

**BERGHEM MORAIS RIBEIRO**

**Custo adaptativo e assimetria flutuante associados à resistência a inseticidas  
em populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005**

**BERGHEM MORAIS RIBEIRO**

**Custo adaptativo e assimetria flutuante associados à resistência a inseticidas em populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

---

Profa. Tânia Maria F. Salomão

---

Profa. Mara Garcia Tavares

---

Prof. José Eduardo Serrão

---

Prof. Edilberto Pozo Velázquez.

---

Prof. Raul Narciso C. Guedes  
(Orientador)

*Aos meus sobrinhos*

*Aos meus irmãos Bergmann e Bergson*

*Ao meu filhote João*

*A minha esposa Raquel*

*e especialmente a minha mãe Maria Morais Ribeiro*

## **Agradecimentos**

Aos colegas do curso de Entomologia.

Aos companheiros de laboratório: Alberto, pela grande ajuda nos experimentos, Léo, Rúbia, Sérgio e Eugênio pela convivência fraterna.

Aos amigos Eugênio, João, Alfredo e César Badji, pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos muitos momentos de alegria.

Ao professor Raul pela orientação, amizade, compreensão e pelo apoio irrestrito durante o curso.

À minha querida esposa, por ser infinitamente paciente, compreensiva e, acima de tudo, companheira em todos os momentos.

Ao meu irmão Bergmann pelo exemplo de vida, pela ajuda e orientação.

À minha mãe, por ter sempre me incentivado e por não ter medido esforços para proporcionar o melhor para minha vida.

## Conteúdo

	Página
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Introdução geral.....	1
Referências.....	3
Capítulo 1: Custo e redução da resistência à inseticidas no caruncho-do-milho <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae).....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	11
Resultados.....	13
Discussão.....	20
Referência.....	24

Capítulo 2 Assimetria flutuante em populações resistentes e susceptível de <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae) a Inseticidas.....	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	37
Discussão.....	48
Referência.....	50
Conclusão geral.....	54

## Resumo

RIBEIRO, Berghem Morais, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.  
**Custo adaptativo e assimetria flutuante associados à resistência a inseticidas em populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Orientador: Bergman Morais Ribeiro. Conselheiros: Maria Goreti Almeida de Oliveira e Marcos Rogério Totola.

Diferenças na taxa respiratória e morfologia do corpo gorduroso foram investigadas em populações resistentes e susceptível de *Sitophilus zeamais*. Os resultados do estudo de citomorfologia do corpo gorduroso e taxa respiratória mostraram que existe relação entre produção de CO<sub>2</sub>, área de trofócitos e massa corporal, independente do sexo e população. Também existe relação entre a citomorfologia do corpo gorduroso e resistência a inseticidas através de incremento no acúmulo de reservas disponíveis para a resistência a inseticidas. A capacidade de acúmulo de reservas energéticas e mobilização destas, possivelmente compensam o custo de energia associado à resistência a inseticidas na população resistente de Jacarezinho, já que esta não apresenta custo fisiológico associado à resistência. O mesmo não acontece com a população resistente de Juíz de Fora. O segundo estudo desta tese objetivou determinar a existência de assimetria flutuante (AF) nas populações de *Sitophilus zeamais*, e a relação entre AF e resistência a inseticidas e suas conseqüências potenciais. Os resultados mostram que as populações resistentes a inseticidas possuem valores menores de AF com relação à população susceptível. A população resistente de Jacarezinho apresentou o menor valor de AF. Esta população parece apresentar maior capacidade adaptativa por não apresentar custo fisiológico associado à resistência. Os resultados também mostram que fêmeas das populações de Sete Lagoas e Jacarezinho parecem usar AF como parâmetro para seleção sexual. Por fim, a pressão de seleção exercida pela aplicação de inseticidas possivelmente promoveu na população de Jacarezinho a fixação de genes modificadores de performance adaptativa, revertendo a desvantagem adaptativa.

## Abstract

RIBEIRO, Berghem Morais, D.S., Universidade Federal de Viçosa, february, 2005.

**Adaptative cost and fluctuating asymmetry associate of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Adviser: Bergman Morais Ribeiro. Committee members: Maria Goreti Almeida de Oliveira e Marcos Rogério Totola.

Differences in respiration rate and fat body morphology were investigated in insecticide susceptible and resistant populations of *Sitophilus zeamais*. The results of fat body citomorphology and respiration rate showed that there is a relationship between CO<sub>2</sub> production, area of trophocytes and body mass, regardless of sex and population. There is also a relationship between fat body citomorphology and insecticide resistance through the accumulation of energy reserves for insecticide resistance. The ability to store and mobilize energy reserves probably compensates the energy cost associated with the insecticide resistance of the Jacarezinho population, which did not show physiological cost associated with the resistance. This does not take place for the population from Juiz de Fora. The second study of the present thesis aimed to determine the fluctuating asymmetry (FA) in the populations of *Sitophilus zeamais*, and the relationship between FA and insecticide resistance with its likely consequences. The results showed that the insecticide resistant populations have lower levels of FA compared with the susceptible population. The resistant population from Jacarezinho showed the lowest FA values. This population seems better adapted for not showing physiological costs associated with insecticide resistance. The results also showed that females from Sete Lagoas and Jacarezinho may use FA as a parameter for sexual selection. It seems that the selection pressure imposed upon the insects from Jacarezinho by the intense insecticide application for a long period of time probably favored the fixation of fitness modifier genes in this population mitigating the adaptative advantage usually associated with insecticide resistance.

## Introdução geral

A resistência a inseticidas é um grande problema no controle de artrópodes considerados pragas agrícolas e vetores de doenças (Tabashnik, 1990). Esse fenômeno é derivado de modificações genéticas que propiciam maior capacidade adaptativa em condições desfavoráveis (Liu *et al.*, 2000).

A resistência a inseticidas em pragas de produtos armazenados é um caso particular de resistência pois, além dos prejuízos diretos associados a esta, ainda pode ser disseminada pelo comércio de produtos infestados por indivíduos resistentes (Champ & Dyte, 1976; Guedes, 1991; Subramanyam & Hagstrum, 1996). O combate a pragas de grãos armazenados é feito principalmente por inseticidas e o uso intenso desses compostos levou ao aparecimento de diversos casos de resistência (Guedes, 1991).

A seleção para resistência a inseticidas é geralmente acompanhada por efeitos pleiotrópicos (vários fenótipos associados a um único gene) que podem colocar insetos resistentes em desvantagem em relação aos susceptíveis quando o uso de inseticidas é interrompido (Coustau *et al.*, 2000; Arnaud & Haubruge, 2002). A frequência de indivíduos resistentes geralmente diminui com o tempo, na ausência de uso de inseticidas. Porém, existem casos onde, na ausência do inseticida, não são observadas diferenças adaptativas entre insetos resistentes e susceptíveis, ou mesmo o potencial adaptativo dos indivíduos resistentes pode ser ainda maior do que nos susceptíveis (Arnaud & Haubruge 2002).

Inseticidas podem influenciar o metabolismo celular no que se refere ao acúmulo, principalmente, de carboidratos e proteínas armazenadas no corpo gorduroso e mobilização destas reservas em insetos (Orr & Downer, 1982; Bhosale *et al.*, 1988; Alaoui *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1997; Nath, 2000). O consumo de O<sub>2</sub> reflete a exigência de energia necessária aos processos fisiológicos dos insetos (Clarke, 1993) e são poucos os estudos sobre o consumo de O<sub>2</sub> ou produção de CO<sub>2</sub> como indicador de capacidade adaptativa de populações de insetos a diferentes condições ambientais (Marais & Chow, 2003). Variações na taxa respiratória média dos insetos podem auxiliar na detecção de custos adaptativos associados à resistência a inseticidas. Por outro lado, modificações na morfologia do corpo gorduroso sugerem a disponibilidade e mobilização de reservas para manutenção do organismo possibilitando sua sobrevivência frente a moléculas tóxicas.

Estabilidade do desenvolvimento representa a estabilidade do desenvolvimento de um fenótipo frente às condições ambientais. Estabilidade de desenvolvimento pode ser avaliada usando medidas de assimetria flutuante (AF) de características morfológicas (Møller, 1997). A assimetria flutuante pode ser definida como pequenos desvios da perfeita simetria bilateral para uma característica morfológica (van Valen, 1962). Estudos mostram que organismos expostos a agentes estressantes desenvolvem certo grau de AF (Møller, 1997). Um exemplo é a temperatura atuando como fator que pode proporcionar o aparecimento de AF em *Musca domestica* (Chapman *et al.*, 2000) ou exposição de populações de *Folsomia candida* à poluentes químicos levando ao aparecimento de AF (Kristensen *et al* 2004).

O uso da AF como um indicativo da característica resistência a inseticidas é aceito, apesar de controvérsias em torno do tema (McKenzie & Batterham, 1994; Møller & Swaddle, 1997; Santos, 2001). Indivíduos que apresentaram AF sobreviveram por mais tempo quando expostos a inseticidas do que indivíduos simétricos, segundo o estudo realizado por Allenbach *et al.*, (1999) com as espécies de peixes da América do Norte, *Gambusia affinis* e *Notropis ludibundus*.

O custo fisiológico associado à expressão da resistência a inseticidas pode ocasionar desvantagem adaptativa na ausência desses compostos como dificuldade de locomoção (Forster *et al.*, 1996, 1997). Um exemplo hipotético seria o custo adaptativo ligado a AF em estruturas como asa e tíbia, que pode tornar o deslocamento dos indivíduos mais energeticamente dispendioso a estes. A AF também pode ser usada como indicativo de seleção sexual. Møller (1996) demonstrou que fêmeas de *Musca domestica* tinham preferência para acasalamento por machos que possuíam asas simétricas.

O presente estudo teve como objetivos determinar diferenças na taxa respiratória, massa corporal e morfologia do corpo gorduroso entre populações resistentes e susceptível do caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais*.e também determinar a existência de AF nestas populações verificando se existe relação entre AF e resistência à inseticidas e suas conseqüências potenciais.

## Referências

- Alaoui, A., Moreau, R., Gourdoux, L. 1997. Effects of deltamethrin on glucose catabolic pathways in the isolated fat body of adult male *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 116: 17–21.
- Allenbach, D.M; Sullivan, K.B. & Lydy, M.J. 1999. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 899-905.
- Arnaud, L., Haubruge, E. 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56: 2435-2444.
- Bhosale, S. H., Yadwad, V. B., Kallapur, V .L. 1988. Residual toxic effect of Ekalux-25 on the biochemical constituents of the fat body of 5th instar *Bombyx mori*, *Indian Journal of Sericulture* 27: 73-82.
- Champ, B.R.; Dyte, C.E. 1976. Global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. Rome. FAO/UN, p. 356
- Chapman, J.W. & Goulson, D. 2000. Environmental versus genetic influences on fluctuating asymmetry in the house fly, *Musca domestica*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 403-413.
- Clarke, A. 1993. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Functional Ecology* 7:139-149.
- Coustau, C., Chevillon, C., french-Constant, R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15: 378-383.
- Foster, S.P., Harrington, R., Devonshire, A.L., Denholm, I., Devine, G.J., Kenward, M.G., Bale, J.S. 1996. Comparative survival of insecticide-susceptible and resistant peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), in low temperature field trials. *Bulletin of Entomological Research* 86: 17-27.
- Foster, S.P., Harrington, R., Devonshire, A.L., Denholm, I., Clark, S.J., Muggleston, M.A. 1997. Evidence for a possible fitness trade-off between insecticide resistance and the low temperature movement that is essential for survival of UK populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 87: 573-579.

- Guedes, R.N.C. 1991. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. *Seiva* 50: 24-29.
- Kristensen, T. N.; Pertold, C.; Pedersen, L. D.; Andersen, D. H.; Bach, L. & Loeschcke, V. 2004. The increase of fluctuating asymmetry in a monocloal strain of collembolans after chemical exposure - discussing a new method for estimating the environmental variance. *Ecological Indicators* 4, 73-81.
- Liu, Z., Valles, S.M., Dong, K., 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 991-997.
- McKenzie, J.A., Batterham, P. 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 166-169.
- Marais, E. & Chow, S. L. 1993. Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria sp.* *Journal of Experimental Biology* 206: 4565-4574.
- Møller, A. P., 1996. Sexual selection, viability selection and developmental stability in the domestic fly *Musca domestica*. *Evolution* 50, 746-752.
- Møller, A.P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *American Naturalist* 149: 916-932.
- Møller, A.P., Swaddle, J.P. 1997. *Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution*. Oxford: Oxford University, 291 p.
- Nath, B. S. 2000. Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. exposed to organophosphorus insecticides. *Pesticide Biochemistry Physiology* 68: 1504-1515.
- Nath, B. S., Suresh, A., Varma, B. M., Kumar, R. P. S. 1997. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36: 169-173.
- Orr, G. L. & Downer, R. G. H. 1982. Effect of lindane (c-Hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Pesticide Biochemistry Physiology* 17: 89-102.

- Santos, M. 2001. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of mating success in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 55: 2248-2256.
- Subramanyam, B.H.; Hagstrum, D.W. Resistance measurement and management. In: Subramanyam, B.H.; Hagstrum, D.W., eds. Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker. p. 331-397, 1996.
- Tabashnik, B. E., 1990. Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 83: 1170-1176.
- van Valen, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16:125-142.

**Custo da resistência a inseticidas e sua redução no caruncho-do-milho**  
*Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

## Resumo

RIBEIRO, Berghem Morais, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.  
**Custo e redução da resistência a inseticidas no caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.  
Conselheiros: Maria Goreti Almeida de Oliveira, Marcos Rogério Totola.

Um tema comum nos modelos de evolução da resistência a inseticidas é a associação entre resistência e custo de performance. Existem evidências empíricas desta associação, mas suas bases fisiológicas e a redução da resistência raramente foram investigadas. Populações resistentes a piretróides do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)) oferecem a oportunidade para essa investigação. Resistência a inseticidas nesta espécie foi observada inicialmente em cinco estados brasileiros, mas o fenômeno aparentemente decresceu e não foi expandido para outras regiões provavelmente devido à ocorrência de desvantagens nos indivíduos resistentes na ausência de inseticidas. A presente investigação tentou verificar se diferenças na taxa respiratória e a morfologia do corpo gorduroso têm relação com a diferença na taxa de desenvolvimento em populações brasileiras de *S. zeamais* resistentes a inseticidas, gerando evidências da existência, ou não, de custo fisiológico, determinando custo de performance da resistência a inseticidas nas populações desta espécie-praga. Estudos de taxa de desenvolvimento, taxa de respiração e citomorfologia do corpo gorduroso foram realizados em uma população susceptível a inseticida (de Sete Lagoas) e duas populações resistentes (de Jacarezinho e Juiz de Fora) de *S. zeamais*. A população resistente de Jacarezinho mostrou alta massa corporal incorrendo em maior estoque de energia (maior área de trofócito) resultando na suficiente reserva de energia, não somente para o seu desenvolvimento e reprodução, mas também para resistência a inseticidas. A população resistente de Juiz de Fora, no entanto, possivelmente não possui reservas de energia suficientes para expressão da resistência a inseticidas e performance de desenvolvimento e/ou reprodutivo, conduzindo para um desbalanço entre resistência e outras características de performance relatadas.

**Palavras-Chave:** Custo adaptativo, resistência a piretróides, taxa respiratória de adultos, produção de CO<sub>2</sub>, área de trofócitos, massa corporal, taxa de desenvolvimento, besouros de grãos.

## **Abstract**

RIBEIRO, Berghem Morais, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee members: Maria Goreti Almeida de Oliveira, Marcos Rogério Totola.

A common assumption in models of insecticide resistance evolution is the association between resistance and fitness cost. There are empirical evidences of such association, but their physiological basis (and mitigation) was seldom investigated. Pyrethroid resistant populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)) offer this opportunity. Pyrethroid resistance in this species was initially observed in five Brazilian states, but the phenomenon apparently decreased and did not spread to other regions probably due to the occurrence of fitness disadvantage in resistant individuals in the absence of insecticides. The present investigation tried to verify if differences in respiration rate and fat body morphology are related with differences in rate of development in Brazilian populations of *S. zeamais* resistant to insecticides providing evidence of the existence (or not) of physiological cost determining fitness cost of insecticide resistance in populations of this insect-pest. To achieve this, studies of rate of development, respiration rate and fat body cytomorphology were carried out in one insecticide susceptible (from Sete Lagoas) and two resistant populations (from Jacarezinho and Juiz de Fora ) of *S. zeamais*. The resistant population from Jacarezinho shows higher body mass incurring in more stored energy (higher trophocyte area) resulting in enough energy reserves not only for its development and reproduction, but also for insecticide resistance. The resistant population from Juiz de Fora however, does not seem to have large enough energy reserves for insecticide resistance expression and development and/or reproductive performance leading to a trade-off between resistance and other fitness-related traits.

**Key words.** Adaptative cost, pyrethroid resistance, adult respiration rate, CO<sub>2</sub> production, trophocyte area, body mass, rate of development, grain beetles.

## Introdução

Estudos sobre resistência a inseticidas são importantes não apenas para os programas de manejo integrado de pragas, mas são também importantes como modelos de evolução de fenótipos recém adaptados e suas mudanças fisiológicas e genéticas associadas (Coustau *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2001). Os principais genes responsáveis pela adaptação do indivíduo a um novo ambiente como, por exemplo, grãos tratados com inseticidas, estão usualmente associados a um custo adaptativo, já que este indivíduo pode estar em desvantagem no ambiente sem inseticida onde pressões de seleção independentes moldaram os fenótipos remanescentes (Coustau *et al.*, 2000, Berticat *et al.*, 2002). Esta idéia se baseia na visão geral de que ocorre uma realocação de recursos, ou ainda, que processos metabólicos ou de desenvolvimento são afetados, diminuindo assim o potencial reprodutivo do organismo (Berticat *et al.*, 2002).

A seleção para resistência a inseticidas é geralmente acompanhada por efeitos pleiotrópicos (vários fenótipos associados a um único gene) que podem colocar insetos resistentes em desvantagem quando o uso de inseticidas é descontínuo (Coustau *et al.*, 2000, Arnaud & Haubruge 2002). Isto levaria a um declínio na frequência de indivíduos resistentes ao longo do tempo, na ausência de inseticidas. Contudo, existem casos de ausência de desvantagem adaptativa ou vantagem de performance, observados em indivíduos resistentes à inseticidas de algumas espécies-praga como o besouro vermelho das farinhas e o mosquito *Culex pipiens* (Beeman & Nanis, 1986; Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001). Modificações alélicas (para um menor custo) e seleção de genes modificadores podem amenizar o custo da resistência a inseticidas (Coustau *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002) mas o processo fisiológico desta diminuição de custo merece maior investigação.

Dos quatro mecanismos básicos de resistência a inseticidas – super produção constitutiva, baixa produção constitutiva, alteração do sítio de ação e mudança induzida da regulação gênica- somente para o último não é possível uma expectativa geral de custo fisiológico de resistência (Taylor & Feyreisen, 1996; Coustau *et al.*, 2000). Estas modificações levam à resistência a inseticidas, geralmente, induzindo efeitos deletérios quando há quebra nas rotas com as quais seus alvos (receptores) estão envolvidos (Coustau

*et al.*, 2000). Como resultado, o aumento da taxa metabólica pode ser necessário para os indivíduos resistentes manterem o mecanismo de resistência, desbalanceando as suas trocas gasosas. Se não acontecer um incremento no metabolismo de energia, a realocação de energia pode ocasionar a drenagem de outros processos fisiológicos envolvidos com o desenvolvimento do inseto, manutenção e reprodução (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999). A molécula inseticida, por si só, pode interferir nas reservas de carboidratos e proteínas no corpo gorduroso e sua mobilização no inseto. (Orr & Downer, 1982; Alaoui *et al.*, 1994; 1997; Nath *et al.*, 1997; Nath, 2000, 2002). No entanto, estes processos não foram ainda estudados comparativamente em populações resistentes e susceptíveis a inseticidas.

Apesar do consumo de O<sub>2</sub> ou a produção de CO<sub>2</sub> representar a soma das demandas energéticas necessária aos processos fisiológicos dos insetos (Clarke, 1993), são poucos os estudos que utilizam a taxa respiratória média (consumo de O<sub>2</sub> ou produção de CO<sub>2</sub>) para demonstrar a adaptabilidade de populações de insetos a diferentes condições ambientais através de seus processos fisiológicos básicos (Marais & Chow, 2003). Variações na taxa respiratória média dos insetos contribui para a detecção de possíveis custos adaptativos associados à expressão do fenômeno da resistência na ausência de inseticidas, enquanto modificações na morfologia do corpo gorduroso sugerem a disponibilidade e mobilização de reservas de energia para manutenção do organismo possibilitando sua sobrevivência frente a moléculas tóxicas.

Resistência a piretróides em populações brasileiras do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae)) foi anteriormente observada em cinco estados (Guedes *et al.*, 1995). Contudo, houve um retrocesso na dispersão do fenômeno (Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003), talvez devido à ocorrência de desvantagem adaptativa dos indivíduos resistentes na ausência de inseticidas, o que pode ter reduzido a disseminação da resistência (Muggleton, 1983; Roush & McKenzie, 1987; Coustau *et al.*, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi determinar as diferenças na performance da taxa respiratória e morfologia do corpo gorduroso entre populações três populações de *S. zeamais* resistentes e susceptíveis a inseticidas, e como elas estão interrelacionadas,

provendo evidência da existência ou não de custo fisiológico associado à resistência a inseticidas em populações desta espécie-praga.

## **Material e Métodos**

### *Populações de insetos e reagentes*

Três populações de *Sitophilus zeamais* foram utilizadas neste estudo. A população padrão de susceptibilidade utilizada é proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo - CNPMS), localizado na cidade de Sete Lagoas-MG. Esta população é considerada padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides e vem sendo mantida em condições de laboratório por aproximadamente vinte anos (Guedes *et al.*, 1994, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003). Esta população foi originalmente coletada em Sete Lagoas (Minas Gerais, Brasil). As outras duas outras populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas, coletada em moinho de grãos na cidade de Juiz de Fora (Minas Gerais, Brasil), no início de 1999 e estabelecida a partir de 500 indivíduos. A segunda população resistente mostra alta resistência para DDT e piretróides e foi coletada originalmente em unidades armazenadoras de sementes de milho em Jacarezinho (Paraná, Brasil), no final da década de 80. Todas as populações foram criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $70 \pm 5\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12h). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

### *Emergência diária*

O experimento de taxa de desenvolvimento foi conduzido usando potes de vidro com capacidade de 1,5 L contendo 250 g de milho. 50 insetos adultos de *S. zeamais* foram colocados em cada pote e removidos 15 dias depois, seguindo o método descrito por Trematerra *et al.* (1996) e adaptado por Fragoso *et al.* (2005). As progênes de adultos de *S. zeamais* foram obtidas a partir da constatação da primeira emergência, com verificação e retirada dos adultos emergidos a cada dois dias. Dados de emergência diária foram registrados, normalizados como sugerido por Trematerra *et al.* (1996), e submetidos à análise de regressão não-linear usando o procedimento de ajuste de curva do SigmaPlot 2000 (SPSS, 2000).

### *Respirometria e massa corporal*

Produção de CO<sub>2</sub> foi medida em um respirômetro do tipo CO<sub>2</sub> Analyser (TR2, Sable System International, Las Vegas, USA) e a metodologia para a medição da respirometria diferencial foi adaptada de Daniel & Smith (1994) e Guedes *et al.* (2003). Para mensuração da taxa respiratória foram utilizados grupos de 20 insetos do mesmo sexo e população em um sistema completamente fechado. Insetos adultos foram sexados usando diferenças morfológicas no rostrum, como textura e largura (Reddy, 1951; Tolpo & Morrison, 1965). Cinco réplicas foram usadas para cada população e sexo e a produção de CO<sub>2</sub> foi medida em cada frasco. Os frascos foram conectados ao sistema para calibração do equipamento, três horas antes da produção de CO<sub>2</sub> pelos insetos. A medida foi obtida pela injeção de ar livre de CO<sub>2</sub> dentro do frasco por dois minutos a um fluxo de 600 ml/min. Essa corrente de ar fazia com que todas as moléculas de CO<sub>2</sub> produzidas passassem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema e que prontamente realizava a mensuração em µmol de CO<sub>2</sub>/hora. Após esse período, os insetos foram removidos do interior da câmara e realizou-se a pesagem de cada grupo de insetos em balança analítica (Sartorius BP 210 D, Gotingen, Alemanha).

### *Citomorfolgia do corpo gorduroso*

Os insetos foram sexados e vinte indivíduos de cada sexo e de cada população foram submetidos a jejum alimentar por 48 horas. Este procedimento teve a finalidade de fazer com que todos os insetos utilizados no experimento tivessem uma constituição semelhante no interior do trato digestivo. Durante este período, os insetos foram acondicionados em frasco cilíndrico de vidro transparente de 20 ml de volume. Para assegurar que as fêmeas utilizadas não acasalaram, foram usadas fêmeas com até dois dias após a emergência do grão, pois fêmeas desta espécie não acasalam antes do terceiro dia após a emergência (Walgenbach & Burkholder, 1987).

Após o período de jejum, 15 insetos de cada sexo e de cada população foram decapitados e seus abdomens foram transferidos para uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M (pH 7,2). Em seguida, os abdomens foram fixados com a

solução fixadora de Zamboni (pH 7,35) (Stephanini *et al.*, 1967) e posteriormente desidratados em série crescente de etanol (70, 80 e 95%), seguida de embebição em resina de inclusão para obtenção de cortes histológicos de 7 $\mu$ m de espessura, em micrótomo RM2255 (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e a medição da área das células trofocíticas (células do corpo gorduroso) foram obtidas usando o programa Image-Pro Plus, versão 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Foram também realizados testes específicos para constatação de reação com proteínas totais, bem como de reação com carboidratos neutros nas diferentes populações de *S. zeamais*. Para a marcação de proteínas totais, os cortes histológicos foram submetidos à reação de mercúrio-bromofenol (HgCl<sub>2</sub> 1%, azul de bromofenol 0,05% e ácido acético 2%). Já para os testes de reação para carboidratos neutros, cortes histológicos foram submetidos ao teste de PAS (reação com ácido periódico a 4%). Ambas as reações foram realizadas segundo metodologia descrita por Pearse (1953), com pequenas adaptações para historesina.

#### *Análises estatísticas*

Os dados de produção de CO<sub>2</sub>, massa corporal e área de trofócitos foram submetidos à análise de variância em dois níveis (2 sexos x 3 populações) seguidos de teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) quando apropriado. Cada média da área dos trofócitos foi calculada baseado em mensurações individuais de área, de 25 células e foram transformadas para log<sub>10</sub>X área para estabilizar a variância e para satisfazer os pressupostos de normalidade. Foram aplicadas análises de correlação entre produção de CO<sub>2</sub> (nmol de CO<sub>2</sub> /inseto/h), massa corporal (mg) e área de trofócitos ( $\mu$ m<sup>2</sup>).

### **Resultados**

#### *Emergência diária*

Os conjuntos de dados para cada população foram normalizados e o tempo de emergência do primeiro adulto foi usado como ponto de partida. Esta transformação tem como vantagens a simplicidade e a eficácia em aumentar a confiança da análise estatística (Trematerra *et al.*, 1996). Inicialmente tentou-se ajustar os dados usando o modelo proposto por Trematerra *et al.* (1996), mas o modelo Gaussiano com três parâmetros ( $y = a \exp(-$

$0,5((x - b)/c)^2$ ) forneceu melhor ajuste para os dados de emergência diária normalizada ( $p < 0,0001$ ;  $R^2 > 0,80$ ; Fig. 1) e por isso foi escolhido (Figura 1).

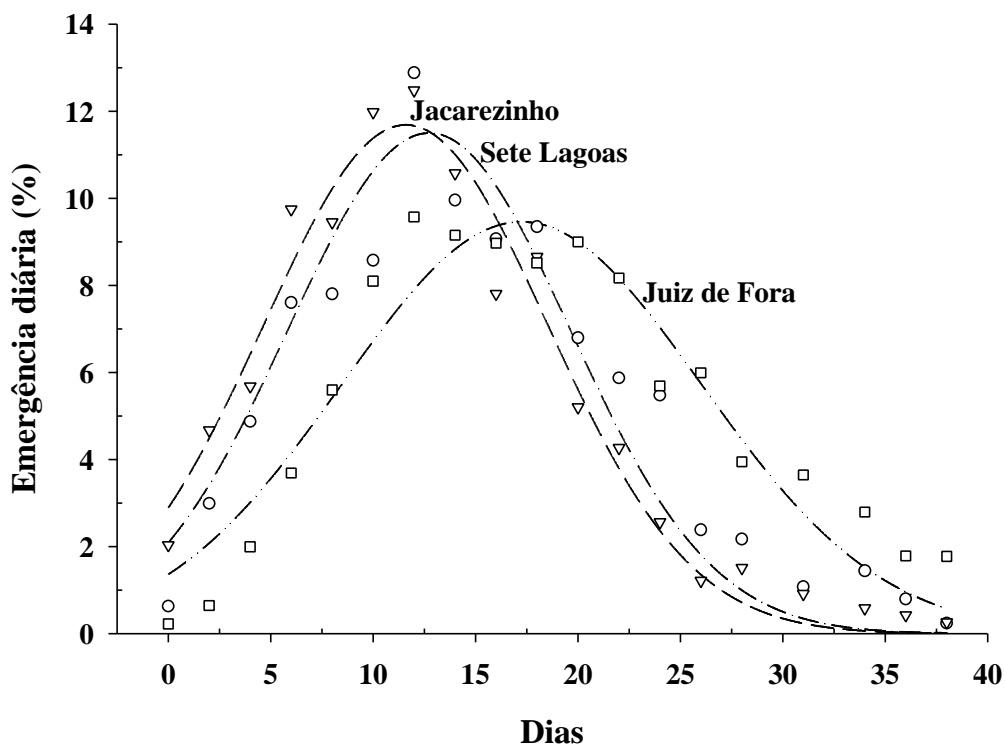


Figura 1. Emergência diária de três populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* (Sete Lagoas (○), Jacarezinho (▽) e Juiz de Fora (□)). Os símbolos representam médias de três repetições. (g.l.erro = 54,  $p < 0,0001$ ,  $R^2 > 0,80$ )

Curvas de emergências diárias normalizadas para as populações são apresentadas na Figura 1 e diferenças nos desenvolvimentos das populações podem ser observadas. As curvas para as populações de Jacarezinho e Sete Lagoas tiveram padrões semelhantes e atingem picos de máxima emergência em um mesmo período de tempo (entre 12 e 13 dias), com desempenho ligeiramente superior para a primeira população. Porém, a população de

Juiz de Fora apresentou atraso para atingir o pico máximo de emergência (cerca de 17 dias após o início da emergência) e apresentou menor pico (*ca.* 9,0%) quando comparada com as outras populações.

### *Respirometria e massa corporal*

Diferenças significativas em metabolismo respiratório, medido aqui pela produção de CO<sub>2</sub> (nmol CO<sub>2</sub>/inseto/hora), foram observadas entre as diferentes populações, mas não houve diferença significativa entre os sexos e a interação população X sexo também não foi significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Análises de variância de produção de CO<sub>2</sub> (nmol CO<sub>2</sub>/inseto/h), área de trofócitos (µm<sup>2</sup>) e massa corporal de insetos adultos (mg).

Fonte de variação	Produção de CO <sub>2</sub> (nmol CO <sub>2</sub> /inseto/h)			Área de trofócitos (µm <sup>2</sup> )			Massa corporal (mg)		
	Graus de liberdade	F	<i>p</i>	Graus de liberdade	F	<i>p</i>	Graus de liberdade	F	<i>p</i>
Modelo	5	6,62	0.0009*	5	18,99	< 0,0001*	5	19,28	< 0.0001*
Erro	20	-	-	20	-	-	1	-	-
População (P)	2	15,52	< 0,0001*	2	42,84	< 0,0001*	2	42,83	< 0.0001*
Sexo (S)	1	0,24	0,63	1	0,71	0,72	1	0,01	0,96
P x S	2	0,55	0,59	2	4,52	< 0,01*	2	5,37	0.006*

\* Significativo a *p* < 0,05.

A população de Jacarezinho apresentou taxa respiratória significativamente maior (*ca.* 2x) que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora, que por sua vez não diferiram significativamente entre si, neste aspecto (Figura 2).

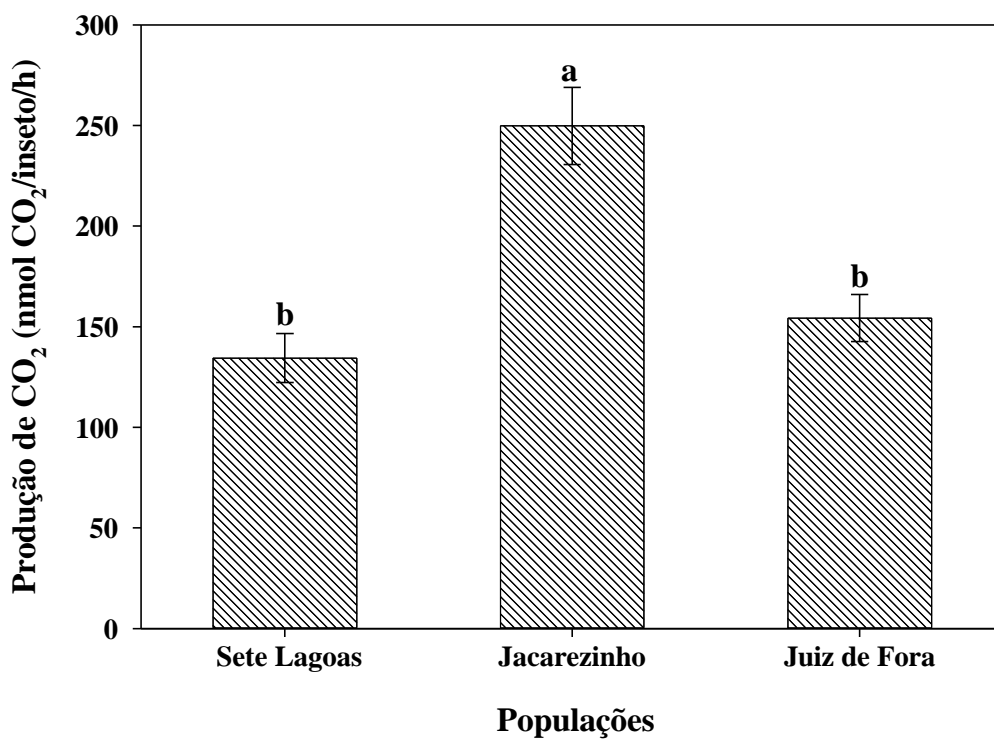


Figura 2. Produção de CO<sub>2</sub> (nmol CO<sub>2</sub>/inseto/h) ( $\pm$  SEM) por insetos adultos de três populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*). Médias seguidas pela mesma letra não diferem-se significativamente a  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Análise de variância para a massa corporal também apontou diferenças significativas entre os tratamentos e, para esta variável, a interação entre população e sexo mostrou-se significativa a 5% (Tabela 1). Os insetos, de ambos sexos, da população de Jacarezinho mais uma vez se destacaram, apresentando massa corporal significativamente superior aos insetos das outras duas populações (Tabela 2). Fêmeas de Sete Lagoas e Juiz de Fora apresentaram massas semelhantes e menores que as fêmeas de Jacarezinho, enquanto os machos de Sete Lagoas mostraram-se ainda mais leves que os de Juiz de Fora, ambos também, significativamente mais leves que os de Jacarezinho (Tabela 2). Machos das populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora foram mais pesados que as fêmeas destas populações, enquanto machos e fêmeas de Sete Lagoas apresentaram valor de massa corporal semelhante (Tabela 2).

Tabela 2. Massa corporal (mg) de insetos adultos (fêmeas e machos) de três populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)

População/Sexo	Massa corporal $\pm$ SEM (mg)	
	Fêmea	Macho
Sete Lagoas	40,36 $\pm$ 0,77 Ab*	37,85 $\pm$ 0,85 Ac
Jacarezinho	62,30 $\pm$ 0,78 Ba	77,50 $\pm$ 0,25 Aa
Juiz de Fora	39,55 $\pm$ 0,59 Bb	47,53 $\pm$ 0,52 Ab

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou pela mesma letra minúscula na coluna diferem-se significativamente a  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

#### *Citomorfolgia do corpo gorduroso*

Diferenças em área de trofócitos, foram significativas para interação entre sexo e populações de *S. zeamais* (Tabela 1). Contudo, quando estes dados foram submetidos ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), as diferenças entre sexo não se mostraram significativas, ao contrário das diferenças entre populações (Tabela 3).

Tabela 3. Área média de trofócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) de machos e fêmeas de três populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)

População/Sexo	Área de trofócitos $\pm$ SEM ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Fêmea	Macho
Sete Lagoas	470,56 $\pm$ 23,21 Ab*	441,89 $\pm$ 58,32 Ab
Jacarezinho	844,70 $\pm$ 65,93 Aa	959,39 $\pm$ 91,27 Aa
Juiz de Fora	575,29 $\pm$ 31,64 Ab	701,40 $\pm$ 32,22 Aa

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou pela mesma letra minúscula na coluna diferem-se significativamente a  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Novamente a área de trofócitos em insetos de Jacarezinho foi significativamente maior tanto para machos, quanto para fêmeas, em relação às outras duas populações (Tabela 3). Machos de Juiz de Fora possuem área de trofócitos semelhante a de machos de Jacarezinho, mas a área de trofócitos para fêmeas desta população assemelha-se as de fêmeas de Sete

Lagoas, cujos insetos adultos (machos e fêmeas) sempre apresentaram menor área de trofócitos (Tabela 3).

Os testes histoquímicos em células do corpo gorduroso mostram maior intensidade de reação para carboidratos e proteínas em fêmeas susceptíveis (Sete Lagoas), seguidas pelas fêmeas de Juiz de Fora e de Jacarezinho (Tabela 4). Em contraste, a intensidade de reação para carboidratos e proteínas em machos foi maior nas populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora, e menor na população susceptível de Sete Lagoas (Tabela 4). A intensidade de reação tanto para carboidratos totais, quanto para proteínas, foi maior em fêmeas do que em machos de Sete Lagoas, ao contrário do que aconteceu nas outras duas populações (Tabela 4).

Tabela 4. Intensidade de reação ocorrida em testes histoquímicos realizados em cortes histológicos de células do corpo gorduroso de populações de *S. zeamais*.

Testes histoquímicos	Populações					
	<i>Sete Lagoas</i>		<i>Jacarezinho</i>		<i>Juiz de Fora</i>	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
<i>Proteínas totais</i>	++	+-	+-	+	+	++
<i>Carboidratos neutros</i>	++	+-	+-	++	+	+

+ - Fraca intensidade de reação; + Intermediária intensidade de reação; ++ Forte intensidade de reação

Insetos das populações resistentes, além de apresentarem maior área de células trofocíticas que os da população susceptível, mostraram maior quantidade e diversidade de vacúolos nestas (Figura 3 a-b). Curiosamente os insetos das populações resistentes também mostraram mais grânulos corados de azul (indicação de mais proteínas totais) (Figura 3 c-d) e mais regiões coradas para carboidratos neutros no citoplasma (Figura 3 e-f) em comparação com insetos susceptíveis, apesar da intensidade de cor ter sido maior para fêmeas de Sete Lagoas em relação a fêmeas das populações resistentes.

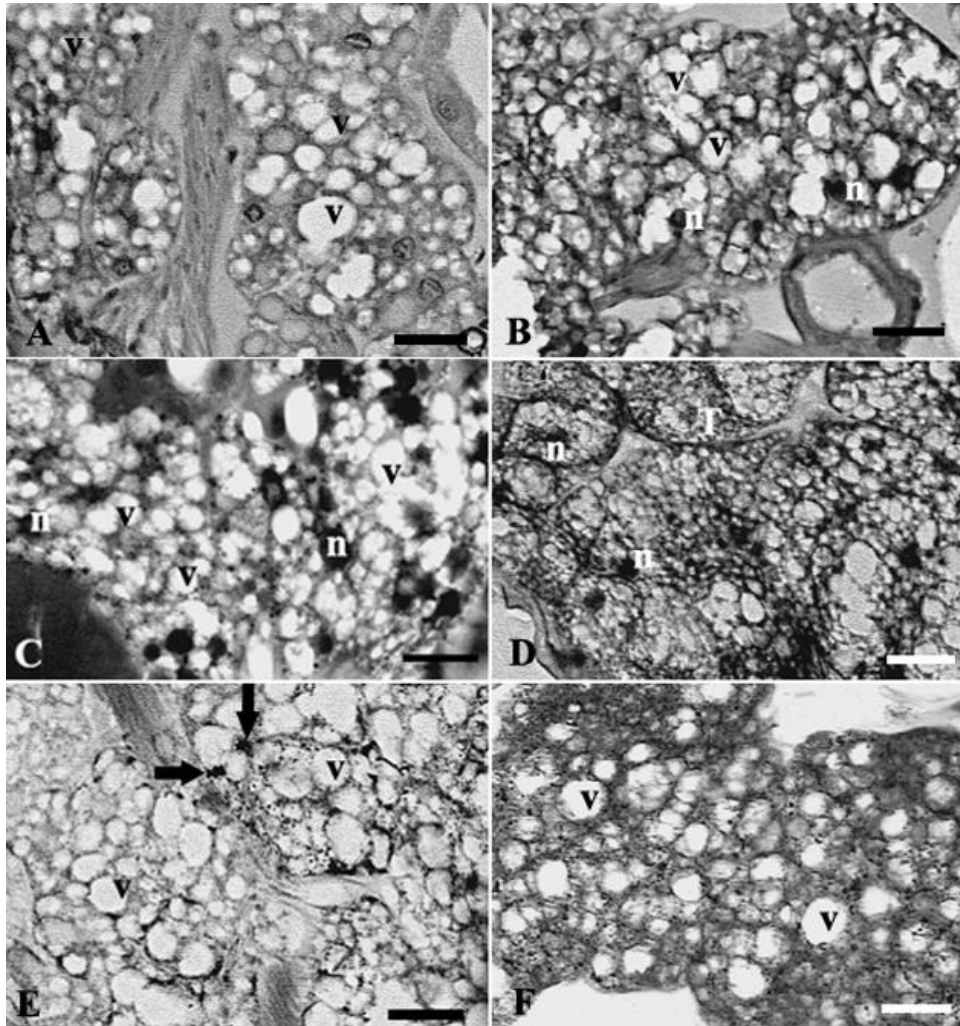


Figura 3. Corpo gorduroso de populações resistentes e susceptíveis do caruncho-do milho (*Sitophilus zeamais*). A – População susceptível. Trofócitos apresentando pequenos vacúolos no citoplasma. B - População resistente mostrando muitos vacúolos (v) de diferentes tamanhos. C e D – Corpo gorduroso marcado com azul de bromofenol. Trofócitos da população susceptível (C) com menor quantidade de grânulos corados do que a população resistente (D). E and F – Corpo gorduroso submetido a teste de PAS. Trofócitos da população susceptível (E) com menor marcação de grânulos corados (setas) do que a população resistente (F). n - núcleos. Barras = 10  $\mu$ m.

### Análises de correlação

Análises de correlação entre produção de CO<sub>2</sub>, massa corporal e área de trofócitos foram todas robustas ( $r > 0,90$ ), positivas e significativas ( $p < 0,05$ ), como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Correlações entre produção de CO<sub>2</sub> (nmol CO<sub>2</sub>/inseto/h), área de trofócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) e massa corporal de insetos adultos (mg) de ambos os sexos e pertencentes a três populações diferentes de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*). (n = 6)

Correlações	Produção de CO <sub>2</sub> (nmol CO <sub>2</sub> /inseto/h)		Área de trofócitos ( $\mu\text{m}^2$ )	
	r	p	R	p
Produção de CO <sub>2</sub> (nmol CO <sub>2</sub> /inseto/h)	-	-	-	-
Área de trofócitos ( $\mu\text{m}^2$ )	0,94	0,005*	-	-
Massa corporal (mg)	0,98	0,0005*	0,92	0,009*

\* Significativo a  $p < 0,05$ .

### Discussão

O corpo gorduroso combina importantes funções no metabolismo dos insetos e muitas de suas funções podem ser relacionadas ao funcionamento do fígado e tecido adiposo nos vertebrados. O corpo gorduroso armazena carboidratos, lipídeos e proteínas que são utilizados pelos insetos através da liberação de neurohormônios mediante demanda energética (Van der Horst *et al.*, 1997). A existência de diferenças na morfologia do corpo gorduroso e na taxa respiratória média em insetos de populações com susceptibilidade distinta a inseticidas sugere uma maior mobilização de reservas para resistir à ação tóxica de inseticidas nas populações resistentes a estes compostos, o que pode estar associado a custos adaptativos do fenômeno da resistência na ausência de inseticidas. A expressão do fenômeno da resistência a inseticidas pode não ser tão útil a partir do momento em que há a interrupção do uso desses compostos. Nestas condições, a manutenção dos mecanismos que conferem resistência a moléculas inseticidas pode demandar uma quantidade de energia adicional e suficiente para tornar os fenótipos resistentes desfavorecidos adaptativamente em relação aos susceptíveis (Chevillon *et al.*, 1999; Coustau *et al.*, 2000; Boivin *et al.*, 2001, 2003; Boivin *et al.*, 2003). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a

população de *S. zeamais* susceptível a inseticidas apresenta menor área de células do corpo gorduroso do que populações resistentes. Além disso, estas células das populações resistentes apresentam mais vacúolos, proteínas e carboidratos do que as células da população susceptível. Isto nos sugere que as populações resistentes apresentam modificações na morfologia das células do corpo gorduroso, de maneira a favorecer um maior acúmulo de substâncias de reserva no interior destas, o que incorre em um maior tamanho dos trofócitos.

O corpo gorduroso também atua no metabolismo intermediário dos insetos, com funções de armazenamento de certas enzimas envolvidas na destoxificação de moléculas tóxicas, o que pode estar acontecendo nas populações resistentes de Jacarezinho e Juíz de Fora e como foi observado em populações de *Spodoptera frugiperda* por Yu *et al.* (2003). O envolvimento das reservas de carboidratos na destoxificação de moléculas inseticidas por insetos foi também evidenciado nos estudos desenvolvidos por Nath (2000 e 2003) e Alaoui *et al.* (1994 e 1997). Modificações no sítio de ação, ocasionando resistência a inseticidas pode romper a rota com a qual este sítio (ou receptor) está envolvido (Coustau *et al.*, 2000). Como resultado, uma maior taxa metabólica pode ser necessária para os indivíduos resistentes manterem seus mecanismos de resistência (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999), o que explica maiores trofócitos e maior taxa respiratória dos indivíduos resistentes.

As principais moléculas armazenadas no corpo gorduroso, que são passíveis de utilização como fonte de energia, nas mais variadas atividades dos insetos, são os lipídeos, carboidratos e proteínas (Van der Horst *et al.*, 1997). Os padrões citomorfológicos observados em células do corpo gorduroso de insetos das populações resistentes sugerem uma maior disponibilidade de proteínas totais e carboidratos neutros do que na população susceptível. Este maior acúmulo provavelmente contribui para que os insetos resistentes tenham uma maior capacidade de mobilização de moléculas de reserva estocada no corpo gorduroso na tentativa de suprir a demanda energética necessária para ativar seus mecanismos de resistência à inseticidas. Os resultados reportados por Park & Keeley (1998) dão suporte a esta hipótese onde a formamidina dimetilclordimiforme (DCDM) levaria a diminuição das reservas de energia armazenadas no corpo gorduroso de baratas

*Blaberus discoidalis* aumentando sua mortalidade pelo comprometimento dos processos fisiológicos básicos.

O fato de células do corpo gorduroso de fêmeas da população susceptível apresentarem maior intensidade de reação do que as resistentes, para os testes específicos de proteínas totais e carboidratos neutros totais, sugere que na população de Sete Lagoas não há alocação de energia para o mecanismo da resistência, mas os processos de desenvolvimento e reprodução não são afetados. É possível que a mobilização de reservas de energia estocadas no corpo gorduroso de fêmeas da população susceptível não ocorre tão eficientemente quanto nas fêmeas das populações resistentes, particularmente na população de Jacarezinho. Esta hipótese merece ser testada e será um futuro objeto da nossa investigação.

Os resultados de respirometria, obtidos nesse estudo, demonstram que a população de Jacarezinho possui uma maior atividade respiratória do que as demais populações. Estudos de atividade enzimática *in vitro* desenvolvidos por Fragoso *et al.* (2003) com essas mesmas populações de *S. zeamais* além da adição de outras populações, indicaram maior atividade tanto de glutatona *S*-transferases como de fosfotriesterases nas populações resistentes. Esta maior atividade de enzimas detoxificativas pode demandar uma maior taxa respiratória em fenótipos resistentes, o que pode ocasionar desbalanço nas trocas gasosas acarretando custos fisiológicos por drenar energia que seria utilizada em outros importantes processos fisiológicos em insetos (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999, Chown & Gaston, 1999). Além disso, modificações no sítio de ação também incorrem em custo energético (Coustau *et al.*, 2000), mas isto merece mais investigação.

Apesar da expectativa de um desbalanço de energia, devido a resistência à inseticidas ocasionar um custo fisiológico e desvantagens em performance de fenótipos resistentes em ambientes livres de inseticida, a população resistente de Jacarezinho mostrou performance demográfica similar a da população susceptível, diferentemente da população de Juiz de Fora . Fragoso *et al* (2005) também mostraram desvantagem de performance na população de Juiz de Fora e performance superior na população de Jacarezinho e na população susceptível quando avaliados, o crescimento populacional e taxa de desenvolvimento. A melhor performance demográfica da população de Jacarezinho é

provavelmente, consequência da sua maior massa corporal, resultado de uma maior eficiência na estocagem de reservas de energia. Estas reservas são, provavelmente, também mais eficientemente mobilizadas, devido a maior taxa respiratória desta população, para atividades de manutenção, proteção contra inseticidas e reprodução. O mesmo não é visto tão eficientemente na população resistente de Juiz de Fora, a qual mostra menores índices de performance demográfica do que a população de Jacarezinho e Sete Lagoas. Esse menor índice, junto com a massa corporal e taxa de respiração indica um custo associado com resistência a inseticida nesta população.

A diferença de performance reprodutiva entre as populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora, talvez decorra da origem da resistência nestas populações. O longo período em que a população de Jacarezinho vem mantendo essa resistência, mesmo na ausência de inseticidas, sugere que os genes responsáveis pela expressão do fenômeno já passaram por alterações ou foram substituídos por genes que incorrem em menor custo adaptativo. O mesmo não parece ter acontecido com a população de Juiz de Fora (Fragoso *et al.*, 2005).

O custo da resistência a inseticidas em insetos é frequentemente associado com o custo de manutenção do maquinário defensivo do organismo (Coustau *et al.*, 2000). A existência de correlações robustas entre produção de CO<sub>2</sub>, área de trofócitos e massa corporal em caruncho-do-milho, independente do sexo e população, provê evidência de como deve acontecer a alocação preferencial de energia nas três populações estudadas e auxilia no entendimento das diferenças entre as taxas de desenvolvimento das populações. No caso da população de Jacarezinho, a sua maior área corporal incorre em maior quantidade de energia armazenada (maior área de trofócitos) resultando na alocação de energia suficiente tanto para seu desenvolvimento e reprodução como para resistência a inseticidas. Na população de Juiz de Fora, no entanto, fica evidente que mesmo apresentando área de trofócitos superior à população de Sete Lagoas, a quantidade de energia alocada para expressão da resistência prejudica seu desenvolvimento e/ou performance reprodutiva.

Em síntese, o presente estudo associa a resistência a inseticidas em populações de *S. zeamais* com a citomorfologia do corpo gorduroso e taxa respiratória de maneira a

favorecer um maior acúmulo de reservas que podem ser mais prontamente disponibilizados para a resistência à inseticidas. Por outro lado, a demanda energética despendida para a resistência a inseticidas pode incorrer em um custo energético adicional capaz de desfavorecer a fixação dos fenótipos resistentes na ausência de inseticidas, a menos que sua capacidade de acúmulo de reservas e mobilização destas, consigam contemplar os processos fisiológicos potencialmente conflitantes (p.ex., resistência a desenvolvimento) como parece acontecer na população de Jacarezinho, mas não na de Juiz de Fora .

Observando sob uma perspectiva mais aplicada, é importante notar que em alguns genótipos resistentes, como o de Jacarezinho, não há custo adaptativo aparentemente associado à resistência a inseticidas. Nestes casos, estratégias de manejo de resistência que se baseiam na interrupção do uso destes, visando o re-estabelecimento da susceptibilidade e eventual re-introdução são pouco usadas. Em contraste, outros genótipos resistentes, como o de Juiz de Fora, apresentam custo adaptativo associado à resistência à inseticidas e a recomendação de manejo referida acima goza de boa perspectiva de êxito. O reconhecimento dos genótipos resistentes predominantes, em dada região, poderá nortear as táticas de manejo a serem adotadas para mitigar a resistência a inseticidas em populações brasileiras de caruncho-do-milho.

## Referências

- Alaoui, A., Gourdoux, L., Atay, Z.K. & Moreau, R. (1994) Alterations in carbohydrate metabolism induced in *Locusta migratoria* after poisoning with the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **50**,183-189.
- Alaoui, A., Moreau, R. & Gourdoux, L. (1997) Effects of deltamethrin on glucose catabolic pathways in the isolated fat body of adult male *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **116C**, 17–21.
- Arnaud, L. & Haubruge, E. (2002) Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution*, **56**, 2435-2444.
- Beeman, R.W. & Nanis, S.M. (1986) Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, **79**, 580-587.

- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. & Chevillon, C. (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research*, **72**, 41-47.
- Boivin, T., d'Hières, C.C., Bouvier, J.C., Beslay, D. & Sauphanor, B. (2001) Pleiotropism of insecticide resistance in the codling moth *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **99**, 381-386.
- Boivin, T., Bouvier, J.C., Beslay, D. & Sauphanor, B. (2003). Phenological segregation of insecticide resistance alleles in the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): a case study of ecological divergences associated with adaptive changes in populations. *Genetical Research*, **81**, 169-177.
- Chevillon, C., Raymond, M., Guillemaud, T., Lenormand, T. & Pasteur, N. (1999) Population genetics of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 147-157.
- Chown, S.L. & Gaston, K. (1999) Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Research*, **74**, 87-120.
- Clarke, A. (1993) Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Functional Ecology*, **7**, 139-149.
- Coustau, C., Chevillon, C. & ffrench-Constant, R. (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecology and Evolution*, **15**, 378-383.
- Daniel, S.H. & Smith, R.H. (1994) Functional anatomy of the egg pore in *Callosobruchus maculatus*: a trade-off between gas-exchange and protective functions? *Physiological Entomology*, **19**, 30-38.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C. & Rezende, S.T. (2003) Biochemical mechanisms of insecticides resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109**, 21-29.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C. & Peternelli, L.A. (2005) Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, **41**. (In press)

- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., Santos, J. P. & Cruz, C.D. (1994) Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *International Journal of Pest Management*, **40**, 103-106.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., Santos, J. P. & Cruz, C.D. (1995) Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, **31**, 145-150.
- Guedes, R.N.C., Smith, R.H. & Guedes, N.M.P. (2003) Host suitability, respiration rate and the outcome of larval competition in strains of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology*, **28**, 298-305.
- Harak, M, Lamprecht, I., Kuusik, A., Hiisaar, K., Metspalu, L. & Tartes, U. (1999) Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochimica Acta*, **333**, 39-48.
- Haubruege, E. & Arnaud, L. (2001) Fitness consequences of malathion-specific resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), and selection for resistance in the absence of insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 552-557.
- Haynes, J.P. (2001) Mass-specific and whole-animal metabolism are not the same concept. *Physiological and Biochemical Zoology*, **74**, 147-150.
- Hostetler, M.E., Anderson, J.F. & Lanciani, C. (1994) Pesticide resistance and metabolic rate in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Florida Entomologist*, **77**, 288-290.
- Marais, E. & Chow, S.L. (1993) Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria* sp. *Journal of Experimental and Biology*, **206**, 4565-4574.
- Muggleton, J. (1983) Adaptive fitness of malathion-resistant phenotypes of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Applied Ecology*, **20**, 245-254.
- Nath, B.S., Suresh, A., Varma, B.M. & Kumar, R.P.S. (1997) Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **36**, 169-173.

- Nath, B.S. (2000) Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. exposed to organophosphorus insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **68**, 1504-1515.
- Nath, B.S. (2002) Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **74**, 73-84.
- Orr, G.L. & Downer, R.G.H. (1982) Effect of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **17**, 89-102.
- Packard, G.C. & Boardman, T.J. (1999) The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comparative Biochemistry and Physiology*, **122C**, 37-44.
- Park, J.H. & Keeley, L.L. (1998) The Effect of biogenic amines and their analogs on carbohydrate metabolism in the fat body of the cockroach *Blaberus discoidalis*. *General and Comparative Endocrinology*, **110**, 88-95.
- Pearse, A.G.E. (1953) *Histochemistry Theoretical and Applied*. J. & Ac Churchill, London.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. & Chevillon, C. (2001) Insecticide resistance in mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*, **112-113**, 287-296.
- Reddy, D.B. (1951) Determination of sex in adult rice and granary weevils (Coleoptera: Curculionidae). *The Pan-Pacific Entomologist*, **27**, 13-16.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E. & Santos, J.P. (2003) Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, **39**, 21-31.
- Roush, R.T. & McKenzie, J.A. (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*, **32**, 361-380.
- SPSS (2000) *SigmaPlot 2000 User's Guide*, Revised Edition. SPSS, Chicago.
- Taylor, M. & Feyereisen, R. (1996) Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 719-134.

- Tolpo, N.C. & Morrison, E.O. (1965) Sex determination by snout characteristics of *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *The Texas Journal of Science*, **17**, 122-124.
- Trematerra, P., Fontana, F. & Mancini, M. (1996) Analysis of developmental rates of *Sitophilus oryzae* (L.) in five cereals of the genus *Triticum*. *Journal of Stored Products Research*, **32**, 315-322.
- van der Horst, D.J., Vroemen, S.F., van Marrewijk, W.J.A. (1997) Metabolism of stored reserves in insect fat body: hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **117B**, 463-474.
- Walgenbach, C.A. & Burkholder, W.E. (1987) Mating behavior of the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **80**, 578-583.
- Yu, S.J., Nguyen, S.N. & Abo-Elghar, G.E. (2003) Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (j.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **77**, 1-11.

**Assimetria flutuante em populações de caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais*,  
resistentes e susceptível a inseticidas**

## Resumo

A assimetria flutuante (AF) pode ser usada como medida de instabilidade do desenvolvimento. A AF é definida como sendo pequenos desvios na perfeita simetria entre os lados de um organismo para uma característica morfológica. Este trabalho objetivou determinar a existência de AF em três populações do caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* e sua relação com resistência a inseticidas. Foram analisadas duas populações resistentes a inseticidas (Jacarezinho e Juiz de Fora ) e uma susceptível (Sete Lagoas). Para tanto, foram feitas medições através de ensaio cego, de distâncias de características localizadas nas asas e tíbias do inseto. Foram usados para o experimento 200 indivíduos de cada população (100 fêmeas e 100 machos). Os resultados mostraram que a população de Jacarezinho possui o menor valor de AF e a população de Sete Lagoas o maior valor. Os resultados sugerem uma maior capacidade adaptativa das populações resistentes em relação a população susceptível. Particularmente no caso da população de Jacarezinho, já que esta população foi exposta a um longo período de seleção, provavelmente ocorreu a fixação de genes modificadores de performance adaptativa levando a diminuição de desvantagem adaptativa concomitantemente a fixação da característica resistência a inseticidas no genótipo. Por apresentarem menores valores de AF, as populações resistentes podem potencialmente possuir maior capacidade de locomoção o que pode influenciar a capacidade de dispersão dos indivíduos resistentes. Esta possibilidade pode ter conseqüências negativas para o manejo da resistência nessas populações. Duas populações (Sete Lagoas e Jacarezinho) apresentaram diferenças nos valores de AF para o sexo. Nestas populações os machos são mais simétricos, o que sugere seleção sexual onde as fêmeas usariam características morfológicas para selecionar parceiros com maior capacidade adaptativa.

*Palavras-chave:* Assimetria flutuante, custo adaptativo, resistência a inseticidas, *Sitophilus zeamais*.

*Key-Word:* Fluctuating asymmetry, adaptative cost, insecticide resistance, *Sitophiluz zeamais*.

### **Abstract**

The fluctuating asymmetry (AF) is a measure of developmental instability. AF is defined as small deviations in the perfect symmetry among the sides of an organism for a morphologic trait. This work aimed to determine the existence of AF in three populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais* and its relationship with insecticide resistance. Two resistant populations were studied (Jacarezinho and Juiz de Fora ), as well as a susceptible population (Sete Lagoas). The measurements were blindly carried out for traits in the wing and tibia (right and left) of each insect. Two hundred insects of each population were used (100 females and 100 males). The results showed that the population from Jacarezinho has the smallest AF and the population of Sete Lagoas the greatest value. The result suggests a higher fitness advantage of the resistant populations in relation to the susceptible population. Particularly in the case of the population of Jacarezinho, which was exposed to a long selection period, the fixation of modifier genes of adaptive performance seem to have taken place minimizing the fitness disadvantage usually associated with insecticide resistance. As the resistant populations present smaller values of AF, they may potentially have greater locomotion capacity that may favor their dispersion, what is an undesirable trait for insecticide resistance management. Two populations (Sete Lagoas and Jacarezinho) showed differences in the values of AF for the sex. In these populations the males are more symmetrical than the females suggesting sexual selection by the females. Seemingly the females use morphologic characteristics to select fitter partners.

## Introdução

A adaptação de um ser vivo a novas condições ambientais pode acarretar um custo adaptativo. Esse custo é expresso sob a forma de modificações no funcionamento e estrutura do organismo, como realocação de recursos, mudanças metabólicas e no processo de desenvolvimento do organismo. Isto, via de regra, gera diminuição da sua performance diante das condições ambientais originais (Berticat *et al.*, 2002).

O uso de pesticidas para o controle de pragas agrícolas e organismos vetores de doenças causa modificações no ambiente e promove uma pressão de seleção sobre organismos que ali vivem, sendo selecionados os mais adaptados. A consequência é o aparecimento do fenômeno da resistência a inseticidas (Guedes, 1991; Guedes *et al.*, 1994; 1995 e 1996; Ribeiro *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2003, 2005).

O custo fisiológico associado à expressão da resistência a inseticidas pode ocasionar desvantagem adaptativa na ausência desses compostos. Modificações no metabolismo e fisiologia dos insetos resistentes ocasionam aumento da sensibilidade ao frio, redução do potencial reprodutivo e diminuição da capacidade de adaptação comportamental como a redução da locomoção e conseqüente aumento da exposição a predação (Berticat *et al.*, 2002). A capacidade de percepção e conseqüente resposta a feromônios também é reduzida (Forster *et al.*, 1996, 1997). Também pode ocorrer alteração da taxa de sobrevivência de parasitas no organismo de insetos vetores resistentes, devido a modificações no metabolismo das células hospedeiras, interferindo na transmissão e propagação de parasitas (McCarrol & Hemingway, 2002).

O custo adaptativo da resistência também está presente ao nível de seleção sexual. Estudos conduzidos por Berticat *et al.* (2002) mostraram que indivíduos machos do mosquito *Culex pipiens* susceptíveis a inseticidas organofosforados apresentaram maior sucesso no acasalamento do que indivíduos resistentes a esses compostos.

Muitas espécies de seres vivos apresentam eixos de simetria ao longo do corpo ou de órgãos. Usualmente os indivíduos não têm a perfeita simetria bilateral, ocorrendo uma leve diferença entre as estruturas similares. A assimetria flutuante (AF) refere-se a essa perda sutil na perfeita simetria causada por estresses genéticos ou ambientais e que pode indicar uma incapacidade do organismo em manter sua estabilidade no desenvolvimento

(Ludwig, 1932; Palmer & Strobeck, 1986). AF é definida como pequenos desvios aleatórios da perfeita simetria bilateral para uma característica morfológica (van Valen, 1962). Palmer & Strobeck (1986) referem-se a AF como um padrão de variação da bilateralidade em um amostra de indivíduos onde a média dos valores direita menos esquerda de uma dada característica é zero e a variação tem uma distribuição normal em torno da média.

Segundo Leung & Forbe (1996) ocorre um aumento da AF com a exposição do indivíduo a uma fonte de estresse. Um possível mecanismo que explica essa relação de causa e efeito é o da utilização de energia pelo organismo para compensar o efeito negativo do estresse sobre ele. Essa realocação de energia compromete outros processos como reprodução e crescimento e a diminuição na precisão no desenvolvimento do organismo (Koehn & Bayne, 1989; Sommer, 1996).

A estabilidade no processo de desenvolvimento e características morfológicas de um organismo podem ser usados como pontos de referência para seleção sexual. A simetria pode representar parceiros sexuais mais saudáveis, sob determinadas condições ambientais. Desta forma, a AF é uma medida que está associada a seleção sexual, (Markow, 1995; Møller, 1993; Møller, 1997; Møller & Swaddle, 1997). Møller (1996) demonstrou que em indivíduos machos de *Musca domestica* que possuíam asas simétricas, havia vantagem seletiva em termos de seleção sexual. Alves (2000) evidenciou por sua vez, que fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus* acasalam preferencialmente com machos mais simétricos em detrimento dos que apresentam algum grau de assimetria.

A ruptura na estabilidade do desenvolvimento de indivíduos resistentes a inseticidas pode levar ao aparecimento de AF. Estudos conduzidos por Allenbach *et al.* (1999) com duas espécies de peixes da América do Norte, *Gambusia affinis* e *Notropis ludibundus*, mostraram que indivíduos que apresentaram AF sobreviveram por mais tempo quando expostos a inseticidas do que indivíduos simétricos. Em populações australianas da mosca das carcaças *Lucilia cuprina* resistentes a inseticidas, ocorreu um aumento da AF em três medidas aferidas de cerdas sensoriais (Clarke & Mckensie, 1987). A AF, deste modo, poderia ser um bom indicativo dos níveis de estresse ou impacto ambiental, podendo ser tomada como base na identificação de características de resistência a inseticidas em insetos

apesar da existência de controvérsias que ainda persistem sobre o assunto (McKenzie & Batterham, 1994; Markow, 1995; Møller & Swaddle, 1997; Santos, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a existência de AF em três populações do caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais*, duas resistentes e uma susceptível a inseticidas e verificar se existe relação entre AF e resistência a inseticidas e quais poderiam ser suas potenciais conseqüências.

### **Material e Métodos**

O experimento foi todo realizado no Laboratório de Toxicologia de Inseticidas da Universidade Federal de Viçosa, onde populações do caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* são mantidas em grãos inteiros de milho (13% bu) não expostos a inseticidas e sob condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 5\%$  u.r.).

#### Populações

Três populações de *S. zeamais* foram utilizadas nesse estudo. A população de Sete Lagoas é proveniente do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo (CNPMS) em Sete Lagoas-MG, onde é mantida em laboratório, por mais de 15 anos, sem exposição a inseticidas e foi usada como padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides (Guedes *et al.* 1995, Ribeiro *et al.* 2003). Foram utilizadas como padrão de resistência a inseticidas piretróides a população de Jacarezinho-PR, obtida no final da década de 80, proveniente de armazéns de grãos armazenados em Jacarezinho-PR (Guedes *et al.*, 1994, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003), juntamente com a população de Juiz de Fora proveniente de paiol proveniente deste município.

#### Experimento

Os tratamentos para a análise da assimetria flutuante foram estabelecidos em arranjo fatorial 3 x 2 (3 populações de insetos e 2 sexos). Foram coletados, de cada população, 200 insetos adultos, sendo 100 machos e 100 fêmeas. Os insetos foram sacrificados por congelamento. Em seguida, as asas posteriores e as tíbias (anteriores, medianas e posteriores) de cada indivíduo, foram retiradas utilizando pinça e tesoura e montadas em

papel cartão com dimensões de 4 cm de largura por 6cm de altura no qual foram demarcados quadrantes para lado (esquerdo e direito) e estrutura (asa e tíbia). Foi usado esmalte incolor para fixar as estruturas nos respectivos quadrantes. Cada cartão corresponde a um indivíduo.

Foram selecionadas doze distâncias a serem medidas das estruturas montadas, sendo seis distâncias na asa e duas na tíbia anterior, mediana e posterior (Quadro 1, Figuras 1 e 2).

Quadro 1: Distâncias medidas na asa e na tíbia

Distância na asa	Pontos na Figura 1
Mediana 1 (M1)	a-b
Mediana 2 (M2)	b-d
Radial 1 (R1)	a-c
Radial 2 (R2)	c-e
Espaço E1 (E1)	b-c
Espaço E2 (E2)	d-e
Distância na tíbia	Pontos na Figura 2
Tíbia anterior (AntT1)	f-g
Tíbia anterior (AntT2)	g-h
Tíbia mediana (MedT1)	f-g
Tíbia mediana (MedT2)	g-h
Tíbia posterior (PosT1)	f-g
Tíbia posterior (PosT2)	g-h

Para cada distância escolhida foram feitas duas leituras de forma independente e por diferentes executores, através de um ensaio cego (sem identificação da população ou sexo nos cartões). Para mensuração das distâncias foi usado um sistema de captura e análise de imagem composto por Lupa esteroscópica Leica Mz 7.5 equipada com câmera digital para captura de imagem processada via computador através do programa Leica Qwin Lite As mensurações das distâncias foram expressas em micrometro ( $\mu\text{m}$ ). Foi utilizada lente de magnitude de aumento 100X para aferição das asas e lente de magnitude de aumento de 200X para as tíbias.

Os dados obtidos foram submetidos aos procedimentos de análise sugeridos por Palmer & Strobeck (1986); Palmer (1994, 2003) e Møller & Swaddle (1997) e, uma vez

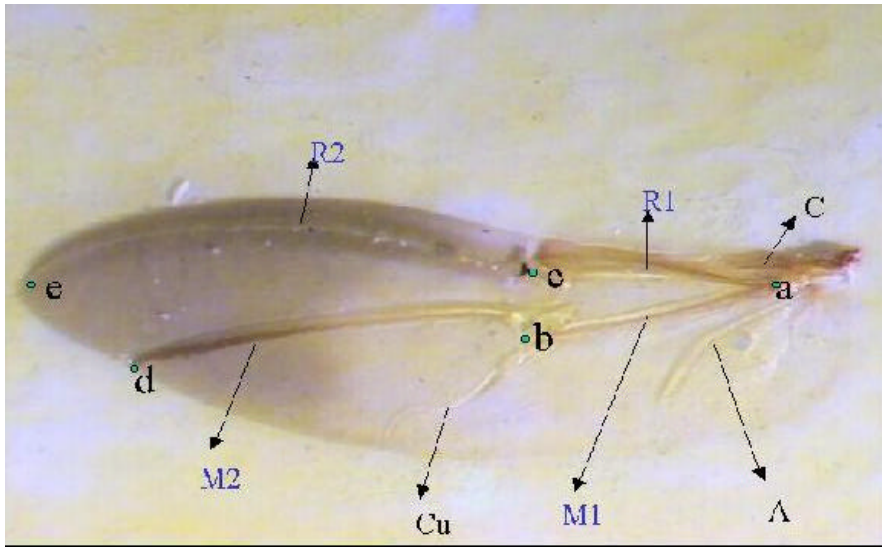


Figura 1. Características escolhidas nas asas posteriores para a análise da assimetria flutuante, em três populações do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*). Os pontos a, b, c, d, e e, correspondem aos pontos que definem as dimensões das características escolhidas. A, C, Cu, M e R, correspondem às veias Anal, Costal, Cubita, Mediana e Radial, respectivamente.

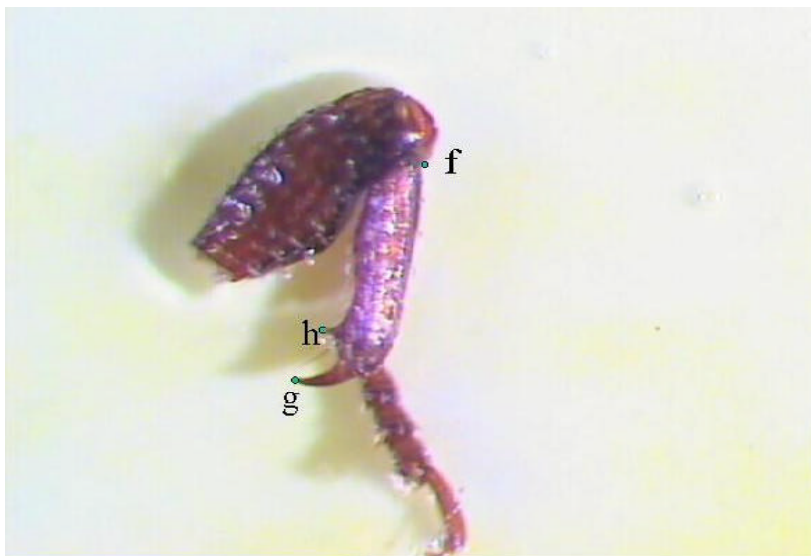


Figura 2. Pontos f, h e g, definem as dimensões das características escolhidas nas tíbias para a análise da assimetria flutuante, em três populações do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*).

atendidos os pressupostos para este tipo de análise, foram submetidos a análise de variáveis canônicas (PROC CANDISC) e análises de variância univariada quando apropriado (PROC GLM). Todas as análises foram feitas usando o programa SAS (SAS Institute 1989).

## Resultados

Com base na análise de variância (ANOVA) de modelo misto proposta por Palmer & Strobeck (1986) e Palmer (1994, 2003) não foi constatada diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre as duas leituras independentes (Tabela 1). De acordo com esse resultado, os erros de mensuração independente não comprometem a detecção de valores de assimetria obtidos nas mensurações.

Tabela 1. Teste de erro ANOVA modelo misto.

Características	QM Assimetria não direcional	QM mensuração	F
M1	18298.13	2.40	7624.20*
R1	9127.38	82.24	110.98*
E1	1304.43	6.87	44.31*
M2	3000.42	386.42	7.76*
R2	17036.90	649.80	26.21*
E2	2258.35	6.21	363.66*
AntT1	1285.62	109.20	11.77*
AntT2	210.08	6.01	34.95*
MedT1	363.84	64.60	5.66*
MedT2	318.33	10.85	29.34*
PosT1	1695.05	94.51	17.93*
PosT2	425.85	17.32	24.58*

\*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Todas as doze variáveis escolhidas para mensuração (R1, R2, M1, M2, E1, E2, AntT1, AntT2, MedT1, MedT2, PosT1e PosT2) atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância, de acordo com o procedimento PROC UNIVARIATE do software SAS (Tabelas 2, 3 e 4). Assim, todas as doze variáveis para as três populações de *S. zeamais* foram consideradas para as análises seguintes.

Foram estimados os valores de AF das doze características avaliadas. O efeito de tamanho foi considerado tanto ao nível de amostra (Tabela 5) como a nível de genótipo (combinação população-sexo) (Tabelas 6).

Tabela2. Estatística descritiva para diferenças entre lados direito e esquerdo (D-E) para as características medidas para a população do caruncho do milho *Sitophilus zeamais* proveniente de Sete Lagoas.

Característica	Fêmea						Macho					
	$n^a$	No <sup>b</sup>	Média	variância	Skewness	Kurtosis	$n$	No	Média	variância	Skewness	Kurtosis
M1	100	00	-20.098	1529.350	-0.268	-0.091	100	00	-15.323	1406.892	-0.376	-0.278
R1	100	00	-48.656	1007.566	0.909	6.828	100	00	-39.0583	492.044	-0.172	0.703
E1	100	00	1.638	398.559	-0,049	-0,169	100	00	6.442	439.822	0.045	-0.232
M2	100	00	20.519	1688.653	-0.131	0.193	100	00	19.772	1187.227	0.205	0.153
R2	100	00	60.213	1257.772	0.045	-0.074	100	00	53.030	1287.533	-0.521	0.713
E2	100	00	6.503	725.654	-0.113	1.165	100	00	8.089	640.776	0.212	0.053
AntT1	100	00	-11.009	528.891	0.044	0.063	100	00	-1.997	596.261	0.200	0.273
AntT2	100	00	4.810	11.604	-0.287	0.139	100	00	3.560	136.243	-0.441	0.328
MedT1	100	00	0.397	560.263	-0.252	-0.003	100	00	1.498	628.900	-0.049	-0.510
MedT2	100	00	-2.836	88.830	0.204	0.577	100	00	-2.484	115.632	-0.049	-0.510
PosT1	100	00	5.043	722.891	0.439	2.649	100	00	5.561	571.216	-0.039	0.103
PosT2	100	00	-2.840	127.199	0.471	1.225	100	00	-0.887	97.284	0.099	-0.588

a = tamanho da amostra; b = número de zeros

Tabela 3. Estatística descritiva para diferenças entre lados direito e esquerdo (D-E) para as características medidas para a população do caruncho do milho *Sitophilus zeamais* proveniente de Jacarezinho.

Característica	Fêmea						Macho					
	$n^a$	No <sup>b</sup>	Média	variância	Skewness	Kurtosis	$n$	No	Média	variância	Skewness	Kurtosis
M1	100	00	-34.319	2186.179	0.112	0.287	100	00	-32.686	1567.852	0.669	2.460
R1	100	00	-30.329	784.327	-0.543	1.314	100	00	-34.527	738.248	0.443	1.208
E1	100	02	1.676	646.491	0.463	0.760	100	00	2.144	676.405	-0.171	0.127
M2	100	02	14.081	1786.44	0.363	-0.290	100	00	14.348	1311.984	0.166	-0.179
R2	100	02	29.155	863.037	0.099	0.842	100	00	32.196	897.839	0.522	0.960
E2	100	02	16.313	662.575	0.313	0.258	100	00	7.650	778.017	0.134	0.127
AntT1	100	00	-10.735	463.989	0.254	-0.150	100	00	-8.122	383.030	0.084	1.317
AntT2	100	00	2.063	175.269	-0.267	1.210	100	01	4.521	240.833	-0.563	0.864
MedT1	100	00	-0.320	288.278	-0.102	-0.294	100	00	-3.828	405.932	-0.079	0.539
MedT2	100	00	-4.552	141.801	-0.532	1.487	100	00	-5.108	103.565	0.115	0.008
PosT1	100	00	-4.918	704.729	0.175	0.084	100	00	-2.250	429.113	-0.230	0.702
PosT2	100	00	-6.67	163.117	0.175	1.551	100	00	-5.214	138.710	0.593	1.531

a = tamanho da amostra; b = número de zeros

Tabela 4. Estatística descritiva para diferenças entre lados direito e esquerdo (D-E) para as características medidas para a população do caruncho do milho *Sitophilus zeamais* proveniente de Juiz de Fora .

Característica	Fêmea						Macho					
	$n^a$	No <sup>b</sup>	Média	variância	Skewness	Kurtosis	$n$	No	Média	variância	Skewness	Kurtosis
M1	100	00	-8.239	1474.276	-0.204	-0.313	100	01	-3.861	1442.011	-0.260	-0.082
R1	100	00	-26.894	750.506	-0.011	1.302	100	01	-26.059	1034.879	-0.191	0.817
E1	100	00	1.893	602.409	-0.405	1.552	100	00	10.736	690.120	-0.349	0.459
M2	100	00	2.702	1374.557	0.337	1.002	100	01	11.429	1256.086	0.183	0.796
R2	100	00	29.926	926.081	-0.512	0.720	100	01	35.762	1238.352	0.527	1.161
E2	100	00	10.870	533.865	0.194	0.082	100	01	3.277	630.708	-0.298	-0.277
AntT1	100	00	-3.930	438.748	0.468	-0.065	100	00	-4.332	776.266	0.267	0.051
AntT2	100	00	2.925	123.063	-0.102	0.506	100	00	2.452	173.703	-0.141	0.342
MedT1	100	00	-2.084	563.606	0.077	0.126	100	00	1.321	482.353	-0.314	0.665
MedT2	100	00	-2.729	125.614	0.116	-0.192	100	00	-1.561	103.916	0.167	0.442
PosT1	100	00	-4.964	460.657	0.160	-0.643	100	00	-1.852	524.669	0.242	-0.510
PosT2	100	00	-3.214	123.091	0.114	-0.358	100	01	-4.702	132.590	-0.291	-0.169

a = tamanho da amostra; b = número de zeros

Tabela 5. Correção dos valores de AF ao nível de amostra com relação ao tamanho

Características	População					
	Sete Lagoas		Jacarezinho		Juiz de Fora	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
M1	0.0082(0.08; 0.78)*	0.025(0.80; 0.37)	0.067(1.37; 0.24)	-0.076(3.88; 0.05)	-0.22(0.39; 0.55)	0.031(0.90; 0.35)
R1	0.043(1.98; 0.16)	0.043(3.11; 0.08)	-0.073(3.03; 0.08)	0.012(0.14; 0.71)	0.017(0.24; 0.63)	0.037(1.01; 0.32)
E1	0.069(3.25; 0.07)	-0.013(0.13; 0.72)	0.059(0.59; 0.44)	0.092(2.42; 0.12)	0.035(0.26; 0.61)	-0.092(1.63; 0.20)
M2	-0.0082(0.23; 0.63)	0.013(0.73; 0.39)	0.0055(0.03; 0.87)	-0.005(0.04; 0.83)	0.019(0.58; 0.45)	-0.007(0.08; 0.78)
R2	-0.015(0.97; 0.32)	0.035(6.14; 0.015)	-0.026(1.63; 0.20)	0.005(0.05; 0.82)	-0.032(3.59; 0.06)	0.026(1.03; 0.31)
E2	0.010(0.07; 0.79)	0.069(4.48; 0.04)	0.023(0.11; 0.74)	0.027(0.25; 0.62)	0.081(2.29; 0.13)	0.038(0.83; 0.37)
AntT1	0.067(9.74; 0.002)	0.067(6.45; 0.01)	0.071(5.35; 0.023)	0.032(1.28; 0.26)	0.07(7.19; 0.008)	0.035(0.93; 0.34)
AntT2	0.047(1.02; 0.32)	0.011(0.04; 0.85)	-0.19(6.52; 0.01)	0.082(0.78; 0.38)	0.081(1.36; 0.25)	0.026(0.11; 0.74)
MedT1	0.001(0.01; 0.97)	0.087(6.93; 0.01)	0.032(1.33; 0.25)	0.047(1.67; 0.20)	0.037(1.07; 0.30)	0.089(6.90; 0.01)
MedT2	0.16(9.54; 0.002)	0.042(0.45; 0.51)	-0.077(0.71; 0.40)	0.032(0.13; 0.72)	0.091(1.38; 0.24)	-0.11(2.12; 0.15)
PosT1	0.005(0.04; 0.84)	0.024(0.93; 0.34)	0.005(0.02; 0.90)	0.013(0.21; 0.65)	0.062(5.18; 0.02)	-0.012(0.17; 0.68)
PosT2	0.085(1.32; 0.25)	0.061(1.49; 0.22)	0.18(2.04; 0.16)	0.11(1.91; 0.17)	0.090(1.31; 0.25)	0.051(0.38; 0.54)

\* valores de inclinação seguidos, entre parêntesis, do valor de F e da probabilidade associada ao erro. gl erro=98)

*Tabela 6.* Correção dos valores de AF ao nível de genótipo com relação ao tamanho

Característica	Inclinação	F	p
M1	0.00074	5.33	0.08
R1	0.000076	0.01	0.93
E1	0.00039	0.04	0.85
M2	0.00026	1.49	0.29
R2	-0.00020	0.94	0.39
E2	0.00078	5.88	0.07
AntT1	-0.0017	2.35	0.20
AntT2	0.0083	0.77	0.43
MedT1	-0.0026	2.74	0.17
MedT2	0.00036	0.00	0.96
PosT1	0.00080	0.56	0.49
PosT2	0.00094	0.02	0.89

gl erro=4; n=6.

Análises de regressão são usadas para verificar a necessidade de correção para tamanho e no caso das avaliações feitas, apenas algumas instâncias demandaram tal correção e somente em relação a amostra (Tabelas 5 e 6). Face a isto foi aplicado o índice de AF=[abs(d-e)] / (d+e)/2 para corrigir o efeito do tamanho sobre os valores de AF. Onde a orreção não foi necessária, a fórmula AF=abs[d-e] foi utilizada (Palmer, 1994, 2003; Møller & Swaddle 1997).

Os valores de AF das doze características escolhidas, foram então submetidos à análise multivariada de variáveis canônicas (CVA) para as três populações de *S. zeamais* e para ambos os sexos. A CVA mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Wilks' lambda = 0,7656; F = 4,64; gl m/den = 35/2960; p < 0.0001). O primeiro e o segundo eixos canônicos, dos cinco eixos gerados, foram significativos, apresentando valores de p < 0.0001 e p = 0,005 respectivamente, explicando 90% da variância total observada (Tabela 7). As características que mais contribuíram para divergência entre os tratamentos no eixo canônico 1 foram: venação R2 , venação R1, tibia posterior PosT2 e tibia mediana MedT2. Para o segundo eixo canônico, as características que mais contribuíram para divergência foram: tibia posterior PosT1 , espaço entre venações E2 e tibia anterior AntT1 e venação R1 (Tabela 7).

O diagrama de ordenação, derivado da análise de variáveis canônicas, foi construído a partir dos dois primeiros eixos canônicos, por serem mais representativos com relação à variância total observada. Há diferença significativa entre as três populações. A população de Sete Lagoas diferiu com relação aos valores de AF das populações resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora). Estas, também diferiram entre si, mas de forma menos

acentuada. Pôde-se perceber também que não houve diferença significativa entre sexos, dentro de cada população. Além disso, fêmeas provenientes das populações resistentes, tiveram valores de AF semelhantes (Figura 3).

*Tabela 7: Eixos canônicos e suas cargas (entre estrutura canônica) relativas a flutuação em assimetria bilateral para ambos sexos em populações susceptível (Sete Lagoas) e resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora ) a inseticidas.*

Variáveis	Eixos canônicos				
	1	2	3	4	5
Venação (R1)	0.79	-0.57	0.14	0.05	0.08
Venação (R2)	0.99	0.06	-0.09	-0.01	0.01
Espaço entre venações (E2)	-0.36	0.66	-0.41	-0.32	0.39
Tíbia anterior (AntT1)	0.45	0.66	0.57	-0.14	0.14
Tíbia mediana (MedT2)	-0.59	0.56	-0.52	0.15	0.16
Tíbia posterior (PosT1)	0.40	0.71	0.40	0.38	0.01
Tíbia posterior (PosT2)	-0.77	-0.12	0.60	0.05	0.13
F	4.64	1.89	1.11	0.45	0.42
G1	35/2475.9	24/2056	15/1629.1	8/1182	3/592
P	<0.0001*	0.005*	0.334	0.893	0.742
Correlação canônica quadrática	0.173	0.047	0.021	0.003	0.002

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

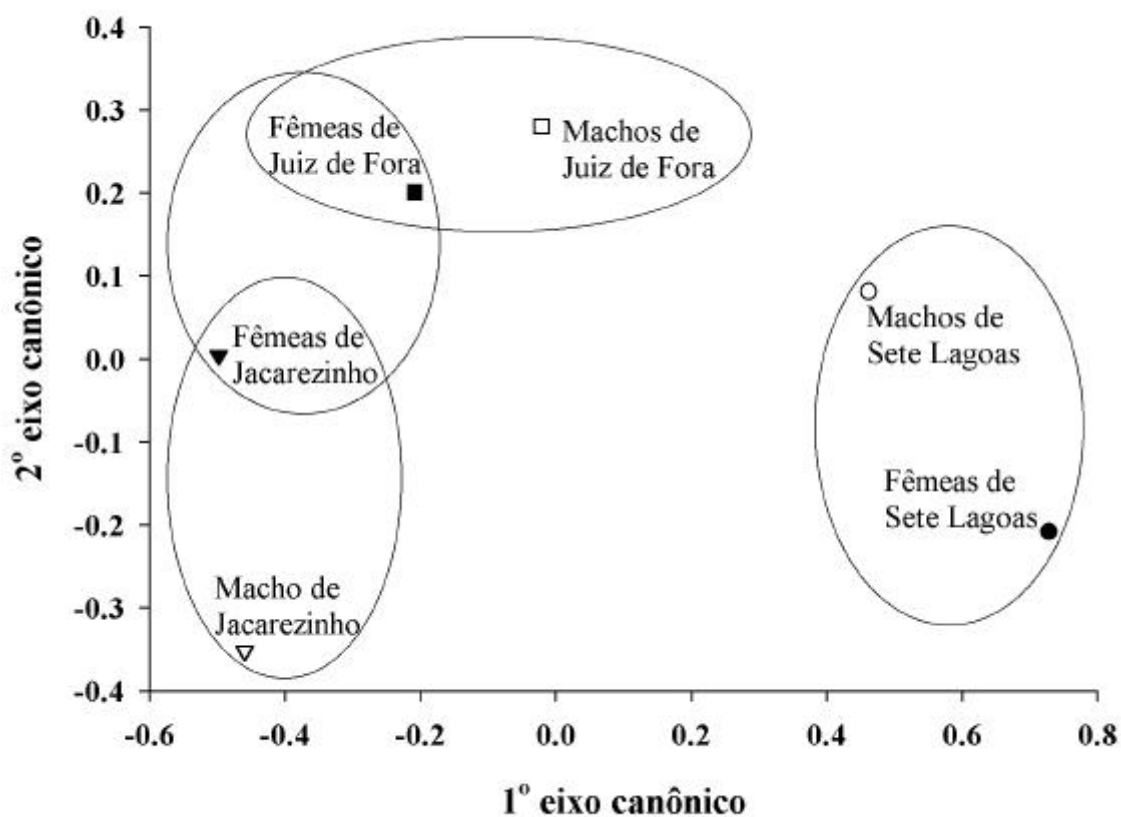


Figura 3. Diagrama de ordenação discriminando duas populações resistentes a inseticidas (Jacarezinho e Juiz de Fora), uma população susceptível de *Sitophilus zeamais* e os sexos, com relação a assimetria flutuante (AF). Os símbolos são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. Elipses representam grupos de tratamentos que não apresentaram diferença significativa entre eles. (Teste de F aproximado,  $p < 0,05$ ) baseado na distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre médias.

As sete principais determinações de AF responsáveis pela distinção dos tratamentos (R1, R2, E2, AntT1, MedT2, PostT1 e PostT2) foram submetidas a análise de variância univariada seguindo um arranjo fatorial 2 x 3 (dois sexos x três populações) (Tabela 8). A AF em R1, R2 e AntT1 mostrou diferença significativa entre tratamentos (Tabela 8). AF em R2 mostrou diferença significativa apenas entre populações (Tabela 8), com a população de Jacarezinho apresentando menores valores de AF com relação a população de Juiz de Fora e Sete Lagoas, sendo que essa última apresentou o maior valor de AF (Figura 4).

Tabela 8. Análise de variância para as principais assimetrias responsáveis pelas diferenças observadas na análise de variáveis canônicas.

Fontes De variação	Gl	R1		R2		E2		AntT1		MedT2		PosT1		PosT2	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
		Modelo	5	7.07	<0.0001*	19.18	<0.0001*	0.57	0,72	3.21	0.0072*	2.09	0.06	1.64	0.15
Erro	594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
População(P)	2	12.77	<0.0001*	47.17	<0.0001*	1.15	0.31	3.83	0.022*	2.36	0.09	0.91	0.40	3.18	0.05
Sexo(S)	1	0.43	0.51	0.00	0.99	0.01	0.91	0.00	0.97	0.04	0.85	0.20	0.65	0.29	0.59
P*S	2	4.68	0.0096*	0.77	0.46	0.26	0.77	4.19	0.016*	2.86	0.06	3.10	0.05	0.78	0.46

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

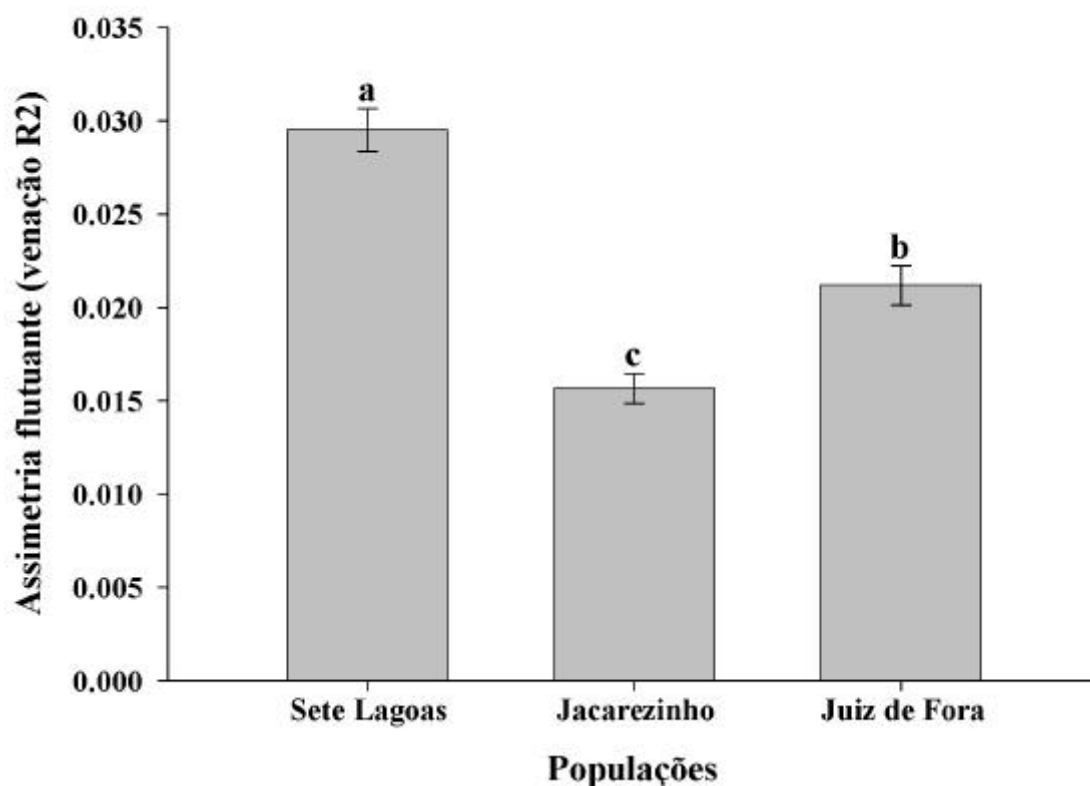


Figura 4. Assimetria Flutuante ( $\pm$ EMP) do comprimento da distância R2 (venação radial 2) da asa de três populações de *Sitophilus zeamais*. Médias seguidas pela mesma letra não se diferem significativamente a  $p < 0,05$  pelo teste F.

A AF na característica R1 mostrou diferença significativa tanto para população, quanto para interação população-sexo. Fêmeas de Sete Lagoas mostraram maiores valores de AF, seguidas de fêmeas da população resistente de Jacarezinho e de Juiz de Fora. Entretanto, não se evidenciou diferença significativa de valores de AF em machos provenientes das três populações. Além disso, foi observado maior valor de AF em fêmeas com relação aos machos na população de Sete Lagoas (Tabela 9).

Tabela 9. Assimetria flutuante ( $\pm$  EPM) do comprimento da venação R1 de fêmeas e machos de três populações do caruncho do milho *Sitophilus zeamais*.

População/ Sexo	Fêmea	Macho
Sete Lagoas	49.15 $\pm$ 2.6940 aA	39.75 $\pm$ 2.0913 aB
Jacarezinho	34.10 $\pm$ 2.4380 bA	37.93 $\pm$ 2.2148 aA
Juiz de Fora	32.20 $\pm$ 2.0869 bA	34.02 $\pm$ 2.4001 aA

Médias seguidas pela mesma letra na linha ou coluna, não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para a característica antTT1, os valores de AF em fêmeas das três populações, não diferiram significativamente. Já os valores de AF, em machos da população de Juiz de Fora, foram significativamente maiores em relação aos das populações de Sete Lagoas e Jacarezinho. Essas últimas, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si com relação a valores de AF. Dentro da população de Sete Lagoas, não houve diferença significativa entre fêmeas e machos com relação a AF. Para as populações resistentes, os níveis de AF mostraram diferenças significativas entre fêmeas e machos. No caso da população de Jacarezinho, foi observado que fêmeas têm maiores valores de AF do que os machos. Já na população de Juiz de Fora, machos apresentam maior AF do que fêmeas. (Tabela 10). As demais características não mostraram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 8).

*Tabela 10.* Assimetria flutuante ( $\pm$  EPM) do comprimento da tibia anterior AntT1 de fêmeas e machos de três populações do caruncho do milho *Sitophilus zeamais*.

População/ Sexo	Fêmea	Macho
Sete Lagoas	0.030 $\pm$ 0.0022 aA	0.028 $\pm$ 0.0022 bA
Jacarezinho	0.027 $\pm$ 0.0018 aA	0.022 $\pm$ 0.0019 bB
Juiz de Fora	0.027 $\pm$ 0.0017 aB	0.034 $\pm$ 0.0027 aA

Médias seguidas pela mesma letra na linha ou coluna, não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade.

## Discussão

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a população de Jacarezinho e de Juiz de Fora possuem menores valores de AF em relação à população de Sete Lagoas, sendo que a população de Jacarezinho foi a que apresentou menor valor de AF. Pode-se sugerir que as populações resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora) apresentam maior estabilidade de desenvolvimento em relação à população susceptível (Sete Lagoas). De acordo com Møller & Swadlow (1997), a AF pode ser usada para estimar a estabilidade desenvolvimental (estabilidade do desenvolvimento de um fenótipo em determinadas condições ambientais). Estudos feitos por White & Bell (1989), McKenzie & Batterham (1994) e Markow (1995) mostraram níveis mais elevados de AF e desvantagens adaptativas em populações da mosca-da-carcaça, *Lucilia cuprina*, resistentes ao inseticida diazinom,

quando comparadas com a população susceptível. As mesmas populações foram avaliadas 10 anos depois e os níveis de AF das populações resistentes diminuíram em relação aos valores iniciais. Possivelmente houve uma seleção a favor de determinados genes que promovem a reversão do quadro de desvantagem adaptativa. A população de Jacarezinho, provavelmente, passou pelo mesmo processo descrito acima, visto que, ela foi exposta por um longo período, a inseticidas usados na proteção de sementes armazenadas (Guedes *et al.*, 1995) o que pode ter acarretado o aumento de sua estabilidade e consequente fixação da característica da resistência, ou seja, a pressão de seleção exercida pela aplicação de inseticidas pode ter promovido a fixação de genes modificadores de performance adaptativa na população de Jacarezinho. Fragoso *et al.* (2005), estudando as mesmas populações de *S. zeamais* investigadas no presente trabalho, verificaram que a população de Jacarezinho possui performance de desenvolvimento igual a população susceptível (Sete Lagoas), sendo mais uma evidência da fixação da característica resistência a inseticidas e ausência de custos associados a este fenômeno. Fragoso *et al.* (2005) constataram ainda a existência de custo adaptativo na população de Juiz de Fora com relação à sua performance. Porém, a população de Juiz de Fora possui níveis de AF menores do que a população susceptível. A característica resistência, provavelmente está em processo de fixação nesta população e a AF parece ser uma das primeiras características de desvantagem a serem revertidas a condição normal ao longo do tempo. Indivíduos com menor grau de AF geralmente denotam melhor crescimento, alta fecundidade, resistência a patógenos e maior longevidade, ou seja, maior capacidade adaptativa (Moller, 1997).

As características que melhor representam a AF estão localizadas em estruturas de locomoção (asa e tibia) nas três populações de *S. zeamais*. Esta situação pode trazer às populações com maiores valores de AF, dificuldades para fugir de predadores, diminuição de eficiência de forrageamento, migração e acasalamento. Para realizar estas tarefas é preciso uma demanda extra de energia para compensar a deficiência morfológica. Avaliando este aspecto, a população de Jacarezinho possivelmente tem maior capacidade locomotora em relação às outras populações, já que possui a menor AF, o que lhe possibilita uma melhor capacidade de dispersão. Isso é visto como um fator facilitador de disseminação do genótipo da resistência para outros locais. A provável consequência é o estabelecimento da resistência em outras populações de outras áreas e com isso as

dificuldades de controle dessa praga aumentam. Moller (1997) comenta esse assunto sugerindo que indivíduos simétricos apresentam melhor habilidade competitiva por ter maior capacidade de locomoção e percepção do ambiente.

Vários trabalhos suportam a tese da existência de correlação entre AF e sucesso de acasalamento. Fêmeas podem selecionar machos pela AF de características morfológicas externas. As fêmeas preferem machos mais simétricos (Moller, 1996a). Nas populações de Jacarezinho e Juiz de Fora foram observados menores valores de AF para machos em relação às fêmeas. A seleção sexual pode estar acontecendo nestas populações através da escolha de machos mais simétricos. Características assimétricas podem ter efeito negativo nas funções de eficiência de forrageamento e locomoção como já foi dito anteriormente, o que, indiretamente pode causar uma redução da atratividade do macho em relação à fêmea (Moller, 1991). A AF é usada pelas fêmeas como um indicador de qualidade fenotípica de seus potenciais parceiros (Moller & Swaddle, 1997).

Armand & Haribug (2002) constataram a preferência sexual de fêmeas do besouro das farinhas *Tribolium castaneum*, por machos resistentes a inseticidas. Este fato merece atenção para o caso do *S. zeamais*. Caso ocorra o mesmo fenômeno, fêmeas de populações susceptíveis podem selecionar machos resistentes a inseticidas para acasalamento, o que acarretaria uma maior disseminação da resistência.

### Referências

- Allenbach, D.M; Sullivan, K.B. & Lydy, M.J. 1999. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. *Environmental toxicology and Chemistry*, Vol. 18. No 5, pp 899-905.
- Alves, S.N. 2000. Efeitos de Ivermectina em Larvas de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823). Dissertação de Mestrado, UFV, Imprensa Universitária Viçosa, p.63.
- Arnaud, L., Haubruge, E. 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56: 2435-2444.
- Berticat, C, Boquien, G; Raymond, M and Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research, Camb.* (2002), 79, pp. 41-47

- Clarke, G. M. & McKenzie, J. A. 1987 Developmental stability of insecticide resistant phenotypes in blowfly: a result of canalizing natural selection. *Nature* 325, 345-346.
- Foster, S.P., Harrington, R., Devonshire, A.L., Denholm, I., Devine, G.J., Kenward, M.G., Bale, J.S., 1996. Comparative survival of insecticide-susceptible and resistant peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Sulzer) (hemiptera: Aphididae), in low temperature field trials. *Bulletin of Entomological Research*. 86: 17-27.
- Foster, S.P., Harrington, R., Devonshire, A.L., Denholm, I., Clark, S.J., Muggleston, M.A., 1997. Evidence for a possible fitness trade-off between insecticide resistance and the low temperature movement that is essential for survival of UK populations of *Myzus persicae* (hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*. 87: 573-579.
- Fragoso, D. B., Guedes, R. N. C., Rezende, S. T. 2003. Biochemical mechanisms of insecticide resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109: 21-29.
- Fragoso, D. B., Guedes, R. N.C., Peternelli, L. A. 2005. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais* Journal of Stored Products Research. (241: 271-281)
- Guedes, R.N.C. 1991. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. *Seiva*, 50: 24-29.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., Santos, J. P., Cruz, C.D. 1994. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *Internat. Journal of Pest Management*. 40: 103-106.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., Santos, J. P., Cruz, C.D. 1995. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 31: 145-150.
- Guedes, R.N.C., B.A. Dover & S. Kambhampati (1996) Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and malation in Brazilian and US populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pesticide Biochemistry Physiology*. 57:156-164.
- Koehn, R. K. & Bayne, B. L. 1989. Towards a physiological and genetic understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* 37, 157-171.

- Leung, B. & Forbes, M. R. 1996 Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: effects of trait type as revealed by meta-analysis. *Ecoscience* 3, 400-413.
- Ludwig W. 1932. Das Rechts-Links Problem in Tierreich und beim Menschen, Berlin: Springer-Verlag.
- Markow, T.A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology*. 40: 105-120.
- Müller AP, Pomiankowski A (1993) Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89: 267-279
- Müller AP, Höglund J (1991) Patterns of fluctuating asymmetry in avian feather ornaments: implications for models of sexual selection. *Proc R Soc Lond B* 245:1±5
- Møller, A. P. (1996). Sexual selection, viability selection and developmental stability in the domestic fly *Musca domestica*. *Evolution* 50, 746-752.
- Møller, A.P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *Am. Nat.* 149: 916-932.
- Møller, A.P., Swaddle, J.P. 1997. *Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution*. Oxford: Oxford University, 291 p.
- McCarroll, L., Hemingway, J. 2002. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1345-1351.
- McKenzie, J.A., Batterham, P. 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol. Evol.* 9: 166-169.
- McKenzie, J.A. 1996. *Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance*. San Diego: Academic, 185p.
- Palmer, A.R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: *Developmental stability: Its Origins and Evolutionary Implications* (Ed. by T. A. Markow), pp 335-364. Dordrecht, Netherlands: kluwer.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. 2003. Fluctuating asymmetry analyses Revisited. In: Polak, M. *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. Pp 279-319. Oxford University Press. Alberta, Canada.
- Palmer, A.R., Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review and Ecological Systematics*.17: 391-421.

- Parsons, F.A. 1990. Fluctuating asymmetry: Na epigenetic measure of stress. *Biological Review*. 65: 131-145.
- Ribeiro, B. M., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E., Santos, J. P. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 39: 21-31.
- Santos, M. 2001. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of mating success in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 55: 2248-2256.
- Sommer, C. 1996. Ecotoxicology and developmental stability as an in situ monitor of adaptation. *Ambio* 25, 374-376.
- Van Valen, L.1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16:125-142.

## Conclusão Geral

Foram testadas as hipóteses da existência ou não de custos adaptativos associados ao fenômeno da resistência a inseticidas em populações resistentes e susceptível do caruncho do milho *Sitophilus zeamais*. Como parâmetro para determinar a existência de custo adaptativo foram usadas características morfológicas como área de células do corpo gorduroso, assimetria flutuante de estruturas de locomoção e taxa respiratória como características metabólicas.

O consumo de O<sub>2</sub> pode representar a soma das demandas energéticas necessária aos processos fisiológicos dos insetos e os poucos estudos que utilizam a taxa respiratória média podem demonstrar a adaptabilidade de populações de insetos a diferentes condições ambientais através de seus processos fisiológicos básicos. No caso desta investigação, foi verificada a existência de correlações entre produção de CO<sub>2</sub>, área de trofócitos e massa corporal nas três populações de *S.zeamais* estudadas, independente do sexo e população. Além disto, foi determinada a existência da relação entre a citomorfologia do corpo gorduroso e resistência a inseticidas através de incremento no acúmulo de reservas disponíveis para a resistência a inseticidas nestas populações.

A capacidade de acúmulo de reservas energéticas e sua mobilização possivelmente compensam o consumo extra de energia associado à resistência a inseticidas na população de Jacarezinho, já que esta não apresenta custo fisiológico associado a este fenômeno. No entanto, a ausência do incremento no metabolismo de energia para compensar o mecanismo de resistência, a realocação de energia pode ocasionar a diminuição da oferta deste recurso para outros processos fisiológicos do inseto. Isto possivelmente está acontecendo com a população de Juíz de Fora que apresentou vários indícios de custo adaptativo associado ao fenômeno da resistência.

As populações resistentes a inseticidas (Jacarezinho e Juíz de Fora) possuem valores menores de AF com relação à população susceptível. Sendo que a população de Jacarezinho apresentou o menor valor de AF. Podemos, então, sugerir que a população de Jacarezinho apresenta maior capacidade adaptativa por não apresentar custo fisiológico associado à resistência.

A população de Jacarezinho, por apresentar asas e tíbias mais simétricas em relação às outras populações estudadas, tem, potencialmente, uma melhor locomoção e conseqüentemente maior capacidade de dispersão.

Os menores valores de AF encontrados na população de Jacarezinho o que denota um maior equilíbrio no desenvolvimento, podem ser considerados como mais indícios da possível reversão da desvantagem adaptativa na população de Jacarezinho pode ter sido conseqüência da pressão de seleção exercida pela constante aplicação de inseticidas que possivelmente promoveu a seleção e fixação de genes modificadores de performance adaptativa nesta população.

A assimetria flutuante pode ser usada como fator de seleção sexual e os resultados obtidos neste estudo concordam com o exposto acima, visto que os machos das populações de Sete Lagoas e Jacarezinho apresentam menores valores de AF do que as fêmeas que possivelmente estariam usando AF como parâmetro para seleção de seus parceiros.

Foi conduzido também um experimento de análise molecular do mecanismo de resistência knockdown (kdr), possivelmente, presente nas populações de *Sitophilus zmais* resistentes a inseticidas usadas neste estudo. Vários estudos já descreveram pontos de mutação no gene que codifica a subunidade a do canal de sódio voltagem dependente, associadas ao mecanismo kdr. O objetivo inicial era o sequenciamento do gene que codifica a subunidade a do canal de sódio e a detecção de pontos de mutação envolvidos com o mecanismo kdr nas populações resistentes. No entanto, este objetivo não foi alcançado. Por outro lado, foi obtido o sequenciamento parcial de uma região codificadora da enzima citocromo oxidase que tem papel central no metabolismo respiratório e este resultado pode servir como ponto inicial de futuras investigações sobre alterações neste gene associadas ao metabolismo respiratório e com um possível reflexo no processo de destoxificação de moléculas inseticidas nas populações resistentes de *Sitophilus zmais*.