



**MARIANA OLIVEIRA GOMES**

**Componentes do valor adaptativo e investigação do polimorfismo genético do gene *Cyp6g1* (exons 1 e 2) em linhagens resistentes e suscetíveis de *Drosophila melanogaster* e de *Drosophila simulans***

Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética.



**MARIANA OLIVEIRA GOMES**

**Componentes do valor adaptativo e investigação do polimorfismo genético do gene *Cyp6g1* (exons 1 e 2) em linhagens resistentes e suscetíveis de *Drosophila melanogaster* e de *Drosophila simulans***

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética no Curso de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Madi-Ravazzi

---

São José do Rio Preto

2009

**MARIANA OLIVEIRA GOMES**

**Componentes do valor adaptativo e investigação do  
polimorfismo genético do gene *Cyp6g1* (exons 1 e 2) em  
linhagens resistentes e suscetíveis de *Drosophila  
melanogaster* e de *Drosophila simulans***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Madi-Ravazzi  
Professor Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Regina Baptista  
Rossit Professor Doutor  
FAMERP- São José do Rio Preto

Prof. Dr. Claudia Márcia Aparecida  
Carareto  
Professor Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 09 de abril de  
2009

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho ao meu pai, Antonio Marques Gomes (*in memoriam*), exemplo de simplicidade e humildade, fonte de sabedoria e fé, à minha mãe, Celeste da Silva Oliveira Gomes que fez do meu sonho seu maior objetivo, e ao meu irmão-amigo, Fellipe Oliveira Gomes que sempre dividiu comigo os momentos de alegrias e tristezas.

## Agradecimentos

É muito bom passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, e querer a tantos homenagear ...

É muito bom dizer **obrigada** a tanta gente que, neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço, alegrias, conseguiu se manter simplesmente presente. Por isso, as homenagens.

Ao bom Deus, a Graça de estar simplesmente viva, e ter a oportunidade de realizar este trabalho e chegar até aqui.... e que acrescentou um milhão de motivos para que eu possa dizer *Graças a Deus!*

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Lilian Madi-Ravazzi, pela eterna paciência em acompanhar todos os ritmos deste trabalho e por tantas luzes que me deu.

Ao programa da Pós-Graduação em Genética, coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Regina Bonini Domingos, por todo auxílio e atenção.

Aos Professores da Pós-Graduação em Genética pelo conhecimento transmitido.

À Capes pelo auxílio financeiro, com a bolsa de Mestrado.

À direção do IBILCE e ao Departamento de Biologia, pelas condições materiais que permitiram a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Massumi Itoyama pela oportunidade, o grande incentivo e por sempre ter acreditado em mim e em meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hermione E. M. C. Bicudo, admirável Mestre, pela disponibilidade de seu laboratório, pela ajuda e sugestões na Banca de

Qualificação e correção do *Abstract*. Além do exemplo de ética e dedicação profissional.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia M. A. Carareto pelo espaço cedido em seu Laboratório e pelas sugestões e colaborações valorosas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Morielle Versute pelas sugestões na Banca de Qualificação.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP, especialmente a Sílvia Emiko Kazama e à Rosemar Rosa Carvalho Brena, pela boa-vontade e atenção com a parte burocrática.

À Damaris dos Santos Martins por tornar nosso ambiente de trabalho mais limpo e agradável.

Aos funcionários do meio de cultura: Sebastião Dias Barbosa (Tião), Christiane da Costa Carreira Nunes e Rinneu Borges, por sempre se disporem a preparar o meio e cultura e ajudar sempre que necessário.

À secretária do Departamento, Simone Carvalho Fernandes, pela colaboração e disposição.

Ao Prof. Antonio José Manzato, pela valiosa colaboração com as análises estatísticas.

Aos Laboratórios de Citogenética de Insetos e de Mapeamento de Bovino, especialmente às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Dr<sup>a</sup> Maria Elizabete Jorge Amaral e às alunas Lucilene Regina Maschio, Rita Luiza Peruquetti e Nedenia Bonvino Stafuzza.

Aos Estagiários do Laboratório, Tiago Alves Jorge de Souza e Renata Aparecida Bernardelli, pelo convívio e ajuda.

Ao Laboratório de Evolução Molecular de Insetos.

E aos alunos: Natalia de Setta, Lilian Ricco Medeiros, Elaine Silva Dias e Fabrício Ramon Lopes pela ajuda molecular.

Ao Elias Alberto Gutierrez Carnelossi pela ajuda na análise das seqüências.

À Adriana Granzotto pela sempre ajuda, ensinamentos e amizade mesmo antes de eu ingressar na Pós-Graduação.

À Julcy, Julcimary Ricci, pelos inúmeros ensinamentos sobre técnicas laboratoriais, programas de computador, além da amizade e apoio permanente para realização deste trabalho.

Aos meus Professores, aos funcionários e colegas de Graduação que sempre torceram por mim em especial: Taise, Simara, os “Dus”, Dani, Maraisa, Aristela, Célia e Edilaine Aued.

*Algumas pessoas, entram em nossas vidas e rapidamente se vão...*

*Algumas pessoas, tornam-se amigas e ficam...deixando belos momentos em nossos corações... então, nós nunca mais seremos os mesmos porque nós fizemos bons amigos...*

*...aos meus amigos  
(Saint Germain)*

Aos colegas de Pós graduação: Aline Sumitani Murakami Lima, Hederson Vinicius de Souza, Lílian Campos Pires, Marcelo Luiz Rubio, Marina Curado Valsechi, Erica Babeto pela convivência agradável e trocas de idéia.

À minha colega de Laboratório Leiza Penariol, que muito além de colega de laboratório, foi uma amiga excepcional, compreensiva, atenciosa e sempre disposta a me ajudar e auxiliar.

À Rê (Rejane Ouchi) minha “irmãzita” querida, que se tornou uma amiga inigualável e que sempre me acalmava nos momentos de stress.



À Lê (Leliane Commar) , que além de minha vizinha e amiga foi também minha companheira de seqüenciamento e PCR, muito obrigada pela ajuda.

À Márcinha, Márcia Maria Urbanin Castanhole, pela amizade e momentos de conversas.

À Maza Alves Jacob por sua disposição e incentivo.

Ao Luis Gustavo Galego, LG, pela amizade e grande ajuda.

Às minhas companheiras de República:

Eliane pelos momentos de companhia,

Ana Carolina (Lerê) minha irmãzinha de coração que sempre me ouviu e auxiliou.

Carolina (Carol) minha companheira de cursos.

Aline (Pinga) pelos momentos de companhia.

Obrigada por também serem minha família durante esse período.

A todos meus AMIGOS que alegraram meus finais de semana em especial:

À Pamella por sua amizade sincera e por todos os momentos: desabafo, tristeza e alegria;

À Elaine pela ajuda, principalmente nestes momentos finais;

À Eidi pela amizade profissional e pessoal;

À Rosi por sua alegria contagiante

e todos os meninos e meninas da “Thurma” que sempre me animavam nos momentos que desânimo e festejavam nos momentos de alegria.

Às crianças, meus amores: Ana Beatriz, Otavio, Pedro Gabriel, Vinicius, Guilherme e Dudinha, que fizeram parte da minha vida e me alegravam.

À Bruna Villas Boas, minha cunhada, pela ajuda e torcida.

A toda minha família, que apesar da distância, sempre torceu por mim e foi meu alicerce nos momentos mais difíceis em especial:

Aos meus pais:

*“A vocês, que nos deram a vida e nos ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos escuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Pela longa espera e compreensão durante nossas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não temos palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.*

Amo vocês!”(Autor desconhecido)

Ao meu irmão que além de ser meu amigo, sempre me auxiliou em todos os momentos principalmente quando eu mais precisava.

Existem pessoas especiais que o destino nos impõe para suavizar nossas quedas, enxugar nossas lágrimas, apoiar nossa recuperação, estar ao nosso lado nas derrotas e conquistas, desinteressadamente, apenas porque independentemente do tempo que estivermos distante, é sempre bom um novo encontro. A estes, sequer preciso nomear ou quantificar, pois saberão intuitivamente a quem me dirijo.

**Muito Obrigada!!!**

*Um dia você aprende...*

*"...Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que você mesmo pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática.*

*E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar."*

*William Shakespeare*

*"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso, aprendemos sempre."*

*Paulo Freire*

*"A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência."*

*Charles Darwin*

## RESUMO

Uma questão central da evolução da resistência a inseticidas é o custo adaptativo do organismo contendo um genótipo que confere a resistência. O custo adaptativo refere-se à sobrevivência e à habilidade reprodutiva de um organismo. As mutações que conferem resistência aos inseticidas são preditas trazerem um custo na ausência dos mesmos e, conseqüentemente não se fixam nas populações. Entretanto, a resistência ao DDT em *Drosophila melanogaster* (DDT-R) está se aproximando de uma fixação global, mesmo após ter sido abolido o uso do DDT. Existem evidências consideráveis na literatura apoiando a hipótese que a resistência ao DDT baseada no metabolismo é poligênica em *Drosophila* e está parcialmente associada à superexpressão de genes do citocromo P450. Alguns trabalhos, entretanto consideram que a superexpressão de um único gene, *Cyp6g1*, associado com a inserção de um elemento transponível, *Accord* em *D. melanogaster* e *Doc* em *D. simulans*, é suficiente para promover a resistência, enquanto outros discutem que a superexpressão desse gene não confere necessariamente a resistência em *D. melanogaster*. O presente trabalho avaliou sete componentes do valor adaptativo (fertilidade, fecundidade, viabilidade ovo-pupa, viabilidade pupa-imago, viabilidade ovo-imago, longevidade e o tempo de desenvolvimento) em quatro experimentos que diferiram quanto à metodologia. Essa análise teve por objetivo avaliar o custo dos fenótipos resistentes de linhagens recém coletadas e de laboratório de *D. melanogaster* e de *D. simulans*. Além disso, foi realizada uma análise do polimorfismo dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*, de linhagens resistentes e suscetíveis de laboratório, e resistentes recém coletadas dessas espécies, com o objetivo de examinar a relação entre o nível de suscetibilidade ao DDT e o polimorfismo. Foi verificado que, mesmo após um período de dois anos em laboratório, as linhagens de *D. melanogaster* e de *D. simulans* mantiveram freqüências significantes de alelos para a resistência ao DDT, sendo nitidamente maior para *D. melanogaster* (43,09%) do que para *D. simulans* (10,30%). Isso é um reflexo de que esse (s) alelo (s) continua (m) sendo mantido(s) nas populações de laboratório, mesmo sem a pressão de seleção pelo inseticida, o

que pode ser explicado ou por sua manutenção em heterozigose, ou por não conferir custo, ou até mesmo por ser vantajoso ou estar ligado a genes que são vantajosos, principalmente em *D. melanogaster*. Pode ser que para *D. simulans*, o fenótipo resistente seja custoso ou restritivo, o que poderia explicar a sua baixa frequência quando comparada com o fenótipo resistente. As linhagens de *D. melanogaster* e de *D. simulans* mostraram ampla variabilidade intra e inter-específica quanto aos componentes do valor adaptativo estudados. Foi evidenciada uma maior fertilidade para o fenótipo resistente, corroborando os achados da literatura que indicam essa vantagem até a fase de larva, que é explicada pela presença de RNAm do gene *Cyp6g1* nos embriões, sugerindo um efeito materno de herança. No presente estudo acrescenta-se uma correlação entre o fenótipo resistente e maior longevidade.

. Em relação ao tempo de desenvolvimento destaca-se que os menores valores foram para as linhagens suscetíveis de ambas as espécies. A avaliação do polimorfismo dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1* de linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e de *D. simulans* evidenciou um número alto de substituições sinônimas inter-espécies, 17 para o exon 1 e 23 para o exon 2 e, apenas 3 substituições não sinônimas para o exon 1 e 11 para o exon 2. Para *D. simulans* foi observada uma diferença intra-específica sinônima no exon 1 (C↔T) na linhagem SC resistente recém coletada e não sinônima no exon 2 (G↔C) na linhagem LE resistente de laboratório. Em *D. melanogaster* não ocorreram substituições intra-específicas. A ausência de polimorfismo entre as linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* nos dois exons analisados indica fortemente que essa região está sob a ação de seleção purificadora, regiões essas referidas com assinaturas genéticas de mutações benéficas, ou de complexos gênicos bem coadaptados. Em *D. simulans*, foi observado um pequeno polimorfismo nos alelos das duas linhagens resistentes, evidenciando que esta região também pode estar sob seleção purificadora. Essas regiões ainda não tinham sido avaliadas em *D. simulans*. Pela análise efetuada não foi possível obter correlação entre os diferentes níveis de suscetibilidade ao DDT das linhagens e o polimorfismo das seqüências dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*. As diferenças podem estar nos distintos modos de regulação dos genes da família P450 e outros genes envolvidos no processo de resistência, que permanecem a ser investigado.

## ABSTRACT

A central matter of the evolution in insecticide resistance is the adaptive cost of the organism carrying a genotype that confers resistance. The adaptive cost refers to the survival and reproductive capacity of an organism. Mutations that confer pesticide resistance are predicted to carry a cost in the absence of the pesticide and consequently they are not fixed in the population. However, DDT resistance in *Drosophila melanogaster* (DDT-R) is closer to a global fixation, even after the suppression of DDT use. There is considerable evidence in the literature supporting the hypothesis that DDT resistance in *Drosophila*, based on metabolism, is polygenic and partially associated with overexpression of CYP genes. However, a recent study concluded that a single P450 gene, *Cyp6g1*, associated with the insertion of *Accord* element in the upstream region, in *D. melanogaster*, is sufficient to promote resistance. In a striking example of parallel evolution, the insertion of a different transposon, *Doc* element, is correlated with overtranscription of *Cyp6g1* homolog in *D. simulans* and also show to be related to resistance. Other studies disagree that the overexpression of this gene necessarily confers resistance in *D. melanogaster*. Seven fitness components (fertility, fecundity, viability – egg-pupa, pupa-imago, egg-imago – developmental time and longevity) were evaluated in the present study, in four experiments that differed in methodology. This analysis aimed at evaluating the cost of the resistant phenotype in both species. In addition, the analysis of the polymorphism of exons 1 and 2 of *Cyp6g1* gene of the susceptible and resistant strains of *D. melanogaster* and *D. simulans* was performed with the aim of examining the relationship between the degree of polymorphism and the susceptibility to DDT. *D. melanogaster* and *D. simulans* strains showed high intra and interspecific variability regarding to the components of the adaptive value studied. Higher fertility for the resistant phenotype was evident, corroborating the findings that indicate an advantage until the stage of larva, which is explained by the presence of mRNA of *Cyp6g1* in embryos, suggesting an effect of maternal inheritance. This study adds a close correlation between the resistant phenotype and increased longevity. Regarding the developmental time, the values were lower for the susceptible strains of both species. It was found that even after a period of

two years in the laboratory, *D. melanogaster* and *D. simulans* strains showed significant frequencies of DDT resistance alleles, higher in *D. melanogaster* (43.09%) than in *D. simulans* (10.30%). This may be indicative that this or these genes are maintained in the laboratory populations (even without the selective pressure by the insecticide), in heterozygosity, because they do not cause cost, or even because they are beneficial or are linked to beneficial genes, mainly in *D. melanogaster*. Perhaps for *D. simulans* the resistant phenotype is expensive or restrictive, what could explain its low frequency compared with the resistant phenotype. The assessment of the polymorphism of exons 1 and 2 of the gene *Cyp6g1* of resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* and *D. simulans* showed a high number of interspecific synonymous substitutions, 17 for exon 1 and 23 for exon 2, and only 3 non-synonymous substitutions in the exon 1 and 11 in the exon 2. An intraspecific synonymous difference in exon 1 (C ↔ T) was observed in the *D.simulans* resistant, recently collected strain SC, and a non-synonymous difference in exon 2 (G ↔ C) in the resistant, laboratory strain LE. Intraspecific substitutions were not found in *D. melanogaster*. The absence of polymorphism among resistant and susceptible *D melanogaster* strains in the two analyzed exons indicates strongly that this region is under the action of purifying selection, the regions being referred to as genetic signatures of beneficial mutations or coadapted genic complexes. In *D. simulans*, a discrete polymorphism was obtained in alleles of the two resistant strains, suggesting that this region may also be under purifying selection. These regions had not yet been assessed in *D.simulans*. In the analysis performed in the present study, it was not possible correlate the different levels of susceptibility to DDT of the strains and the polymorphism of the sequences of exons 1 and 2 of the gene *Cyp6g1*. The differences may be due to different regulation processes of the P450 family of genes and other genes involved in resistance, but this still remains to be investigated.

# SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 Valor Adaptativo	17
1.2 Resistência a inseticidas	21
1.3 Resistência a inseticida e custo adaptativo	24
1.4 Resistência X genes <i>Cyps</i> e elementos transponíveis	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 Espécies, linhagens e procedência geográfica	33
3.2 Bioensaios com DDT	33
3.3 Descrição dos cruzamentos em cada experimento	35
3.4 Avaliação dos componentes do valor adaptativo: fertilidade, fecundidade, viabilidade, longevidade e tempo de desenvolvimento	40
3.5 Análises estatísticas dos componentes do valor adaptativo	41
3.6 Investigação dos polimorfismos genético dos exons 1 e 2 do gene <i>Cyp6g1</i> em linhagens geográficas de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. simulans</i>	41
3.6.1 Extração do DNA genômico das linhagens com fenótipo resistente e suscetível	42
3.6.2 Amplificação e purificação das seqüências de interesse (exons 1 e 2 do <i>Cyp6g1</i> )	43
3.6.3 Análise evolutivas das seqüências	44
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1 Resistência ao DDT	46

---



---

4.2 Avaliação dos parâmetros do valor adaptativo: fertilidade, fecundidade, viabilidades (ovo-pupa, pupa-imago, ovo-imago), longevidade e tempo de desenvolvimento	<b>53</b>
4.3 Avaliação geral dos componentes do valor adaptativo entre os experimentos realizados	<b>76</b>
4.4 Avaliação do polimorfismo no exon 1 e no exon 2 do gene <i>Cyp6g1</i>	<b>81</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>102</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>104</b>
<b>8 APÊNDICE</b>	<b>121</b>

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Valor Adaptativo

A teoria da seleção natural descreve o processo de evolução adaptativa em termos de variação entre indivíduos na sua capacidade de contribuir com progênie para as gerações futuras (HEDRICK; MURRAY, 1983). Segundo Falconer (1981), quando um alelo está sujeito à pressão da seleção sua frequência na progênie não é a mesma que na geração paterna, pois pais com diferentes genótipos passam seus alelos desigualmente para a próxima geração. Desta maneira a seleção causa uma mudança nas frequências gênicas e, conseqüentemente, também nas frequências genotípicas, pela alteração da fertilidade, da viabilidade, ou de ambas.

A essência do conceito de seleção natural é a eficácia reprodutiva dos diferentes genótipos presentes na população. A quantificação desta eficácia pode ser feita por meio de parâmetros que refletem a habilidade de uma população sobreviver e reproduzir-se em determinado ambiente: o valor adaptativo, também referido como aptidão Darwiniana ou valor seletivo.

De acordo com Dobzhansky (1973), valor adaptativo refere-se à taxa de transmissão de genes de geração a geração: é a eficiência reprodutiva de um genótipo, de um grupo de genes, de indivíduos ou mesmo de populações inteiras. Pode ser definido operacionalmente como a contribuição que os portadores de um genótipo, ou de uma classe de genótipos, fazem para o conjunto gênico da geração seguinte, relativa à contribuição de outros genótipos; é, portanto uma medida relativa.

As diferenças genotípicas que causam contribuição diferencial para a geração seguinte dependem não somente dos efeitos diretos dos genes destacados em cada estudo, mas também dos efeitos dos outros genes do genoma e do ambiente no qual a espécie vive: um dado gene tem

efeito imediato na produção de uma substância que, em conjunção com as dos outros genes, pode afetar, direta ou indiretamente, um grande número de traços fenotípicos. Esses traços, em combinações com as circunstâncias ambientais, afetam a habilidade do organismo para sobreviver e reproduzir-se. Assim, “um dado valor adaptativo, em certa localidade ou região geográfica e em um dado momento, pode tornar-se maior ou menor no futuro ou em uma localidade diferente” (DOBZHASKY, 1968).

O valor adaptativo de um indivíduo é o resultado final de todos os processos fisiológicos e do desenvolvimento. As diferenças entre indivíduos, quanto a esses processos, são observadas em relação às variações de atributos mensuráveis; as variações do valor adaptativo podem, assim, ser teoricamente divididas em relação às variações dos caracteres mensuráveis que o compõe (FALCONER, 1981). Desse modo, a condição necessária para que a seleção ocorra é que os traços sejam geneticamente variáveis; tais variações foram amplamente demonstradas em *Drosophila* e outros organismos.

Na maioria dos estudos de mensuração do valor adaptativo são feitas medidas de um ou de poucos componentes, na suposição de que estejam positivamente correlacionados com o valor adaptativo total. Existem evidências experimentais de correlação positiva entre muitos componentes do valor adaptativo (YAMAZAKI, 1984; YAMAZAKI; HIROSE, 1984; CARARETO; MOURÃO, 1988), bem como de correlação negativa (YAMAZAKI; HIROSE, 1984; CARARETO; MOURÃO, 1988) ou de ausência de correlação (MOURÃO et al., 1972; YAMAZAKI; HIROSE, 1984; CARARETO; MOURÃO, 1988). Há, portanto caracteres cuja influência sobre o valor adaptativo é menos direta ou menos óbvia, mas que são correlacionados com outros componentes.

Segundo Prout (1971), estimativas de componentes do valor adaptativo em *Drosophila*, e em outros organismos requerem procedimentos extremamente laboriosos que quase sempre são feitos

sob condições diversas daquelas da população, sendo também frequentemente incompletas, por não incluírem o estudo de alguns componentes potencialmente importantes. Para Prout (op. cit.), essas dificuldades estão ligadas especialmente com o estudo da fase adulta do ciclo vital, precisamente que pode gerar modos complexos de seleção devidos à fertilidade diferencial e ao comportamento de acasalamento.

De acordo com Hiraizumi (1961), os principais componentes do valor adaptativo são a taxa de desenvolvimento e a fertilidade, nas fases pré-adulta e adulta, respectivamente. Também Carareto e Mourão (1988) mostraram, em *D. prosaltans*, que a contribuição relativa dos componentes do estado adulto (frequência de acasalamento, tempo de acasalamento, fecundidade e produtividade, entre outros) ou do estado larval (viabilidade ovo-pupa, pupa-imago e ovo-imago), é variável em três linhagens geográficas, sugerindo diferentes estratégias adaptativas.

De acordo com Mackay (1985), a seleção natural atua no valor adaptativo de modo que diversos caracteres são selecionados conjuntamente, com efeitos diferenciados em relação a cada um deles. A predição de respostas à seleção natural requer a identificação de todos os caracteres que, juntos, compõem o valor adaptativo, de seus pesos relativos e de suas variâncias, genética e fenotípica, bem como das covariâncias desses caracteres com o valor adaptativo e de cada caráter com os demais. Segundo o autor, a construção de um índice possibilitaria não somente a predição da resposta da população à seleção natural, nos diferentes ambientes nos quais os pesos relativos de seus componentes podem variar, como também a da evolução de componentes como uma resposta correlacionada.

As estimativas do valor adaptativo são de grande importância, especialmente quando se quer definir o modo de ação da seleção natural. Segundo Seager e Ayala (1982), o principal objetivo da genética de populações é identificar os mecanismos de ação da seleção natural e medir sua intensidade.

A forma mais direta para se medir a pressão seletiva é através da análise da reprodução de diferentes genótipos de um determinado loco, e calcular seus valores adaptativos. Embora teoricamente não existam dificuldades para a estimativa do valor adaptativo, na prática as dificuldades são virtualmente insuperáveis. Mantendo-se ainda atual a frase de Lewontin (1974): “Até o presente momento, ninguém conseguiu medir com precisão o valor adaptativo total de genótipos para qualquer loco, em qualquer espécie e em qualquer ambiente da natureza”.

Sendo a seleção a força orientadora da adaptação dos organismos aos seus ambientes, e podendo esta atuar em todas as etapas do ciclo biológico, as medidas do valor adaptativo total, mesmo em condições controladas de laboratório, são difíceis de serem feitas. Assim, mesmo em laboratório, são raras as medidas diretas do valor adaptativo e estas se referem às linhagens de *Drosophila* homozigotas para um de seus cromossomos (SVED; AYALA, 1970; SVED, 1971; MOURÃO et al., 1972; VARTANIAN, 1973; TRACEY; AYALA, 1974).

Uma vez que a seleção natural atua em qualquer estágio do ciclo biológico de um organismo e podendo esta ser diferente nestes estágios, a seleção total em organismos diplóides, segundo Bundgaard e Christiansen (1972), Hedrick e Murray (1983), Christiansen (1984) e Christiansen e Prout (2000) pode ser dividida em quatro componentes principais:

- 1) Seleção zigótica: diferencial na sobrevivência no amadurecimento dos zigotos
- 2) Seleção sexual: diferencial no amadurecimento dos indivíduos para o acasalamento
- 3) Seleção na fecundidade: variação na fecundidade dos casais
- 4) Seleção gamética: diferencial na sobrevivência dos gametas.

Inúmeros são os trabalhos sobre componentes do valor adaptativo, sendo o nível zigótico o mais estudado e usado em modelos teóricos, provavelmente por ser mais facilmente quantificado, embora os componentes da seleção sexual, gamética e para a fecundidade tenham-se mostrado como aspectos importantes em muitas situações.

## **1.2 Resistência a inseticidas**

Resistência é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “O desenvolvimento, em uma linhagem de um organismo, da capacidade de tolerar doses de tóxicos que são letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal (suscetível) da mesma espécie” (ANONYMOUS, 1957 *apud* SCOTT, 1995). Scott (1995) acrescenta que a resistência é a expressão fenotípica em uma população, de um traço herdável que já foi expresso em alguns dos indivíduos em uma população antes da exposição ao tóxico, sendo um evento pré-adaptativo.

A resistência a inseticidas é um dos maiores obstáculos que impedem o controle de pragas de importância agrícola e médico-sanitária. A resistência resulta em aumento das taxas de aplicação dos inseticidas, diminuindo a produção, causando danos ambientais, e a disseminação de doenças animais e humanas quando os vetores não podem ser controlados (PIMENTEL et al., 1992).

Dinamicamente, as populações de insetos suscetíveis expostas a toxinas por um período de tempo são gradualmente substituídas pelas populações resistentes (ROUSH; MCKENZIE, 1987; MCKENZIE, 1993; MCKENZIE, 1996).

Os tipos mais comuns de resistência encontrados nos insetos são a desintoxicação enzimática aumentada e a insensibilidade ao sítio alvo (AGOSIN, 1985; OPPENOORTH, 1985). A resistência mediada pelas monooxigenases é provavelmente o tipo mais freqüente de metabolismo baseado na resistência à inseticida (HODGSON; KULKARNI, 1983;

OPPENORTH, 1985; BRATTSTEN et al., 1986; SCOTT et al., 1991), embora em alguns casos a resistência mediada pelas esterases (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998) e pelas glutathione S-transferase (YU, 1996) sejam também importantes e significativas. Dessa forma, acredita-se que as famílias multigênicas como o citocromo P450, glutathione S-transferase e esterases forneçam meios para os animais se defenderem dos xenobióticos e de desafios do meio ambiente, tais como as plantas tóxicas e produtos químicos e microbianos encontrados nos alimentos e nas drogas, pesticidas ou poluentes orgânicos (FEYEREISEN, 1999; SCOTT; KASAI, 2004; Le GOFF et al., 2006).

Há consenso sobre o fato de que a resistência a inseticida contribui positivamente para a população de inseto-praga através da adaptação dos indivíduos ao uso de inseticidas: a dúvida começa quando o uso de inseticida é interrompido ou drasticamente modificado, circunstância em que a resistência a inseticida pode não ser tão útil (COUSTAU et al, 2000). Assim, a característica de resistência a inseticidas pode colocar indivíduos resistentes frente a uma desvantagem biológica na ausência do inseticida, desde que esteja associado a um custo adaptativo. Esse é um assunto que merece ser investigado cujos resultados poderão ajudar a suprimir ou retardar a evolução da resistência (COUSTAU et al, 2000).

Muitos exemplos de custos fisiológicos de importância prática têm sido associados com a resistência a inseticidas (COUSTAU et al, 2000; McCARROLL; HEMINGWAY, 2002). A diversidade de padrões de resistência pode impor diferentes custos sobre as populações resistentes favorecendo a fixação de alguns fenótipos resistentes sobre determinadas condições ambientais (COUSTAU et al., 2000).

*Drosophila melanogaster* tem sido utilizada como organismo modelo para o entendimento dos mecanismos de resistência e de sua evolução. A utilidade de *D. melanogaster* não é devida somente à descoberta que populações naturais têm desenvolvido resistência a toxinas liberadas no ambiente pelo homem, mas também devido às

inúmeras vantagens genéticas desta mosca: fácil acasalamento, rápido ciclo de vida, pequeno número de cromossomos e fácil manipulação cromossômica. Outras duas vantagens foram incluídas na relação: fácil transformação genética e disponibilidade de suas seqüências genômicas. A transformação genética da linhagem germinativa via vetores com elemento-P permite que fragmentos de DNA sejam inseridos em um dos cromossomos, e estas inserções persistem na progênie onde a expressão usualmente ocorre. A transformação permite que o investigador identifique seguramente um gene para a resistência clonado, como tem sido feito com muitos outros genes inseticida-resistentes (ASHOK et al., 1998; Le GOFF et al., 2003) ou para testar uma região de um gene quanto à resistência por mutagênese sítio direcionada (PITTENDRIGH et al., 1997).

*Drosophila simulans*, espécie irmã de *D. melanogaster*, também tem sido utilizada para o estudo de resistência a inseticidas devido à abundância de informações bioquímicas e genéticas disponíveis para esta espécie (WILSON, 1988; FRENCH-CONSTANT, et al., 1993; WINDELSPECHT et al., 1995). Embora estas espécies sejam estreitamente relacionadas, existem diferenças em seu tamanho populacional efetivo (AQUADRO et al., 1988), grau de diferenciação genética entre as populações (MORIYAMA; POWELL, 1996), polimorfismos de nucleotídeos (AQUADRO et al., 1988; MARTIN-CAMPOS, et al., 1992), variação protéica (CHOUDHARY; SINGH 1987; SINGH et al., 1987), e preferências ambientais (TURELLI et al., 1984). Estudos têm demonstrado que estas espécies exibem uma resposta diferencial à seleção por inseticida (WALLACE, 1986; WINDELSPECHT et al., 1995; GRANZOTTO, 2007), fazendo delas um sistema atrativo para o estudo dos efeitos da seleção sobre espécies simpátricas.



### 1.3 Resistência a inseticida e custo adaptativo

Uma questão central da evolução da resistência é o custo adaptativo do organismo transportando um genótipo que confere resistência. O custo adaptativo refere-se à sobrevivência e à habilidade reprodutiva de um organismo, e pode ser medido pela fertilidade, fecundidade, longevidade e mortalidade durante o desenvolvimento.

Operacionalmente, o valor adaptativo relativo é avaliado melhor pela medida da habilidade de linhagens resistentes competirem com uma linhagem suscetível em populações misturadas (WILSON, 2001). Quando duas linhagens de *D. melanogaster*, mutantes *Met* (resistentes ao inseticida methoprene) e selvagens, foram colocadas juntas em caixas de populações foi observada uma rápida diminuição da frequência do alelo *Met* (em poucas gerações) demonstrando a fraca competitividade de indivíduos portadores desse alelo na ausência do inseticida (MINKOFF; WILSON, 1992). Semelhantemente a *Met*, algumas linhagens resistentes têm valor adaptativo reduzido (CROW, 1954; HALPERN; MORTON, 1987; FUCHS et al., 1993). Entretanto, muitas outras têm surpreendentemente, seu valor ajustado (BEEMAN; NANIS, 1986; ROUSH; MCKENZIE, 1987; COUSTAU et al., 2000; Mc CART et al., 2005; Mc CART et al., 2008).

Considerações sobre o valor adaptativo são críticas para o entendimento da evolução da resistência. Primeiro, um alelo resultando em um fenótipo severo quando em homozigose, pode persistir em heterozigose na população. Se o heterozigoto é parcialmente resistente (como usualmente é o caso), essas moscas têm uma vantagem sobre aquelas com os genótipos suscetíveis se a toxina está presente em baixas doses. Talvez os alelos resistentes persistam dessa maneira crítica na população ao longo do tempo após a retirada da toxina do ambiente (BEEMAN; NANIS, 1986). Segundo, uma mudança genética adicional no organismo resistente pode aliviar o déficit no fenótipo. As etapas da evolução da resistência ao inseticida diazinon, foram observadas nas

populações da mosca *Lucilia cuprina* na Austrália. Numa primeira etapa, os indivíduos resistentes mostraram baixo valor adaptativo na ausência do inseticida. Entretanto, a seleção continuada no campo com diazinon resultou em um maior valor adaptativo via evolução de um gene modificador não identificado que melhorou o valor adaptativo (BEEMAN; NANIS, 1986). De fato, a frequência do alelo *Rop-1*, envolvido na resistência, permanece alta até hoje, embora o diazinon tenha sido substituído em muitas localidades pela ciromazina, que pertence a uma classe completamente diferente de inseticidas (McKENZIE, 1996). Uma hipótese para a ocorrência de seleção em variantes de genes que moderam o baixo valor adaptativo. A identificação dessas variantes tem sido difícil, provavelmente porque elas têm um fenótipo sutil. Entretanto, elas possuem uma importância óbvia para aumentar o valor adaptativo dos homocigotos e podem explicar o valor adaptativo surpreendentemente alto de muitas linhagens resistentes (BEEMAN; NANIS, 1986; ROUSH; McKENZIE, 1987). Terceiro, as restrições do valor adaptativo dos alelos resistentes podem responder pelo baixo número de diferentes alelos para resistência em sítios-alvo, que tem sido observado em populações resistentes (FFRENCH-CONSTANT et al., 1998). Uma interpretação desse achado é que são permitidas poucas mudanças nos aminoácidos que resultam em resistência e valor adaptativo, e esses são os únicos que sobrevivem a seleção. Outra possibilidade, é que as poucas mutações em ponto em genes para a resistência que tem sido detectada em populações naturais, e que resultam em resistência e alto valor adaptativo, podem se espalhar rapidamente por seleção na população. A distinção entre essas possibilidades requer métodos de genética de populações, tais como o exame de substituições nucleotídicas em sítios silenciosos (WILSON, 2001).

Linhagens resistentes de *D. melanogaster* são notavelmente ajustadas a seus ambientes. Isso parece evidente pela persistência do alelo *Rdl* em populações dos E.U.A. por muitos anos após a retirada dos

ciclodienos de uso disseminado. Essa observação sugere que uma mutação em ponto no receptor GABA tem pouco ou nenhum efeito sobre o funcionamento normal das proteínas desse receptor (WILSON, 2005). Similarmente, a resistência ao DDT (DDT-R) está se aproximando de uma fixação global, mesmo após ter sido abolido o uso intenso do DDT em atividades agrícolas, embora ainda utilizado no controle de insetos vetores (CATANIA et al., 2004). Isso pode ser devido a um outro inseticida que continuou a seleção, por resistência cruzada ou porque esse loco parece ter pouco ou nenhum efeito sobre o valor adaptativo das moscas que o transportam (WILSON, 2005; McCART et al., 2005).

#### **1.4 Resistência X genes *Cyps* e elementos transponíveis**

Alguns trabalhos da literatura indicam que a resistência pode ocorrer pelo aumento da transcrição de um gene P450 levando a um aumento da expressão da proteína e aumento da desintoxicação do inseticida (LIU; SCOTT, 1998; DABORN et al., 2002; LE GOFF et al., 2003; GRANZOTTO, 2007; KURUGANTI, et al., 2007) e, isto pode ocorrer por regulação cis ou trans do processo de transcrição (LIU; SCOTT, 1998). Portanto, é possível que a resistência à inseticidas como um caráter, pode ser mapeada em um local do genoma que é diferente do (s) gene (s) P450 envolvido (s) na resistência que também parece capaz de regular a expressão de outro (s) genes (s) P450 que não estão necessariamente envolvidos na resistência. Isto fornece um outro nível de complexidade ao estudo dos genes P450 dos insetos, por que não somente a especificidade do substrato é variável, mas a regulação dos genes *Cyps* são também sujeitas ao controle que variarão. Assim, se conhecermos quais são as enzimas P450 que estão elevadas pelos mesmos fatores regulatórios poderemos compreender os padrões de resistência cruzada.

Um resultado consistente, considerando a superexpressão das enzimas P450 em linhagens resistentes, é que a amplificação gênica parece não estar envolvida. Este é um contraste em relação à resistência mediada por esterases na qual a amplificação gênica parece ser o principal mecanismo da superexpressão destas proteínas (MOUCHES et al., 1986; FIELD; DEVONSHIRE, 1991; HEMINGWAY; KARUNARANTNE, 1998).

Em um esforço para o entendimento do papel dos genes CYPs na resistência a inseticidas, foram comparadas as expressões de muitos genes CYPs entre as linhagens resistentes e suscetíveis. Geralmente, o nível de expressão de um ou mais genes CYP é maior nas linhagens resistentes que nas linhagens suscetíveis (KURUGANTI, et al., 2007, GRANZOTTO, 2007).

Daborn et al. (2002) verificaram que o gene *Cyp6g1* é responsável pela resistência ao DDT em *Drosophila*. Nesse trabalho, linhagens de laboratório e resistentes ao DDT de diferentes regiões do globo mostraram altos níveis de expressão do *Cyp6g1* comparadas com as linhagens suscetíveis e linhagens suscetíveis transgênicas, e sobreviveram a uma concentração discriminante de DDT. Além disso, esses autores e outros (CATANIA et al., 2004) associam a inserção do elemento transponível *Accord* na região 5' e 3' flanqueadora do gene *Cyp6g1* com a superexpressão do gene *Cyp6g1*.

No trabalho de Le Goff et al. (2003), que utilizaram análises por *microarray* de todos os genes P450 de *Drosophila*, foi verificado que genes como *Cyp12d1* e *Cyp6a8* também foram selecionados usando DDT em laboratório. Além disso, um gene homólogo de *Cyp6g1* foi superexpressado em uma linhagem resistente de *D. simulans*. Foi mostrado também que as linhagens resistentes ao DDT podem conferir resistência cruzada ao neonicotinóide imidaclopride.

Modificações das etapas metabólicas são importantes na evolução da resistência a inseticidas. Mutações dos genes P450, GST e esterases

levando a mudanças nos níveis de expressão ou especificidade dos substratos podem estar ligadas a muitos casos de resistência com as enzimas responsáveis utilizando os inseticidas como substrato.

Tem sido sugerido especificamente para os genes P450 que o substrato pode induzir a expressão das enzimas envolvidas no seu metabolismo (WHITLOCK, 1986). Por exemplo, em *Papilio polyxenes* ocorre a indução dos genes *Cyp6B1* e *Cyp6B3* em resposta a um composto tóxico produzido pelas famílias de plantas Apiaceae e Rutaceae (COHEN et al., 1992; HUNG et al., 1995). Uma resposta semelhante ocorre em *Helicoverpa zea*, onde o *Cyp6B8* e *Cyp321A1* são induzidos por xantotoxinas e são capazes de metabolizá-las (LI, et al., 2003; SASABE, et al., 2004). A espécie cactofílica *D. mettleri* alimenta-se de um produto tóxico produzido nos tecidos necróticos de espécies de cactos colunar. Esse alcalóide produzido pelos cactos induz a expressão em *D. mettleri* de *Cyp4D10*, o qual tem sido sugerido estar envolvido no seu metabolismo.

Brandt et al. (2002) analisando a expressão e indução dos genes *Cyp6g1* e *Cyp12d1* em linhagens suscetíveis e resistentes de *Drosophila melanogaster* verificaram que as enzimas CYP6G1 e CYP12D1 foram superexpressas na linhagem resistente Wisconsin quando comparada com Canton S, linhagem suscetível, e somente CYP12D1 foi induzida a níveis altos de expressão quando as moscas foram expostas a altas concentrações de DDT por 24 h. O DDT não causou nenhum efeito de indução em CYP6G1.

Willoughby et al. (2006) investigaram a indução da resposta para P450s, GSTs e esterases para seis diferentes inseticidas, usando técnica de microarray em *D. melanogaster*. Esses resultados mostraram que, com exceção do DDT, os inseticidas não induziram a expressão de genes P450, GST e das esterases. A exposição ao DDT induziu um dos 37 genes GST (*GstD2*) e um dos 89 genes P450 (*Cyp12d*) e nenhum membro da família gênica das esterases. Segundo os autores, não existiu

relação significativa entre a indução, metabolismo e resistência, principalmente pelo fato de que os genes *Cyp6g1*, *Cyp6a2* e *GstD1*, os quais são implicados na resistência ao DDT em *D. melanogaster* (TANG; TU, 1994; DABORN, et al., 2002; AMICHOT et al., 2004), não foram induzidos pelo DDT.

A resistência mediada pelas monooxigenases parece evoluir usando diferentes P450 e possivelmente diferentes sinais regulatórios controlam a expressão de P450, mesmo em linhagens selecionadas com o mesmo inseticida. Scott e Kasai (2004) demonstraram que as P450s exibem uma plasticidade evolutiva em resposta a seleção de inseticidas. Esses autores observaram que a resistência metabólica mediada pelas enzimas P450 evolui via seleção diferencial de múltiplas enzimas P450 e possivelmente com diferentes sinais regulatórios, mesmo com a seleção efetuada por um mesmo inseticida. O trabalho de Festucci-Buselli et al. (2005), corroboram esses achados.

Desde longa data (WILSON, 1993) tem sido discutido o papel dos elementos transponíveis na evolução da resistência a inseticidas. Entretanto, somente recentemente os mecanismos de resistência foram sugeridos, envolvendo elementos transponíveis em populações naturais (DABORN et al., 2001; CATANIA et al., 2004; McCART, et al., 2005; FFRENCH-CONTANT et al., 2006), onde a resistência está associada com a deleção ou a inativação de proteínas alvo de inseticidas (GAHAN, et al., 2001), ou o truncamento de um gene resultando na geração de uma proteína com uma função nova (AMINETZACH et al., 2005), ou com o aumento da expressão de um gene associado com a resistência metabólica a inseticidas (DABORN et al., 2002; SCHLENKE; BEGUN, 2004; MARSANO et al., 2005). Raramente os efeitos de uma mutação causada pelo TE tem sido completamente caracterizados em nível molecular em exemplos de resistência a inseticidas e outros com a inserção de TE. Em insetos, são limitadas as evidências de seqüências acentuadoras derivadas de retrotransposons (CONTE et al., 2002) ou

elementos (MOZER; BENZER, 1994) que regulam independentemente a expressão de genes tecido- específico.

Em *D. melanogaster*, a resistência a inseticidas mapeada no loco DDT-R é devida a super expressão do gene *Cyp6g1* do citocromo P450. (DABORN et al., 2001). Em populações coletadas de diferentes localizações o aumento da expressão do *Cyp6g1* está correlacionada com a presença de 491 pb de LTR do elemento transponível *Accord*, a 291 pb antes do sítio inicial de transcrição para este gene (DABORN et al., 2002; CATANIA et al., 2004). A inserção de elementos transponíveis dentro de regiões reguladoras dos genes pode romper ou alterar a expressão gênica, pela introdução de elementos regulatórios tais como acentuadores (ARGESON et al. 1996; CONTE et al.; 2002) ou insuladores (GDULA et al., 1996; CONTE et al., 2002; PARNELL et al., 2003)

O trabalho de Chung et al. (2007) demonstrou que a LTR do *Accord* não muda o sítio de transcrição do *Cyp6g1*, mas ela carrega acentuadores tecido-específicos que resultam no aumento da expressão desse gene no ceco gástrico, intestino, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *D. melanogaster*.

Como já mencionado *D. melanogaster* não é a única espécie onde um elemento transponível tem se inserido na região 5' e 3' flanqueadora ao gene *Cyp6g1*. Em um exemplo notável de evolução paralela, o elemento *Doc*, tem se inserido na região 3' e 5' flanqueadora do gene ortólogo *Cyp6g1* de *D. simulans* e está associado com a expressão desse gene (SCHLENKE; BEGUN, 2004). O mecanismo exato da superexpressão de *Cyp6g1* em *D. simulans* ainda não tem sido caracterizado, embora seja provável que seqüências associadas ao *Doc* afetam a expressão desse gene.

Deste modo algumas questões permanecem a serem elucidadas, como por exemplo, se a inserção do *Accord* é responsável pela superexpressão de *Cyp6g1* e isto está relacionado com a resistência, embora não necessariamente, porque nem todas as linhagens que

apresentam esse elemento e superexpressam *Cyp6g1* não são resistentes? Que vantagens o loco DDT-R traz, ou outros elementos associados a ele, para as populações de *D. melanogaster* que propicia a alta frequência do fenótipo resistente nas populações desta espécie? Isto também ocorre com o gene ortólogo *Cyp6g1* de *D. simulans*? Existem diferenças polimórficas nos alelos desse gene que poderiam explicar a variação populacional na suscetibilidade aos inseticidas em *D. melanogaster* e em *D. simulans*?



## 2 OBJETIVOS

- Avaliar o custo adaptativo dos fenótipos resistentes ao DDT de *Drosophila melanogaster* e de *D. simulans* por meio de componentes do valor adaptativo.
- Investigar o polimorfismo genético dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1* de *D. melanogaster* e de *D. simulans* e relacionar com a variação da suscetibilidade.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Espécies, linhagens e procedência geográfica

Foram utilizadas diferentes linhagens geográficas de *Drosophila melanogaster* e de *Drosophila simulans*. Os experimentos foram realizados em câmara de temperatura constante a  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com exceção do experimento I, que foi realizado a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , o meio de cultura padrão foi o de banana com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*). Na Tabela 1 encontram-se discriminadas as espécies, linhagens, procedência geográfica, indicação dos experimentos em que as linhagens foram utilizadas, ano de coleta e os valores das  $CL_{50}$  (concentrações que 50% dos indivíduos submetidos ao tratamento com inseticida morrem) obtidos em trabalho anterior.

### 3.2 Bioensaios com DDT

Os níveis de suscetibilidade ao DDT foram avaliados por contato das moscas com o inseticida, as quais foram colocadas em vidros específicos para o teste (vidros de cintilação) previamente preparados como segue: 200 $\mu\text{l}$  de solução de inseticida obtida a partir de uma solução estoque (1000 $\mu\text{g}$  DDT/mL de acetona) e aplicada no vidro nas concentrações previamente estabelecidas em estudos anteriores (DARBON, 2002; GRANZOTTO, 2007). Logo após a aplicação, os vidros foram continuamente movimentados até que a acetona evaporasse totalmente. Depois de 10 horas, foi colocado um casal por tubo de cintilação e os vidros foram fechados com algodão embebido em solução açucarada (sacarose 5%) para fornecer alimento e água e evitar a dessecação das moscas. A mortalidade foi computada 24 horas após a exposição ao inseticida. Os casais que sobreviveram ao teste foram considerados resistentes e os que não sobreviveram foram considerados

**Tabela 1.** Espécies e linhagens, procedência geográfica, indicação dos experimentos em que as linhagens foram utilizadas, ano de coleta e o valor da CL<sub>50</sub> (GRANZOTTO, 2007)

Espécie	Linhagem	Procedência geográfica	Experimentos	Ano de coleta	CL <sub>50</sub>
<i>D. melanogaster</i>	RP 1	São José do Rio Preto/SP	I, II, III	2005	49,27
	RP 2	São José do Rio Preto/SP	IV	2008	n.a.
	SE	Lagarto/SE	I, II, III	2005	0,11
	LE	Lençóis/BA	III	2005	14,53
	BG	Bento Gonçalves/RS	III	2005	6,10
	SC	São Carlos/SP	IV	2008	n.a.
	Canton-S	Linhagem Padrão	III	2005	n.a.
<i>D. simulans</i>	BG	Bento Gonçalves/RS	III	2005	6,06
	OV	Onda Verde/SP	III	2005	4,88
	PF	Paulo de Faria/SP	III	2005	3,21
	LE	Lençóis/BA	III	2005	0,87
	RP	São José do Rio Preto/SP	IV	2008	n.a.
	SC	São Carlos/SP	IV	2008	n.a.

n.a.: não avaliada

suscetíveis. Não foram utilizados nos experimentos dos componentes do valor adaptativo os casais em que apenas um indivíduo sobreviveu ao teste.

No experimento III, foi realizado um outro bioensaio com o DDT colocando-se 30 indivíduos (machos ou fêmeas de três dias de idade) por tubo de cintilação, nas mesmas concentrações utilizadas nesse experimento.

### **3.3 Descrição dos cruzamentos em cada experimento**

Para a avaliação dos componentes do valor adaptativo foram realizados quatro tipos de experimentos (I, II, III e IV) que variaram principalmente quanto ao método usado para a oviposição (meio ágar ou de padrão de banana), quanto ao período da oviposição, ao número de repiques, ao tipo de cruzamento (massal ou casal), a geração utilizada (parentais ou F1) e a concentração do DDT (Tabela 2). As diferentes metodologias empregadas foram com o intuito de obter o maior número possível de casais com fenótipos resistentes e suscetíveis de mesmo *background* genético (mesma linhagem).

Foram efetuados 20 cruzamentos por casal, em cada experimento, exceto no experimento I em que foram realizados 10 cruzamentos, com moscas de três dias de idade. Os casais foram colocados em tubos de excursão com meio de cultura padrão de banana para a oviposição. Após esse período, os casais foram submetidos ao bioensaio com DDT nas concentrações de 50 µg/mL para a linhagem RP de *D. melanogaster* e de 10 µg/mL para as demais linhagens (experimento I, II e III). Essas concentrações foram utilizadas baseando-se em estudos anteriores (DARBON, 2002; GRANZOTTO, 2007) os quais obtiveram as CL<sub>50</sub> de cada uma das linhagens de laboratório avaliada no presente estudo. No experimento IV foi utilizada a concentração de 10 µg/mL para todas as linhagens (DARBON, 2002). Após os bioensaios as linhagens foram

**Tabela 2.** Caracterização dos quatro experimentos quanto às variações na metodologia utilizada e identificação da geração na qual os componentes do valor adaptativo foram obtidos

<b>Experimento</b>	<b>Tipo de cruzamento</b>	<b>Geração</b>	<b>Tempo de oviposição em dias</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Concentrações de DDT (µg/mL)</b>
<b>I</b>	casal e massal	F1	1	ágar	50 e 10
<b>II</b>	casal e massal	F1 selecionada	1	ágar	50 e 10
<b>III</b>	casal	Parental	5	banana-fermento	50 e 10
<b>IV</b>	casal	Parental	4	banana-fermento	10

classificadas em resistentes ou suscetíveis, baseando-se na sobrevivência do casal (ver descrição item 3.2). A oviposição, para análise dos componentes do valor adaptativo, foi feita no meio ágar nos experimentos I e II e em tubos de excursão contendo meio de cultura padrão de banana nos experimentos III e IV. No experimento II foram realizados também intercruzamentos entre as linhagens RP e SE de *D. melanogaster* em ambas as direções com o objetivo de avaliar o efeito materno do fenótipo resistente nos componentes do valor adaptativo.

No caso dos experimentos que se utilizou o meio à base de ágar, os casais foram introduzidos em garrafas de 1/4 L, limpas e esterilizadas, contendo uma colher plástica com meio de cultura de ágar sobre o qual foi pincelada uma mistura de fermento biológico diluído em água. Nesse experimento, os ovos foram transferidos juntamente com o meio ágar para garrafas (1/4 L) contendo o meio de cultura padrão de banana para dar continuidade ao desenvolvimento. Para os experimentos em que se utilizou o meio de cultura padrão de banana os ovos permaneceram nos tubos de excursão onde foram depositados.

#### **a. Experimento I**

Os casais permaneceram em tubos de excursão durante três dias para a oviposição e, após esse período, foram submetidos ao bioensaio com o DDT. Para o estudo dos componentes do valor adaptativo, foram efetuados cruzamentos com cinco casais de três dias de idade com a F1. Nesse experimento sete réplicas da linhagem RP e sete da linhagem SE de *D. melanogaster* foram avaliadas sem considerar-se a sua suscetibilidade ao DDT, devido a um número pequeno de fenótipos resistentes e suscetíveis. Muito embora esse experimento tenha sido considerado inicialmente como “piloto”, decidiu-se incluí-lo nas análises (Figura 1A).

### **b. Experimento II**

Nesse experimento, os casais permaneceram em tubos de excursão por cinco dias para a oviposição e, logo após este período, foram submetidos ao bioensaio com o DDT. Foram realizados novos cruzamentos por casal entre os indivíduos da F1 dessas linhagens, por mais três gerações, em que os casais também foram submetidos ao teste DDT após a oviposição. Com os descendentes da F4 foram montados cruzamentos massais com cinco casais de três dias de idade para análise dos componentes do valor adaptativo (Figura 1B). Com o intuito de analisar a existência de efeito materno agindo positivamente no valor adaptativo das fêmeas (McCart et al., 2005, 2008) foram efetuados intercruzamentos (em ambas as direções) com indivíduos resistentes da linhagem RP e indivíduos suscetíveis da linhagem SE. Os cruzamentos realizados foram com cinco casais de três dias de idade.

### **c. Experimento III**

Os casais permaneceram em tubos de excursão por cinco dias para a oviposição, com repiques diários. Após foram submetidos ao bioensaio com o DDT e os componentes do valor adaptativo foram avaliados nessa descendência (Figura 1C).

### **d. Experimento IV**

Para esse experimento os casais permaneceram em tubos de excursão por quatro dias para a oviposição, com repiques diários, e logo após foram submetidos ao bioensaio com o DDT, neste caso também os componentes do valor adaptativo foram avaliados nessa descendência (Figura 1D).

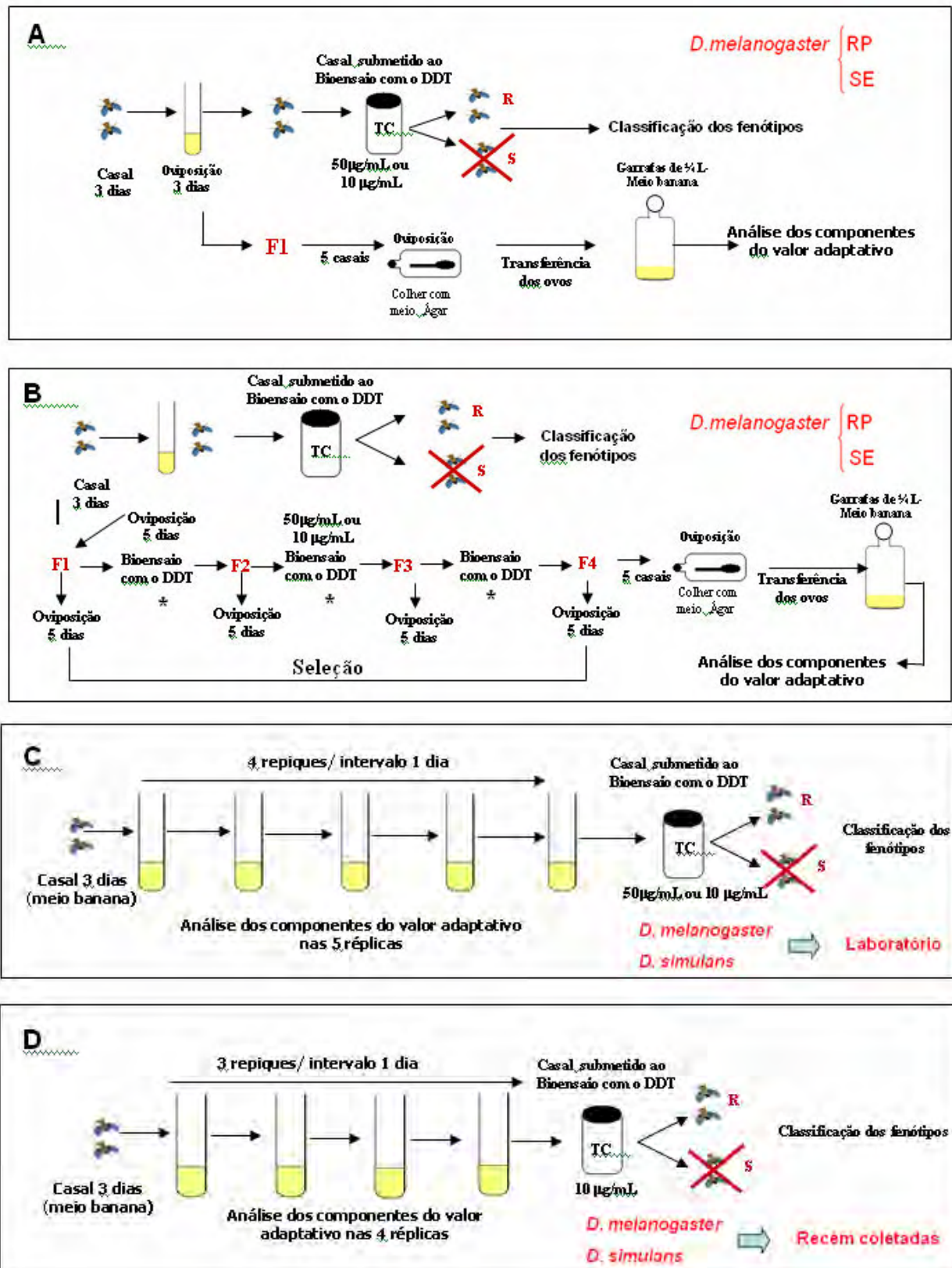


Figura 1A-D. Esquemas dos quatro experimentos realizados. **A.** Experimento I. **B.** Experimento II. **C.** Experimento III. **D.** Experimento IV. \* = casais que foram submetidos ao bioensaio com o DDT para a classificação das linhagens em resistentes e suscetíveis. TC= tubo de cintilação



### **3.4 Avaliação dos componentes do valor adaptativo: fertilidade, fecundidade, viabilidade, longevidade e tempo de desenvolvimento**

#### **a. Fertilidade**

Para essa análise foi computado o número de ovos obtido em cada experimento.

#### **b. Fecundidade**

A fecundidade foi avaliada contando-se o número de imagos emergido, separadamente e por sexo.

#### **c. Viabilidade**

Foram avaliadas em porcentagem as viabilidades: ovo-pupa; ovo-adulto e pupa-adulto de cada linhagem.

#### **d. Longevidade**

A longevidade foi avaliada individualmente (machos e fêmeas isolados em tubos, 20 indivíduos de cada) e por casal (20 casais) com o objetivo de verificar a correlação entre o esforço reprodutivo e a longevidade. Em ambos os casos, as moscas recém-nascidas foram colocadas em tubos contendo meio de cultura padrão de banana-fermento, e foram transferidas para novos tubos uma vez por semana até a morte dos indivíduos.

### **e. Tempo de desenvolvimento**

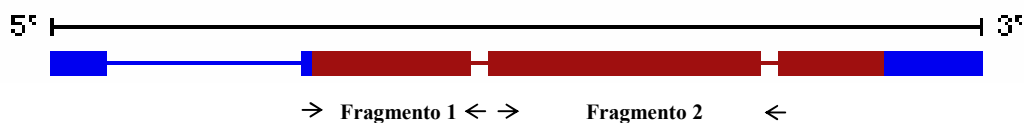
O tempo de desenvolvimento foi computado em dias em todos os experimentos avaliando-se o período desde a postura dos ovos até a emergência total dos imagos.

### **3.5 Análises estatísticas dos componentes do valor adaptativo**

Para as análises e homogeneidade das médias foram utilizados o teste *t* de Student e a análise de variância (*F*) com o critério One-Way. As médias com diferenças significantes foram determinadas pelas análises de variância (ANOVA). Foram usados para comparações múltiplas o teste Tukey e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Também foi aplicado o teste de *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) para avaliar a significância das diferenças.

### **3.6 Investigação dos polimorfismos genéticos dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1* em linhagens geográficas de *D. melanogaster* e *D. simulans*.**

O polimorfismo genético dos exons 1 (498 pb) e 2 (801 pb) do gene *Cyp6g1* (Figura 1) foi investigado nas linhagens de laboratório resistentes BG e RP, suscetíveis SE e *Canton-S* e nas linhagens recém coletadas RP e SC de *D. melanogaster*. Em *D. simulans*, foi investigado o polimorfismo na linhagem de laboratório resistente LE, na linhagem suscetível de PF e nas linhagens recém coletadas RP e SC.



**Figura 2.** Representação esquemática do gene *Cyp6g1* de *D. melanogaster*. Os retângulos representam os exons, em vermelho as regiões codificadoras e em azul as regiões não traduzidas; setas indicam as posições de anelamento do oligonucleotídeo forward e reverse dos exons 1 (Fwd: nucleotídeos 656 a 679 e Rev: nucleotídeos 1373 a 1396) e 2 (Fwd: nucleotídeos 1209 a 1232 e Rev: nucleotídeos 2220 a 2243).

### 3.6.1 Extração do DNA genômico das linhagens com fenótipo resistente e suscetível

Após o *screening* com o DDT (item 3.3) as moscas com fenótipo resistente e fenótipo suscetível foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração do DNA. O DNA genômico de cada linhagem foi extraído a partir de um “pool” de amostras de 30 indivíduos, segundo Jowett, 1986 (com modificações).

Para a extração do DNA, as moscas foram colocadas em  $700\mu\text{l}$  de Tampão de Extração com Uréia, onde foram desintegradas. Essa mistura foi incubada a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Acrescentou-se no tubo  $700\mu\text{l}$  de fenol, agitou-se por inversão do tubo por no mínimo durante 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 10 minutos. Retirou-se a fase aquosa sobrenadante e foi transferida para um novo tubo. Acrescentou-se o mesmo volume de clorofórmio: fenol (1:1) e agitou-se levemente durante 5 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos. Retirou-se a fase aquosa tomando cuidado para não tocar na interface. O conteúdo foi colocado em um novo tubo, acrescentando-se o mesmo volume de clorofórmio, agitou-se levemente durante 5

minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Para a precipitação, foi colocado o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e 20% de acetato de sódio. Agitou-se levemente até que o DNA fosse precipitado formando fios. Refrigerou-se a  $4^{\circ}\text{C}$  até o dia seguinte ou deixou pelo menos 1h no freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Centrifugou-se a 12000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi decantado em papel absorvente e o tubo foi invertido para secar o líquido à temperatura ambiente. Acrescentou-se  $100\mu\text{l}$  de etanol 70% e deixou-se por 10 minutos para que ocorresse a desidratação do DNA. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. Após esse tempo, acrescentou-se  $30\mu\text{l}$  de tampão de estabilização e incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Por fim, acrescentou-se  $1\mu\text{l}$  de RNase e incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora e 5 minutos  $60^{\circ}\text{C}$  em banho seco. Essas amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

### **3.6.2 Amplificação e purificação das seqüências de interesse (exons 1 e 2 do *Cyp6g1*)**

Foram utilizados 2 oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *Cyp6g1* que foram desenhados a partir do programa *Primer idt* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>). Os oligonucleotídeos iniciadores para o exon 1 foram: forward 5' AAACCATCGACC GTTTC AAATGCG 3' e reverse 5' ACTGAGCGCAGA TCTCCTTAATCT 3' e para o exon 2 forward 5' AGGTCAAGCAGATGTA CACCCTTA3' e reverse 5' TATGCCATGGC CACTATGTTCTTG 3'. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados são respectivamente 740 pb do exon 1 e 1034 pb do exon 2.

As amplificações foram realizadas em  $25\mu\text{L}$  de volume total de reação, contendo  $24\mu\text{L}$  Mix ( $2,5\mu\text{L}$  1X tampão Taq Polimerase

(Invitrogen) ; 1 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(2 mM); 1,25 $\mu$ L dNTP(100  $\mu$ M); 0,5 Taq DNA polimerase (Invitrogen) (2,5U/mL), 1  $\mu$ L de DNA e 10 pmoles de cada iniciador.As PCRs foram realizadas em Termociclador Mastercycler Gradiente e utilizando os parâmetros: 1) 94°C/min., temperatura inicial; 2) 94°C/min., temperatura de desnaturação; 3)55°C/min. temperatura de hibridização; 4) 72°C/3min., temperatura de extensão; 5)repetir por 37 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C/10 min., extensão final.

Os produtos de amplificação do gene foram purificados com o Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE) separadamente. A qualidade e quantidade do DNA extraído e purificado foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 Spectrophotometer, e foram enviados 50ng de DNA purificado e 10pmoles de cada iniciador para cada reação de seqüenciamento, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Jaboticabal, no qual foi utilizado o Sequenciador Automático de DNA ABI PRISM modelo 3100.N.C.M.:9027.90.99.

### **3.6.3 Análises evolutivas das seqüências**

As seqüências de DNA produzidas foram manipuladas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e os alinhamentos foram realizados pelo programa ClustalW 1.6 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) no formato *default* dos programas.

Foram calculados os números de substituições sinônimas por sítios sinônimos (dS) e de substituições não-sinônimas por sítios não-sinônimos (dN), bem como as razões dN/dS, usando o método de Nei e Gojobori (1986) com o programa Mega 3.1 (KUMAR et al. 2004). Para analisar a ocorrência de restrições seletivas nos exons 1 e 2 foi utilizado o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989), como implementado no programa

DnaSP 4.50 (ROZAS et al., 2003), que compara o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas, bem como estima a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

## 4 RESULTADOS

Todos os componentes foram avaliados separadamente em cada experimento e também foi realizada uma avaliação geral com os dados agrupados. Na Tabela 3 encontram-se os números de casais avaliados com os fenótipos resistente e suscetível obtidos em cada experimento.

### 4.1 Resistência ao DDT

Os números absolutos, porcentagens e médias dos indivíduos submetidos aos bioensaios com o DDT nos quatro experimentos encontram-se nas Tabelas de 4 a 7.

No experimento I, dos 40 indivíduos testados por casal das linhagens RP e SE de *D. melanogaster*, 25% foram resistentes, destes, 70% foram fêmeas e 30% foram machos. No experimento II, dos 298 indivíduos dessas mesmas linhagens, submetidos ao teste com o DDT, obtivemos 26,5% de resistentes, sendo 76% fêmeas e 24% machos (Tabela 4).

No experimento III, o bioensaio com o DDT foi realizado por casal e massal, como detalhado em Material e Métodos (item 3.1). Para as linhagens de *D. melanogaster*, do total de indivíduos testados (1182), 30,7% foram resistentes no método por casal e 60,6% no método massal, essas diferenças foram significantes ( $\chi^2= 53,96$ ;  $p<0,01$ ). Foi obtido no método por casal, 72,1 % de fêmeas e 27,9% de machos resistentes e no método massal 46,1% de fêmeas e 53,9% de machos resistentes para essa espécie.

Dos 689 indivíduos de *D. simulans* testados para o DDT, 13,3% foram resistentes no método por casal e 8,7% no método massal. Dos resistentes, 84,4 % foram fêmeas e 15,6% foram machos obtidos pelo método por casal e 64,1% foram fêmeas e 35,9% foram machos no método massal (Tabela 5).

Tanto para *D. melanogaster* quanto para *D. simulans* foi obtida uma porcentagem maior de fêmeas resistentes no método por casal, com diferenças significativas ( $t=3,92$  e  $t=12,94$ ;  $p<0,01$  para *D. melanogaster* e *D. simulans*, respectivamente). No método massal não foi obtida diferença significativa na comparação das porcentagens de fêmeas e machos resistentes para ambas as espécies, embora para *D. simulans*, outro teste estatístico deverá ser aplicado pelo baixo número de amostras e grande desvio apresentado (Tabela 6).

Nas comparações das médias das porcentagens do total de indivíduos resistentes de *D. melanogaster* e de *D. simulans* não foram obtidas diferenças significantes entre os métodos por casal e massal.

No experimento IV, realizado com moscas recém coletadas das linhagens RP e SC de *D. melanogaster* e *D. simulans* foi obtida uma alta porcentagem de indivíduos resistentes para ambas as linhagens das duas espécies. De 192 indivíduos de *D. melanogaster* testados para o DDT, 83,3% foram resistentes. Destes, 51,3% foram fêmeas e 48,7% foram machos. Nas comparações entre os indivíduos resistentes dessas linhagens a diferença foi significativa ( $\chi^2= 11,70$ ;  $p<0,01$ ). Em *D. simulans*, dos 82 indivíduos testados, 90,2% foram resistentes, sendo 51,4% fêmeas e 48,6% machos (Tabela 7).

Nos quatro experimentos realizados foram submetidos ao bioensaio com o DDT 1.712 indivíduos de *D. melanogaster*, desses, 47,60% foram resistentes, sendo 450 fêmeas (55,21 %) e 365 machos (44,79%). Dos 771 indivíduos de *D. simulans* submetidos ao bioensaio com o DDT, foram obtidos apenas 18,81% de indivíduos resistentes, sendo 90 fêmeas (62,07%) e 55 machos (37,93%).



**Tabela 3.** Números de casais com fenótipos resistentes (R) e suscetíveis (S) obtidos nos bioensaios com DDT e utilizados nos experimentos dos componentes do valor adaptativo ,R= resistente; S=suscetível, -: não avaliada

Experimento	Espécie	Linhagem	Fenótipos/Réplicas	
			R	S
I	<i>D. melanogaster</i>	RP	-	-
		SE	-	-
II	<i>D. melanogaster</i>	RP	15	10
		SE	0	13
III	<i>D. melanogaster</i>	BG	3	1
		LE	3	2
		RP	1	3
		SE	1	3
		Canton-S	0	3
	<i>D. simulans</i>	LE	1	3
		OV	0	3
		PF	0	3
		BG	0	3
IV	<i>D. melanogaster</i>	RP	20	0
		SC	20	0
	<i>D. simulans</i>	RP	20	0
		SC	17	0

**Tabela 4.** Números absolutos e porcentagens dos bioensaios com o DDT das linhagens RP e SE de *D. melanogaster* dos experimentos I e II

Experimento	Linhagem	Indivíduos testados	Indivíduos resistentes (%)	Total de indivíduos resistentes (%)	
				Machos	Fêmeas
I	RP	20	8 (40,0)	3 (37,5)	5 (62,5)
	SE	20	2 (10,0)	0	2 (100,0)
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>10 (25,0)</b>	<b>3 (30)</b>	<b>7 (70)</b>
II	RP	164	54 (32,9)	18 (33,3)	36 (66,7)
	SE	134	25 (18,7)	1 (4,0)	24 (96,0)
	<b>Total</b>	<b>298</b>	<b>79 (26,5)</b>	<b>19 (24,0)</b>	<b>60 (76,0)</b>

**Tabela 5.** Números absolutos, porcentagens do bioensaio com o DDT das linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* do experimento III

Método	Espécie e Linhagem	Indivíduos testados	Indivíduos resistentes (%)	Total de indivíduos resistentes (%)	
				Machos	Fêmeas
<b>Por Casal</b>	<i>D. melanogaster</i>				
	RP	228	67 (29,4)	21 (31,3)	46 (68,7)
	SE	194	35 (18,0)	2 (5,7)	33 (94,3)
	LE	40	24 (60,0)	9 (37,5)	15 (62,5)
	BG	40	28 (70,0)	11 (39,3)	17 (60,7)
	<b>Total</b>	<b>502</b>	<b>154 (30,7)</b>	<b>43(27,9)</b>	<b>111 (72,1)</b>
	<i>D. simulans</i>				
	BG	60	16 (26,7)	3 (18,75)	13 (81,25)
	PF	60	1 (1,7)	0	1 (100,0)
	OV	60	9 (15,0)	1 (11,1)	8 (88,9)
	LE	60	6 (15,0)	1 (16,7)	5 (83,3)
	<b>Total</b>	<b>240</b>	<b>32 (13,3)</b>	<b>5 (15,6)</b>	<b>27 (84,4)</b>
	<b>Massal</b>	<i>D. melanogaster</i>			
RP		243	187 (76,9)	94 (50,3)	93 (49,7)
SE		149	37 (24,8)	18 (48,6)	19 (51,4)
LE		206	106 (51,4)	53 (50,0)	53 (50,0)
BG		82	82 (100,0)	57 (69,5)	25 (30,5)
<b>Total</b>		<b>680</b>	<b>412 (60,6)</b>	<b>222 (53,9)</b>	<b>190 (46,1)</b>
<i>D. simulans</i>					
BG		10	0	0	0
PF		150	0	0	0
OV		180	20 (11,1)	10 (50,0)	10 (50,0)
LE		159	19 (11,9)	4 (21,1)	15 (78,9)
<b>Total</b>		<b>449</b>	<b>39 (8,7)</b>	<b>14 (35,9)</b>	<b>25 (64,1)</b>

**Tabela 6.** Médias e erros padrões das porcentagens do bioensaio com o DDT das linhagens de *D. melanogaster* e de *D. simulans* do experimento III. t= teste t de Student

Tipo de Teste	Espécie	Indivíduos Resistentes	Machos	Fêmeas	t
<b>Por Casal</b>	<i>D. melanogaster</i>	44,40 ± 12,30	28,45 ± 7,77	71,55 ± 7,77	<b>3,92**</b>
	<i>D. simulans</i>	14,60 ± 5,11	11,63 ± 4,20	88,38 ± 4,20	<b>12,94**</b>
<b>Massal</b>	<i>D. melanogaster</i>	63,30 ± 16,20	54,60 ± 4,98	45,40 ± 4,98	<b>ns</b>
	<i>D. simulans</i>	5,75 ± 3,32	17,80 ± 11,80	32,20 ± 19,50	<b>ns</b>

\*\* : p<0,01; ns= diferença não significativa

**Tabela 7.** Números absolutos e porcentagens do bioensaio com o DDT das linhagens RP e SC de *D. melanogaster* e *D. simulans* do experimento IV.

Espécie e Linhagem	Indivíduos testados	Indivíduos resistentes (%)	Total de indivíduos resistentes (%)	
			Machos	Fêmeas
<i>D. melanogaster</i>				
RP	136	133 (97,8)	65 (48,9)	68 (51,1)
SC	56	27 (48,2)	13 (48,2)	14 (51,8)
<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>160 (83,3)</b>	<b>78 (48,7)</b>	<b>82 (51,3)</b>
<i>D. simulans</i>				
RP	58	54 (93,1)	26 (48,2)	28 (51,8)
SC	24	20 (83,3)	10 (50,0)	10 (50,0)
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>74 (90,2)</b>	<b>36 (48,6)</b>	<b>38 (51,4)</b>

## **4.2 Avaliação dos componentes do valor adaptativo: fertilidade, fecundidade, viabilidades (ovo-pupa, pupa-imago, ovo-imago) e longevidade**

### **Experimento I**

Na comparação dos componentes do valor adaptativo entre as linhagens de *D. melanogaster*, RP e SE, foi observada uma única diferença significativa ( $t= 2,75$ ;  $p<0,05$ ) entre as médias do número de ovos. A maior viabilidade foi obtida em pupa-imago para ambas as linhagens (em torno de 95%) e a menor, em ovo-imago (em torno de 60%), sugerindo uma alta mortalidade ao nível larval (Tabela 8)

Para o estudo de longevidade foram analisados 60 indivíduos de cada linhagem. A longevidade dos machos individuais variou de 10 a 93 dias, enquanto das fêmeas variou de 10 a 99 dias. Machos por casal viveram de 18 a 93 dias e suas fêmeas viveram de 10 a 99 dias. Na análise das médias da longevidade das linhagens, as diferenças foram significantes nas comparações entre as fêmeas individuais de RP (64,39 dias) e de SE (40,30 dias) ( $t = 3,63$ ;  $p<0,01$ ), entre os machos por casal de RP (60,40 dias) e SE (43,75 dias) ( $t = 2,08$ ;  $p<0,05$ ), e das fêmeas por casal de RP (66,90 dias) e SE (47,15 dias) ( $t= 2,98$ ;  $p<0,01$ ). Essas diferenças mostram uma maior longevidade para a linhagem RP (Tabela 9)

Na avaliação do tempo de desenvolvimento (ovo-imago) as médias foram de 9,31 dias para a linhagem de SE e de 9,66 dias para a linhagem de RP e nessa comparação a diferença observada foi significativa ( $t=3,23$ ;  $p<0,01$ ).

**Tabela 8.** Médias e erros padrões do número de ovos e imagos e das porcentagens das viabilidades (ovo-pupa; pupa-imago; ovo-imago), das linhagens de *D. melanogaster*, obtidos no experimento I. t= Teste *t de Student*

Linhagem	Média dos Ovos	Média dos Imagos	Viabilidades (%)		
			Ovo-pupa	Pupa-imago	Ovo-imago
<b>RP</b>	48,14 ± 4,76	31,29 ± 3,74	72,06 ± 7,40	93,53 ± 3,99	66,99 ± 7,05
<b>SE</b>	64,29 ± 3,45	34,43 ± 5,24	56,04 ± 8,53	96,86 ± 2,26	54,29 ± 8,30
<b>t</b>	<b>2,75*</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>

\*: p<0,05 ; ns=diferença não significante

**Tabela 9.** Médias e erros padrões da longevidade (em dias) de machos e fêmeas avaliados por casal e individualmente das linhagens de *D. melanogaster* RP e SE obtidas no experimento I. t= teste *t de Student*

Linhagem	Individual		t	Casal		t	t	
	Machos	Fêmeas		Machos	Fêmeas		Machos	Fêmeas
RP	51,70 ± 5,30	64,30 ± 4,32	ns	60,40 ± 6,29	66,90 ± 5,16	ns	ns	ns
SE	55,05 ± 5,59	40,30 ± 5,00	ns	43,75 ± 4,96	47,15 ± 4,16	ns	ns	ns
t	ns	<b>3,63**</b>		<b>2,08*</b>	<b>2,98**</b>			

\*: p<0,05 ; \*\*: p<0,01; ns=diferença não significante



## Experimento II

Na comparação das médias entre as réplicas resistentes da linhagem RP (RPR) somente a diferença observada na fertilidade foi significativa e ocorreu entre RPR3 e RPR1 como avaliado pelo teste de Tukey ( $F= 4,01$ ;  $p<0,05$ ). Na avaliação das réplicas suscetíveis de RP (RPS) foi observada também somente diferença significativa na fertilidade ( $H = 4,39$ ;  $p<0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis. As réplicas da linhagem SE suscetíveis (SES) mostraram diferenças significantes na comparação das médias do número de ovos ( $F=23,60$ ;  $p<0,01$ ) e imagos ( $F=7,76$ ;  $p<0,01$ ) (Tabela 10). O teste de Tukey evidenciou que houve diferenças significantes entre todas as comparações dessas réplicas na fertilidade e em relação à média do número de imagos a diferença foi entre SES1 e SES3.

Entre as linhagens resistentes e suscetíveis de RP, foram observadas diferenças significantes na fertilidade ( $F= 6,86$ ;  $p<0,01$ ), viabilidade ovo-pupa ( $F=7,50$ ;  $p<0,05$ ) e viabilidade ovo-imago ( $F=5,49$ ;  $p<0,05$ ) (Tabela 10). Na comparação duas a duas, realizada pelo teste de Tukey, as diferenças significantes observadas na fertilidade foram entre a linhagem RPS1 e todas as outras três réplicas resistentes, outra diferença foi observada para viabilidade ovo-pupa entre RPS1 e RPR3 e na viabilidade ovo-imago entre RPS1 e RPR3.

Nas comparações entre as linhagens suscetíveis de RP e SE as diferenças significantes observadas foram no número de ovos e no de imagos, respectivamente  $F= 5,23$  e  $7,15$ ,  $p<0,05$  (Tabela 10). As combinações duas a duas significantes para a fertilidade foram entre RPS2 com RPS1, SES1 e SES2 e entre SES3 com RPS1, SES1; para a fecundidade somente a combinação SES1 e RPS2 foi significativa.

Na Tabela 11 encontram-se as análises dos dados obtidos nos inter e intracruzamentos realizados entre as linhagens resistentes de RP

(RPR) e suscetíveis de SE (SES). Na comparação entre os intercruzamentos não foi observada nenhuma diferença significativa nos componentes avaliados e entre os intracruzamentos somente a fertilidade mostrou valores significantes ( $t=4,96$ ,  $p<0,01$ ). Quando comparados os inter com os intracruzamentos, a única diferença observada também foi na fertilidade ( $F=5,26$ ;  $p<0,01$ ) que foi entre os intracruzamentos de RPR e o intercruzamento F RPR x M SES.

No estudo de longevidade foram analisados 192 indivíduos de RP resistente (RPR), 120 indivíduos de RP suscetível (RPS), 180 indivíduos de SE suscetível (SES) e 60 indivíduos em cada intercruzamento (F RPR x M SES; F SES x M RPR). A longevidade dos machos individuais variou de 15 a 119 dias e a das fêmeas de 15 a 135 dias. Os machos por casal viveram de 6 a 139 dias e as fêmeas de 5 a 127 dias. Foram significantes as comparações entre as médias das fêmeas individuais ( $F=2,46$ ;  $p<0,05$ ), dos machos por casal ( $F=3,35$ ;  $p<0,05$ ) e de suas fêmeas ( $F=3,06$ ;  $p<0,05$ ) nas diferentes linhagens e cruzamentos. As diferenças significantes nas médias obtidas pelo teste de Tukey foram nas combinações para machos acasalados entre SES e RPR, para fêmeas por casal entre o F RPR x M SES e RPR e entre F RPR x M SES e SES. Nas comparações entre as médias dos machos individuais com as das fêmeas individuais a única diferença significativa observada foi em RPS ( $t=2,53$ ;  $p<0,05$ ). A diferença significativa entre as médias de machos e fêmeas por casal foi somente para a linhagem SES ( $t=2,76$ ;  $p<0,01$ ). Não foi observada diferença significativa na comparação entre machos individuais com machos por casal e entre fêmeas individuais com fêmeas por casal, nas diferentes linhagens e cruzamentos (Tabela 12). Comparando-se as linhagens RP resistentes (RPR) com RP suscetíveis (RPS), foram observadas diferenças significantes para as fêmeas individuais ( $F=2,30$ ;  $p<0,05$ ) e machos por casal ( $F=2,31$ ;  $p<0,05$ )(Tabela 12).

Na avaliação do tempo de desenvolvimento (ovo-imago) não houve diferenças significantes entre as linhagens resistentes (T.D.=9,00 dias) e suscetíveis (t.d.=9,00 dias) e entre os inter cruzamentos efetuados em ambas as direções com essas linhagens (T.D.=8,00 dias) (Tabela 13).

**Tabela 10.** Médias e erros padrões do número de ovos e imagos e das porcentagens das viabilidades (ovo-pupa; pupa-imago; ovo-imago) das linhagens de *D. melanogaster* obtidos no experimento II. *F* para homogeneidade das médias; *H*= análise não-paramétrica (Kruskal-Wallis)

Linhagem	Média dos Ovos	Média dos Imagos	Viabilidades (%)		
			Ovo-pupa	Pupa-imago	Ovo-imago
Resistente					
RPR1	80,00 ± 4,46	15,20 ± 1,96	20,46 ± 1,89	92,30 ± 3,48	18,30 ± 1,59
RPR2	101,00 ± 9,43	28,20 ± 11,40	31,10 ± 11,60	88,50 ± 5,67	28,60 ± 11,50
RPR3	115,00 ± 11,20	16,00 ± 6,42	15,72 ± 5,57	81,86 ± 5,38	13,02 ± 4,36
<b>F</b>	<b>4,01*</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
Suscetível					
RPS1	37,40 ± 4,76	16,80 ± 3,99	49,62 ± 7,26	88,44 ± 4,75	44,74 ± 8,06
RPS2	80,80 ± 15,30	31,20 ± 8,08	44,36 ± 7,88	86,92 ± 5,55	39,10 ± 8,00
<b>H</b>	<b>4,39*</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
SES1	16,60 ± 3,87	5,20 ± 1,77	33,10 ± 9,73	74,30 ± 19,40	31,80 ± 10,10
SES2	46,00 ± 7,04	13,40 ± 4,15	35,04 ± 7,42	81,40 ± 8,96	31,00 ± 8,57
SES3	79,67 ± 7,22	28,67 ± 6,89	51,30 ± 12,00	69,60 ± 4,90	35,67 ± 8,37
<b>F</b>	<b>23,60**</b>	<b>7,76**</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
<b>F<sub>RPR x RPS</sub></b>	<b>6,86**</b>	<b>ns</b>	<b>7,50*</b>	<b>ns</b>	<b>5,49*</b>
<b>F<sub>RPS x SES</sub></b>	<b>5,23*</b>	<b>7,15*</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; ns=diferença não significante

**Tabela 11.** Médias e erros padrões número de ovos e imagos e das porcentagens das viabilidades (ovo-pupa; pupa-imago e ovo-imago) entre os cruzamentos das linhagens de *D. melanogaster* resistentes (RPR) e suscetíveis (SES) obtidos no experimento II. M= macho, F= fêmea. *F* para homogeneidade das médias; *t*=Teste *t de Student*

Cruzamentos		Média dos Ovos	Média dos Imagos	Viabilidades (%)		
F	M			Ovo-pupa	Pupa-imago	Ovo-imago
RPR	SES	43,70 ± 7,69	18,00 ± 4,59	52,42 ± 8,56	83,73 ± 4,97	44,63 ± 8,82
SES	RPR	59,40 ± 15,6	13,40 ± 2,70	39,06 ± 9,83	69,00 ± 10,70	29,82 ± 9,09
RPR	RPR	90,80 ± 6,10	21,70 ± 5,87	25,79 ± 5,80	90,40 ± 3,20	23,44 ± 5,72
SES	SES	39,70 ± 8,31	12,70 ± 3,31	38,64 ± 4,44	85,74 ± 5,33	35,00 ± 5,18
<i>t</i> <sub>RPRxRPR SESxSES</sub>		<b>4,96**</b>	ns	ns	ns	ns
F		<b>5,26**</b>	ns	ns	ns	ns

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; ns= diferença não significativa

**Tabela 12.** Médias e erros padrões da longevidade (em dias) de machos e fêmeas avaliados individualmente e por casal no experimento II. *F* para a homogeneidade das médias; *t*= teste *t de Student*

Cruzamentos		Individual			Casal			t	
		Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas
<b>M</b>	<b>F</b>								
<b>RPR</b>	<b>RPR</b>	50,65 ± 4,06	60,55 ± 4,16	ns	52,63 ± 3,62	53,58 ± 3,67	ns	ns	ns
<b>RPS</b>	<b>RPS</b>	56,10 ± 5,85	76,29 ± 5,43	<b>2,53*</b>	65,58 ± 4,29	63,05 ± 4,17	ns	ns	ns
<b>SES</b>	<b>SES</b>	58,65 ± 4,62	62,47 ± 4,27	ns	69,82 ± 4,19	54,50 ± 3,54	<b>2,76**</b>	ns	ns
<b>SES</b>	<b>RPR</b>	59,30 ± 7,55	53,35 ± 8,51	ns	72,15 ± 6,77	75,30 ± 6,86	ns	ns	ns
<b>RPR</b>	<b>SES</b>	60,70 ± 7,69	75,70 ± 7,72	ns	71,15 ± 7,79	64,75 ± 6,46	ns	ns	ns
	<b>F</b>	ns	<b>2,46*</b>		<b>3,35 *</b>	<b>3,06*</b>			
	<b>F<sub>RPR x RPS</sub></b>	ns	<b>2,30*</b>		<b>2,31*</b>	ns			

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; ns= diferença não significativa

**Tabela 13.** Médias e erros padrões do tempo de desenvolvimento (em dias), das linhagens de *D. melanogaster*, obtidos no experimentos II. N= número de imagos emergidos; F=homogeneidade das médias; t= Teste *t de Student*. RPR: linhagem Rio Preto resistente, SES: linhagem Sergipe suscetível. M= macho, F= fêmea

<b>Linhagem</b>	<b>Média e erro padrão</b>	<b>N</b>
<b>Resistentes</b>		
RP1	9,00 ± 0,00	74
RP2	9,01 ± 0,00	141
RP3	9,00 ± 0,00	80
<b>Suscetíveis</b>		
RP1	9,00 ± 0,00	82
RP2	9,01 ± 0,00	156
SE1	9,00 ± 0,00	26
SE2	9,03 ± 0,02	67
SE3	9,02 ± 0,01	86
<b>Cruzamentos</b>		
F RPRx M SES	8,00 ± 0,00	180
F SESx M RPR	8,00 ± 0,00	134

\*\* :  $p < 0,01$

### Experimento III

Em uma análise geral das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* verifica-se a existência de uma variabilidade entre as linhagens nos diferentes componentes avaliados, com maior diferença para a fertilidade (número de ovos) e fecundidade (número de imagos), do que para a viabilidade (Tabela 14).

Entre todas as linhagens resistentes de *D. melanogaster*, BG demonstrou maior fertilidade, produtividade e altas viabilidades. Nas linhagens suscetíveis dessa espécie, obtivemos um único casal suscetível para BG e dois para LE, sendo que, para essa última linhagem, obtivemos os menores valores médios de fertilidade e fecundidade. Nesse grupo de linhagens RP foi a linhagem em que se obteve as maiores médias na fertilidade, fecundidade e viabilidades. Canton-S, a linhagem suscetível padrão de laboratório, também mostrou valores baixos quando comparada, por exemplo, com RP suscetível.

Para *D. simulans*, foi obtida uma única linhagem resistente, LE, a qual mostrou valores baixos na fertilidade e fecundidade quando comparada com a linhagem BG resistente e RP suscetível de *D. melanogaster*, que apresentaram os maiores valores para esses componentes. E, quando comparada em valores numéricos com as suscetíveis de *D. simulans*, os valores foram notadamente superiores. De modo geral, os valores para as viabilidades também foram altos e superiores a algumas linhagens suscetíveis de *D. simulans*, principalmente para a viabilidade ovo-imago (Tabela 14).

As linhagens suscetíveis de *D. simulans* mostraram valores baixos de fertilidade e fecundidade quando comparadas com a maioria das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster*, e em alguns



casos viabilidades mais baixas também, principalmente a viabilidade ovo-imago para OV, PF e BG.

Nesse experimento devido ao número diferente de réplicas entre as linhagens utilizadas, elas foram agrupadas em resistentes e suscetíveis, para viabilizar alguns testes estatísticos. Assim, foram feitas comparações entre três grupos: linhagens resistentes de *D. melanogaster*, linhagens suscetíveis de *D. melanogaster* e linhagens suscetíveis de *D. simulans*. Pelo fato da linhagem LE resistente de *D. simulans* ter apenas uma réplica ela não pode ser incluída nas comparações estatísticas. Entre as suscetíveis de *D. melanogaster* e de *D. simulans* para número de ovos ( $F=4,84$ ;  $p<0,05$ ) e número de imagos ( $F=9,22$ ;  $p<0,01$ ) (Tabela 14).

Para o estudo de longevidade em *D. melanogaster* foram considerados os dados obtidos nas linhagens resistentes LE e BG e nas linhagens suscetíveis RP, SE e *Canton-S* (Tabela 15).; e para *D. simulans* foram analisados os indivíduos da linhagem resistente LE e das linhagens suscetíveis OV, BG, LE (Tabela 16). Nesta análise foram avaliados 366 indivíduos da espécie de *D. melanogaster* e 183 indivíduos de *D. simulans*.

Os machos individuais de *D. melanogaster* viveram de 16 a 151 dias ( $78,83 \pm 3,59$ ) e as fêmeas individuais viveram de 23 a 158 dias ( $95,47 \pm 3,83$ ); os machos e fêmeas por casal viveram de 23 a 142 dias ( $86,92 \pm 3,60$ ;  $70,21 \pm 3,93$ ). Em *D. simulans*, os machos individuais viveram de 23 a 148 dias ( $80,12 \pm 5,56$ ) e as fêmeas individuais viveram de 19 a 129 ( $61,94 \pm 4,40$ ); machos por casal viveram de 19 a 127 dias ( $68,05 \pm 7,94$ ) e as fêmeas por casal viveram de 20 a 127 dias ( $71,08 \pm 7,62$ ).

Dentre as linhagens de *D. melanogaster* as diferenças foram significantes nas comparações entre os machos individuais ( $F=7,73$ ;  $p<0,01$ ) e machos por casal ( $F=6,13$ ;  $p<0,05$ ). Na comparação duas a duas de Tukey essas diferenças foram observadas entre RP suscetível

(RPS) (71,60 dias) com SE suscetível (SES)(98,70 dias) e *Canton-S* (48,15 dias) com SES (98,70 dias), LE resistente (LER) (81,10 dias) e BG resistente (BGR)(92,10) para machos individuais e entre *Canton-S* (44,20 dias) com SES (93,95 dias), LER (87,45 dias) e BGR (88,65 dias) para machos por casal (Tabela 15).

Nas comparações entre machos com fêmeas individuais e entre machos com fêmeas por casal foram significantes as diferenças observadas nas linhagens LER, RPS e *Canton-S* (Tabela 15). Foram significantes também as diferenças obtidas entre machos individuais com machos por casal ( $F= 2,96$ ;  $p<0,01$ ) na linhagem RPS entre fêmeas individuais com fêmeas por casal na linhagem LER ( $F= 2,35$ ;  $p<0,05$ ) e na linhagem RPS ( $F= 2,50$ ;  $p<0,05$ ). Na comparação entre as linhagens resistentes (LER e BGR) e suscetíveis (RPS, SES, *Canton-S*) não foi observada diferença significativa (Tabela 15).

Na Tabela 16 encontram-se as análises da longevidade realizada nas linhagens de *D. simulans*. Foram obtidas diferenças significantes na comparação entre machos individuais de todas as linhagens ( $F= 4,09$ ;  $p<0,05$ ) e entre os machos individuais da linhagem resistente com as linhagens suscetíveis ( $F= 3,00$ ;  $p<0,01$ ). Na análise de Tukey as diferenças foram entre OV suscetível (56,50 dias) com LE suscetível (92,30 dias) e com LE resistente (LER) (104,14 dias). Na comparação entre machos e fêmeas individuais as diferenças significantes foram observadas nas linhagens LER ( $t= 4,40$ ;  $p<0,01$ ) e BG suscetível ( $t= 2,46$ ;  $p<0,05$ ).

No experimento III, as médias para o tempo de desenvolvimento para *D. melanogaster* ficaram entre 11,89 e 14,40 dias para as linhagens resistentes e entre 12,45 e 14,00 dias para as linhagens suscetíveis, em *D. simulans* foi de 13,42 dias para a linhagem resistente (LE) e entre 10,50 a 12,21 dias para as linhagens suscetíveis. Foram obtidas diferenças significantes nas comparações entre as linhagens resistentes de *D. melanogaster* ( $F= 45,68$ ;  $p<0,01$ ) e entre as linhagens resistentes e

suscetíveis dessa espécie ( $F= 18,58$ ;  $p<0,01$ ) (Tabela 17). Na comparação duas a duas das linhagens resistentes, as diferenças ocorreram entre BG-R com LE-R, SE-S, RP-S e *Canton-S* e entre LE-R com RP-R, SE-S E RP-S.

Nas linhagens de *D. simulans*, as diferenças foram significantes entre as linhagens suscetíveis ( $F= 19,22$ ;  $p<0,01$ ) e na comparação dessas linhagens com a linhagem resistente LE-R ( $F=36,12$ ;  $p<0,01$ ) (Tabela 17). Na comparação duas a duas a linhagem LE-R apresentou diferença significativa com todas as outras linhagens suscetíveis e entre as linhagens suscetíveis as diferenças significantes foram entre LE-S com PF-S e BG-S e entre OV-S com PF-S e BG-S.

**Tabela 14.** Médias e erros padrões do número de ovos e de imagos e das porcentagens das viabilidades (ovo-pupa; pupa-imago; ovo-imago) das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans* do experimento III. *F* para homogeneidade das médias; -: teste estatístico não realizado

Linhagem	Média dos Ovos	Média dos Imagos	Viabilidades (%)		
			Ovo-pupa	Pupa-imago	Ovo-imago
<i>D. melanogaster</i>					
<b>Resistente</b>					
<b>BGR</b>	97,70 ± 10,50	79,00 ± 8,08	90,27 ± 3,19	89,93 ± 4,20	81,03 ± 4,21
<b>LER</b>	51,00 ± 4,73	45,00 ± 7,09	86,83 ± 7,72	99,37 ± 0,63	87,07 ± 6,64
<b>RPR</b>	36,00 -	32,00 -	91,7 -	96,90 -	88,90 -
<b>Suscetível</b>					
<b>BGS</b>	61,00 -	42,00 -	85,20 -	80,70 -	68,80 -
<b>LES</b>	7,00 ± 4,00	4,50 ± 3,50	57,60 ± 24,30	94,4 ± 5,60	53,00 ± 19,7
<b>RPS</b>	90,33 ± 6,17	75,33 ± 5,17	91,07 ± 3,84	90,90 ± 4,15	83,40 ± 0,55
<b>SES</b>	61,3 ± 14,10	47,70 ± 18,80	78,30 ± 12,50	88,97 ± 8,30	71,40 ± 15,90
<b>Canton-S</b>	34,33 ± 8,11	17,33 ± 3,84	68,6 ± 13,50	77,57 ± 4,71	52,37 ± 7,91
<i>D. simulans</i>					
<b>Resistentes</b>					
<b>LER</b>	45,00 -	38,00 -	86,70 -	97,4 -	84,40 -
<b>Suscetíveis</b>					
<b>OVS</b>	17,67 ± 4,63	11,00 ± 4,58	65,6 ± 17,8	81,30 ± 9,83	55,90 ± 18,6
<b>PFS</b>	10,33 ± 2,60	5,67 ± 2,19	77,8 ± 11,1	71,70 ± 17,40	52,23 ± 7,79
<b>LES</b>	14,00 ± 1,00	10,00 ± 0,58	89,10 ± 7,39	80,97 ± 3,01	72,57 ± 8,48
<b>BGS</b>	6,00 ± 1,00	3,67 ± 0,88	80,93 ± 9,53	76,70 ± 14,50	59,9 ± 6,29
<b>F<sub>D.mel, S x D.sim S</sub></b>	<b>4,84*</b>	<b>9,22**</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>

\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; ns=diferença não significante

**Tabela 15.** Médias e erros padrões da longevidade (em dias) de machos e fêmeas avaliados individualmente e por casal de *D. melanogaster* obtidos no experimento III. F homogeneidade das médias; t= teste *t de Student*

Linhagem	Individual			Casal			t	
	Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas
Resistentes								
LER	81,10 ± 7,33	104,55 ± 4,63	<b>2,87*</b>	87,45 ± 7,91	83,20 ± 7,80	<b>2,71*</b>	ns	<b>2,35*</b>
BGR	92,10 ± 6,32	97,30 ± 6,07	ns	88,65 ± 6,53	80,15 ± 8,71	ns	ns	ns
Suscetíveis								
RPS	71,60 ± 7,69	103,90 ± 10,30	<b>2,52*</b>	101,00 ± 6,28	68,25 ± 9,90	<b>2,79**</b>	<b>2,96**</b>	<b>2,50*</b>
SES	98,70 ± 9,36	87,00 ± 10,20	ns	93,95 ± 7,01	88,95 ± 7,67	ns	ns	ns
Canton-S	48,15 ± 3,62	73,80 ± 8,18	<b>2,87*</b>	44,20 ± 8,74	71,80 ± 8,78	<b>2,23*</b>	ns	ns
<b>F</b>	<b>7,73**</b>	<b>ns</b>		<b>6,13*</b>	<b>Ns</b>			

\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; ns=diferença não significativa

**Tabela 16.** Médias e erros padrões da longevidade (em dias) de machos e fêmeas avaliados por casal e individualmente de *D. simulans* obtidos no experimento III. *F* homogeneidade das médias; *t* = teste *t de Student*; -: teste estatístico não realizado devido ao número pequeno de amostras

Linhagem	Individual			Casal			t	
	Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas	t	Machos	Fêmeas
<b>Resistentes</b>								
LE	104,14 ± 6,76	55,33 ± 8,79	<b>4,40**</b>	-	-	-	-	-
<b>Suscetíveis</b>								
OV	56,50 ± 9,72	56,45 ± 8,07	ns	58,50 ± 13,90	78,10 ± 11,30	ns	ns	ns
BG	86,20 ± 12,0	48,70 ± 9,44	<b>2,46*</b>	21,00 ± 2,00	72,5 ± 46,5	-	-	-
LE	92,30 ± 8,79	78,00 ± 7,63	ns	84,62 ± 8,31	64,90 ± 10,80	ns	ns	ns
F	<b>4,09*</b>	ns		ns	ns		-	-
F <sub>Rxs</sub>	<b>3,00**</b>	ns		-	-		-	-

\*p<0,05; \*\*; p<0,01; ns=diferença não significativa

**Tabela 17.** Médias e erros padrões do tempo de desenvolvimento (em dias), das linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*, obtidos no experimento III. N= número de imagos emergidos; t= Teste *t de Student*; *F* para a homogeneidade das médias. R= Resistente, S= Suscetível, *D.sim*= *D. simulans*

Espécie	Linhagem	Média e erro padrão	N
<i>D. melanogaster</i>	<b>Resistentes</b>		
	BG	13,43 ± 0,11	235
	LE	11,89 ± 0,09	135
	RP	14,40 ± 0,24	32
	<b>F</b>	<b>45,68**</b>	
	<b>Suscetíveis</b>		
	SE	12,69 ± 0,14	121
	RP	12,52 ± 0,09	226
	<i>Canton-S</i>	12,45 ± 0,14	51
	BG	14,00 ± 0,32	42
	LE	13,50 ± 0,64	9
	<b>F<sub>RxS</sub></b>	<b>18,58**</b>	
	<i>D. simulans</i>	<b>Resistente</b>	
LE		13,42 ± 0,12	38
<b>Suscetíveis</b>			
LE		12,21 ± 0,11	24
OV		12,00 ± 0,18	33
PF		10,59 ± 0,25	17
BG		10,50 ± 0,07	10
<b>F<sub>D.sim-S</sub></b>	<b>19,22**</b>		
<b>F<sub>D.sim</sub></b>	<b>36,12**</b>		

\*: p<0,01

## Experimento IV

Nesse experimento foram obtidas somente linhagens resistentes de *D. melanogaster* e *D. simulans*, recentemente coletadas.

Na Tabela 18 encontram-se as análises entre as linhagens resistentes RP e SC de *D. melanogaster*. As diferenças foram significantes entre o número de ovos ( $t=4,24$ ;  $p<0,01$ ) e de imagos ( $t=3,14$ ;  $p<0,05$ ) e a viabilidade ovo-imago ( $t=3,17$ ;  $p<0,01$ ). Na comparação das linhagens resistentes RP e SC de *D. simulans* foram observadas diferenças significantes no número de ovos ( $t=3,86$ ;  $p<0,01$ ) e no número de imagos ( $t=4,24$ ;  $p<0,01$ ).

Comparando-se a linhagem RP de *D. melanogaster* com a linhagem RP de *D. simulans*, as diferenças foram significantes na fertilidade ( $t=3,35$ ;  $p<0,01$ ), fecundidade ( $t=2,94$ ;  $p<0,05$ ) e na viabilidade ovo-pupa ( $t=2,38$ ;  $p<0,05$ ). Entre as linhagens SC dessas duas espécies, com exceção da viabilidade pupa-imago, todas as outras comparações foram significantes (Tabela 18).

Para o estudo da longevidade foram analisados 160 indivíduos de cada espécie (*D. melanogaster* e *D. simulans*) das linhagens RP e SC. Os machos e as fêmeas individuais de *D. melanogaster* viveram de 6 a 142 dias ( $89,50 \pm 6,10$ ;  $69,48 \pm 5,83$ ); os machos por casal viveram de 21 a 142 dias ( $81,73 \pm 5,27$ ) e as fêmeas por casal viveram de 6 a 128 dias ( $74,80 \pm 5,50$ ). Em *D. simulans*, os machos individuais viveram de 6 a 142 dias ( $84,83 \pm 6,58$ ) e as fêmeas individuais viveram de 6 a 128 ( $66,93 \pm 5,27$ ); machos por casal viveram de 21 a 142 dias ( $88,68 \pm 5,33$ ) e as fêmeas por casal viveram de 34 a 129 dias ( $85,08 \pm 4,50$ ).

Entre as linhagens de *D. melanogaster* analisadas foram obtidas diferenças significantes nas comparações entre machos individuais ( $t=3,90$ ;  $p<0,05$ ) e fêmeas individuais ( $t= 2,31$ ;  $p<0,05$ ) e fêmeas por casal



( $t= 3,04$ ;  $p<0,01$ ). Para *D. simulans* foram significantes nas comparações entre os machos e fêmeas individuais da linhagem de SC ( $t=2,13$ ;  $p<0,05$ ); entre as fêmeas individuais e as por casal da linhagem de RP ( $t= 2,42$ ;  $p<0,05$ ). Quando aplicado o teste *One-Way* para homogeneidade das amostras, a única diferença significativa foi observada entre as fêmeas pos casal das quatro linhagens ( $t= 4,57$ ;  $p<0,05$ ) (Tabela 19).

Os machos foram mais longevos que as fêmeas em 6 das 8 comparações efetuadas em ambas as espécies, independente das linhagens e do tipo de cruzamento (individual ou por casal) considerados.

No tempo de desenvolvimento desse experimento, os valores variaram de 12,15 a 15,06 dias para as linhagens de *D. melanogaster* e de 12,00 a 13,42 dias para as de *D. simulans*. Foram obtidas diferenças significantes entre as comparações duas a duas de *D. melanogaster* ( $t=35,83$ ;  $p<0,01$ ), de *D. simulans* ( $t=14,42$ ;  $p<0,01$ ) e nas comparações entre as linhagens RP ( $t= 2,11$ ;  $p<0,05$ ) e SC ( $t=15,36$ ;  $p<0,01$ ) (Tabela 20).

**Tabela 18.** Médias e erros padrões do número de ovos e de imagos e das porcentagens das viabilidades (ovo-pupa; pupa-imago; ovo-imago) das linhagens resistentes de *D. melanogaster* e *D. simulans* obtidos no experimento IV. t=teste *t* de Student

Linhagem	Média dos Ovos	Média dos Imagos	Viabilidades (%)		
			Ovo-pupa	Pupa-imago	Ovo-imago
<i>D. melanogaster</i>					
RP	194,00 ± 4,67	134,60 ± 9,89	74,92 ± 3,99	92,50 ± 3,19	68,93 ± 3,91
SC	241,00 ± 14,50	203,30 ± 12,80	84,92 ± 3,03	99,44 ± 0,24	84,45 ± 2,95
t	<b>3,14*</b>	<b>4,24**</b>	ns	ns	<b>3,17**</b>
<i>D. simulans</i>					
RP	170,00 ± 5,11	102,80 ± 4,40	62,86 ± 3,12	96,56 ± 1,04	60,69 ± 3,03
SC	114,40 ± 13,00	74,17 ± 4,83	72,03 ± 5,07	96,28 ± 1,62	69,67 ± 5,75
t	<b>3,86**</b>	<b>4,24**</b>	ns	ns	ns
t <sub>DMRPxDSRP</sub>	<b>3,35**</b>	<b>2,94*</b>	<b>2,38*</b>	ns	ns
t <sub>DMSCxDSSC</sub>	<b>6,59**</b>	<b>8,98**</b>	<b>2,96*</b>	ns	<b>2,95*</b>

\*:p<0,05; \*\*: p<0,01; ns= diferença não significante

**Tabela 19.** Médias e erros padrões da longevidade (dias) de machos e fêmeas avaliados por casal e individualmente de *D. melanogaster* e *D. simulans* obtidos no experimento IV. *F* para homogeneidade das médias; *t*= teste *t* de Student

Espécie/ Linhagem	Individual		Casal		t	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	t	Machos Fêmeas
<i>D. melanogaster</i>						
RP	78,50 ± 8,93	56,70 ± 8,07	77,75 ± 7,04	59,60 ± 6,67	ns	ns ns
SC	101,72 ± 7,42	82,25 ± 7,55	85,70 ± 7,92	90,00 ± 7,44	ns	ns ns
<b>t</b>	<b>3,90*</b>	<b>2,31*</b>	ns	<b>3,04**</b>		
<i>D. simulans</i>						
RP	78,75 ± 9,50	69,15 ± 6,81	86,95 ± 8,45	90,10 ± 5,32	ns	ns 2,42*
SC	90,90 ± 9,16	64,70 ± 8,19	89,60 ± 6,73	80,05 ± 7,22	2,13*	ns ns
<b>t</b>	ns	ns	ns	ns	ns	
<b>F</b>	ns	ns	ns	4,57*		

\*:  $p < 0,05$ ; ns= diferença não significativa

**Tabela 20.** Médias e erros padrões do tempo de desenvolvimento (em dias), das linhagens recém coletadas de *D. melanogaster* e *D. simulans*, obtidos no experimento IV. N= número de imagos emergidos; DM: *D. melanogaster*, DS: *D. simulans*; RP: Rio Preto, SC: São Carlos. t= Teste *t* de Student, DM= *D. melanogaster*, DS= *D. simulans*

Espécie	Linhagem	Média e erro padrão	N
<i>D. melanogaster</i>	RP	12,15 ± 0,15	1339
	SC	15,06 ± 0,37	2024
		<b>t = 35,83**</b>	
<i>D. simulans</i>	RP	12,00 ± 0,04	1028
	SC	13,42 ± 0,08	445
		<b>t = 14,42**</b>	
		<b>t<sub>DMRP x DSRP</sub> = 2,11*</b>	
		<b>t<sub>DMSC x DS SC</sub> = 15,36 **</b>	

\*: p<0,05 ; \*\*: p<0,01

### 4.3 Avaliação geral dos componentes do valor adaptativo entre os experimentos realizados

Para as linhagens de laboratório de *D. melanogaster* obtivemos 23 casais resistentes e 45 suscetíveis e para *D. simulans* 1 casal resistente e 12 suscetíveis. Já, para as recém coletadas, foram obtidos 40 casais resistentes de *D.melanogaster* e 37 casais resistentes de *D.simulans*. Não foi obtido casais suscetíveis recém coletados para *D. melanogaster* como também para *D.simulans*.

As Tabelas de 21 a 23 contêm uma análise geral dos componentes do valor adaptativo das linhagens resistentes e suscetíveis de ambas as espécies estudadas. Todos os dados obtidos nos 4 experimentos foram agrupados.

Todas as comparações dos componentes do valor adaptativo de *D. melanogaster* foram significantes entre as linhagens resistentes recém coletadas e de laboratório e, entre as resistentes e suscetíveis de laboratório, foram significantes as médias da fertilidade e tempo de desenvolvimento (Tabela 21).

Em *D. simulans* não foi possível comparar estatisticamente as linhagens resistentes recém coletadas com a única linhagem resistente LE. A única análise estatística possível realizada entre a linhagem resistente LE e as recém coletadas e as suscetíveis de laboratório, foi em relação ao tempo de desenvolvimento, que apresentaram diferenças significantes (Tabela 21).

As maiores médias foram para as linhagens resistentes recém coletadas de ambas espécies, com exceção das viabilidades e do tempo de desenvolvimento de *D. simulans* (Tabela 21).

Outra análise foi realizada, agrupando-se os valores obtidos em todos os experimentos para as linhagens resistentes e suscetíveis de ambas as espécies. Nesta avaliação não foi considerada as diferenças na

metodologia empregada ou tempo de coleta das linhagens (Tabela 22). Foram obtidas diferenças significantes na fertilidade de *D. melanogaster* e *D. simulans* ( $t = 7,48; 12,35$ ,  $p < 0,01$  respectivamente), na fecundidade ( $t = 5,57; 13,42$ ,  $p < 0,01$ ), na viabilidade pupa-imago de *D. simulans* ( $t = 3,43$ ;  $p < 0,01$ ) e no tempo de desenvolvimento ( $t = 44,80; 5,67$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente).

A avaliação geral da longevidade mostrou que os cinco maiores valores obtidos foram para os fenótipos resistentes para as linhagens recém coletadas ou de laboratório, de *D. melanogaster* e *D. simulans*. A maior longevidade em *D. melanogaster* foi obtida para as linhagens resistentes recém coletadas, sendo os machos individuais os mais longevos (89,50 dias), seguido pelos machos (81,73 dias) e fêmeas acasaladas (74,80 dias). A maior longevidade em *D. simulans* foi obtida para os machos individuais da linhagem resistente de laboratório (LER, 104,14 dias), como já mencionado anteriormente, seguida pela longevidade dos machos (88,28 dias) e fêmeas (85,08) acasaladas e machos individuais (84,83 dias) das linhagens recém coletadas (Tabela 23).

**Tabela 21.** Médias por fêmeas e erros padrões da fertilidade, fecundidade, viabilidades e tempo de desenvolvimento das linhagens recém coletadas (resistentes) e linhagens de laboratório resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans*. t= teste *t* de Student. LR= linhagens de laboratório resistentes, LS= linhagens de laboratório suscetíveis, RCR= linhagens recém coletadas resistentes, Fertilidade e Fecundidade por dia de oviposição. T.D.: Tempo de desenvolvimento (em dias).-: análise estatística não realizada por número pequeno de amostras

Componentes do valor adaptativo	Linhagem			t	
	RCR	LR	LS	RCR x LR	LR x LS
<i>D. melanogaster</i>					
Fertilidade	54,50 ± 2,31	17,47 ± 1,31	10,46 ± 0,77	14,02 **	4,47**
Fecundidade	42,42 ± 2,79	6,37 ± 1,10	5,62 ± 0,59	11,96**	ns
Viabilidades:					
Ovo-pupa	79,92 ± 2,69	43,61 ± 7,44	57,82 ± 3,37	4,59**	ns
Pupa-imago	95,97 ± 1,75	89,91 ± 2,21	88,30 ± 1,84	2,15*	ns
Ovo-imago	76,69 ± 2,97	40,58 ± 7,23	51,78 ± 3,23	4,61**	ns
T. D.	13,89 ± 0,05	11,18 ± 0,09	10,25 ± 0,05	24,33**	8,25**
<i>D. simulans</i>					
Fertilidade	36,90 ± 2,27	9,00 -	2,40 ± 0,35	-	-
Fecundidade	23,02 ± 1,20	7,60 -	1,98 ± 0,40	-	-
Viabilidades:					
Ovo-pupa	65,72 ± 3,22	86,70 -	78,37 ± 5,76	-	-
Pupa-imago	96,89 ± 0,91	97,40 -	77,65 ± 5,44	-	-
Ovo-imago	63,72 ± 3,23	84,40 -	60,05 ± 5,38	-	-
T. D.	12,43 ± 0,48	13,42 ± 0,18	11,65 ± 0,13	5,31**	7,89**

\*: p<0,05; \*\*: p<0,01; ns= diferença não significativa

**Tabela 22.** Médias e erros padrões da fertilidade, fecundidade, viabilidades e tempo de desenvolvimento das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans* obtidos em todos os experimentos. t= teste *t* de Student T.D.: Tempo de desenvolvimento (em dias)

Componentes do valor adaptativo	Linhagem		t
	Resistentes	Suscetíveis	
<i>D. melanogaster</i>			
Fertilidade	34,56 ± 3,13	10,46 ± 0,77	<b>7,48**</b>
Fecundidade	23,45 ± 3,14	5,63 ± 0,60	<b>5,57**</b>
Viabilidades:			
Ovo-pupa	60,90 ± 4,95	57,82 ± 3,37	ns
Pupa-imago	92,80 ± 1,48	88,30 ± 1,84	ns
Ovo-imago	57,70 ± 4,88	51,78 ± 3,23	ns
T. D.	13,48 ± 0,05	10,26 ± 0,05	<b>44,80**</b>
<i>D. simulans</i>			
Fertilidade	35,35 ± 2,65	2,40 ± 0,30	<b>12,35 **</b>
Fecundidade	22,11 ± 1,45	1,98 ± 0,40	<b>13,42**</b>
Viabilidades:			
Ovo-pupa	67,50 ± 2,94	78,37 ± 5,76	ns
Pupa-imago	96,51 ± 0,81	77,65 ± 5,44	<b>3,43**</b>
Ovo-imago	65,25 ± 3,04	60,05 ± 5,38	ns
T. D.	12,46 ± 0,05	11,65 ± 0,13	<b>5,67**</b>

\*\* : p<0,01; ns= diferença não significante



**Tabela 23.** Médias e erros padrões da longevidade (em dias) das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans* obtidos em todos os experimentos. t= teste *t de Student*. LR= linhagens de laboratório resistentes, LS= linhagens de laboratório suscetíveis, RCR= linhagens recém coletadas resistentes, R= linhagens resistentes de todos os experimentos;-: análise estatística não realizada por número pequeno de amostras

Linhagem	Individual		Casal	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<i>D. melanogaster</i>				
RCR	89,50 ± 6,10	69,48 ± 5,83	81,73 ± 5,27	74,80 ± 5,50
LR	65,03 ± 3,61	77,32 ± 3,51	66,28 ± 3,44	65,32 ± 3,46
LS	61,94 ± 2,62	71,18 ± 2,68	69,66 ± 2,42	62,82 ± 2,23
R	71,82 ± 3,13	75,05 ± 3,01	70,73 ± 2,93	68,05 ± 2,94
<b>t<sub>RCR x LR</sub></b>	<b>3,45**</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
<b>t<sub>LR x LS</sub></b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>2,08*</b>	<b>ns</b>
<b>t<sub>R x LS</sub></b>	<b>2,37</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
<i>D. simulans</i>				
RCR	84,83 ± 6,58	66,93 ± 5,27	88,28 ± 5,33	85,08 ± 4,50
LR	104,14 ± 6,76	55,33 ± 8,79	-	-
LS	76,76 ± 6,13	63,52 ± 5,04	68,65 ± 7,94	71,08 ± 7,61
R	87,70 ± 5,76	64,24 ± 4,63	-	-
<b>t<sub>RCR x LR</sub></b>	<b>2,05*</b>	<b>ns</b>	-	-
<b>t<sub>LR x LS</sub></b>	<b>3,00**</b>	<b>ns</b>	-	-
<b>t<sub>R x LS</sub></b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	-	-

\*:p<0,05; \*\*: p<0,01; ns= diferença não significativa

#### 4.4 Avaliação do polimorfismo das seqüências dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*

Foram avaliados os polimorfismos dos exons 1 e 2 de 6 linhagens de *D. melanogaster*, sendo 4 resistentes (BG, RP, SC) e 2 suscetíveis (SE e Canton-S), e de 4 linhagens de *D. simulans*, sendo 3 resistentes (LE, RP, SC) e uma suscetível (PF).

A comparação das seqüências dos exons 1 e 2 nas linhagens analisadas de *D. melanogaster* mostrou ausência de polimorfismo (Figura 3, 4). Para *D. simulans*, foi observada uma diferença intra-específica sinônima no exon 1 (C → G) na linhagem SC resistente recém coletada (Figura 3) e uma diferença não-sinônima no exon 2 (G→C) na linhagem LE resistente de laboratório, nessa substituição o aminoácido Treonina foi substituído pela Serina (Figura 4).

Na comparação inter-espécies das seqüências do exon 1 foram encontradas 20 substituições, sendo 17 sinônimas e 3 não-sinônimas (Figura 3). Para o exon 2, foram observadas 34 substituições, sendo 23 sinônimas e 11 não-sinônimas (Figura 4).

As médias das razões dN/dS para os exons 1 e 2 foram baixas, respectivamente de 0,052 e 0,140, indicando ocorrência de seleção purificadora forte entre as seqüências das duas espécies. O teste D de Tajima confirma esse modelo de seleção, com D: 2,356 (p,0,05) e  $\pi$ : 0,027 para o exon 1 e D: 2,163 (p<0,05) e  $\pi$ : 0,022 para o exon 2.

	.... .... .... .... .... .... .... .... .... ....
	10 20 30 40 50
D.mel_BGR	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
D.mel_RPR3	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
D.mel_RPR4	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
D.mel_SCR	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
D.mel_SES	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
Canton-S	CTGGTGGCGC TCTACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT ACTGGCAACG
D.sim_LER	CTGGTGGCGC <b>TGT</b> TACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT <b>ATTGGCAGCG</b>
D.sim_PFS	CTGGTGGCGC <b>TGT</b> TACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT <b>ATTGGCAGCG</b>
D.sim_RPR	CTGGTGGCGC <b>TGT</b> TACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT <b>ATTGGCAGCG</b>
D.sim_SCR	CTGGTGGCGC <b>TGT</b> TACACTTG GTTCCAGCGC AACCATAGCT <b>ATTGGCAGCG</b>
	.... .... .... .... .... .... .... .... .... ....
	60 70 80 90 100
D.mel_BGR	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.mel_RPR3	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.mel_RPR4	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.mel_SCR	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.mel_SES	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
Canton-S	CAAGGGCATA CCCTATATTC CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.sim_LER	CAAGGGCATA CCCTAT <b>ATTC</b> CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.sim_PFS	CAAGGGCATA CCCTAT <b>ATTC</b> CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.sim_RPR	CAAGGGCATA CCCTAT <b>ATTC</b> CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
D.sim_SCR	CAAGGGCATA CCCTAT <b>ATTC</b> CGCCCACGCC GATCATTGGC AACACCAAGG
	.... .... .... .... .... .... .... .... .... ....
	110 120 130 140 150
D.mel_BGR	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
D.mel_RPR3	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
D.mel_RPR4	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
D.mel_SCR	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
D.mel_SES	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
Canton-S	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTTGGGA TGCACCTATC GGAGATATAC
D.sim_LER	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTT <b>GGCA</b> TGCAC <b>CTGTC</b> GGAG <b>ATT</b> TAC
D.sim_PFS	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTT <b>GGCA</b> TGCAC <b>CTGTC</b> GGAG <b>ATT</b> TAC
D.sim_RPR	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTT <b>GGCA</b> TGCAC <b>CTGTC</b> GGAG <b>ATT</b> TAC
D.sim_SCR	TGGTCTTCAA GATGGAGAAC TCCTTT <b>GGCA</b> TGCAC <b>CTGTC</b> GGAG <b>ATT</b> TAC
	.... .... .... .... .... .... .... .... .... ....
	160 170 180 190 200
D.mel_BGR	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.mel_RPR3	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.mel_RPR4	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.mel_SCR	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.mel_SES	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
Canton-S	AATGATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.sim_LER	<b>AAC</b> GATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.sim_PFS	<b>AAC</b> GATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.sim_RPR	<b>AAC</b> GATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA
D.sim_SCR	<b>AAC</b> GATCCGC GGCTGAAGGA CGAGGCTGTG GTGGGCAACT CCATGAACAA

**Figura 3:** Alinhamento de nucleotídeos da sequência do exon 1 do gene *Cyp6g1* das linhagens de *D. melanogaster* (D.mel) e *D. simulans* (D.sim). Vermelho: representa a substituição sinônima intra-espécie; negrito: representa as substituições sinônimas inter-espécies; \*: representa as substituições não-sinônimas inter-espécies

Continuação da Figura 3

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210      220      230      240      250
D.mel_BGR  GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.mel_RPR3 GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.mel_RPR4 GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.mel_SCR  GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.mel_SES  GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
Canton-S   GCCCGGCTTG ATAATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.sim_LER   GCCCGGCTTG GTTTATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.sim_PFS   GCCCGGCTTG GTTTATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.sim_RPR   GCCCGGCTTG GTTTATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
D.sim_SCR   GCCCGGCTTG GTTTATACGCG ACATAGAGCT GATCAAATCC ATTCTGATCA
      ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260      270      280      290      300
D.mel_BGR  AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
D.mel_RPR3 AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
D.mel_RPR4 AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
D.mel_SCR  AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
D.mel_SES  AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
Canton-S   AGGACTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGCGATCC CCATGGCGAT
D.sim_LER   AGGATTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGTGATCC CCATGGCGAT
D.sim_PFS   AGGATTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGTGATCC CCATGGCGAT
D.sim_RPR   AGGATTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGTGATCC CCATGGCGAT
D.sim_SCR   AGGATTATCG GTTCCACAAC CGATACGCC  GCTGTGATCC CCATGGCGAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310      320      330      340      350
D.mel_BGR  CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
D.mel_RPR3 CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
D.mel_RPR4 CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
D.mel_SCR  CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
D.mel_SES  CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
Canton-S   CCATTGGGCT ATAATAACCT GTTCTTCGTC AGGGATGCC  ATTGGAAGGG
D.sim_LER   CCCTTGGGCT ATAATAACTT GTTCTTCGTC AGGGATACC  ATTGGAAAGA
D.sim_PFS   CCCTTGGGCT ATAATAACTT GTTCTTCGTC AGGGATACC  ATTGGAAAGA
D.sim_RPR   CCCTTGGGCT ATAATAACTT GTTCTTCGTC AGGGATACC  ATTGGAAAGA
D.sim_SCR   CCCTTGGGCT ATAATAACTT GTTCTTCGTC AGGGATACC  ATTGGAAAGA
      ***          **

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      360      370      380      390      400
D.mel_BGR  AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
D.mel_RPR3 AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
D.mel_RPR4 AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
D.mel_SCR  AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
D.mel_SES  AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
Canton-S   AATTCGCACC AAGCTGACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAC
D.sim_LER   CATTCGCACC AAGCTCACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAT
D.sim_PFS   CATTCGCACC AAGCTCACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAT
D.sim_RPR   CATTCGCACC AAGCTCACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAT
D.sim_SCR   CATTCGCACC AAGCTCACTC CCGTTTTTAC CAGCGGCAAG GTCAAGCAGA TGTAT
      *

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           10      20      30      40      50
D.mel_BGR  ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
D.mel_RP3  ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
D.mel_RPR4 ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
D.mel_SC-R ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
D.mel_SE-S ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
Canton-S  ATTGGAAAGG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCGTGGAG AGAAGAACTC
D.sim_Le-R ATTGGAAACG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCATGGCG AGAAGAACTC
D.sim_PF-s ATTGGAAACG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCATGGCG AGAAGAACTC
D.sim_RP_R ATTGGAAACG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCATGGCG AGAAGAACTC
D.sim_SC_R ATTGGAAACG ATCTGGAGCT GGCCTGCAG AGGCATGGCG AGAAGAACTC
           ***                               ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           60      70      80      90     100
D.mel_BGR  TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.mel_RP3  TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.mel_RPR4 TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.mel_SC-R TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.mel_SE-S TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
Canton-S  TGGGAGTTTC ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.sim_Le-R GGGGAATTTT ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.sim_PF-s GGGGAATTTT ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.sim_RP_R GGGGAATTTT ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
D.sim_SC_R GGGGAATTTT ATTACGGAGA TTAAGGAGAT CTGCCAGTTC TCCACGGACA
           ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           110     120     130     140     150
D.mel_BGR  GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.mel_RP3  GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.mel_RPR4 GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.mel_SC-R GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.mel_SE-s GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
Canton-S  GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.sim_Le-R GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.sim_PF-s GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.sim_RP_R GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
D.sim_SC_R GCATAGCCAC GATTGCATTT GGCATTCGTG CTAACAGCCT AGAGAATCCC
           ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           160     170     180     190     200
D.mel_BGR  AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
D.mel_RP3  AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
D.mel_RPR4 AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
D.mel_SC-R AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
D.mel_SE-s AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
Canton-S  AACGCAGAGT TCCGTAACGG ACGCAAGATG TTCACCTTCA CCGTAGCGCG
D.sim_Le-R AACGCGGAGT TTCGTAACGG ACGCAAGCTG TTCACCTTCA CCGTAGGCCG
D.sim_PF-s AACGCGGAGT TTCGTAACGG ACGCAAGCTG TTCACCTTCA CCGTAGGCCG
D.sim_RP_R AACGCGGAGT TTCGTAACGG ACGCAAGCTG TTCACCTTCA CCGTAGGCCG
D.sim_SC_R AACGCGGAGT TTCGTAACGG ACGCAAGCTG TTCACCTTCA CCGTAGGCCG
           ***                               ***

```

**Figura 4:** Alinhamento de nucleotídeos da seqüência do exon 2 do gene *Cyp6g1* das linhagens de *D. melanogaster* (D.mel) e *D. simulans* (D.sim). Vermelho: representa a substituição não-sinônima intra-espécie; negrito: representa as substituições sinônimas inter-espécies; \*: representa as substituições não sinônimas inter-espécies

Continuação da Figura 4

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
D.mel_BGR      TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.mel_RP3      TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.mel_RPR4     TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.mel_SC-R     TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.mel_SE-s     TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
Canton-S      TGCCAAGGAC TTCTTTGTGG CCTTCTTCCT GCCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.sim_Le-R     TGCCAAGGAC TTCTTTCGTGG CCTTCTTCCT ACCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.sim_PF-s     TGCCAAGGAC TTCTTTCGTGG CCTTCTTCCT ACCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.sim_RP_R     TGCCAAGGAC TTCTTTCGTGG CCTTCTTCCT ACCCAAGCTG GTGTCGCTGA
D.sim_SC_R     TGCCAAGGAC TTCTTTCGTGG CCTTCTTCCT ACCCAAGCTG GTGTCGCTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
D.mel_BGR      TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
D.mel_RP3      TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
D.mel_RPR4     TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
D.mel_SC-R     TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
D.mel_SE-s     TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
Canton-S      TGCGCATCCA GTTCTTCACG GCGGACTTTT CCCACTTTAT GCGCAGCACC
D.sim_Le-R     TGCGCATCCA GTTCTTCACG CCGGACTTCT CCCACTTTCAT GCGCAGCACC
D.sim_PF-s     TGCGCATCCA GTTCTTCACG CCGGACTTCT CCCACTTTCAT GCGCAGCACC
D.sim_RP_R     TGCGCATCCA GTTCTTCACG CCGGACTTCT CCCACTTTCAT GCGCAGCACC
D.sim_SC_R     TGCGCATCCA GTTCTTCACG CCGGACTTCT CCCACTTTCAT GCGCAGCACC
                      ***

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
D.mel_BGR      ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.mel_RP3      ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.mel_RPR4     ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.mel_SC-R     ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.mel_SE-s     ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
Canton-S      ATTGGTCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.sim_Le-R     ATTGGCCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.sim_PF-s     ATTGGCCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.sim_RP_R     ATTGGCCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA
D.sim_SC_R     ATTGGCCACG TTATGGAGGA GCGAGAGCGA TCGGGCCTGC TCCGCAATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
D.mel_BGR      TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.mel_RP3      TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.mel_RPR4     TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.mel_SC-R     TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.mel_SE-s     TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
Canton-S      TCTCATAGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.sim_Le-R     TCTGATTGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.sim_PF-s     TCTGATTGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.sim_RP_R     TCTGATTGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT
D.sim_SC_R     TCTGATTGAT GTCTTGGTGA GTCTGCGCAA AGAGGCGGCT GCCGAGCCTT

```

Continuação da Figura 4

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410      420      430      440      450
D.mel_BGR   CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
D.mel_RP3   CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
D.mel_RPR4  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
D.mel_SC-R  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
D.mel_SE-s  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
Canton-S    CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC TCAGGCGGGC
D.sim_Le-R  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC CCAGGCAGGC
D.sim_PF-s  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC CCAGGCAGGC
D.sim_RP_R  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC CCAGGCAGGC
D.sim_SC_R  CGAAGCCTCA CTATGCCAAG AACCAGGACT TCCTGGTGGC CCAGGCAGGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      460      470      480      490      500
D.mel_BGR   GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
D.mel_RP3   GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
D.mel_RPR4  GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
D.mel_SC-R  GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
D.mel_SE-s  GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
Canton-S    GTGTTTTTTA CGGCGGGTTT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTCTTTTGC
D.sim_Le-R  GTGTTCTTTA CGGCGGGATT CGAGAGCTCC TCCTCGACCA TGTTCCTTTGC
D.sim_PF-s  GTGTTCTTTA CGGCGGGATT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTTCCTTTGC
D.sim_RP_R  GTGTTCTTTA CGGCGGGATT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTTCCTTTGC
D.sim_SC_R  GTGTTCTTTA CGGCGGGATT CGAGACCTCC TCCTCGACCA TGTTCCTTTGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
D.mel_BGR   CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
D.mel_RP3   CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
D.mel_RPR4  CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
D.mel_SC-R  CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
D.mel_SE-s  CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
Canton-S    CCTGTACGAG ATGAAGCATC CAGAGATGCA GAAACGCCTG CGCGACGAGA
D.sim_Le-R  CCTGTACGAG CTGAAGCATC CAGAGATGCA GCAACGCCTG CGCGAGGAGA
D.sim_PF-s  CCTGTACGAG CTGAAGCATC CAGAGATGCA GCAACGCCTG CGCGAGGAGA
D.sim_RP_R  CCTGTACGAG CTGAAGCATC CAGAGATGCA GCAACGCCTG CGCGAGGAGA
D.sim_SC_R  CCTGTACGAG CTGAAGCATC CAGAGATGCA GCAACGCCTG CGCGAGGAGA
                ***                ***                ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      560      570      580      590      600
D.mel_BGR   TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.mel_RP3   TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.mel_RPR4  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.mel_SC-R  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.mel_SE-s  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
Canton-S    TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.sim_Le-R  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.sim_PF-s  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.sim_RP_R  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG
D.sim_SC_R  TCAACGAAGC TTTGGTGGAG GCGGTGGGT CATTGAGCTA CGAGATCCAG

```

Continuação da Figura 4

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            610      620      630      640      650
D.mel_BGR   TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.mel_RP3   TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.mel_RPR4  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.mel_SC-R  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.mel_SE-s  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
Canton-S   TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.sim_Le-R  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.sim_PF-s  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.sim_RP_R  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC
D.sim_SC_R  TCCCTGGAGT ATCTGGCCAT GGTGGTGGAC GAGGTGCTGC GCATGTATCC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            660      670      680      690      700
D.mel_BGR   GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
D.mel_RP3   GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
D.mel_RPR4  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
D.mel_SC-R  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
D.mel_SE-s  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
Canton-S   GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGCGTGGAG GGACAGCCAG
D.sim_Le-R  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGTGTGCAG GGACAGCCGG
D.sim_PF-s  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGTGTGCAG GGACAGCCGG
D.sim_RP_R  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGTGTGCAG GGACAGCCGG
D.sim_SC_R  GGTGCTGCCG TTCCTGGACC GCGAGTACGA GAGTGTGCAG GGACAGCCGG
                                     ***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            710      720      730      740      750
D.mel_BGR   ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.mel_RP3   ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.mel_RPR4  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.mel_SC-R  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.mel_SE-s  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
Canton-S   ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTACA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.sim_Le-R  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTATA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.sim_PF-s  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTATA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.sim_RP_R  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTATA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT
D.sim_SC_R  ACTTGAGCCT GAAGCCGTTT TACGACTATA CTCTCGAGAA CGGAACCCCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ...
            760      770      780
D.mel_BGR   GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.mel_RP3   GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.mel_RPR4  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.mel_SC-R  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.mel_SE-s  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
Canton-S   GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.sim_Le-R  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.sim_PF-s  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.sim_RP_R  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT
D.sim_SC_R  GTGTTTCATAC CCATCTATGC ACTGCATCAT GAT

```



## 5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da resistência a inseticidas é o processo de evolução, em que inicialmente genes para a resistência raros são selecionados pela aplicação de inseticidas e suas freqüências são aumentadas na população (CROW, 1957). Devido a sua raridade inicial, presume-se que os genes que conferem resistência a inseticidas têm efeitos negativos sobre os componentes do valor adaptativo (HOLLINGSWORTH, et al., 1997, HAUBRUGE, ARNAUD 2001; ARNAUD et al., 2002). Se os genes para a resistência têm efeitos negativos sobre os componentes do valor adaptativo, espera-se que após a população ter sido liberada da pressão de seleção ocorra a redução nos níveis de resistência aos inseticidas, pela diminuição da freqüência dos indivíduos resistentes da população (MCKENZIE, 1996; ARNAUD et al., 2002; MYO; OGUMA, 2002).

Embora a grande maioria de estudos do valor adaptativo tem mostrado que existe custo adaptativo associado com a resistência a inseticidas (FERRARI; GEORGHIOU, 1981; ARGENTINE et al.,1989; PARELLA; TRUMBLE, 1989; WHITE; BELL,1990, COCHRAN,1993; MCKENZIE,1994), em alguns casos, na ausência do tratamento, não há diferença entre o valor adaptativo de linhagens resistentes e suscetíveis, ou ainda as linhagens resistentes tem uma vantagem no valor adaptativo (ROUSH; HOY, 1981; BEEMAN; NANIS, 1986; MCKENZIE 1993; SPOLLEN et al.,1995; WHITE; BELL,1995, BIELZA et al., 2008 ).

Em *Drosophila melanogaster* a resistência ao DDT (loco DDT-R) está se aproximando de uma fixação global, mesmo após o uso do DDT ter sido abolido há um longo tempo (CATANIA et al, 2004; McCART et al., 2005), sugerindo a inexistência de custo adaptativo para esse loco nesta espécie.

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar o custo adaptativo de fenótipos resistentes ao DDT de linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* de laboratório e recém coletadas.

Foi verificado que mesmo após um período de dois anos em laboratório, as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* mantiveram freqüências significantes de alelos para a resistência ao inseticida DDT, como observado pela porcentagem de indivíduos resistentes obtida nos bioensaios, sendo nitidamente maior para *D. melanogaster* (43,09%) do que para *D. simulans* (10,30%). Isso é um reflexo de que esse (s) gene (s) continua (m) sendo mantido (s) nas populações em laboratório, mesmo sem a pressão de seleção pelo inseticida, o que pode ser explicado ou por sua manutenção em heterozigose, ou por não conferir custo, ou até mesmo por ser (em) vantajoso (s) ou estar (em) ligado (s) a genes que são, principalmente em *D. melanogaster*. Pode ser que para *D. simulans* o fenótipo resistente seja custoso, o que explicaria uma freqüência bem mais baixa de indivíduos resistentes nas linhagens de laboratório.

As linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* utilizadas nos experimentos de I a III foram as mesmas usadas no trabalho de Granzotto (2007), que foram coletadas em 2005 e mantidas em estoque até a realização do presente trabalho. As linhagens do experimento IV foram coletadas em 2008.

As linhagens RP e SE de *D. melanogaster* (experimentos I e II) já analisadas anteriormente por Granzotto (2007) diferem quanto ao seu nível de suscetibilidade aos inseticidas DDT e imidaclopride, que apresentam resistência cruzada (DARBON et al., 2001; DARBON et al., 2002; Lê GOFF et al., 2003). A linhagem RP foi a que apresentou a mais alta taxa de sobrevivência às maiores concentrações dos inseticidas (100ug/ml DDT; 10ug/ml de imidaclopride), e a linhagem SE foi a linhagem mais suscetível de *D. melanogaster*, com freqüência igual a 1 de mortalidade em baixas concentrações do DDT. Na avaliação das CL<sub>50</sub> entre essas linhagens, RP apresentou o maior valor (49,27µg/mL) e SE o

menor (0,11 µg/mL) (GRANZOTTO, 2007). No presente estudo essas linhagens diferiram nos componentes estudados com diferenças significantes para a fertilidade e longevidade sendo que SE foi mais fértil que RP, embora RP foi mais longeva, exceto para os machos individuais. Não conseguimos obter casais resistentes para a linhagem SE, reforçando o caráter de suscetibilidade para essa linhagem, já demonstrado por Granzotto, 2007. Quando realizamos uma análise agrupada de todas as réplicas, a linhagem resistente RP mostrou maior média que as suscetíveis RP e SE somente para a fertilidade.

Os genes da família P450, na qual os genes *Cyps* são incluídos, estão envolvidos na detoxificação de alguns inseticidas por mecanismo metabólico, incluindo o DDT (McCart et al., 2005, 2008), e a presença do elemento transponível *Accord* está associada com o aumento da expressão desses genes (McCart et al., 2005, 2008). Na análise molecular efetuada por Granzotto (2007) nas linhagens RP e SE avaliadas no presente trabalho, RP foi a que apresentou um dos maiores níveis de expressão para os genes *Cyp6g1* e *Cyp12d1* e SE um dos menores níveis. Além disso, essa autora também verificou a presença do elemento *Accord* inserido na região promotora de *Cyp6g1* em RP, mas não em SE.

Quando comparamos os intra e intercruzamentos das linhagens resistentes de RP e suscetíveis de SE, obtivemos diferenças significantes apenas na fertilidade, com a maior média de ovos obtida para os intracruzamentos da linhagem RP resistente. Embora não obtivemos diferenças significantes entre os intercruzamentos, as médias do intercruzamento de onde procede a fêmea resistente foram mais altas do que a do cruzamento recíproco, com exceção da fertilidade. Esse resultado sugere a existência de um efeito materno agindo positivamente no valor adaptativo das fêmeas resistentes, que já foi observado no trabalho de McCart et al. (2005, 2008). Tal vantagem desaparece a partir do estágio de pupa.

Na análise da longevidade entre as linhagens RP resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster*, e suscetíveis SE, as maiores médias observadas foram sempre para uma maior longevidade nas suscetíveis do que nas resistentes, mas isso ocorreu raramente nos outros experimentos do presente trabalho, em que as linhagens resistentes foram no geral as mais longevas.

A longevidade é considerada um componente associado com o valor adaptativo, porque os indivíduos que possuem as maiores longevidades têm possibilidade de produzirem mais descendentes e persistirem na população por mais tempo. Entretanto, em um ambiente constante e favorável, um tempo maior de vida pode não aumentar o valor adaptativo do inseto; as populações poderiam se desenvolver rapidamente se os adultos colocassem todos seus ovos rapidamente, então morressem, e deixassem o alimento remanescente para os jovens, que são mais produtivos. Mas em alguns casos extremos se o ambiente não for favorável, um tempo de vida maior poderá assegurar a permanência e sobrevivência da população. É o que ocorre por exemplo com o coleóptero *Cryptolestes ferrugineus*, uma praga de grãos do Canadá, onde foi verificado que as fêmeas com maior longevidade produzem mais descendentes e também que o *gene R* que confere resistência ao malathion, não reduz esse componente do valor adaptativo, inclusive os adultos virgens resistentes foram mais longevos que os adultos suscetíveis, indicando que esse gene ou genes ligados a ele podem estar atuando no aumento do tempo de vida desta espécie (NOEL;BELL, 1995).

No nematódeo, *Caenorhabditis elegans*, muitas mutações(*age-1*, *daf-2* e *clk-1*) foram descritas relacionadas com o aumento do tempo de vida desse verme (FRIEDMAN; JOHNSON, 1998). Os genes correspondentes têm sido clonados e estão envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento e do metabolismo (KENYON, et al, 1993; KIMURA, et al, 1997).

Tempo de vida e resposta ao estresse estão intimamente associados. Em *C. elegans*, o mutante *age-1*, apresenta uma resistência elevada a exposição térmica (WONG, et al, 1995) e ao estresse oxidativo (JOHNSON, et al, 1999). Em *Drosophila*, estoques de laboratório selecionados para uma maior longevidade também mostraram um aumento da tolerância ao calor, da fome, da dissecação e ao dano oxidativo (LIN, et al, 1998; ROGINA et al, 2000; CLANCY, et al, 2001). A superexpressão de genes da superóxido dismutase (SOD) e da catalase também aumentaram o tempo de vida em *Drosophila* cerca de 30% (TATAR, et al, 2001).

Em um trabalho recente, Khazaeli et al, 2007, avaliando a variação genética para a longevidade e resistência ao paraquat (um agente oxidante exógeno) e resistência ao DDT em linhagens de *D. melanogaster*, verificaram que a tolerância ao DDT nessas linhagens não foi significativamente correlacionada com o tempo de vida. Entretanto, Lai et al, 2006, constataram um aumento da expressão de genes da família P450 (*Cyp12c1*, *Cyp9h1*, *Cyp6a13* e *Cyp6a18*) relacionada com o tempo de vida.

As linhagens resistentes de *D. melanogaster* e *D. simulans* avaliadas no presente trabalho, em uma análise geral mostraram maior longevidade que as suscetíveis, se esse aumento está relacionado com a resistência ou com outros fatores intrínsecos das linhagens e até mesmo do envolvimento da superexpressão dos genes *Cyps*, é algo que merece ser investigado.

Na avaliação de outras linhagens de laboratório de *D. melanogaster* e *D. simulans* (experimento III) foi nítida a variação obtida para os componentes do valor adaptativo estudados, principalmente para a fertilidade e fecundidade de *D. melanogaster*, com linhagens altamente fecundas como BGR e RPS e outras como LES com baixa fertilidade e fecundidade. As linhagens de *D. simulans* mostraram menos variações quanto a esses parâmetros, e os valores obtidos para essa espécie foram

significativamente menores que aos de *D. melanogaster*. A única linhagem resistente obtida em *D. simulans*, LER, foi tão fértil e tão produtiva quanto as linhagens de *D. melanogaster*. As maiores viabilidades foram para as linhagens resistentes de *D. melanogaster* e *D. simulans*. Quando agrupamos separadamente os dados desse experimento fica evidente que as maiores médias para todos os componentes avaliados, são para os fenótipos resistentes de *D. melanogaster* e para as médias de fertilidade, fecundidade e viabilidade ovo-imago de *D. simulans* resistente, indicando novamente um maior valor adaptativo para o fenótipo resistente. Na análise do tempo de desenvolvimento as menores médias foram para os fenótipos suscetíveis.

No último experimento (IV) foram avaliadas as linhagens resistentes recém coletadas de *D. melanogaster* e *D. simulans* de duas localidades do Estado de São Paulo, com histórico de exposição intermitente de inseticidas na região agrícola ou urbana, pulverizações com o malathion no uso do controle de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue.

No presente estudo as linhagens de laboratório de *D. simulans* foram menos variáveis do que as de *D. melanogaster* quanto aos componentes do valor adaptativo estudados. E na comparação entre as linhagens recém coletadas simpátricas destas espécies, *D. melanogaster* apresentou os maiores valores dos componentes estudados, indicando vantagem adaptativa sobre *D. simulans* nos ambientes estudados. No estudo da longevidade ocorreu um fato interessante, na comparação entre as linhagens de RP, de ambas as espécies, *D. simulans* apresentou os maiores valores e para a população de SC, os maiores valores foram obtidos para *D. melanogaster*. O tempo de desenvolvimento dessas linhagens foram altos em ambas espécies, principalmente, na linhagem SC de *D. melanogaster* (15,06 dias).

Na publicação de Singh e Long (1992) foi observado, como muitas publicações anteriores, que *D. simulans* é menos variável que *D.*

*melanogaster*, exceto em relação a diversidade de nucleotídeos (AQUADRO;LADO;NOON, 1988). Entretanto, alguns trabalhos tem indicado que isto não é completamente verdadeiro para outras características, como por exemplo, em relação aos traços morfológicos de pigmentação do tórax e do abdômen parece não haver variação clinal nesta espécie (CAPY; PLA; DAVID, 1994). Além disso, o polimorfismo de inversões é muito baixo, mas não inteiramente ausente em *D. simulans* (AULARD; LEMEUNIER, 2004). O que tem sido um consenso é que *D. melanogaster* é mais variável do que sua espécie irmã entre as populações, mas as duas espécies mostram níveis similares de variabilidade genética dentro das populações (CAPY; GILBERT, 2004). Os dados do presente trabalho corroboram esses achados tanto na comparação das linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* quanto na comparação entre as linhagens suscetíveis de *D. simulans* de laboratório e as resistentes recém coletadas de ambas as espécies.

Quando todos os dados dos quatro experimentos foram agrupados e efetuamos a comparação entre as linhagens resistentes recém coletadas e de laboratório todas as diferenças foram significantes, com as maiores médias para os fenótipos resistentes. Entretanto, as comparações entre as linhagens resistentes e suscetíveis de laboratório somente foram observadas diferenças significantes na fertilidade e no tempo de desenvolvimento, aqui também com vantagem para as resistentes na fertilidade.

Uma outra avaliação geral realizada foi feita agrupando todos os valores obtidos nos quatro experimentos para os componentes dos fenótipos resistentes e suscetíveis. As diferenças significantes encontradas para a fertilidade, fecundidade e tempo de desenvolvimento de *D. melanogaster* e *D. simulans* e para a viabilidade pupa-imago de *D. simulans* foram para maiores valores dos fenótipos resistentes.

Por essas análises fica evidente que as maiores médias da fertilidade, fecundidade e longevidade foram obtidas pelos fenótipos

resistentes. Entretanto, como já mencionado anteriormente, o *background* genético dessas linhagens podem influenciar seu valor adaptativo (KHAZAELI et al, 2007; CAPY, GILBERT, 2004).

A diferença na fertilidade entre os fenótipos resistentes e suscetíveis, já foi evidenciada em outros trabalhos para linhagens de *D. melanogaster* (MCCART et al, 2005, 2008) e foi atribuída a uma vantagem do fenótipo resistente das fêmeas. McCart et al. (2008) verificaram que as moscas resistentes de *D. melanogaster* são sempre mais fecundas do que as suscetíveis e que os ovos colocados pelas fêmeas resistentes contém 20 vezes mais RNA de *Cyp6g1*, o gene associado a resistência. Essa medida foi efetuada três horas após a oviposição, antes do início da transcrição endógena do embrião, sugerindo que as fêmeas armazenam RNA de *Cyp6g1* dentro de seus ovos. Isso poderia explicar a vantagem no valor adaptativo para ovos e larvas e não para o estágio de pupa, estágio o qual os transcritos maternos cessam o seu funcionamento. Entretanto, ainda permanece a ser descoberto como essa vantagem é efetuada por esse transcrito. Todos os dados dos diferentes experimentos realizados no presente trabalho corroboram a vantagem na fertilidade para os fenótipos resistentes.

No estudo de Drnevich et al. (2004), foi observado que os machos com baixo sucesso reprodutivo em condições competitivas (MCRS) mostraram os índices mais altos de expressão de *Cyp6g1*, esses autores sugeriram a existência de um *tradeoff* entre a resistência e o valor adaptativo dos machos na ausência de inseticidas, ou de modo mais geral poderia ser um *tradeoff* entre o estresse da resistência e o valor adaptativo dos machos, o que poderia explicar a manutenção da variação genética na população de *D. melanogaster* por eles estudada. Isto poderia explicar em parte, as baixas médias observadas na fertilidade e fecundidade das linhagens de laboratório de *D. melanogaster* e *D. simulans* quando comparadas com as linhagens recém coletadas.



A não observação de custo para o fenótipo resistente pode ser causada pela perda dos efeitos pleiotrópicos negativos associados com o alelo resistente (BAKER et al., 1998). Entretanto, a redução do valor adaptativo não está necessariamente associada com os genes responsáveis pela resistência.

O tempo de desenvolvimento (TD) a 22° C para ovo-imago em *D. melanogaster* variou de 10,25 dias para as linhagens suscetíveis de laboratório, 11,18 para as resistentes de laboratório até 13,89 dias para as resistentes recém coletadas, que foram mais altos aos já obtidos para essa espécie em experimentos a 25° C (8,41 dias) por Sturtevant, 1919 (apud WOODS, 2002). Para *D. simulans* o tempo de desenvolvimento ficou em 11,65 dias para as linhagens suscetíveis de laboratório, de 12,43 para as resistentes recém coletadas e 13,42 dias para as resistentes recém coletadas, também superiores ao obtido por Sturtevant, 1919 de 8,36 dias. Como esses experimentos foram realizados em diferentes temperaturas, e esse fator influencia diretamente o componente TD, fica difícil procedermos a essa comparação. O que se pode destacar é que os menores TD foram para as linhagens suscetíveis de ambas as espécies.

É comumente aceito que a reprodução em animais e plantas devem ter algum custo: uma grande atividade sexual, diminui a duração da vida. Mas, as causas dessas diferenças não são bem entendidas; para os machos de *D. melanogaster* foi sugerido que pode ser uma consequência da diminuição fisiológica causada pela produção do esperma e do líquido seminal (PARTRIDGE; FARQUHAR, 1981); para as fêmeas, isto pode ser consequência da alocação de energia para a produção de ovos ou efeitos detrimenais do acasalamento (PARTRIDGE et al., 1987). Entretanto, os achados sobre a associação entre a longevidade e a atividade sexual são muito contraditórios. Correlações negativas e positivas, assim como ausência de correlação tem sido encontrada entre esses traços (MALICK; KIDWEL, 1966; KIDWELL

MALICK, 1967; CARARETO; MOURÃO, 1992; SETTA; CARARETO, 2005).

No presente estudo, foram obtidos três tipos de correlações e as únicas positivas foram para as fêmeas individuais da linhagem LER e as fêmeas e machos individuais da linhagem RPS de *D. melanogaster* que foram mais longevas que as fêmeas e/ou machos acasalados. A única correlação negativa significativa encontrada foi para a linhagem RP de *D. simulans* em que as fêmeas acasaladas foram mais longevas que as individuais.

Semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, Bielza et al., 2008, estudaram componentes do valor adaptativo, como fertilidade, fecundidade, tempo de desenvolvimento e longevidade em linhagens resistentes e suscetíveis de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), uma praga de vegetais e frutas, e não encontraram diferenças significativas quanto aos componentes avaliados, sugerindo a inexistência de um custo adaptativo nas populações resistentes.

A ausência de polimorfismo entre as linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* nas seqüências dos dois exons analisados indicam fortemente uma região sob a ação de seleção purificadora, regiões essas referidas como assinaturas genéticas de mutações benéficas, ou de complexos gênicos bem coadaptados.

Essas regiões já foram estudadas por Kuruganti et al 2007, entretanto, esses autores utilizaram somente linhagens de laboratório de *D. melanogaster*. Os resultados obtidos por esses autores mostram que a seqüência de bases dos alelos de *Cyp6g1* de linhagens resistentes e suscetíveis são quase idênticas, exceto para 9 codons, que apresentam substituições sinônimas, exceto para a linhagem resistente *Wisconsin* onde ocorre três substituição não sinônimas.

Em *D. simulans* foi obtido um pequeno polimorfismo nos alelos de duas linhagens resistentes, evidenciando também que esta região está sob seleção purificadora. Essas regiões ainda não tinham sido avaliadas

nessa espécie. *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* são duas espécies intimamente relacionadas e possuem uma área de distribuição similar. Elas são particularmente intrigantes, pois embora estejam entre as espécies mais comuns de *Drosophila*, o local exato de sua origem e de seu ancestral ainda não foi satisfatoriamente explicado. Estas espécies têm sido muito utilizadas em estudos comparativos. Uma das conclusões centrais emergentes destes estudos é sobre o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) que difere entre as duas espécies, sendo maior para *D. simulans* (AQUADRO et al., 1988)

Muitos trabalhos têm encontrado que o nível de polimorfismo neutro o qual se relaciona com o tamanho populacional efetivo maior em *D. simulans* do que em *D. melanogaster* (AQUADRO et al., 1988; AQUADRO, 1992; MORIYAMA; POWELL, 1996). Devido ao fato da alta eficácia da seleção em populações grandes, caracteres não neutros são esperados serem menos variáveis nas espécies com tamanho populacional grande, assim como *D. simulans* apresenta tamanho populacional grande, verifica-se para *D. melanogaster* altos níveis de polimorfismos sinônimos (MORIYAMA; POWELL, 1996; MORTON et al., 2004). Entretanto, a maioria desses dados baseou-se em comparações de populações não africanas (MORIYAMA; POWELL, 1996).

NOLTE e SCHOTTERER, 2008 avaliaram essa questão do  $N_e$  utilizando populações africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans* pela análise da seqüência de 10 loci ligados ao cromossomo X. Contrariando os resultados prévios, esses autores não encontraram evidências para maior variabilidade, e portanto, maior tamanho populacional em *D. simulans*. Foram observados níveis similares de variabilidade para ambas as espécies. Os autores argumentam, entre outros fatos, que a diferença no  $N_e$  pode estar limitada a populações derivadas, o que implica que diferença no  $N_e$  surgiu recentemente, além de outras implicações evolutivas. No presente trabalho foi obtido nível semelhante de polimorfismo para os exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1* entre essas espécies,

o que não está de acordo com a hipótese apresentada pelos autores *op.cit*, pois se assim fosse, esperaríamos encontrar níveis maiores de polimorfismo para *D. simulans*. O polimorfismo apresentado por essa espécie não foi estatisticamente significativo, apesar da ocorrência de uma substituição não sinônima que precisa ser investigada mais detalhadamente.

Pela análise efetuada, não foi possível obter correlação entre os diferentes níveis de suscetibilidade ao DDT das linhagens e o polimorfismo das seqüências dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*. As diferenças podem estar nos distintos modos de regulação dos genes da família P450 envolvidos no processo de resistência e outros genes, que permanece a ser investigado.

Em recente trabalho, McCart et al (2008) documentaram a expressão da proteína CYP6G1 mais fortemente no intestino, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de linhagens transgênicas resistentes de *D. melanogaster*. Nesse mesmo estudo foi realizado o nocaute da expressão de *Cyp6g1* usando um inserto transgênico que promove o RNAi em todos os estágios de *Drosophila*. Comparando-se os níveis de transcrição dos adultos resistentes, suscetíveis e genótipos RNAi, foi evidenciado que as moscas com genótipos RNAi não mostraram níveis detectáveis de RNAm *Cyp6g1*, e também mostraram somente um leve aumento da suscetibilidade ao DDT, embora essa diferença não foi significativa. Os autores discutem sobre a possível função de CYP6G1 e por que ela confere a vantagem para os embriões. Os autores argumentam sobre a possibilidade de uma atividade antioxidante ou na possibilidade dessa proteína metabolizar um hormônio importante do desenvolvimento do inseto, tal como o hormônio juvenil e assim influenciar nas taxas de desenvolvimento embrionico e larval.

O trabalho de Jou Bem et al (2008) mostrou que em culturas de células transgênicas (com gene *Cyp6g1* de *D. melanogaster*) de *Nicotiana tabacum*, CYP6G1 foi capaz de converter DDT para DDD e o

imidaclopride em outros dois compostos hidroxí. Essa foi a primeira vez que demonstrou-se que CYP6G1 é capaz de metabolizar esses dois inseticidas, fortalecendo ainda mais as evidências de sua relação com a resistência a inseticidas.

Embora sejam crescentes as descobertas sobre o mecanismo da resistência a inseticidas muito ainda permanece a ser desvendado, indicando a complexidade do processo. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram a inexistência de custo para o fenótipo resistente em populações de *D. melanogaster*, de laboratório e recém coletadas, mas isto não ficou tão nítido para as linhagens de *D. simulans*. Evidencia também, a vantagem do fenótipo resistente para a fertilidade das linhagens de ambas as espécies, já mostrado em estudos anteriores, e também indica uma correlação entre o fenótipo resistente e maior longevidade.

A análise do polimorfismo dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*, um dos principais genes envolvidos na resistência ao DDT que foi completamente monomórfica para as linhagens de *D. melanogaster* e mostrou um pequeno polimorfismo para as linhagens de *D. simulans* sugere a existência de uma assinatura genética nessas regiões pela ação da seleção purificadora, corroborando a idéia emergente de mutações benéficas nesses locos.

Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar as similaridades e diferenças entre essas duas espécies cosmopolitas (CHOUDLHARY; SINGH, 1987; SINGH; CHOUDHARY; DAVID, 1987; SINGH; LONG, 1992; AQUADRO; LADO; NOON, 1988). Essas hipóteses podem ser divididas em dois grupos, aquelas baseadas no *background* genético, e aqueles que referem-se a manutenção dessas diferenças, incluindo fatores populacionais, tais como o tamanho efetivo da população, taxa de migração, pressão de seleção, tamanho do nicho e colonização.

Alguns autores (CHOUDLHARY; SINGH, 1987; DAVID; CAPY, 1988), sugerem que a plasticidade fenotípica de *D. melanogaster* é mais

alta do que *D.simulans*, que a redução da variabilidade genética em *D. simulans* pode ser o resultado de uma estratégia favorecendo uma ampla adaptabilidade de um único genótipo. No nível nucleotídeo, *D. simulans* é mais variável do que *D. melanogaster*, enquanto o oposto é verdadeiro nos níveis morfológicos e enzimáticos. O potencial de colonização e a habilidade adaptativa das duas espécies podem ser o mesmo, mas elas não colonizam sua presente área de distribuição no mesmo período (CAPY, GILBERT, 2004). Essas e outras diferenças podem explicar em parte os achados do presente trabalho em relação ao estudo do custo adaptativo e do polimorfismo dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1* em linhagens destas duas espécies.

Outros estudos devem ser realizados com populações recém coletadas dessas espécies, para avaliar a suscetibilidade a inseticidas de amplo espectro, e também a comparação dessas regiões envolvidas na resistência, como genes da família P450, tanto nessas espécies, *D. melanogaster* e *D. simulans*, como em outras espécies do grupo *melanogaster* ou ainda em outros insetos, podem ser realizadas, com a finalidade de desvendar a complexidade das interações gênicas no desenvolvimento dos mecanismos de resistência aos inseticidas.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi observada uma porcentagem significativa de indivíduos resistentes ao DDT nas linhagens mantidas em laboratório, maior para *D. melanogaster* (43,09%) do que para *D. simulans* (10,30%), sugerindo que ao menos para *D. melanogaster* o custo adaptativo é baixo ou inexistente.
- As linhagens resistentes recém coletadas de *D. melanogaster* e *D. simulans* mostraram altas médias para a fertilidade e fecundidade que foram significativamente diferentes das linhagens resistentes e suscetíveis de laboratório dessas espécies.
- Na avaliação geral da longevidade de todos os experimentos, com os dados agrupados, ao assinalarmos os cinco maiores valores obtidos para as linhagens de *D. melanogaster* e os cinco maiores valores para *D. simulans* todos eles pertencem às linhagens resistentes recém coletadas ou de laboratório, ou na avaliação incluindo ambas. A linhagem mais longeva foi a resistente LE de *D. melanogaster* (104,55 dias).
- A única correlação positiva encontrada entre reprodução e custo, foi para as fêmeas individuais da linhagem LER e as fêmeas e machos individuais da linhagem RPS de *D. melanogaster* foram mais longevas que as fêmeas e/ou machos acasalados. A única correlação negativa significativa encontrada foi para a linhagem RP de *D. simulans* em que as fêmeas acasaladas foram mais longevas que as individuais.
- A ausência de polimorfismo entre as linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* nos dois exons analisados indicam fortemente uma região sob a ação de seleção purificadora, regiões essas referidas como assinaturas genéticas de mutações benéficas, ou de complexos gênicos bem coadaptados.

- Em *D. simulans* foi obtido um baixo polimorfismo em alelos de duas linhagens resistentes, evidenciando também que esta região está sob seleção purificadora. Destaca-se que essas regiões ainda não tinham sido avaliadas nessa espécie.
- Pela análise efetuada, não foi possível obter correlação entre os diferentes níveis de suscetibilidade ao DDT das linhagens e o polimorfismo das seqüências dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*. As diferenças podem estar nos distintos modos de regulação dos genes da família P450 envolvidos no processo de resistência e outros genes, que permanece a ser investigado.
- Os dados obtidos no presente trabalho corroboram a inexistência de custo para o fenótipo resistente em populações de *D. melanogaster*, de laboratório e recém coletadas, mas isto não ficou tão nítido para as linhagens de *D. simulans*. Evidencia também, a vantagem do fenótipo resistente para a fertilidade das linhagens de ambas as espécies, já mostrado em estudos anteriores, e também indica uma correlação entre o fenótipo resistente e maior longevidade.
- A análise do polimorfismo dos exons 1 e 2 do gene *Cyp6g1*, um dos principais genes envolvidos na resistência ao DDT, que foram completamente monomórficas para as linhagens de *D. melanogaster* e mostrou um polimorfismo pequeno para as linhagens de *D. simulans* sugere a existência de uma assinatura genética nessas regiões pela ação da seleção purificadora, corroborando a idéia emergente de mutação benéfica nesse loco.



## 7 REFERÊNCIAS

AGOSIN, M. Role of microsomal oxidations in insecticide degradations. Kerkut GA, Gilbert LI, eds. **Compr. Ins. Physiol., Biochem. and Physiol.**, Oxford, UK: Pergamon, 12 volumes, v. 12, p. 647-712, 1985.

AQUADRO, C. F.; LADO, K.M.; NOON, W.A. The rosy region of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* 1. Contrasting levels of naturally-occurring DNA restriction map variation and divergence. **Genetics**, v.119, p.875-1988.

AQUADRO, C.F.K.M.; JENNINGS, Jr.; M.M. BLAND, C.C. LAURIE, C.H.; Patterns of naturally occurring restriction map variation, dopa decarboxylase activity variation, and linkage disequilibrium in the *Ddc* gene region of *drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.132, p. 443-452, 1992

AMINETZACH, Y. T.; MACPHEERSON, J. M.; PETROV, D. A. Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. **Science**, v. 309 (5732), p. 764-767, 2005.

ANONYMOUS, 1957. World Health Expert Committee on Insecticides 7th Report. Who Technical Report Series, n. 125. In: SCOTT, J. G. The molecular genetics of resistance: resistance as response to stress. **Florida Entomol**, v. 78, p. 399-414, 1995.

ARGENTINE, J.A.; CLARCK, J.M., FERRO, D.N. Relative fitness of insecticide resistant Colorado potato beetle strains (Coleoptera: chrysomelidae). **Environ. Entomol.** v.18, p. 705-710, 1989.

ARGESON, A. C.; NELSON, K. K.; SIRACUSA, L. D. Molecular basis of the pleiotropic phenotype of mice carrying the hypervariable yellow (*Ahvy*) mutation at the *agouti* locus. **Genetics**, v. 142, p. 557-567, 1996.

ARNAUD, L.; BROSTAU, Y.; ASSIE, L.K.; GASPAR, C.; HAUBRUGE, E. Increase fecundity of malathion-specific resistant beetles in absence of insecticide pressure. **Heredity**. v. 89, p. 245-429, 2002.

ASHOK, M.; TURNER, C.; WILSON, T.G. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p. 2761-2766, 1998.

AULARD, S.; MONTI, L.; CHAMINADE, N.; LEMEUNIER, F., Mitotic and polytene chromosomes: comparisons between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**. v.120, p.137-150, 2004.

BAKER, J.L.; PEREZ-MENDOZA, J.; BEEMAN, R.W.; THRONE, J.E. Fitness of malathion-resist strain of the parasitoid *Anisopteromalus calandrea* (Hymenoptera: Pteromalidae). **J. Econ. Entomol.** v.91, p. 50-55, 1998.

BEEMAN, R. W.; NANIS, S. M. Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 79, p. 580-587, 1986.

BIELZA, P.; QUINTO, V.; GRÁVALOS.C.; ABELLÁN, J.; FERNÁNDEZ, E. Lack Fitness Costs of Insecticide Resistance in the Western Flower Thrips (Thysanoptera: Thripidae). **J. econ. Entomol.** n.101, v. 2, p. 499-503, 2008.

BRANDT, A.; SCHARF, M.; PEDRA, J. H. F.; HOLMES, G.; DEAN, A.; KREITMAN, M.; PITTENDRIGH, B. R. Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the *Rst(2)DDT* locus. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 4, p. 337-341, 2002.

BRATTSTEN, L. B.; HOLYOKE, C. W. JR; LEEPER, J. R.; RAFFA, K. F. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. **Science**, v. 231, p. 1255-60, 1986.

BRIDE, J. M.; CUANY, A.; AMICHOT, M.; BRUN, A.; BABAULT, M. et al. Cytochrome P-450 field insecticide tolerance and development of laboratory resistance in grape vine populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 90, p. 1514-1520, 1997.

BUNDGAARD, J.; CHRISTIANSEN, F. B. Dynamics of polymorphisms. I. Selection components in an experimental population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 71, p. 319-480, 1972.

CAPY, P.; PLA, E.; DAVID, J.R., Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. II Within-population variability. **Genet. Sel. Evol.** v.26, p. 15-28, 1994.

CAPY, P.; GILBERT, P. *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*: so similar yet so different. **Genetica**. v.120, p. 5-16, 2004.

CARARETO, C. M. A; MOURÃO, C.A. Darwinian fitness in *Drosophila prosaltans*. II. Quantification of total fitness, **Genetics**, 1988.

CARARETO, C. M. A; MOURÃO, C.A. Darwinian fitness in *Drosophila prosaltans*. III. Fitness components of *Drosophila sturtevantii*. **Rev. Brasil. Genética**, v. 15, n. 2, p. 323-338, 1992.

CATANIA, F.; KAUER, M. O.; DABORN, P. J.; YEN, J. L.; FRENCH-CONSTANT, R. H.; SCHLÖTTERER, C. World-wide survey of an *Accord* insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. **Molec. Ecol.**, v. 13, p. 2491-2504, 2004.

CHOUDHARY, M.; SINGH, R.S. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster* 3. variations in genetics-structure and their causes between *Drosophila melanogaster* and its sibling species *Drosophila simulans*. **Genetics**, v. 117, 1987.

CHRISTIANSEN, F.B. The definition and measurement of fitness. **Evol. Ecol.**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 65-79, 1984.

CHRISTIANSEN, F. B.; PROUT, T. **Aspects of fitness**, pp. 146-156 in *Evolutionary Genetics From Molecules to Morphology*, edited by R. S. Singh and C. B. Krimbas, Cambridge University Press, New York, 2000.

CHUNG, H.; BOGWITZ, M. R.; MCCART, C.; ANDRIANOPOULOS, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. Cis-Regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene Cyp6g1. **Genetics**, v. 175, p. 1071-1077, 2007.

CLANCY, D. J.; GEMS, D.; HARSHMAN, L. G.; OLDHAM, S.; STOCKER, H.; HAFEN, E.; LEEVERS, S. J.; PARTRIDGE, L. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. **Science**. v.292, p. 104–106, 2001.

CROW, J. F. Analysis of a DDT-resistant strain of *Drosophila*. **J. Econ. Entomol.**, v. 7, p. 393–398, 1954.

CROW, J.F. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annu. Rev. Entomol.** V.2, p. 227-246, 1957.

COCHRAN, D. G. Decline of pyrethroid resistance in the absence of selection pressure in a population of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **J. Econ. Entomol.** v. 86, p. 1639–1644 , 1993.

COHEN, M. B.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. A host-inducible cytochrome P-450 from a host-specific caterpillar: molecular cloning and evolution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 15, p. 10920-4, 1992.

CONTE, C.; DASTUGUE, B.; VAURY, C. Coupling of enhancer and insulator properties identified in two retrotransposons modulates their mutagenic impact on nearby genes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 1767-1777, 2002.

COUSTAU C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Tren. in Ecol. and Evol.**, v. 15, p. 378-383, 2000.

DABORN, P.; BOUNDY, S.; YEN, J.; PITTENDRIGH, B.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidaclopride. **Mol. Genet. Genom.**, v. 266, n. 4, p. 556- 563, 2001.

DABORN PJ, YEN J, BOGWITZ, MR, LE GOFF, G, FEIL E, JEFFERS, S, TIJET, N, PERRY T, HECKEL, D, BATTERHAM, P, FEYEREISEN, R, WILSON, TG, FFRENCH-CONSTANT, R. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. **Science**, v. 297, p. 2253-56, 2002.

DAVID, J.R.; CAPY, P., Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends Genet.** v.4, p.106-111, 1988

DOBZHANSKY, T. H. On some fundamental concepts of Darwinian biology. **Evol. Biol.**, 4 ed, p. 1-34, 1968.

DOBZHANSKY, T. H. **Genética do Processo Evolutivo**. Ed: Universidade de São Paulo, Ed. Polígono, São Paulo, 1973.

DRNEVICH, J. H.; REDDY, M.M.; RUEDI, E.A., RODRIGUEZ-ZAS, S. HUGHES, K.A. Quantitative evolutionary genomics: differential gene expression and male reproductive success in *Drosophila melanogaster* . **Proc. R. Lon.**, v. 271, p.2267-2273, 2004

FALCONER, D. S. Introduction to Quantitative Genetics. **Longman**. New York, 1981.

FERRARI, J.A.; GEORGHIOU, G.P. Effects on insectidal selection and treatment on reproductive potential of resistant, susceptible, and heterozygous strains of the southern house mosquito. **J. Econ. Entomol.** V.74, p.552-557, 1981.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CARVALHO-DIAS, S.; OLIVEIRA-ANDRADE, M.; CAIXETA-NUNES, C.; LI, H. M.; STUART, J. J.; MUIR, W.; SCHARF, M.E.; PITTENDRIGH, B.R. Expression of *Cyp6g1* e *Cyp12d1* in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 69-77, 2005.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 507-533, 1999.

FFRENCH- CONSTANT, R. H.; ROUSH, R. T.; CARINO, F. A. *Drosophila* as a tool for investigating the molecular genetics of insecticide resistance. In G.P. Georgioui and T. Saito (Eds) **Pest resist. to pest.**, Pleum, New York, 1993.

FFRENCH- CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? **Philos. Proc. R. Soc. London Ser.**, v. 353, p. 1685-1693, 1998.

FFRENCH-CONTANT, R. H.; DABORN, P.; FEYEREISEN, R. Resistance and the jumping gene. **BioEssays**, v. 28, p. 6-8, 2006.

FIELD, L. M.; DEVONSHIRE, A. L. Insecticide resistance by gene amplification in *Myzus persicae*. In Denholm D, Holloman Eds, **Resistance**, v. 91, p. 240-50, 1991.

FRIEDMAN, D.B.; JOHNSON, T.E. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. **Genetics**, v. 118, p.75-86, 1998.

FUCHS, S. Y.; SPIEGELMAN, V. S.; BELITSKI, G. A. The effects of thw cytochrome P-450 system on the development of *Drosophila melanogaster*. **J. Biochem. Toxicol.**, v. 8, p. 83-88, 1993.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v. 293, p. 857-860, 2001.

GRANZOTTO, A. **Suscetibilidade ao DDT e imidaclopride em espécies invasoras e neotropicais da família Drosophilidae com ênfase na expressão dos genes *Cyp6g1* e *Cyp12d1***. 2007.51f. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

GDULA, D. A.; GERASIMOVA, T. I.; CORCES, V. G. Genetic and molecular analysis of the *gypsy* chromatin insulator of *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 9378-9383, 1996.

HALL, T. A. Bioedit- a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HALL, R. J., GUBBINS, S., GILLIAN, C. A. Invasion of drug and pesticide resistance is determined by a trade-off between treatment efficacy and relative fitness. **Bull. Math. Biol.**, v. 66, p. 825-840, 2004.

HALPERN, M. E.; MORTON, R. A. Reproductive and development defects in a malathion-resistant, laboratory-selected population of *Drosophila melanogaster*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 28, p. 44-56, 1987.

HAUBRUGE, E.; ARNAUD, L. Fitness Consequences of Malathion-Specific Resistance in Red Flour Beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and Selection for Resistance in the Absence of Malathion. **J. Econ. Entomol.** n. 94, v. 2, p. 552-557, 2001.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 1-12, 1998.

HEDRICK, P. W.; MURRAY, E. Selection and measure of fitness. **The Gen. and Biol. of Dros.**, v. 3d, M. asburner, H.L. Carson & J.N. Thompson, Jr. Eds Academic Press, Inc., London, New York, p. 61-104, 1983.

HIRAIZUMI, Y. Negative correlation between rate of development and female fertility in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 46, p. 615-624, 1961.

HODGSON, E.; KULKARNI, A. P. Characterization of cytochrome P450 in studies of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, Y. Eds. **Pest Resist. to Pest.** Plenum Press, New York, 1983.

HOLLINGSWORTH, R.G.; TABASHNIK, B.E.; JOHNSON, M.W.; MESSING, R.H.; ULMAN, D.E. Relation between susceptibility to

insecticides and fecundity across populations of cotton aphid (Homoptera: Aphididae). **J. Econ. Entomol.** v.90, p. 55-58, 1997.

HUNG, C. F.; HARRISON, T. L.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. CYP6B3: a second furanocoumarin-inducible cytochrome P450 expressed in *Papilio polyxenes*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 4, p. 149-60, 1995.

JOHNSON, F. B.; SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Molecular biology of aging. **Cell** v. 96, p. 291–302, 1999.

JOUBEN, N.; HECKEL, D.G.; HAAS, M.; SCHUPHAN, I; SCHMIDT, B. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in *Cyp6g1*-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. **Pest Manag Sci**, v 64, p.65-73, 2008.

JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D.B. **Drosophila: A Practical Approach**. Oxford, IRL Press, p. 245-277, 1986

KHAZAELI, A.A.; SERGEY, V.N., CUSRTSINGER, J.W. Genetic variation for life span, resistance to paraquat, and spontaneous activity in unselected population of *Drosophila melanogaster*. Implications for transgenic rescue of life span. **Mechan. Age. Develop.** v.128, p. 486-493, 2007.

KENYON, C.; CHANG, J.; GENSCHE, E.; RUDNER, A.; TABTING, R.A. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. **Nature** v.366, p. 461-464, 1993.

KIDWELL, J. F.; MALICK, L. E. The effects of genotype, mating status, weight and egg production on longevity in *Drosophila melanogaster*. **J. Hered.**, v. 58, p. 169-172, 1967.

KIMURA, K. D.; TISSENBAUM, H.A.; LIU, Y.; RUVKUN, G.; *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 277, p. 942-946, 1997



KUMAR S.; TAMURA K.; NEI M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings. **Bioinformatics**, v. 5, p.150-163, 2004.

KURUGANTI, S.; LAM, V.; ZHOU, X.; BENNETT, G.; PITTENDRIGH, B. R.; GANGULY, R. High expression of *Cyp6g1*, a cytochrome P450 gene, does not necessarily confer DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. **Gene**, v. 388, p. 43-53, 2007.

LAI, C.; PARNELL, L.D.; LYMAN, R.F.; ORDOVAS, J.M.; MACKAY, T.F.C. Candidate genes affecting *Drosophila* life span identified by integrating microarray gene expression analysis and QTL mapping. **Mechan. Age. Develop.** v. 128, p. 237-249, 2007.

Le GOFF, G.; BOUNDY, S.; DABORN, P. J.; YEN, J. L.; SOFER, L.; LIND, R.; SABOURAULT, C.; MADI-RAVAZZI, L.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. **Insect Biochem. and Molec. Biol.**, v. 33, p. 701-708, 2003.

Le GOFF, G.; HILLIOUB, F.; SIEGFRIEDC, B. D.; BOUNDYA, S.; WAJNBERGB E.; SOFER, L.; AUDANT, P.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; FEYEREISEN, R. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. **Insect Biochem. and Molec. Biol.**, v. 36, p. 674-682, 2006.

LEVONTIN, R.C. **The genetics basis of Evolutionary Change**. Columbia University Press, New York, 1974.

LI, X.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. Strustural and functional divergence of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist cytochrome P450. **PNAS**, v. 101, p. 2939-2944, 2003.

LIN, Y. J.; SEROUDE, L.; BENZER, S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. **Science**, v. 282, p. 943-946, 1998.

LIU, N.; SCOTT, J. G. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 28, p. 531-35, 1998.

MACKAY, T.F.C. A quantitative genetic analysis of fitness and its componets in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 47, p. 59-70, 1985.

MALICK, L. E.; KIDWELL, J. F. The effects of mating status, sex and genotype on longevity in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 54, p. 203-209, 1966.

MARSANO, R. M.; CAZZI, R.; MOSCHETTI, R.; JUNAKOYIC, N. Evidence for a functional interaction between the *Bari1* transposable element and the cytochrome P450 *Cyp12a4* gene in *Drosophila melanogaster*. **Gene**, v. 12, n. 357, p. 122-128, 2005.

MARTIN-CAMPOS, J. M.; COMERON, J. M., MIYASHITA, N; AQUADE, M. Intraspecific and interspecific variation at the y-ac-sc region of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 130, p. 805-816, 1992.

McCARROLL, L.; HEMINGWAY, J.; Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? **Insect Biochem.**, 2002.

McCART, C.; BUCKLING, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. DDT resistance in flies carries no cost. **Curr. Biol.**, v. 9, n. 15, p. 587-589, 2005.

McCART, C.; FFRENCH-CONTANT, R.H. Dissecting the insecticide-resistance-associated cytochrome P450 gene *Cyp6g1*. **Pest Manag. Sci.** v. 64, p. 639-645, 2008.

McKENZIE, J. A. Measuring fitness and intergenic interactions: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. **Genetica**, v. 90, p. 227-37, 1993.

McKENZIE, J. A. Selection at the diazinon resistance locus in overwintering populations of *Lucilia cuprina* (the Australian sheep blowfly). **Heredity**, v. 73, p. 57–64, 1994.

McKENZIE, J. A. Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. *Austin, TX: Landes*, p. 185, 1996.

MINKOFF, C.; WILSON, T. G. The competitive ability and fitness components of the *Methoprene-tolerant (Met) Drosophila* mutant resistant to juvenile hormone analog insecticides. **Genetics**, v. 131, p. 91-97, 1992.

MIYO, T.; OGUMA, Y. Negative Correlation Between Resistance to Three Organophosphate Insecticides and Productivity Within a Natural population of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **J. Econ. Entomol.** n. 95, v. 6, p.1229-1238, 2002.

MORIYAMA, E.N.; POWELL, J. R. Intraspecific nucleotide variation in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 133, p. 261-277, 1996.

MORTON, R.A., CHOUDHARY, M.;CARIOU, M.L.; SINGH, R.S. A reanalysis of protein polymorphism in *Drosophila melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia* and *D. mauritiana* effects of population size and selection. **Genetica**. v.120, p. 101-114, 2004.

MOUCHES, C.; PASTEUR, N.; BERGE, J. B.; HYRIEN, O.; RAYMOND, M. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex*. mosquito. **Science**, v. 233, p. 778-80, 1986.

MOURÃO, C. A.; AYALA, F. J.; ANDERSON, W. W. Darwinian fitness and adaptedness in experimental populations of *Drosophila willistoni*. **Genetica**, v. 43, 1972.

MOZER, B. A.; BENZER, S. Ingrowth by photoreceptor axons induces transcription of a retrotransposon in the developing *Drosophila* brain. **Development**, v. 120, p. 1049-1058, 1994.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.**, v. 3, p. 418-426, 1986.

NOEL, D.G.W.; BELL, R.J. A Malathion Resistance Gene Associated with Increased Life Span of the Rusty Grain Beetle *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae). **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** v.50, n.1, p. B9-B13, 1995

NOLTE, V.; SCHLÖTTERER, C. African *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* Populations Have Similar Levels of Sequence Variability, Suggesting Comparable Effective Population Sizes. **Genetics**, v.178, p.405-412, 2007.

OPPENOORTH, F. J. Biochemistry and physiology of resistance. In: KERKUT G. A.; GILBERT L. I., Eds. **Comp. Insect Physiol., Biochem. and Pharm.**, v. 12, p. 731-73, 1985.

PARELLA, M. P. AND J. T. TRUMBLE. Decline of resistance in *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in the absence of insecticide selection pressure. **J. Econ. Entomol.** v.82, p. 365–368, 1989.

PARNELL, T. J.; VIERING, M. M.; SKJESOL, A.; HELOU, C.; KUHN, E. J. et al. An endogenous suppressor of hairy-wing insulator separates regulatory domains in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 13436-13441, 2003.

PARTRIDGE, L.; FARQUHAR, M. Sexual activity reduces lifespan of male fruit flies. **Nature**, v. 294, p. 580-582, 1981.

PARTRIDGE, L.; GREEN, A.; FOWLER, K. Effects of egg-production and exposure to males on females's survival in *Drosophila melanogaster*. **J. Ins. Physiol.**, v. 33, p. 745-749, 1987.

PIMENTEL, D.; STACHOW, U.; TAKACS, D. A.; BRUBAKER, H. W.; DUMAS, A. R.; MEANEY, J. J.; O'NEIL, J. A. S.; ONSI, D. E.; CORZILIUS, D. B. Conserving Biological Diversity in Agricultural/Forestry Systems. *BioScience*, v. 42, n. 5, p. 354-362, 1992.

PITTENDRIGH, D.; RENAN, R. ; FFRENCH-CONSTANT, R. H. ; GANETZKY, B. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, p. 602-610, 1997.

PROUT, T. The relation between fitness components and populations prediction in *Drosophila*. The estimation of fitness components. **Genetics**, v. 68, p. 127-149, 1971.

ROGINA, B.; REENAN, R. A.; NILSEN, S. P.; HELFAND, S. L. Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. **Science**, v. 290, p. 2137–2140, 2000.

ROUSH, R. T. AND M. A. HOY. Laboratory, glasshouse, and field studies of artificially selected carbaryl resistance in *Metaseiulus occidentalis*. **J. Econ. Entomol.** v.74, p. 142–147, 1981.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 361-80, 1987.

ROZAS, J.; Sánchez-DelBarrio, C. J.; Messeguer X. ; Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, Inglaterra, v.19, p. 2496-2497, 2003.

SASABE, M.; WEN, Z.; BERENBAUM, M. R.; ACHULER, M. A. Molecular analysis of *Cyp312A1*, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. **Gene**, v. 338, p. 163-175, 2004.

SCHLENKE, T.A., and BEGUN, D.J. Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, p.1626-1631, 2004.

SCOTT, J. G.; ROUSH, R. T.; LIU, N. Selection of high-level abamectin resistance from field-collected house flies, *Musca domestica*. **Experientia**, v. 47, n. 3, p. 288-291, 1991.

SCOTT, J. G. The molecular genetics of resistance: resistance as response to stress. **Florida Entomol.**, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J. G.; KASAI, S. Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 78, p. 171-178, 2004.

SEAGER, R.D.; AYALA, F.J. Chromosome interactions in *Drosophila melanogaster*. I Viability studies. **Genetics**, v. 102, p. 467- 483, 1982.

SETTA, N.; CARARETO, C. M. A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. **Iheringia, Ser. Zool.**, v. 95, n. 1, p. 47-51, 2005.

SINGH. R. S.; CHOUDHARY, M.; DAVID, J. R. Contrasting patterns of geographic variation in the cosmopolitan sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Biochem. Genetics**, v. 25, p. 27-40, 1987.

SINGH, R.S.; LONG, A.D. Geographic variation in *Drosophila*: from molecules to morphology and back. **Tree**. v. 7, p. 340-345, 1992.

SPOLEEN, K. M., M. W. JOHNSON, AND B. E. TABASHNIK. Stability of fenvalerate resistance in the leafminer parasitoid *Diglyphus begini* (Hymenoptera, Eulophidae). **J. Econ. Entomol.** v.88, p.192–197, 1995.

SVED, J. A. An estimate of heterosis in *Drosophila melanogaster*. **Genet. Res.**, v. 18, p. 97-105, 1971.

SVED, J. A.; AYALA, F. J. A population cage test for heterosis in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 66, p. 97-113, 1970.

TAJIMA, F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypotheses by DNA polymorphism. **Genetics**, EUA, v. 123, p. 585-595, 1989.

TANG, A. H.; TU, C. D. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione-S-transferases D1 and D21, **J. Biol. Chem.**, v.269, p. 27876–27884, 1994.

TATAR, M.; KOPELMAN, A.; EPSTEIN, D.; TU, M. P.; YIN, C. M.; GAROFALO, R. S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. **Science**, v. 292, p.107–110, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRACEY, M. L.; AYALA, F. J. Genetic load in natural populations: Is it compatible with the hypothesis that many polymorphisms are maintained by natural selection? **Genetics**, v. 77, p. 569-589, 1974.

TURELLI, M.; COYNE, J. A.; PROUT, T. Resource choice in orchard populations of *Drosophila*. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 22, p. 95-106, 1984.

VARTANIAN, G. **Variabilidade genética de população naturais de *Drosophila melanogaster***. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 1973.

WALLACE, B. A survey of wild-type strains of *Drosophila melanogaster* for resistance to malathion and pheulthiocarbamide. **Z. Zool. Syst. Evolutonforsh.**, v. 24, p. 52-58, 1986.

WHITE, N. D G. AND R. J. BELL. Relative fitness of a malathion-resistant strain of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera, Cucujidae) when development and oviposition occur in malathion-treated and untreated wheat kernels. **J. Econ. Entomol.** v.26 p. 23–37, 1990.

WHITE, N. D G. AND R. J. BELL. A malathion resistance gene associated with increased life span of the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae). **J. Gerontol.** v. 50, p. 9–13, 1995.

WHITLOCK, J. P. Jr. The regulation of cytochrome P-450 gene expression. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 26, p. 333-369, 1986.

WILLOUGHBY, L.; CHUNG, H.; LUMB, C.; ROBIN, C.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and Phenobarbital. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 934-942, 2006.

WILSON, T. G., *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): a model insect for insecticide resistance studies. **J. Econ. Entomol.**, 1988.

WILSON, T. G. Transposable Elements as Initiators of Insecticide Resistance. **J. Econ. Entomol.**, v. 86, p. 645-651, 1993.

WILSON, T. G. Resistance of *Drosophila* to toxins. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 545-571, 2001.

WILSON, T. G. *Drosophila*: Sentinels of Environmental Toxicants. **Integr. Compar. Biol.**, v. 45, p.127-136, 2005.

WINDELSPECHT, M.; RICHMOND, R. C.; COCHRANE, B. J. Malathion resistance levels in sympatric populations of *Drosophila simulans* and



*Drosophila melanogaster* differ by two orders of magnitude. **J. Econ. Entomol.**, v. 88, p. 1138-1143, 1995.

WONG, A.; BOUTIS, P.; HEKIMI, S.; Mutations in the *elk-1* Gene of *Caenorhabditis elegans* Affect Developmental and Behavioral Timing. **Genetics**, v. 139, p. 1247-1259, 1995.

WOODS, R. E.; SGRÒ, C. M.; HERCUS, M.; HOFFMANN, A. A. Fluctuating asymmetry, fecundity and development time in *Drosophila*: is there an association under optimal and stress conditions? **J. Evol. Biol.**, v. 15, p. 146-157, 2002.

YAMAZAKI, T. Measurement of fitness and its components in six laboratory strains of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 108, p. 201-211, 1984.

YAMAZAKI, T.; HIROSE, Y. Genetics analysis of natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. II. The measurement of fitness components in homozygous lines. **Genetics**, v. 108, p. 213-221, 1984.

YU, S. J. Insect glutathione S-transferases. **Zool. Stud.**, v. 35, p. 9-19, 1996.

# APÊNDICE

## Apêndice A1

**Tabela 1.** Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nas linhagens de *D.melanogaster* RP e SE obtidos no experimento I

Linhagens	Réplicas	Número Total de Ovos ( $\chi$ / casal )	Número total de pupas e Viabilidade Ovo-Pupas (%)	Número Total de Imagos e Viabilidade Pupa-Imago (%)	Viabilidade ovo-imago (%)
RP	1	24 (4,8)	24 (100,0)	24 (100,0)	100,0
	2	48 (9,6)	31(64,6)	31 (100,0)	64,6
	3	42 (8,4)	24 (57,1)	24 (100,0)	57,1
	4	48 (9,6)	23 (47,9)	23 (100,0)	48,0
	5	55 (11,0)	33 (60,0)	27 (81,8)	49,0
	6	59 (11,8)	49 (83,0)	48 (97,9)	81,4
	7	61 (12,2)	56 (91,8)	42 (75,0)	68,8
SE	1	66 (13,2)	34 (51,5)	34 (100,0)	52,0
	2	71 (14,2)	32 (45,0)	27 (84,4)	38,0
	3	63 (12,6)	14 (22,2)	14 (100,0)	22,0
	4	55 (11,0)	42 (76,3)	42 (100,0)	76,0
	5	69 (13,8)	63 (91,3)	59 (93,6)	86,0
	6	50 (10,0)	30 (60,0)	30 (100,0)	60,0
	7	76 (15,2)	35 (46,0)	35 (100,0)	46,0

## Apêndice A2

**Tabela 2.** Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nas linhagens RP e SE de *Drosophila melanogaster* obtidas no experimento II

Linhagens	Réplicas	Número Total de Ovos ( $\chi$ /casal)	Número Total de Pupas e Viabilidade Ovo-Pupa (%)	Número Total de Imagos e Viabilidade Pupa-Imago (%)	Viabilidade Ovo-Imago (%)
<b>Resistentes</b>					
<b>RP</b>					
CASAL 1	R1	71 (14,2)	10 (14,0)	10 (100,0)	14,0
	R2	78 (15,6)	16 (20,5)	14 (87,5)	18,0
	R3	94 (18,8)	24 (25,5)	22 (91,7)	23,4
	R4	86 (17,2)	17 (19,8)	14 (82,3)	16,3
	R5	71 (14,2)	16 (22,5)	16 (100,0)	19,8
CASAL 2	R1	91 (18,2)	49 (53,8)	48 (97,9)	52,8
	R2	86 (17,2)	10 (11,6)	8 (80,0)	9,3
	R3	105 (21,0)	67 (63,8)	63 (94,0)	60,0
	R4	89 (17,8)	17 (19,1)	12 (70,6)	13,5
	R5	137 (27,4)	10 (7,3)	10 (100,0)	7,3
CASAL 3	R1	123 (24,6)	19 (15,4)	16 (84,2)	13,0
	R2	133 (26,6)	15 (11,3)	12 (80)	9,0
	R3	80 (16,0)	10 (12,5)	10 (100,0)	12,5
	R4	99 (19,8)	3 (3,0)	2 (66,7)	2,0
	R5	140 (28,0)	51 (36,4)	40 (78,4)	28,6
<b>Suscetíveis</b>					
<b>RP</b>					
CASAL 1	S1	35 (7,0)	17 (48,6)	15 (88,2)	42,0
	S2	38 (7,6)	21 (55,3)	21 (100,0)	55,3
	S3	44 (8,8)	32 (72,7)	30 (93,7)	68,0
	S4	21 (4,2)	9 (42,9)	8 (88,9)	38,0
	S5	49 (9,8)	14 (28,6)	10 (71,4)	20,4
CASAL 2	S1	39 (7,8)	13 (33,3)	9 (69,2)	23,0
	S2	114 (22,8)	29 (25,4)	24 (82,7)	21,0
	S3	49 (9,8)	28 (57,1)	28 (100,0)	57,2
	S4	100 (20,0)	68 (68,0)	58 (85,3)	58,0
	S5	102 (20,4)	38 (38,0)	37 (97,4)	36,3
<b>SE</b>					
CASAL 1	S1	20 (4,0)	11 (55,0)	11 (100,0)	55,0
	S2	10 (2,0)	0	0	0
	S3	9 (1,8)	4 (44,4)	4 (100,0)	44,0
	S4	30 (6,0)	7 (23,3)	5 (71,4)	17,0
	S5	14 (2,8)	6 (42,8)	6 (100,0)	43,0

## Continuação tabela

---

CASAL 2	S1	39 (7,8)	6 (15,4)	4 (66,7)	10,0
	S2	66 (13,2)	13 (19,7)	7 (53,8)	11,0
	S3	58 (11,6)	28 (48,3)	28 (100,0)	48,0
	S4	27 (5,4)	14 (51,8)	13 (92,8)	48,0
	S5	40 (8,0)	16 (40,0)	15 (93,7)	38,0
CASAL 3	S1	94 (18,8)	43 (45,7)	34 (79,0)	36,0
	S2	71 (14,2)	24 (33,8)	15 (62,5)	21,0
	S3	74 (14,8)	55 (74,3)	37 (67,3)	50,0

---

## Apêndice A3

**Tabela 3.** Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nos cruzamentos das linhagens resistentes e suscetíveis de *Drosophila melanogaster* RP e SE do experimento II. M=macho; F=fêmea

Tipo de cruzamento		Réplicas	Número Total de ovos ( $\chi$ /casal)	Número Total de Pupas e Viabilidade Ovo-Pupa (%)	Número Total de Adultos e Viabilidade Pupa-Adulto (%)	Viabilidade Ovo-Adulto (%)
M	F					
SES	RPR	1	11 (2,2)	7 (63,6)	4 (57,1)	36,4
		2	31 (6,2)	12 (38,7)	9 (75,0)	29,0
		3	46 (9,2)	18 (39,1)	18 (100,0)	39,1
		4	43 (8,6)	8 (18,6)	7 (87,5)	16,3
		5	28 (5,6)	9 (32,1)	9 (100,0)	32,1
		6	11 (1,8)	11 (100,0)	11 (100,0)	100,0
		7	83 (16,6)	55 (66,3)	45 (81,8)	54,2
		8	49 (9,8)	43 (87,7)	42 (97,7)	85,7
		9	62 (12,4)	34 (54,8)	23 (67,6)	37,1
		10	73 (14,6)	17 (23,3)	12 (70,6)	16,4
RPR	SES	1	72 (14,4)	11 (15,3)	10 (90,9)	13,9
		2	107 (21,4)	33 (30,8)	19 (57,6)	17,8
		3	72 (14,4)	55 (76,4)	21 (38,2)	29,2
		4	103 (20,6)	29 (28,2)	16 (55,2)	15,5
		5	152 (30,4)	44 (28,9)	23 (52,3)	15,1
		6	26 (5,2)	17 (65,4)	17 (100,0)	65,4
		7	14 (2,8)	6 (42,9)	6 (100,0)	42,9
		8	14 (2,8)	1 (7,1)	1 (100,0)	7,1
		9	11 (2,2)	0	0	0
		10	23 (4,6)	22 (95,6)	21 (95,4)	91,3

Tabela 4. Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nas linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* obtidos no experimento III

Linhagens	Réplicas	Número Total de Ovos	Número total de pupas e Viabilidade Ovo-Pupa (%)	Número Total de Imagos e Viabilidade Pupa -imago (%)	Viabilidade Ovo-Imago (%)
<b>Resistentes</b>					
	<b>BG</b>				
	R	117	109 (93,2)	89 (81,7)	76
	R1	81	68(83,9)	63 (92,6)	77,7
<b>LE</b>	R2	95	89 (93,7)	85 (95,5)	89,4
	R	53	50 (94,3)	50 (100)	94,3
	R1	42	31(71,4)	31(100)	73,8
<b>RP</b>	R2	58	55 (94,8)	54 (98,1)	93,1
	R	36	33 (91,7)	32 (96,9)	88,9
<b>SE</b>	R	21	0	0	0
<b>Suscetíveis</b>					
	<b>BG</b>				
	S	61	52 (85.2)	42 (80.7)	68,8
<b>LE</b>	S	3	1 (33.3)	1 (100)	33,3
	S1	11	9 (81.8)	8(88.8)	72,7
<b>RP</b>	S	97	95 (97.9)	80 (84.2)	82,5
	S1	78	66 (84.6)	65 (98.5)	83,3
	S2	96	90 (90.7)	81 (90)	,4
<b>SE</b>	S	56	46 (82.1)	46 (100)	82,1
	S1	88	86 (97.7)	81 (94.2)	92
	S2	40	22 (55)	16 (72.7)	40
<b>Canton</b>	S	33	17(51.5)	13 (76.5)	39,4
	S1	49	29 (59.1)	25(86.2)	51
	S2	21	20 (95.2)	14 (70)	66,7

## Apêndice A5

**Tabela 5.** Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nas linhagens resistentes e suscetíveis de *D.simulans* obtidos no experimento III

Linhagens	Réplicas	Número Total de Ovos (Média)	Número total de pupas e Viabilidade Ovo-Pupa (%)	Número Total de Adultos e Viabilidade Pupa -Adulto (%)	Viabilidade Ovo-Adulto (%)
<b>Resistente</b>					
LE	R	45	39 (86.7)	38 (97.4)	84,4
<b>Suscetíveis</b>					
<b>OV</b>					
	S	26	22 (84.6)	17 (77.2)	65,4
	S1	17	14 (82.3)	14 (100)	82,3
	S2	10	3 (30)	2 (66.7)	20
<b>PF</b>					
	S	10	10 (100)	4 (40)	40
	S1	6	4 (66.7)	3 (75)	50
	S2	15	10 (66.7)	10 (100)	66,7
<b>LE</b>					
	S	16	12 (75)	9 (75)	56,2
	S1	13	13 (100)	11 (84.6)	84,6
	S2	13	12 (92.3)	10 (83,3)	76,9
<b>BG</b>					
	S	7	5 (71.4)	4 (80)	57,1
	S1	4	4 (100)	2 (50)	50
	S2	7	5 (71.4)	5 (100)	71,4



## Apêndice A6

**Tabela 6.** Números absolutos e porcentagens dos componentes do valor adaptativo avaliados nas linhagens resistentes RP e SC de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans* obtidas no experimento IV

Espécies e Linhagens	Réplicas	Número Total de Ovos	Número Total de pupas e Viabilidade Ovo-Pupa (%)	Número Total de Adultos e Viabilidade Pupa-Adulto (%)	Viabilidade Ovo-Adulto (%)
<i>D. melanogaster</i>					
<b>RP</b>	R1	181	97 (53,6)	97 (100,0)	53,6
	R2	186	157 (84,4)	124 (79,0)	66,7
	R3	228	187 (82,0)	187 (100,0)	82,0
	R4	187	150 (80,2)	104 (69,3)	55,6
	R5	186	137 (73,7)	133 (97,1)	71,5
	R6	180	119 (66,1)	114 (95,8)	63,3
	R7	203	170 (83,7)	162 (95,3)	79,8
	R8	203	179 (88,2)	171 (95,5)	84,2
	R9	200	109 (54,5)	105 (96,3)	52,5
	R10	186	154 (82,8)	149 (96,7)	80,1
<b>SC</b>	R1	297	265 (89,2)	265 (100,0)	89,2
	R2	304	246 (80,9)	244 (99,2)	80,3
	R3	261	240 (91,9)	239 (99,6)	91,6
	R4	232	224 (96,5)	223 (99,5)	96,1
	R5	230	187 (81,3)	185 (98,9)	80,4
	R6	178	169 (94,9)	165 (97,6)	92,7
	R7	266	168 (63,2)	168 (100,0)	63,2
	R8	274	227 (82,8)	226 (99,6)	82,5
	R9	182	148 (81,3)	148 (100,0)	81,3
	R10	195	170 (87,2)	170 (100,0)	87,2

---

 Continuação Tabela
*D. simulans*

<b>RP</b>	R1	175	94 (53,7)	94 (100,0)	53,7
	R2	185	123 (66,5)	123 (100,0)	66,5
	R3	163	113 (69,3)	106 (93,8)	65,0
	R4	186	123 (66,1)	119 (96,7)	64,0
	R5	160	99 (61,9)	92 (92,9)	57,5
	R6	164	94 (57,3)	94 (100,0)	57,3
	R7	147	113 (76,9)	109 (96,5)	74,1
	R8	179	122 (68,2)	112 (91,8)	62,6
	R9	152	102 (67,1)	102 (100,0)	67,1
	R10	197	82 (41,6)	77 (93,9)	39,1
<b>SC</b>	R1	89	71 (79,8)	71 (100,0)	79,8
	R2	86	69 (80,2)	67 (97,1)	77,9
	R3	75	63 (84,0)	63 (100,0)	84,0
	R4	126	74 (58,7)	66 (89,2)	52,4
	R5	121	91 (75,2)	87 (95,6)	71,9
	R6	175	95 (54,3)	91 (95,8)	52,0
	R7	129	0	0	0

---