold. Based on this difference, discriminating concentrations between 32 and 100 ppm (A.I.) were defined for monitoring dicofol-resistant B. phoenicis. A survey of different B. phoenicis populations collected from commercial citrus groves in the State of São Paulo showed significant differences between populations in relation to their responses to dicofol.

KEY WORDS: Citrus leprosis mite, *Citrus sinensis*, chemical control, resistance management.

RESUMO - Um método de bioensaio residual foi utilizado para caracterizar a resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) ao acaricida dicofol. Arenas confeccionadas com folhas de laranjeira foram pulverizadas com diferentes concentrações de dicofol com o auxílio da torre de Potter. Posteriormente, as arenas foram acondicionadas em placas de acrílico contendo uma solução a 2,3% de ágar-água. Após a transferência de ácaros adultos para a arena pulverizada, as placas foram mantidas a $25\pm1^{\circ}$ C, umidade relativa de $70\pm10\%$ e fotofase de 14h. A avaliação da mortalidade foi realizada 24h após a infestação dos ácaros. As CL_{50} s estimadas para as linhagens susceptível e resistente ao dicofol foram 7,44 µg de dicofol / mL de água destilada [ppm (I.A.)] (IC 95% 6,74 - 8,23) e 422,45 ppm (I.A.) (IC 95% 369,41 - 482,80), respectivamente; resultando numa razão de resistência de aproximadamente 57 vezes. Concentrações

discriminatórias entre 32 e 100 ppm (I.A.) foram definidas para um programa de monitoramento da resistência de *B. phoenicis* ao dicofol. Resultados de um levantamento da susceptibilidade de populações de *B. phoenicis* coletadas em diversos pomares comerciais de citros do estado de São Paulo evidenciaram uma grande variabilidade entre as populações com relação à resposta ao dicofol.

PALAVRAS-CHAVE: Ácaro da leprose, *Citrus sinensis*, controle químico, manejo da resistência.

O ácaro da leprose Brevipalpus phoenicis (Geijskes) é uma das principais pragas que

afetam a produção de laranja no Brasil. Esse ácaro é o transmissor da leprose, doença provocada por um rabdovírus de ação não sistêmica (Kitajima *et al.* 1972). Os sintomas da doença se manifestam em folhas, galhos e frutos, onde causa desde cloroses até a queda dos órgãos atacados, resultando em perdas tanto na quantidade como na qualidade dos frutos e até mesmo na morte da planta (Chagas & Rossetti 1980, Chiavegato & Salibe 1981, Chiavegato 1987).

O controle de B. phoenicis tem sido realizado principalmente através da aplicação de acaricidas para manter a densidade populacional desta praga abaixo do nível de dano econômico. Estima-se que mais de 100 milhões de dólares são gastos por ano com acaricidas em citros no Brasil. Esta grande quantidade de acaricidas se deve também à ocorrência do ácaro da falsa ferrugem, Phyllocoptruta oleivora (Ashmead), uma outra importante praga da cultura. Tanto B. phoenicis como P. oleivora ocorrem durante o ano todo, porém as maiores densidades populacionais são observadas durante o período seco para B. phoenicis e durante o período chuvoso para P. oleivora, resultando em uma média de duas a quatro aplicações anuais de acaricidas na cultura de citros (Oliveira 1986, Salvo Filho 1997).

Por mais de 25 anos o acaricida dicofol vem sendo utilizado para o controle de *B. phoenicis* e *P. oleivora*. Falhas no controle com este e outros acaricidas vêm sendo relatadas com freqüência por produtores e técnicos da área citrícola paulista. A alta

intensidade de uso destes acaricidas pode ser um dos fatores responsáveis pela ineficiência dos mesmos. Acredita-se que muitas destas falhas sejam devido à evolução da resistência de *B. phoenicis* aos acaricidas comumente utilizados; embora fatores como condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da praga, má regulagem dos equipamentos de pulverização e outros fatores operacionais também devam ser considerados para avaliar os fracassos no controle (Gravena 1994, Omoto 1995).

Devido às características do dicofol, como por exemplo a sua especificidade de ação e custo relativamente baixo, este acaricida tem sido um importante componente em programas de manejo integrado de pragas em diversas culturas, o que justifica os esforços para prolongar a sua vida útil (Dennehy & Granett 1984, Omoto et al. 1995). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o de detectar e caracterizar a resistência de B. phoenicis ao dicofol para a implementação de um programa de manejo da resistência. Inicialmente uma técnica de bioensaio para avaliar a susceptibilidade de populações de B. phoenicis ao dicofol foi desenvolvida. Posteriormente, foram realizados trabalhos de seleção de uma linhagem resistente de B. phoenicis ao dicofol para a caracterização da resistência e estimativa da sua intensidade. E por último, uma concentração discriminatória (i.e., uma concentração que discrimine indivíduos susceptíveis dos resistentes) foi definida para um programa de monitoramento da resistência de B. phoenicis ao dicofol.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Resistência de Artrópodos a Pesticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Criação de B. phoenicis. A criação de B. phoenicis foi realizada sobre frutos de laranja da variedade Pera Rio ou Valência coletados em pomares sem a aplicação de acaricidas. Os frutos coletados eram lavados com água e após a secagem, eram parafinados deixandose uma arena de aproximadamente 8 a 16 cm² circundada com cola adesiva (Tanglefoot®, Grand Rapids, MI, Estados Unidos) para confinar os ácaros. Em cada fruto foram transferidos de 40 a 50 ácaros adultos com auxílio de um pincel com apenas um pêlo e dois microscópios estereoscópicos. Os frutos infestados com os ácaros foram colocados em caixas plásticas (dimensões de 41 x 34 x 14 cm) contendo em seu fundo uma prancha de isopor com 12 orifícios onde os frutos eram acondicionados. A criação foi mantida em sala climatizada à temperatura de 25±2°C. umidade relativa ao redor de 70% e fotofase de 14 horas. Para a manutenção de cada população de B. phoenicis foram estabelecidos aproximadamente 72 frutos. Os frutos eram renovados a cada 30 ou 40 dias onde a arena do fruto novo era mantida em contato com a arena do fruto infestado com os ácaros até que grande parte dos ácaros transferissem para o fruto novo.

Procedimentos de Bioensaio. O método de bioensaio adotado foi o de contato residual. O acaricida utilizado foi o Kelthane® 480 CE (480 g de dicofol por litro de produto comercial, formulação concentrado emulsionável, Rohm and Haas Química Ltda.). As concentrações do produto escolhidas para os bioensaios foram preparadas através da diluição do produto comercial em água destilada. Os bioensaios

foram realizados em arenas de 2.6 cm de diâmetro confeccionadas com folhas de laranjeira da variedade Pera Rio coletadas em um pomar sem a aplicação de acaricidas. As arenas de folha foram mantidas sobre algodão embebido em água até a pulverização do produto. A aplicação foi feita sobre a superfície adaxial dos discos de folha através do uso da torre de pulverização de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido) calibrada à pressão de 10 psi (68,95 kPa). Foi utilizado um volume de 2 ml de solução em cada pulverização, obtendo-se uma deposição média de resíduo úmido de 1,56 mg/cm² sobre as arenas. Após a aplicação, as arenas foram retornadas sobre o algodão umedecido até a secagem do produto. Em seguida, as arenas foram acondicionadas individualmente em placas acrílicas de 3.5 cm de diâmetro (Falcon 1008. Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ. Estados Unidos) contendo 2 mL de uma mistura ainda não geleificada de ágar-água na concentração de 2,3%. Após a geleificação do substrato no fundo da placa, uma barreira para evitar a fuga dos ácaros foi construída ao redor dos discos de folha com a mesma mistura de ágar-água (adaptado de Vestergaard et al. 1995).

Foram transferidos 10 ácaros adultos por arena. Cada concentração foi repetida cinco a seis vezes ao longo do tempo e cada repetição foi constituída por aproximadamente 40 ácaros. Após a infestação dos ácaros nas arenas, as placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 25±1°C, umidade relativa de 70+10% e fotofase de 14 horas. A mortalidade foi avaliada 24 horas após a infestação com o auxílio de um pincel com um único pelo e microscópio estereoscópico. Os ácaros foram virados de costas e aqueles que retornaram à posição normal e andaram foram considerados vivos. As repetições que apresentaram uma mortalidade superior a 15% na testemunha foram descartadas, assim como aquelas cuja perda de ácaros no ágar ultrapassou 15%.

Caracterização da Resistência. Uma população de *B. phoenicis* da região de

Piracicaba foi coletada em um pomar de citros sem aplicação de acaricidas e mantida no laboratório na ausência de pressão seletiva com acaricidas desde 1995. Esta população foi tomada como a linhagem susceptível de referência (S). A linhagem resistente de B. phoenicis ao dicofol (R) foi obtida através da seleção de uma população de B. phoenicis oriunda de um pomar comercial de citros da região de Itápolis, SP em 1997. A intensidade de uso do dicofol neste pomar era bastante alta e falhas no controle de B. phoenicis com este acaricida tinham sido relatadas com frequência. Foram realizadas duas etapas de seleção utilizando-se a concentração de 320 mg de dicofol / ml de água destilada [ppm (I.A.)]. Esta concentração foi escolhida baseada em trabalhos preliminares que evidenciaram mortalidade de 100% da linhagem susceptível. Os ácaros sobreviventes da primeira etapa de seleção foram transferidos em frutos parafinados para a sua multiplicação por uma a duas gerações. Após a obtenção de número suficiente de descendentes dos ácaros selecionados na primeira etapa, a segunda etapa de seleção foi realizada. Pelo fato de o ácaro da leprose se reproduzir por partenogênese telítoca do tipo automítica, originando descendentes fêmeas geneticamente idênticas à geração maternal, apenas uma etapa de seleção seria o suficiente para eliminar todos os susceptíveis, porém na tentativa de diminuir qualquer falha no processo que ocasionasse a sobrevivência de ácaros susceptíveis, foram realizadas duas etapas de seleção. A população obtida após as duas etapas de seleção foi considerada resistente ao dicofol (R).

Para a obtenção da curva de concentraçãoresposta, cinco concentrações de dicofol espaçadas logaritmicamente foram testadas entre 1,8 a 18 μg de dicofol / ml de água destilada [ppm (I.A.)] para a linhagem S, e seis concentrações entre 100 e 1.800 ppm (I.A.) para a linhagem R. Os dados de mortalidade para as linhagens S e R foram submetidos à análise de Probit através do programa POLO-PC (LeOra Software 1987). Um teste de paralelismo das linhas de concentração-resposta para as duas linhagens foi conduzido para determinar se o coeficiente angular de cada linha era significativamente diferente. O nível de significância do teste foi de $\alpha = 0.05$. A razão de resistência foi obtida através da divisão da CL_{50} da linhagem R pela CL_{50} da linhagem S, e o seu intervalo de confiança (IC) a 95% foi estimado de acordo com os procedimentos descritos por Robertson & Preisler (1992).

Monitoramento da Resistência. Um levantamento da susceptibilidade de populações de B. phoenicis ao dicofol foi realizado em onze pomares comerciais de citros do Estado de São Paulo em comparação com a susceptibilidade da linhagem S. As populações foram coletadas nas cidades de Araraguara (população identificada como ARA2), Bebedouro (BEB3, BEB4, BEB5 e BEB6), Boa Esperança do Sul (BES1), Colômbia (COL1), Itápolis (ITA1 e ITA2), São José do Rio Preto (RPR1) e Tabapuã (TAB1). De cada pomar foram coletados aproximadamente 50 frutos infestados com B. phoenicis. Os ácaros foram multiplicados no laboratório por uma ou duas gerações. Posteriormente, foram realizados bioensaios de concentrações discriminatórias de 32 e 100 ppm (I.A.) para estimar a freqüência de ácaros resistentes em cada pomar. Cada concentração foi repetida pelo menos quatro vezes.

Os dados de porcentagem de mortalidade (X) para cada concentração e localidade foram corrigidos através da fórmula de Abbott (Abbott 1925), transformados para arc sen (RAIZ (X/100)) e submetidos à análise de variância de dois fatores (população e concentração). O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0.05$.

Resultados e Discussão

Caracterização da Resistência. As linhas de concentração-resposta das linhagens S e R de *B. phoenicis* ao acaricida dicofol estão representadas na Fig. 1. Foram testados 1.169 e 1.183 indivíduos para as linhagens S e R,

respectivamente. A CL $_{50}$ estimada através da análise de Probit para a linhagem S foi de 7,44 ppm (I.A.) de dicofol (IC 95% 6,74-8,23), coeficiente angular (± desvio padrão) de 3,85 (± 0,19) (χ^2 = 3,37; g.l.= 3; P>0,05). Para a linhagem R, a CL $_{50}$ foi de 422,45 ppm (I.A.) de dicofol (IC 95% 369,41-482,80), coeficiente angular (± desvio padrão) de 3,21 (± 0,15) (χ^2 = 7,56; g.l. = 4; P>0,05). A razão de resistência derivada da CL $_{50}$ das duas linhagens foi de 56,82 (IC 95% 53,54-60,29).

O coeficiente angular da linhagem R foi significativamente menor que o da linhagem

angular, maior a homogeneidade de uma população. A inclinação da reta pode também estar relacionada ao método de bioensaio (ffrench-Constant & Roush 1990). Como o método de bioensaio para a caracterização da linha de concentração-resposta das linhagens S e R foi o mesmo neste trabalho, os resultados indicam uma maior homogeneidade da linhagem S. Provavelmente este resultado se deve ao fato de esta linhagem estar em condições laboratoriais por período maior do que a linhagem R, aumentando assim as chances de seleção de indivíduos mais

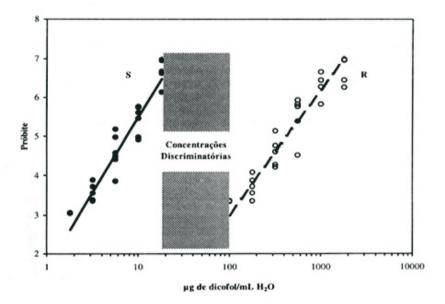


Figura 1. Curvas de concentração-resposta das linhagens de *B. phoenicis* susceptível (S) e resistente (R) ao acaricida dicofol. A área hachureada representa o intervalo de concentrações discriminatórias de dicofol para um programa de monitoramento da resistência de *B. phoenicis* ao dicofol.

S (χ²=7,44; g.l.=1; P<0,05). Segundo Hoskins & Gordon (1956), uma interpretação biológica do coeficiente angular está relacionado à homogeneidade de uma determinada população; isto é, quanto maior o coeficiente

adaptados no laboratório. Uma outra explicação poderia estar ligada à possibilidade de um estrangulamento da variabilidade genética durante o processo de colonização desta linhagem no laboratório (Bartlett 1984).

Qualquer alteração na composição genética de populações de *B. phoenicis* poderia ser mantida devido ao seu modo de reprodução, predominantemente por partenogênese telítoca, e à ausência de migração em condições laboratoriais. Por outro lado, a linhagem R foi obtida através de uma população proveniente do campo e submetida a apenas duas pressões de seleção com o acaricida dicofol em condições laboratoriais; sendo assim, a preservação da variabilidade genética original do campo seria maior nesta linhagem.

Como a sobreposição das linhas de concentração-resposta das populações S e R ao dicofol não foi observada (Fig. 1), concentrações entre 32 e 100 ppm de dicofol poderiam ser utilizadas como discriminatórias para a estimativa da freqüência de resistência de *B. phoenicis* ao dicofol em um determinado pomar. Vantagens da utilização de concentrações discriminatórias em relação à comparação da CL₅₀ em um programa de monitoramento da resistência foram

discutidas por Roush & Miller (1986). O nível de ação preconizado para *B. phoenicis* em citros é baixo (ao redor de 10% de frutos infestados), e sendo assim a quantidade de ácaros que poderia ser amostrada para os bioensaios para estimar a freqüência de resistência a um determinado acaricida também seria limitada. Nestas condições, se todos os ácaros amostrados fossem submetidos a uma única concentração discriminatória, ao invés de se estimar a CL₅₀, a precisão na detecção da resistência seria maior.

Monitoramento da Resistência. Resultados do levantamento da susceptibilidade de *B. phoenicis* ao dicofol revelaram diferenças significativas entre populações provenientes de diferentes pomares comerciais (F = 15,8; g.l.= 11, 76; P<0,05) (Fig. 2). Apesar do dicofol ser um acaricida utilizado há longa data, ainda existem pomares onde a freqüência de ácaros resistentes a este acaricida é baixa. Por outro lado, verifica-se que em alguns

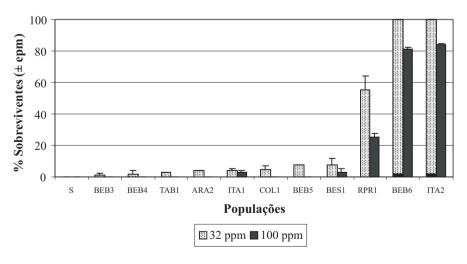


Figura 2. Porcentagens de ácaros sobreviventes (± erro padrão da média) observadas no levantamento da susceptibilidade de populações de *B. phoenicis* ao dicofol em diferentes pomares de citros do Estado de São Paulo, obtidas através de um bioensaio de concentrações discriminatórias de 32 e 100 ppm de dicofol.

pomares a freqüência de resistência é bastante alta. As estimativas da freqüência de resistência com as concentrações discriminatórias de 32 e 100 ppm (I.A.) foram distintas (F = 8,2; g.l.= 1, 76; P<0,05), ou seja, uma menor sobrevivência de ácaros foi observada na concentração de 100 ppm. Sendo assim, conclui-se que a concentração de 32 ppm seria a ideal para o monitoramento da resistência de *B. phoenicis* ao dicofol para que o problema não seja subestimado com a utilização da concentração de 100 ppm.

Os resultados obtidos na presente pesquisa confirmaram a presença de B. phoenicis resistente ao dicofol em alguns pomares de citros. Com o isolamento e caracterização da resistência de B. phoenicis ao dicofol, outros estudos poderão ser realizados para a implementação de um programa de manejo da resistência; como por exemplo os estudos da dinâmica da resistência para verificar se existe custo adaptativo dos indivíduos resistentes na ausência da pressão seletiva e de relações de resistência cruzada entre o dicofol e outros acaricidas recomendados para o controle de B. phoenicis. Se a resistência de B. phoenicis ao dicofol for instável, a instabilidade da resistência poderá ser explorada em um programa de manejo da resistência através da rotação de acaricidas (Georghiou 1972; Dennehy et al. 1988). Os estudos de resistência cruzada possibilitarão identificar os produtos que poderiam ser utilizados em rotação ou em mistura com o dicofol. Uma vez implementada uma estratégia de manejo da resistência de B. phoenicis ao dicofol, esta poderá ser avaliada facilmente através da estimativa da frequência de resistência utilizando-se de bioensaios de concentrações discriminatórias definidas no presente trabalho.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na execução da presente pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo e de produtividade em pesquisa, respectivamente.

Literatura Citada

- **Abbott, W.S. 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Bartlett, A.C. 1984. Genetic changes during insect domestication, p.2-8. In E.G. King & N.C. Leppla (eds.), Advances and challenges in insect rearing, Washington, USDA, ARS, 306p.
- Chagas, C.M. & V. Rossetti. 1980. Transmissão experimental de leprose dos citros por meio de implantação de tecido foliar no caule. Fitopat. Bras. 5: 211-214.
- Chiavegato, L.G. & A.A. Salibe. 1981.
 Prejuízos provocados pelo ácaro
 Brevipalpus phoenicis (Geijskes, 1939)
 (Acari: Tenuipalpidae) em algumas
 variedades cítricas. Congr. Bras. Frut.,
 6, Recife, p.709-718.
- Chiavegato, L.G. 1987. A leprose dos citros no Estado de São Paulo. Laranja 8: 7-18.
- Dennehy, T.J. & J. Granett. 1984. Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: inter- and intraspecific variability in susceptibility of three species of *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 77: 1381-1385.
- Dennehy, T.J., J.P. Nyrop, W.H. Reissig & R.W. Weires. 1988. Characterization of resistance to dicofol in spider mites (Acari: Tetranychidae) from New York apple orchards. J. Econ. Entomol. 81: 1551-1561.

ffrench-Constant, R.H. & R.T. Roush.

- **1990.** Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, p.4-38. In: R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. New York, Chapman and Hall, 303 p.
- **Georghiou, G.P. 1972.** The evolution of resistance to pesticides. Ann. Rev. Ecol. Syst. 3: 133-168.
- **Gravena, S. 1994.** Rotação de acaricidas no MIP-Citros: menos desequilíbrio e resistência. Laranja 15: 375-395.
- Hoskins, W.M. & H.T. Gordon. 1956. Arthropod resistance to chemicals. Ann. Rev. Entomol. 1: 89-122.
- **Kitajima, E.W., G.W. Müller, A.S. Costa & W. Yuki. 1972.** Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. Virology 50: 254-258.
- **LeOra Software. 1987.** POLO-PC: a user's guide to Probit Or LOgit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Oliveira, C.A.L. de. 1986. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. Laranja 7: 1-31.
- Omoto, C. 1995. Resistência de *Brevipalpus* phoenicis (Acari: Tenuipalpidae) aos produtos químicos na citricultura, p. 179-188. In C.A.L. de Oliveira & L.C.

- Donadio, (eds.) Leprose dos citros. Jaboticabal, FUNEP, 219p.
- Omoto, C., T.J. Dennehy, C.W. McCoy, S.E. Crane & J.W. Long. 1995.

 Management of citrus rust mite (Acari: Eriophyidae) resistance to dicofol in Florida citrus. J. Econ. Entomol. 88: 1120-1128.
- **Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, CRC Press, 127p.
- Roush, R.T. & G.L. Miller. 1986.
 Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Salvo Filho, A. de. 1997. Notas sobre o tratamento fitossanitário em citros. Laranja 18: 155-163.
- Vestergaard, S., A.T. Gillespie, T.M. Butt, G. Schreiter & J. Eilenberg. 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. Biocont. Sci. and Tech. 5: 185-192.

Aceito em 21/09/2000.