


Conteúdo adaptado com base nos dados disponibilizados pelo IRAC Internacional (www.irac-online.org) - junho/2020

## Detalhes:

Metodologia:	022	
Situação:	Aprovado	
Espécie:	<i>Tuta absoluta</i>	
Estágio de desenvolvimento:	Larval L2 (tamanho: 4-5 mm)	
Grupos químicos indicados:	Oxadiazina (IRAC MoA 22) Diamidas antranílicas (IRAC MoA 28) Espinosinas (IRAC MoA 5)	

Larva de *Tuta absoluta*  
Fotografia cortesia da  
DuPont Crop Protection

## Comentários:

Para obter larvas homogêneas de *Tuta absoluta* (mesma idade, estado nutricional e de saúde geral), é altamente recomendável que os insetos coletados em campo (geração F0) sejam levados a um laboratório e criados até a próxima geração para avaliação da suscetibilidade a inseticidas na geração F1.

## Objetivos:

Linha de base de suscetibilidade:

Monitoramento de Resistência:

## Descrição:

### Materiais:

Recipientes arejados para coleta dos insetos (gaiolas, vasilhas plásticas contendo furos possibilitando a passagem do ar), tesouras para coleta de folhas, pinças ou pincel fino para manuseio dos insetos, balança analítica para pesagem dos ingredientes ativos sólidos, micropipeta para dosagem dos ingredientes ativos líquidos, béqueres para o preparo das soluções de teste, microscópio binocular ou lente manual, rede de arame ou toalhas de papel, placas de células de 10 a 15 cm<sup>2</sup> com tampa, papéis de filtro, luvas de proteção, termômetro máximo / mínimo, folhas de tomate jovens e não tratadas.

Opcional: uma caixa de luz (mesa de superfície de vidro com uma fonte de luz fluorescente embaixo).

### Metodologia:

Este método é um bioensaio de imersão em folha a ser realizado preferencialmente com larvas de segundo instar (L2 - tamanho de 4-5 mm).

- a) Coletar várias amostras de insetos na mesma área de maneira aleatorizada para se obter uma boa representatividade do campo. Podem ser coletados larvas, pupas ou ovos, evitando colocá-los em condições de altas temperaturas, umidade ou estresse de fome após a coleta. Para obter uma amostra representativa de insetos de campo, o ideal é coletar pelo menos 1000 larvas e/ou pupas de cada área a ser testada, a fim de estabelecer uma colônia de pelo menos 500 adultos. Recomenda-se a coleta de larvas em estágio avançado (por exemplo, 4º instar), pois exigirão menos material vegetal para desenvolver e terão menor tempo de criação no laboratório, e o surgimento de mariposa será síncrono.
- b) Coletar folhas de tomate não infestadas e não tratadas. Embora o teste seja realizado com folhas únicas, é preferível coletar folhas inteiras de tamanho uniforme. Folhas jovens e tenras são preferidas. Não permita que as folhas murchem, mantendo-as em um ambiente úmido (saco plástico selado) ou papel úmido em cima das folhas.
- c) Prepare diluições precisas da substância de teste a partir do produto comercial identificado. Para estudos iniciais, seis concentrações espaçadas são recomendadas. O uso de um adjuvante não iônico é altamente recomendado para obter uma cobertura foliar ideal. A solução adjuvante deve ser usada para a solução de controle "não tratada" no lugar de água sozinha. Como a adição de um agente umectante pode afetar significativamente o desempenho de um produto inseticida em um bioensaio, é essencial que os detalhes do agente umectante e da concentração utilizados sejam registrados com quaisquer dados resumidos e que apenas dados gerados com o mesmo tipo de agente umectante e concentração são comparadas para medições de suscetibilidade.
- d) Mergulhe as folhas individualmente na solução com inseticida de teste por 3 segundos com agitação suave, garantindo que toda a superfície seja emergida igualmente. Em seguida, seque as folhas tratadas em uma rede de arame com a superfície superior da folha (superfície abaxial) voltada para cima ou em toalhas de papel (menos preferível). Não deixe as folhas murcarem. Mergulhe o mesmo número de folhas por tratamento (dose) e trate a área foliar. Execute o mesmo procedimento para todas as doses, começando com o controle "testemunha não tratada", seguido pela ordem da dose mais diluída e avançando progressivamente para concentrações mais altas.
- e) Antes de colocar as folhas nas células do bioensaio, coloque um papel de filtro levemente umedecido cobrindo o fundo de cada célula. Cerca de 0,2 mL de água destilada deve ser suficiente para umedecer o papel de filtro e manter o material da folha turvo durante todo o período do bioensaio. O excesso de água ou gotas de água precisa ser removido.
- f) Quando a superfície das folhas estiver completamente seca, coloque-as nos recipientes rotulados (uma folha por unidade celular), que deve ser adequado para reter o material da folha suficiente em boas condições por 3 dias.  
**Nota:** As folhas de tomate são bastante frágeis e sensíveis. Manter as folhas de tomate intactas - evitando cortá-los em pedaços medidos - ajuda a manter as folhas em boas condições durante o período do bioensaio.

- g) Comece a transferência das larvas L2 para as unidades celulares do bioensaio, usando um pincel macio e fino e tomando extremo cuidado para não danificar as larvas muito frágeis. O método a seguir é recomendado para minimizar a mortalidade das larvas devido ao manuseio: coloque as folhas infestadas com larvas L2 em uma caixa de luz (mesa de superfície de vidro com uma fonte de luz fluorescente por baixo), para que as larvas possam ser vistas claramente através da epiderme foliar. As larvas podem ser facilmente localizadas forçando-as a se moverem tocando suavemente a superfície da folha usando um pincel fino. Uma vez que uma larva L2 é detectada, um pequeno quadrado de folha é cortado ao redor com um bisturi afiado. O quadrado da folha (com a larva) é levantado com um pincel ou pinça fina e é colocado na folha de tomate na bandeja de bioensaio. Em alguns minutos, a larva começará a procurar comida na folha de tomate fresca fornecida na bandeja de bioensaio. Inicie o processo de infestação com as unidades celulares de controle não tratadas (1 larva por célula) e continue por ordem crescente de concentração de inseticida. Evite contaminações cruzadas, por ex. pincel tocando folhas tratadas (caso isso aconteça, lave imediatamente o pincel bem, antes de continuar a infestação). Cada dose deve ter pelo menos 32 larvas.

**Nota:** Como o tempo de desenvolvimento pode variar entre populações e pequenas diferenças nas condições de criação e/ou ambiente, podemos considerar larvas de L2 quando as mesmas atingirem 4-5 mm de comprimento.

- h) Quando a infestação terminar, feche as bandejas cuidadosamente, selando as células com tampas.
- i) Armazene as bandejas de bioensaio em uma área em que não sejam expostas à luz solar direta ou a temperaturas extremas. Registre as temperaturas máxima e mínima. Se possível, mantenha uma temperatura de  $25 \pm 2$  ° C, 60-70% de umidade relativa e regime de fotoperíodo 12: 12 claro: escuro.
- j) Realize avaliações 72 horas após colocar as larvas nas bandejas:  
Avaliação dos efeitos sobre as larvas: As larvas que são incapazes de fazer movimentos coordenados a partir de estímulos suaves com um alfinete ou pinça de ponta fina para o segmento posterior do corpo devem ser consideradas mortas (combinação de mortos e moribundos).  
Efeitos anti-alimentação (porcentagem de danos ao crescimento das folhas ou larvas) também podem ser registrados para obter informações adicionais.  
Avaliação do dano foliar: Como as folhas uniformes foram escolhidas no início do ensaio, o registro do dano foliar como% da área foliar total extraída é o método preferido.

A mortalidade dos tratamentos devem ser corrigidas pela mortalidade do controle não tratado usando a fórmula de Abbott. Recomenda-se que os dados de mortalidade sejam utilizados para realizar uma análise de dose-resposta probit ou logit para fornecer estimativas de LC50 e LC90 para cada inseticida e população de insetos testados. Se a porcentagem de lagartas mortas (mortas + moribundos) no controle não tratado for superior a 20%, o bioensaio é considerado de qualidade inferior e deve ser repetido. Idealmente, a mortalidade de controle não deve exceder 10-15%.

## **Precauções & Notas:**

1. É preferível equipamento plástico descartável, desde que não seja afetado pelos constituintes da formulação, equipamentos de vidro podem ser usado, mas devem ser adequadamente limpos com um solvente orgânico apropriado antes da reutilização.

2. Os produtos inseticidas contêm concentrações variadas de ingrediente (s) ativo (s). Certifique-se de que as diluições de inseticida sejam baseadas no conteúdo de ingrediente ativo (g i.a.). Alguns inseticidas são vendidos como misturas com outros inseticidas, esses produtos não devem ser usados para determinar a suscetibilidade das populações de insetos ao inseticida único, pois o parceiro da mistura pode ter um impacto significativo nos dados de mortalidade gerados.

### **Referências & Agradecimentos:**

Esse método IRAC é baseado em um método desenvolvido pela DuPont Crop Protection no Brasil. O método foi validado por vários pesquisadores na Europa: Dr. T. Cabello (Universidade de Almeria, Espanha), Dr. P. Bielza (Universidade de Cartagena, Espanha), Dr. E. Roditakis (NAGREF, Grécia) e Pr. C. Rapisarda (Universidade de Catania, Itália).