

# POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ALTERNATIVAS PARA MONITORAMENTO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A PESTICIDAS EM ARTRÓPODES-PRAGA DE CITROS

BERGHEM MORAIS RIBEIRO<sup>1</sup>, MARCOS ANTÔNIO MACHADO<sup>1</sup>,  
VALDENICE MOREIRA NOVELLI<sup>1</sup>, MÁRIO EIDI SATO<sup>2</sup> e JULIANA FREITAS-ASTÚA<sup>1</sup>

## RESUMO

A resistência de artrópodes-praga a pesticidas é um grande problema da agricultura mundial, responsável por enormes prejuízos para várias culturas agrícolas. A citricultura nacional sofre com o ataque de inúmeras pragas e, anualmente são gastos aproximadamente 100 milhões de dólares no controle químico de suas pragas, e casos de resistência a pesticidas em artrópodes-praga poderiam aumentar o custo para o combate de tais organismos. O método mais usado para detecção e monitoramento da resistência é o bioensaio: baseia-se em testes de dose-mortalidade, geralmente demorado e bastante laborioso. Existem alternativas para diagnose e monitoramento da resistência. Métodos bioquímicos e moleculares são mais ágeis e consistentes para esse fim. Técnicas como PCR, RT-PCR, RAPD, AFLP, microssatélites, determinação da atividade enzimática dos grupos de enzimas destoxicadoras, além de outras, são usadas em estudos de resistência a pesticidas. Neste artigo, apresentam-se várias técnicas bioquímicas, moleculares e biometria, e o potencial de sua aplicação para a diagnose e monitoramento da resistência a pesticidas em artrópodes-praga da cultura de citros.

**Termos de indexação:** Controle químico, RT-PCR, RAPD, atividade enzimática, proteção de plantas.

---

<sup>1</sup> Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP).  
E-mail: berghem@centrodecitricultura.br

<sup>2</sup> Instituto Biológico, SAA, Centro Experimental Central, Caixa Postal 70, 13001-970 Campinas (SP).

## SUMMARY

### POTENTIAL OF APPLICATION OF ALTERNATIVE TECHNIQUES FOR MONITORING AND DETECTION OF PESTICIDE RESISTANCE IN CITRUS PEST-ARTHROPODS

Pesticide resistance in arthropod pests is a serious problem for the agriculture worldwide. It is responsible for high damages to several crops. The Brazilian citriculture is attacked by many pests and approximately US\$ 100.000.000 are spent annually to control insects and mites in this crop; moreover, pesticide resistance in arthropod pests can increase the costs of control. The most commonly used method for detection and monitoring pesticide resistance is the bioassay, which is based on concentration-mortality test, however is generally laborious and time-consuming. There are alternatives for the diagnosis and monitoring of resistance, such as biochemical and molecular methods, which are the most agile and consistent strategies for this purpose. The techniques of PCR, RT-PCR, RAPD, AFLP, microsatellites, determination of enzymatic activity of the detoxification enzyme groups, and others, are used in studies of pesticide resistance. In this article, biochemical and molecular techniques, biometry and the potential of application for the diagnosis and monitoring of pesticide resistance in citrus arthropod pests are discussed.

**Index terms:** Chemical control, RT-PCR, RAPD, enzymatic activity, plants protection.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de pesticidas é o método mais aplicado no combate a artrópodes considerados pragas agrícolas. Existem, porém, inúmeros casos de falhas de controle devido ao desenvolvimento do fenômeno da resistência a inseticidas e acaricidas, considerado um dos maiores entraves no controle de centenas de espécies de ácaros e insetos-praga (TABASHNIK, 1990).

A resistência é a capacidade de uma população sobrepujar o efeito de doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie (SUBRAMANYAM & HAGS-

TRUM et al., 1996). Essa característica é derivada de modificações genéticas que propiciam ao indivíduo maior capacidade adaptativa, em condições desfavoráveis (LIU & YUE 2000) e, segundo BILLS et al. (2004), já são contabilizadas mais de 540 espécies de insetos e ácaros resistentes a algum tipo de pesticida.

O tema resistência a pesticidas é bastante interessante, pois possibilita a investigação de aspectos de interesse científico, como biologia evolutiva, ecologia, fisiologia etc. Mas, também exige uma investigação direta e aplicada a problemas da sociedade, como as pragas agrícolas e urbanas. Existem vários exemplos de trabalhos científicos que geraram informações importantes para a elaboração de táticas de controle de populações resistentes de artrópodes-praga em várias culturas agrícolas. A seguir, alguns exemplos de estudos científicos sobre o fenômeno da resistência: trabalhos de SIQUEIRA et al. (2000), determinando a existência de populações da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) resistentes a inseticidas no Estado de Minas Gerais; FRAGOSO et al. (2002), observando a resistência em populações mineiras do bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) a inseticidas do grupo dos organofosforados utilizados para seu controle. Populações do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) de várias regiões do Brasil também foram classificadas como resistentes a inseticidas piretróides (GUEDES et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003). Do mesmo modo, também foram descritos casos de resistência em várias espécies de ácaros, como o ácaro da leprose (*Brevipalpus phoenicis*) (OMOTO et al., 1998; ALVES et al., 2005; CAMPOS & OMOTO, 2006), e o ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (OMOTO et al., 1995). Também detectou-se resistência em ácaros da família Tetranychidae em populações de *Tetranychus urticae* coletadas de culturas de morango, as quais apresentaram resistência a abamectina e resistência cruzada a milbemectin (SATO et al., 2005).

O estabelecimento e a evolução da resistência podem levar à adoção de práticas inadequadas no combate às pragas, como, por exemplo, o aumento da dose prescrita de pesticidas, aumento no número de aplicações e emprego de misturas de pesticidas fora das recomendações. A consequência dessas práticas é o maior impacto dos pesticidas no ambiente que se reflete no aumento da mortalidade da entomofauna associada, onde estão incluídos

os inimigos naturais das pragas, e também no aumento do custo do controle da praga alvo como consequência do maior volume de pesticida aplicado (GEORGHIOU & TAYLOR, 1986).

A citricultura nacional sofre o ataque de inúmeras pragas, como o bicho-furão (*Gymnandrosoma auratianum*), o minador-dos-citros (*Phyllocnistis citrella*), a mosca-das-frutas, e vetores de doenças como as cigarrinhas (transmite a bactéria *Xylella fastidiosa* que causa a CVC), o psilídio (*Diaphorina citri*) que transmite *Candidatus liberibacter* spp.; a bactéria que causa o HLB, e os pulgões dos citros que transmitem o vírus da tristeza dos citros (CTV). Além desses, tem-se os ácaros da ferrugem e da leprose dos citros (GRAVENA, 2005). Entre essas, uma das mais importantes é o ácaro *B. phoenicis*, vetor do vírus CiLV, causador da leprose dos citros. Segundo RODRIGUES & MACHADO (2000), o gasto com controle de ácaros por meio de acaricidas na cultura de citros no Brasil é da ordem de 90 milhões de dólares; desses, cerca de 70 milhões de dólares são gastos somente para o controle do *B. phoenicis*. Todas as pragas dos citros têm um risco potencial de apresentar o fenômeno da resistência a inseticidas e acaricidas. Nessa perspectiva, o desenvolvimento de métodos mais precisos e ágeis de detecção, monitoramento e estudo da resistência é fundamental para a racionalização dos gastos com o controle químico.

FFRENCH-CONSTANT & ROUSH (1990) discutiram a necessidade do avanço em novas técnicas, para detectar a resistência entre as diferentes espécies de pragas.

As limitações dos métodos convencionais de detecção e o monitoramento da resistência têm estimulado a utilização de técnicas alternativas, como as moleculares e/ou bioquímicas (SHAH et al., 2002). As técnicas disponíveis para monitorar a resistência de insetos aos produtos químicos geralmente caem em duas categorias: testes *in vivo*, utilizando indivíduos intactos, que são expostos aos produtos, e testes *in vitro*, em que se empregam técnicas bioquímicas que determinam a atividade enzimática ou a natureza ou quantidade de DNA que codifica genes específicos de resistência, usando preparações de insetos (CRUZ, 2002). A detecção e a estimativa desse fenômeno e de seus padrões genéticos, bem como o desenvolvimento de técnicas rápidas, simples e confiáveis, são essenciais para desenvolver um programa bem-sucedido de manejo da resistência (CERUTI & LÁZZARI, 2003).

Dessa forma, este artigo tem como objetivo mostrar exemplos de aplicação de diagnósticos moleculares e bioquímicos já utilizados para a detecção e o monitoramento da resistência a pesticidas em várias espécies de artrópodes-praga e a possibilidade de seu uso em artrópodes-praga dos citros.

## **2. TÉCNICAS APLICADAS PARA A DETECÇÃO E O MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA**

### **2.1. Bioensaios**

A detecção e o monitoramento de resistência a pesticidas, na maioria dos casos, são feitos por meio de bioensaios: consiste em avaliar a mortalidade de uma amostra de determinada população a ser testada com a aplicação de um gradiente de concentrações ou doses de determinado pesticida, a fim de estabelecer uma comparação com a população-padrão para suscetibilidade. Testes com sinergistas (substâncias que inibem determinado tipo de mecanismo enzimático de resistência) também são feitos com essa técnica. Nesse caso, o sinergista pode gerar evidências sobre o tipo de mecanismo de resistência que está presente naquela população. Como forma de avaliação da magnitude da resistência, o bioensaio também é uma técnica bastante útil.

O tempo entre a realização do bioensaio e a determinação e identificação da resistência é uma das grandes desvantagens da técnica, mas não deixa de ser uma ferramenta importante para o monitoramento de resistência de populações desses artrópodes (GEORGE et al., 2004), e, na maioria das vezes, é a única técnica utilizada. Casos como o do ácaro da leprose são um exemplo dessa situação. Atualmente, só esse método está bem estabelecido e disponível para o monitoramento da resistência de populações desse ácaro a acaricidas, em talhões de citros, no País e no mundo. No entanto, além de laboriosa e relativamente imprecisa, a técnica requer um tempo mínimo de 48 horas para a detecção da resistência em adultos e de sete dias para a detecção da resistência em ovos (FUNDECITRUS, 2006). No caso da detecção da resistência em carapatos, o processo pode levar até 35 dias (GEORGE et al., 2004).

## 2.2. Métodos bioquímicos

Para determinação de resistência a pesticidas, podem-se utilizar métodos bioquímicos que têm como objetivo determinar a atividade de enzimas destoxicadoras de pesticidas presentes em indivíduos das populações testadas. Dessa forma, o método bioquímico é utilizado na identificação de um tipo de mecanismo de resistência chamado enzimático, onde existem três grupos principais de enzimas destoxicadoras atuando no organismo: as monoxigenases dependentes do citocromo P450, as esterases e as glutathione-S-transferases. Nos testes bioquímicos, procura-se determinar maior atividade de determinado grupo de enzimas destoxicadoras em populações resistentes quando comparada com a atividade enzimática de uma população suscetível. GUERRERO et al. (2002) fizeram a diagnose de resistência de populações mexicanas do carrapato *Boophilus microplus* pela expressão e atividade de uma enzima da família das esterases que têm a capacidade de hidrolisar vários compostos tóxicos. A atividade da enzima Czes9 mostrou-se maior quando comparada à atividade da mesma enzima extraída de uma população suscetível.

Um novo método de extração de acetilcolinesterase, por sonicação, a partir de cérebro do carrapato *B. microplus*, possibilita um diagnóstico mais eficiente e rápido para detectar resistência a pesticidas em populações dessa espécie. Por meio da determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase, podem-se discriminar indivíduos resistentes, particularmente ao grupo dos organofosforados. Tal método está sendo usado pelo USDA para monitoramento e detecção de possíveis populações resistentes na fronteira entre os EUA e o México (PRUETT & POUND, 2006).

Em populações resistentes do bicho-mineiro-do-cafeeiro *L. coffeella*, constatou-se uma atividade maior das enzimas do grupo das glutathione-S-transferase em relação às populações suscetíveis (FRAGOSO et al., 2002). Outros exemplos mostram populações com elevados níveis de atividade das monoxigenases dependentes do citocromo P450.

Outro exemplo da aplicação de métodos bioquímicos para detecção de resistência em populações de *T. urticae* é o trabalho de STUMPF & NAUEN (2002), que determinaram maior atividade das enzimas glutathione-S-transferase

se e do complexo monoxigenases dependentes do citocromo P450 em populações resistentes à abamectina em comparação com populações suscetíveis ao pesticida.

Estes são exemplos de como os métodos bioquímicos podem ser aplicados efetivamente nas ações fitossanitárias e quarentenárias de forma ágil e eficiente.

Os métodos bioquímicos normalmente requerem um número menor de insetos que os bioensaios, o que proporciona maior facilidade e agilidade ao ensaio e, em muitos casos, pode ser utilizado qualquer estágio de desenvolvimento da praga.

### **2.3. Métodos moleculares**

Diagnósticos moleculares de resistência a pesticidas, em populações de artrópodes, são considerados mais precisos e diminuem a variabilidade associada com bioensaios, levando em consideração aspectos intrínsecos (estrutura genética) e extrínsecos (condições laboratoriais, tamanho da amostra etc.) (SHAH et al., 2002).

Com o estabelecimento da técnica conhecida como PCR (Polymerase Chain Reaction), houve grande avanço no entendimento da resistência em nível molecular. A técnica consiste em uma amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA a partir de pequenas quantidades dessa molécula, utilizando enzimas polimerases e pequenas seqüências iniciadoras (primers) que se ligam a regiões complementares do DNA e servem como molde inicial para a amplificação de determinada região dessa molécula de DNA. Um exemplo de sua utilização para diagnose é a utilização de primers específicos para detecção de regiões do vírus da leprose dos citros (CiLV), o que permite determinar sua presença tanto em amostras de seus hospedeiros quanto em populações do ácaro vetor *B. phoenicis* (LOCALI et al., 2003). Tal técnica poderia ser muito bem utilizada para a detecção de uma região específica de populações de pragas resistentes aos pesticidas com o emprego de marcadores moleculares para essa característica.

### 2.3.1. RAPD

Uma das técnicas derivadas da PCR, bastante utilizada nos estudos de resistência a pesticidas, é a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Grande parte dos trabalhos que buscam encontrar marcadores moleculares ligados às mais diversas características, como resistência aos pesticidas, utilizam técnicas menos robustas, porém, mais fáceis e simples de serem implementadas, como o RAPD: ele permite a amplificação de fragmentos de DNA delimitados por primers com seqüências arbitrárias que hibridizam em seqüências complementares distribuídas ao acaso no DNA. Podem-se citar vários exemplos da sua aplicação, como nos estudos desenvolvidos por LIMA et al. (2002), que detectaram diversidade em populações brasileiras de *Bemisia tabaci*. ALVES et al. (2005) determinaram a variabilidade genética entre populações do ácaro da leprose de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. RODRIGUES et al. (2004), utilizando marcadores RAPD e DNA mitocondrial, estudaram a variabilidade genética entre populações do mesmo ácaro oriundas do Brasil e dos Estados Unidos da América.

Existem vários estudos sobre os efeitos da estrutura das populações no desenvolvimento da resistência a pesticidas (OSAKABE et al., 2000), e muitos exemplos sobre a aplicação de marcadores RAPD em investigações relacionadas ao fenômeno da resistência. A grande maioria destes trabalhos focaliza o estudo da resistência de insetos a diferentes inseticidas e, em menor número, a resistência de ácaros a acaricidas. Têm-se, como exemplo, trabalhos que detectaram populações resistentes, utilizando marcadores RAPD, das espécies *Aedes aegypti* e *Tribolium castaneum*, alguns coleópteros de produtos armazenados, afídeos e gafanhotos (BLACK et al., 1992; CHAPCO et al., 1992; ANDREEV et al., 1994; FFRENCH-CONSTANT et al., 1994 & CERUTI & LÁZZARI, 2003). Dos trabalhos feitos com marcadores RAPD para o estudo de suscetibilidade e resistência a pesticidas em ácaros, cita-se SHAH et al. (2002) com populações de *T. urticae*. No entanto, de maneira geral, essa técnica resulta em informações limitadas por não fornecer dados sobre a seqüência genômica. Essa limitação pode ser superada com a conversão destes marcadores aleatórios por marcadores SCAR específicos mediante clonagem, seqüenciamento dos marcadores RAPD e posterior consulta das seqüências por homologia às presentes no GenBank.



### 2.3.2. Determinação de pontos de mutação

A determinação de pontos de mutação que conferem resistência a pesticidas é feita por RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) onde o RNA é usado como molde para síntese de DNA. Os fragmentos obtidos da população suscetível e da, possivelmente, resistente são seqüenciados e, posteriormente, comparados entre si. Dessa forma, pode-se verificar se existe mutação em regiões específicas do gene e que confere resistência a pesticidas. Sítios de ação de inseticidas e acaricidas, como canal de sódio, receptores gaba e acetilcolinesterase, são exemplos de locais onde ocorre mutação pontual, o que acarreta o não-acoplamento da molécula pesticida no sítio de ação (CRUZ, 2002; RIBEIRO et al., 2003). Dessa forma, não há o efeito esperado do pesticida. Esse é um mecanismo de resistência conhecido como insensibilidade do sítio de ação.

### 2.3.3. Determinação de microssatélites

A comparação e a determinação de diferenças entre seqüências genômicas conhecidas de uma população resistente e outra suscetível geram resultados mais consistentes. Marcadores moleculares fundados em seqüências conhecidas, com destaque para marcadores microssatélites, têm sido desenvolvidos para plantas e, em menor escala, para artrópodes, e produzem grande quantidade de informação como as relacionadas com a biologia e a evolução da espécie, além de ampliar a possibilidade de se encontrarem marcadores ligados à resistência a pesticidas (ADAMS et al., 1992; FLEISCHMANN et al., 1995).

Entende-se por microssatélite regiões repetitivas em seqüência no genoma de um organismo. Adotam-se tais seqüências para detectar polimorfismos e servir como parâmetro de diferenciação intra-específica ou interespecífica. OSAKABE et al. (2000) descobriram um microssatélite localizado em um marcador RAPD mostrando polimorfismo em populações do ácaro *Panonychus citri*. Pode-se também, por meio dessas informações, desenhar novas moléculas a serem utilizadas no controle ou na interferência da habilidade desses organismos em transmitir patógenos. Tendo em vista as vantagens de tais técnicas, estão em andamento projetos de seqüenciamento do

genoma de várias espécies, como, por exemplo, *Aedes aegypti*, transmissora do vírus da dengue, e *Anopheles gambiae*, transmissora de *Plasmodium* sp., causador da malária (GOLD-GENOMES ONLINE DATABASE, 2005) e também do carrapato *B. microplus* (GUERRERO et al., 2006).

De acordo com DIAS NETO et al. (2000), a identificação de seqüências expressas ESTs (seqüências obtidas a partir de RNA mensageiro correspondentes a possíveis genes expressos em uma célula ou tecido) complementa as informações do genoma, estabelecendo ligação com o genoma funcional (ADAMS et al., 1992; 1995). Além disso, ESTs são consideradas como uma ferramenta poderosa na identificação de polimorfismos genéticos (BUETOW et al., 1999) e determinação da expressão gênica diferencial (HUANG et al., 1999). Por meio de ESTs, é possível comparar expressão gênica entre diferentes variedades ou populações de um organismo, ou entre a mesma variedade ou população submetida a diferentes condições (NEWMAN et al., 1994). Este tipo de seqüenciamento tem sido bastante utilizado por ser mais econômico que o seqüenciamento completo do genoma e por trazer informação sobre funcionalidade dos genes, por meio de sua expressão diferencial em variadas condições preestabelecidas (HILL & GUTIERREZ, 2000; ASTÚA-MONGE et al., 2002a, b; BIOR et al., 2002).

Outra técnica adotada é o seqüenciamento de fragmentos obtidos por quebra randômica (shotgun) do genoma. FIEHN et al. (2001) discutem que, apesar da importância e grande utilização de ESTs, essa técnica possui limitações, especialmente quando usada em grande escala. Tais limitações ocorrem principalmente devido ao fato de a maioria dos genes de qualquer organismo não estar representada nas bibliotecas e a falta de informação adicional sobre estrutura genômica, como elementos regulatórios envolvidos no controle de expressão gênica.

Portanto, seria interessante obter o seqüenciamento de organismos eucarióticos a partir de bibliotecas de ESTs e shotgun a fim de se conseguirem as informações relevantes e, até certo ponto, complementares, que cada técnica proporciona, e a partir dessas informações gerarem métodos de diagnose molecular.

## 2.4. Indicadores biométricos

A alteração na simetria bilateral de um organismo pode ser consequência do custo adaptativo relacionado à manutenção da característica resistência a pesticidas (MCKENZIE & CLARKE, 1988; MCKENZIE & OFARRELL, 1993; RIBEIRO et al., 2007). Comparação de medidas de estruturas, como, por exemplo, comprimento da tibia esquerda em relação à tibia direita, em insetos, pode servir de parâmetro para a análise da resistência. Pode-se citar o estudo com populações da mosca *Lucilia cuprina* resistentes a inseticidas, que apresentaram menor simetria bilateral quando comparadas a populações suscetíveis (MCKENZIE & CLARKE, 1988; MCKENZIE & OFARRELL, 1993). Não só o monitoramento como também o estudo da evolução da resistência podem ser investigados por meio da análise do grau de variação da simetria bilateral. O estudo comparativo entre populações do gorgulho do milho *S. zeamais*, resistentes e suscetíveis a pesticidas (RIBEIRO et al, 2007), mostra evidências do processo evolutivo da resistência. Existem poucos trabalhos científicos que exploram essa possibilidade de biomonitoramento em artrópodes, mas os resultados obtidos nesses estudos mostram uma perspectiva promissora para a aplicação desse método para monitoramento da resistência.

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos convencionais de monitoramento e detecção de resistência de artrópodes-praga a pesticidas ainda são indispensáveis, visto que a utilização de técnicas bioquímicas e moleculares são pouco usadas e difundidas entre os produtores.

A adoção de técnicas bioquímicas e moleculares para a determinação da existência de indivíduos resistentes, em populações de artrópodes-praga, abre uma perspectiva de maior agilidade no diagnóstico e também na tomada de decisão de controle da praga, propiciando, assim, melhor aplicação do recurso destinado à fitossanidade (CRUZ, 2002). Particularmente, a citricultura nacional gasta por ano cerca de 100 milhões com controle fitossanitário e, dessa forma, qualquer método que venha a diminuir esse

custo deve ser aplicado. Neste sentido, são bastante desejáveis a geração e a utilização de ferramentas bioquímicas e de biologia molecular que possam contribuir para alcançar este objetivo e promover o manejo fitossanitário adequado da cultura de citros.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D.; DUBNICK, M.; KERLAVAGE, A.R.; MORENO, R.; KELLEY, J. M.; UTTERBACK, T. R.; NAGLE, J. W.; FIELDS, C. & VENTER, J. C. Sequence identification of 2,375 human brain genes. **Nature**, v.355, p.632–634, 1992.
- ADAMS, M. D.; KERLAVAGE, A. R.; FLEISCHMANN, R. D.; FULDNER, R. A.; BULT, C. J.; LEE, N. H.; KIRKNESS, E. F.; WEINSTOCK, K. G.; GOCAYNE, J. D. & WHITE, O. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, v.77, p.173-174. 1995.
- ALVES, E. B.; CASARIN, N. F. B. & OMOTO, C. Dispersal mechanisms of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari:Tenuipalpidae) in citrus grove. **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.89-96, 2005.
- ANDREEV, D.; ROCHELEAU, T.; PHILLIPS, T.W.; BEEMAN, R.W. & FRENCH-CONSTANT, R.H. A PCR diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Pesticide Science**, v.41, p.345-349, 1994.
- ASTÚA-MONGE, G.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; AMARAL, A. M. do & MACHADO, M. A. Identification and characterization of resistance gene analogs expressed in citrus plants under different growth conditions. **Fitopatologia Brasileira**, v.27S, p.577. 2002a.
- ASTÚA-MONGE, G.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; PRADA, F. S. & MACHADO, M. A. Functional characterization of differentially expressed genes from sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa* using EST. **Fitopatologia Brasileira**, v.27S, p.757, 2002b.
- BILLS, P.S.; MOTA-SANCHEZ, D. & WHAALON, M. **The database of arthropods resistant to pesticides**. Michigan State University, 2004. Disponível em: <<http://www.cips.msu.edu/resistance/rmdb>>. Acesso em fevereiro de 2007.
- BIOR, A. D.; ESSENBERG, R. C. & SAUER, J. R. Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 645-655. 2002.

- BLACK, W. C.; DUETEAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NECHOLS, J. R., & PETTORINI, J. M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, v.82, p.151-159, 1992.
- BUETOW, K. H.; EDMONSON, M. N. & CASSIDY, A. B. Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data. **Nature Genetic**, v.21, p.323-325, 1999.
- CAMPOS, F. J. & OMOTO, C. Stability to *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) in citrus groves. **Neotropical Entomology**, v.35, n.6, p.840-848, 2006.
- CERUTI, F. C. & LÁZZARI, S. M. N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, n.3, p.447-453, 2003.
- CHAPCO, W. N. W. A.; MARTEL, R. K. B. & ANTONISHYN, N. A feasibility study of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. **Genome**, v.35, p.569-574, 1992.
- CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith) / Ivan Cruz. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 15p, 2002. (**Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 21**).
- DIAS NETO, E.; CORREA, R. G., VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M. R. S.; NAGAI, M. A.; DA SILVA, JR., W.; ZAGO, M. A.; BORDIN, S.; COSTA, F. F.; GOLDMAN, G. H.; CARVALHO, A. F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G. S.; SIMPSON, D. H.; BRUNSTEIN, A.; OLIVEIRA, P. S. L. DE.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C. V.; O'HARE, M. J.; SOARES, F.; BRENTANI, R.R.; REIS, L. F. L.; SOUZA, S. J. DE & SIMPSON, A. J. G. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proceedings National Academy of Sciences**, v.97, p.3491-3496, 2000.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H & ROUSH, RT. 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, Chapman and Hall, p.4-38, 303 p., 1990.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; STEICHEN, J. C. & BRUN, L. O. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.84, p.11-16, 1994.
- FIEHN, O.; KLOSKA, S. & ALTMANN, T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. **Current Opinion Biotechnology**, v.12, p.82-86. 2001.

- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DAOUGHERTY, B. A & MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v.269, p.496-512, 1995.
- FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C. & ZAMBOLIN, L. Insecticide use and organophosphate resistance in coffee leaf-miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.92, p.203–212, 2002.
- FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Leprose dos citros**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. 2006. Acesso em 10 jan. 2007.
- GEORGE, J. E.; POUND, J. M. & DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v.129 S, p.353-366, 2004.
- GEORGHIOU, G. P. & TAYLOR, C. E. Factors influencing the evolution of resistance. In: **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**, p.157-169. National Academy Press, Washington, DC, 1986.
- GOLD GENOMES ONLINE DATABASE. <<http://www.genomesonline.org>> 2005. Acesso em 24/3/2007.
- GRAVENA, S. **Manual prático de manejo ecológico de pragas dos citros**. Jaboticabal, S. Gravena, 2005. 372p.
- GUEDES, R. N. C.; LIMA, J. O. G.; SANTOS, J. P. & CRUZ, C. D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.145–150, 1995.
- GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H. & LI, A, Y. Molecular and biochemical diagnosis of esterase-mediated pyrethroid resistance in a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.28. n.1, p.257-264, 2002.
- GUERREIRO, F.D.; NENE, V.M.; GEORGE, J.E.; BARKER, S.C. & WILLADSEN, P. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. **Journal of Medical Entomology** 43(1):9-16, 2006.
- HILL, C. A. & GUTIERREZ, J. A. Analysis of the expressed genome of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) using an expressed sequence tag approach. **Microbial & Comparative Genomics**, v.5, p.89-101, 2000.
- HUANG, G.M.; NG, W.; FARKAS, J.; HE, L.; LIANG, H.A.; GORDON, D.; YU, J. & HOOD, L. Prostate cancer expression profiling by cDNA sequencing analysis. **Genomics**, v.59, p.178-186, 1999.

- LIMA, L.H.C.; MORETZOHN, CAMPOS, L.; MORETZSONHN, M. C.; NÁVIA, D. & OLIVEIRA, M.R.V. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations in Brazil revealed by RAPD markers. **Genetic and Molecular Biology**, v.25, n.2, p.217-223, 2002.
- LIU, N. & YUE, X. Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). **Journal Economic Entomology**, v.93, p.1269-1275, 2000.
- LOCALI, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E. W. & MACHADO, M. A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis a major treat to the citrus production in Americas. **Plant Disease**, v.87, p.1317-1321, 2003.
- MCKENZIE J. A. & CLARKE G.M. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Genetica**, v.120, p.213-220, 1988.
- MCKENZIE J.A. & OFARRELL K. Modification of developmental instability and fitness: malathion-resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Genetica**, v.89, p.67-76, 1993.
- NEWMAN, T.; BRUIJN, F.J. de; GREEN, P.; KEEGSTRA, K.; KENDE, H.; MCINTOSH, L.; OHLROGGE, J.; RAIKHEL, N.; SOMERVILLE, S. & THOMASHOW, M. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones. **Plant Physiology**, v.106, p.1241-1255, 1994.
- OMOTO, C. Acaricide resistance management of leprosis mite (*Brevipalpus phoenicis*) in Brazilian citrus. **Pesticide Science**, v.53, p.189-198, 1998.
- OMOTO, C.; DENNEHY, T. J.; MCCOY, C. W.; CRANE, S. E. & LONG, J. W. Management of Citrus Rust Mite (Acari, Eriophyidae) resistance to dicofol in Florida citrus. **Journal Economic Entomology**, v.88, n.5, p.1120-1128, 1995.
- OSAKABE, M. H.; HINOMOTO, N.; TODA, S.; KOMAZAKI, S. & GOKA, K. Molecular cloning and characterization of a microsatellite locus found in a RAPD marker of a spider mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.385-395, 2000.
- PRUETT, J. H. & POUND, J. M. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3-4, p.355-363, 2006.
- RIBEIRO, B.; GUEDES, R. N. C.; CORRÊA, A. S. & SANTOS, C. T. Fluctuating asymmetry in insecticide-resistant and susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.53, p.77-83, 2007.

- RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. & SANTOS, J. P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.21-31, 2003.
- RODRIGUES J. C. V.; GALLO-MEAGHER M.; OCHOA, R.; CHILDERS, C. C. & ADAMS, B. J. Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.34, p.275-290, 2004.
- RODRIGUES, J. C. V. & MACHADO, M. A. Virus-*Brevipalpus*-plant relationships of the citrus leprosis pathosystems. International Society of Citriculture, Orlando, **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.1, p.768-770, 2000.
- SATO, M. E.; SILVA, M. Z.; RAGA, A. & SOUZA, F. M. F. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. **Neotropical Entomology**, v.34, n.6, p.991-998, 2005.
- SHAH, R.; ARMSTRONG, K.; WORNER, S. P. & CHAPMAN, R. B. Investigation of a PCR-based methods for insecticide resistance monitoring. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.5, n.10, p.1070-1073, 2002.
- SIQUEIRA, H. A.; GUEDES, R. N. C. & PICANÇO, M. C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agriculture Forest Entomology**, v.2, p.147-153, 2000.
- STUMPF, N. & NAUEN, R. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72, p.111-121, 2002.
- SUBRAMANYAM B. & HAGSTRUM, D. W. Resistance measurement and management. p.331-397. In: B. Subramanyam & D. W. Hagstrum (Eds.). **Integrated management of insects in stored products**. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1996.
- TABASHNIK, B. E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. In: **Pesticide Resistance in Arthropods**. In: R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Eds.). p.153-182, New York: Chapman & Hall, 1990.