

FABIANE CRISTINA CERUTI

Detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas, através de bioensaios e marcadores moleculares

Monografia apresentada ao Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia M. N. Lazzari

Curitiba
2000

Detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas, através de bioensaios e marcadores moleculares

FABIANE CRISTINA CERUTI

Monografia apresentada para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Setor de ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, à banca examinadora:

Prof^a Dr^a Sonia M. N. Lazzari

Dr. Giovani Mocelin

Dr. Airton Rodrigues Pinto Jr.

Curitiba, 2 de dezembro de 2000.

Dedico aos meus pais Adelmo e Marli pelas palavras de apoio e incentivo que me ensinaram a lutar sempre pela vida, com respeito e determinação. . .

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todos os momentos esteve comigo, diretamente através de Sua presença Divina, e indiretamente, por me conceder o privilégio de poder contar sempre com pessoas especiais a minha volta.

À Prof^a Dr^a Sonia M. N. Lazzari, agradeço pela orientação, cooperação, apoio, e amizade, durante a realização desta pesquisa.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) - Londrina, pela cessão do laboratório e equipamentos utilizados para testes com marcadores moleculares e colaboração de Alfredo Otávio R. de Carvalho e Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

À doutoranda Helenara dos Santos Beckel pelo apoio nas análises dos bioensaios e ao Dr. Irineu Lorini da Embrapa-Trigo, Passo Fundo, RS pelo envio de insetos para estudo.

Ao Dr. Airton Rodrigues Pinto Jr. pela contribuição e esclarecimentos na execução dos bioensaios.

Ao Dr. Paulo Roberto S. Pereira pelo auxílio na identificação das espécies de *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae* através do estudo da genitália.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e incentivo.

Aos meus pais e meu irmão Alexandre, pelo estímulo, carinho, apoio e atenção que sempre me dedicaram.

A Anderson R. Sartor, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão durante todos esses anos compartilhados.

À amiga Andréia A. Barbosa por todos os momentos de amizade compartilhados com carinho.

À Perdigão Agroindustrial S/A pela atenção e colaboração no envio de grãos com insetos para análise dos bioensaios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

RESUMO

O estudo da resistência de insetos de produtos armazenados a inseticidas é importante devido às elevadas perdas qualitativas e quantitativas, e também porque há poucos ingredientes ativos indicados para o controle destes organismos e, uma vez estabelecida a resistência, pouco poderá ser feito para efetuar um controle efetivo das populações. O objetivo desta pesquisa foi detectar populações de besouros de produtos armazenados resistentes e suscetíveis a inseticidas, baseando-se em bioensaios e marcadores moleculares. Apesar de terem sido coletadas diversas espécies, foram utilizados, para os ensaios os coleópteros *Sitophilus oryzae* (L.) e *S. zeamais* Motschulsky (Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Bostrychidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Silvanidae), provenientes de armazéns e criações de laboratório. A técnica utilizada para o bioensaio foi a de impregnação de papel filtro, aplicando-se 1 ml de solução de deltametrina (K-Obiol 25 CE[®]) em discos de papel filtro, em quatro concentrações diferentes, em cinco repetições; a testemunha continha apenas o solvente (acetona). Foram liberados 10 adultos por repetição, avaliando-se a mortalidade a 24 h. Os resultados mostraram uma mortalidade crescente de acordo com o aumento da concentração do inseticida e ao longo do tempo indicaram também que existiam populações resistentes e suscetíveis à dose utilizada. A CL₅₀ para avaliar o nível de resistência das populações foi determinada através da análise de probit. Os insetos vivos e mortos nos bioensaios foram congelados para os testes com marcadores moleculares. A técnica de PCR-RAPD utilizada para obtenção de bandas foi realizada com as seguintes condições: 1 X tampão (10 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂ e 50 mM KCl, pH 8,3), 100 µM de cada dNTP; 0,5 µM de primer; 1,25 U de *Taq* polimerase; 25 ng DNA e BSA 0,05%, utilizando-se o programa de amplificação: 3 min a 94°C, 3 min a 35°C e 2 min a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. Foram utilizados os primers OPA-05, OPA-07, OPA-10, OPA-16, OPA-18 e OPA-20. Os resultados ainda não demonstraram quais os primers que poderiam ser utilizados para detectar a resistência, mas os testes indicam que o método de extração, a quantidade de DNA por espécime e a qualidade do DNA são adequadas para os ensaios. A associação dos bioensaios com os marcadores moleculares representam uma ferramenta muito importante e precisa para a detecção e manejo da resistência das principais pragas.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ÍNDICE.....	iv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	5
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Coleta e Criação dos Insetos.....	6
Bioensaios.....	6
Marcadores moleculares.....	8
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
1. Bioensaios com deltametrina.....	9
2. Ensaio de DNA.....	18
3. PCR-RAPD.....	20
V. CONCLUSÃO.....	22
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

L. INTRODUÇÃO

Resistência é a habilidade de indivíduos de uma espécie de suportar doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos da população normal (Subramanyam & Hagstrum 1996). O termo resistência é aplicado por Smith (1970) para caracterizar espécies de insetos anteriormente suscetíveis, cuja população não pode mais ser controlada por um dado inseticida, na dose normalmente recomendada, ou em nenhuma dose. A resistência deve ser vista como um fenômeno de pré-adaptação, isto é, o inseticida não induz as mudanças hereditárias, mas somente seleciona em cada geração os genes responsáveis pela resistência, encontrados em uns poucos indivíduos (Brown 1958). Sob a pressão seletiva de inseticidas, aproximadamente 95% dos indivíduos - que são os suscetíveis - são eliminados, enquanto que os resistentes sobrevivem, reproduzem-se e aumentam sua proporção na população. Assim, há populações somente com genes resistentes ou suscetíveis, ou uma combinação de ambos.

Segundo Georghiou (1972), os insetos apresentam diversos mecanismos de resistência: bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. A detoxificação realizada por enzimas é um dos mais importantes; os inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides são detoxificados pela ação de oxidases de funções mistas, esterases e transferases; os organofosforados sofrem também a ação de hidrolases. Os mecanismos fisiológicos que reduzem a penetração incluem a redução da penetração e transporte do inseticida para o alvo (sistema nervoso), insensibilidade do sítio de ação e aumento da excreção. O autor refere-se, ainda, à resistência comportamental, devida a efeitos irritantes e repelentes dos inseticidas sobre indivíduos fisiologicamente suscetíveis, que alteram seu comportamento para evitar áreas tratadas.

O metabolismo ou detoxificação é provavelmente o mecanismo de resistência de insetos a inseticidas mais estudado. Esse mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo (Fukuto & Mallipudi 1983). A degradação do inseticida pode ocorrer por vários processos metabólicos nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto.

Em algumas espécies de coleópteros de produtos armazenados houve comprovação da resistência bioquímica, como indicado por Subramanyam *et al.* (1989), que detectaram resistência ao malation em todas as linhagens de campo de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) testadas, estando as carboxilesterases envolvidas com a detoxificação do produto. Collins *et al.* (1992), trabalhando com quatro linhagens de *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Silvanidae) constataram diferentes níveis de resistência a fenitrothion, associada à alta atividade de monooxigenase e ao clorpirifós-metil à alta atividade de esterase.

Guedes *et al.* (1997) demonstraram que a atividade específica de acetilcolinesterase diferiu significativamente entre populações resistentes e suscetíveis de *R. dominica*, indicando que a atividade aumentada da acetilcolinesterase estaria associada com a resistência a organofosforados. E, com relação à resistência bioquímica aos piretróides, estudos de Collins (1990), com a espécie *T. castaneum*, indicam que o aumento do metabolismo enzimático na molécula do inseticida envolveu oxidação e/ou hidrólise por ésteres.

As barreiras de penetração nos insetos são um mecanismo de resistência viável, sendo que a redução da penetração do inseticida pela cutícula é efetiva quando associada ao mecanismo de defesa metabólico (Matsumura 1983). A base genética deste mecanismo está relacionada a genes secundários, como o gene *pen* da mosca doméstica. Este é localizado no cromossomo III e é um gene recessivo que normalmente confere pouca ou nenhuma resistência na ausência de outro mecanismo de resistência e provavelmente não causa por si só significantes falhas de controle (Plapp & Wang 1983; Roush & Daly 1990).

No Brasil, há indicação de resistência de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae), *T. castaneum* e *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrychidae) a organofosforados (Pacheco *et al.* 1991) e à fosfina (Sartori *et al.* 1991). Guedes (1993) registrou a resistência de linhagens de *Sitophilus zeamais* Motschulsky a DDT e piretróides. A estabilidade e severidade da resistência tem sido documentada para algumas linhagens das principais espécies de insetos de armazenamento a inseticidas, em diversas regiões do País. Isso evidencia a necessidade urgente de fazer o manejo integrado de pragas no armazenamento (Lorini 1998) para que esses inseticidas sejam preservados pelo maior tempo possível, haja vista a grande dificuldade de substituição desses produtos.

Dessa forma, o manejo da resistência das pragas aos inseticidas no ambiente de armazenagem de grãos é uma prática essencial, pois é muito difícil controlar uma praga depois de ela tornar-se resistente a um produto químico. O manejo adequado pode reduzir o número de espécies resistentes ou, no mínimo, retardar o aparecimento do problema da resistência (Lorini 1997).

A importância do estudo da resistência de insetos de produtos armazenados a inseticidas pode ser resumida em dois aspectos: o primeiro refere-se às perdas quantitativas e qualitativas da produção impostas pelo ataque de insetos; o segundo está relacionado com o reduzido número de produtos utilizados no controle desses insetos, sendo que, uma vez estabelecida a resistência, pouco poderá ser feito para efetuar um controle efetivo das populações.

As técnicas de bioensaios têm sido adotadas para detectar a resistência em insetos de produtos armazenados, porém, os testes de dose-resposta exigem um grande número de insetos, são demorados e pouco precisos para detectar baixas frequências de resistência nas populações (Subramanyam & Hagstrum 1996). Técnicas bioquímicas, como eletroforese para a detecção da atividade de esterases em homogeneizados de insetos; métodos colorimétricos com anti-soro policlonal para enzimas específicas; e marcadores moleculares para genes de resistência específicos são discutidos por French-Constant & Roush (1990).

O conhecimento da base genética da resistência a inseticidas é fundamental para estabelecer estratégias para o manejo da resistência. Maiores progressos no entendimento da resistência poderiam ser obtidos se houvesse disponibilidade de marcadores moleculares ligados à resistência. Entretanto, ainda não estão disponíveis marcadores e mapas genéticos para pragas de grãos armazenados.

Diversas técnicas para a obtenção de marcadores moleculares (DNA) foram desenvolvidas e já estão sendo utilizadas em entomologia. Um avanço importante para a disseminação do uso de marcadores moleculares foi o estabelecimento da técnica PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase). Através dela é possível ampliar exponencialmente um fragmento específico de DNA a partir de uma quantidade muito pequena de moléculas.

Um dos protocolos de amplificação de DNA derivado de PCR é o RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA – Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico), o qual permite a ampliação de fragmentos de DNA delimitados por primers (10 pares de bases) com seqüências arbitrárias, os quais hibridizam-se em seqüências complementares distribuídas ao acaso no DNA. Desta forma, são detectadas variações produzidas por mutações nos sítios de hibridização ou por inserções e deleções entre estes sítios. A técnica RAPD tem sido muito utilizada para diferenciar espécies e populações, identificar espécies, reconstituir filogenia, monitorar variações genéticas dentro e entre biótipos e para estudos epidemiológicos de insetos vetores de doenças (Ballinger-Crabtree *et al.* 1992; Kambhampati *et al.* 1992; Apostol *et al.* 1993; Mendel *et al.* 1994).

A escolha do uso da técnica de RAPD, dentre outras capazes de fornecer marcadores, deve-se a algumas vantagens, como a não necessidade de ter informação prévia sobre seqüências de DNA, grande disponibilidade de primers, rapidez e custo mais baixo que outras técnicas de PCR. Algumas desvantagens também podem ser enumeradas – marcadores dominantes, falta de reprodutibilidade se as condições da reação não forem otimizadas ou se problemas de contaminação não forem resolvidos. Entretanto, com a atenção devida a estas restrições, RAPD pode fornecer bastante informação, especialmente em espécies que ainda não foram sujeitas a análises genéticas detalhadas, devido ao grande número de marcadores que podem ser obtidos.

Para encontrar marcadores moleculares adequados para a resistência a inseticidas, podem ser comparados perfis de RAPD de grupos de insetos suscetíveis e resistentes, preferencialmente obtidos da mesma população. Isto diminui o número de fragmentos que são devidos às diferenças entre populações, e que portanto não estariam relacionados a resposta aos inseticidas. Portanto, bandas que são grupo-específicas são candidatas para análise de ligação gênica usando cruzamentos entre insetos suscetíveis e resistentes. Nestes cruzamentos, entre indivíduos suscetíveis e resistentes, somente os fragmentos presentes em um dos pais e ausente no outro são informativos para análise de ligação.

O manejo da resistência tem como objetivos: prevenir, retardar ou reverter a evolução da resistência de pragas aos inseticidas. A detecção e estimativa da resistência e de padrões genéticos da resistência, bem como o desenvolvimento de técnicas rápidas,

simples e confiáveis, são essenciais para desenvolver um programa bem sucedido de manejo da resistência. A estratégia mais comum tem sido o uso de diversos inseticidas usados seqüencialmente, em misturas ou rotação (Roush 1989; Tabashnik 1989), além de produtos sinérgicos que bloqueiam certos processos metabólicos. O desenvolvimento da resistência pode ser retardado reduzindo o número de aplicações de inseticidas, adequando as dosagens de acordo com a freqüência da resistência e uso de produtos menos persistentes. A suscetibilidade pode ser preservada, provendo refúgio para estes indivíduos, através de coberturas parciais, propiciando a imigração dos suscetíveis para a diluição dos genes resistentes.

Modelos matemáticos podem ser usados para elaborar programas de manejo da resistência, predizer sua evolução e programar as aplicações de inseticidas. Contudo, o programa de manejo mais efetivo, segundo Subramanyam & Hagstrum (1996) envolve o uso de produtos inseticidas naturais associados a outras medidas para o manejo de pragas de armazenamento, e usando os inseticidas como uma medida alternativa, apenas quando a população atingir o nível econômico de danos.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral detectar a resistência de insetos de produtos armazenados a inseticidas, com a finalidade de se definir estratégias para o manejo da resistência em estudos posteriores. Os objetivos específicos foram:

1. Detectar, através de bioensaios, populações de coleópteros resistentes e suscetíveis a inseticidas convencionalmente usados em produtos armazenados;
2. Identificar e confirmar as populações resistentes e suscetíveis através de marcadores moleculares;
3. Determinar a razão da resistência nas populações dos insetos estudados.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Criação dos Insetos

Foram coletadas amostras de insetos de produtos armazenados em armazéns, incluindo as seguintes espécies: *S. zeamais*, *S. oryzae*, *R. dominica*, *T. castaneum* e *O. surinamensis*, que são as principais pragas de grãos e farinhas (Tabela I).

Amostras infestadas de grãos foram coletadas com auxílio de canecas e/ou armadilhas tipo calador, colocadas em sacos plásticos devidamente etiquetados, e levadas ao laboratório da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para estabelecer a criação estoque.

Cada espécie, de cada local, foi criada sobre o grão/produto de origem, em um pote plástico de 2 l, com a tampa de tela fina. Os grãos foram previamente congelados para eliminar qualquer infestação. A criação foi mantida em câmara climatizada com temperatura em torno de 25 °C e umidade relativa de 75%, e algumas em temperatura ambiente. As amostras foram repicadas periodicamente para a manutenção das populações.

Bioensaios

Foi utilizada a técnica de tratamento de papel de filtro impregnado com inseticida (FAO Método nº 15). Foram usados cartões de papel de filtro de 9 cm de diâmetro, tratados com 1 ml de solução de deltametrina em diferentes concentrações, usando acetona como solvente e somente acetona como controle (FAO 1974).

Foram testadas inicialmente quatro concentrações do inseticida deltametrina (K-Obiol 25 CE®), com 5 repetições, iniciando-se com a dosagem recomendada pelo fabricante, que foi então dividida ao meio e assim sucessivamente (25 g/1000 ml), o limite das concentrações foi de 0,125% a 2%. Cada papel com as respectivas concentrações do inseticida foi seco ao ar e colocado em uma placa de Petri. Após 1 h, foram colocados em cada placa 10 adultos da espécie em questão, sem sexagem e sem idade definida, fechando-se as placas com fita adesiva para evitar fuga. Os insetos permaneceram expostos aos tratamentos durante 24 horas, quando a mortalidade foi avaliada. O número de insetos mortos foi contado e expresso em porcentagem, os insetos que em 1 minuto não

conseguiram desvirar-se quando colocados de costas, foram considerados mortos. A CL_{50} foi determinada através da análise de Probit através do programa GLIM, Royal Statistical Society versão 3.77 (Crawley 1993). A razão de resistência foi obtida pela razão entre a CL_{50} da população mais resistente e a CL_{50} da população suscetível.

Tabela I. Populações de insetos utilizados nos bioensaios, testes com marcadores moleculares (DNA) e método de preservação das amostras para estudos de resistência a inseticidas.

População	Utilização Bioensaio	Utilização Ensaio DNA	Método de preservação p/ PCR-RAPD
<i>Sitophilus zeamais</i> Viçosa – MG	sim	amostra 6 a amostra 6 b	<i>In vivo</i>
<i>Sitophilus zeamais</i> Campo -Erê - SC	sim	—	—
<i>Sitophilus zeamais</i> Videira – SC	sim	amostra 7 a amostra 7 b	<i>In vivo</i>
<i>Sitophilus zeamais</i> Guarapuava – PR (milho úmido)	sim	amostra 5 a amostra 5 b	<i>In vivo</i>
<i>Sitophilus zeamais</i> Guarapuava – PR (milho seco)	sim	amostra 4 a amostra 4 b	<i>In vivo</i>
<i>Rhyzopertha dominica</i> suscetível (BR4) Passo Fundo – RS	sim	amostra 2	<i>In vivo</i> / álcool 70%
<i>Rhyzopertha dominica</i> resistente(BR12) Passo Fundo – RS	sim	amostra 1	<i>In vivo</i> / álcool 70%
<i>Sitophilus oryzae</i> A	sim	—	—
<i>Sitophilus oryzae</i> B	sim	—	—
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> Passo Fundo – RS	sim	amostra 3	Álcool 70%
<i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 27/09/00	sim	amostra 8 a amostra 8 b	Congelados -18°C
<i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 27/09/00	sim	amostra 9 a amostra 9 b	Congelados -18°C
<i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 3/10/00	sim	amostra 10 a amostra 10 b	Congelados -18°C
<i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 3/10/00	sim	amostra 11 a amostra 11 b	Congelados -18°C

Marcadores moleculares

Com esse experimento objetivou-se determinar se fragmentos de RAPD poderiam contribuir como marcadores genéticos para a análise da resistência a inseticidas em pragas de grãos armazenados.

As amostras submetidas à técnica de PCR-RAPD foram preservadas em álcool a 70 %, congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e *in vivo* para verificação da interferência do método de preservação na qualidade de bandas.

Foi usado o protocolo de extração de DNA total descrito por Cheung *et al.* (1993), com leves modificações: Coloca-se o inseto em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 200 μl do tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 2 M NaCl e 70 mM EDTA) e tritura com o homogeneizador elétrico (Glas-Col Mod. 099C) com pistilo de polipropileno (lavados e autoclavados). Adiciona-se 50 μl de sarcosyl 5% (detergente), homogeneizar novamente e incubar em banho-maria ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Centrifuga-se a 10000 rpm por 15 min e transfere o sobrenadante para um novo tubo de microcentrifuga. Precipita-se o DNA adicionando 110 μl de acetato de amônia (10 M) e 250 μl de isopropanol gelado, deixando-se à noite na geladeira. Centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos, descarta-se o sobrenadante e lavar o “pellet” duas vezes com etanol a 70% gelado (300 μl de cada vez). Remover o etanol e deixar o “pellet” secar à temperatura ambiente, escorrendo sobre lenço de papel. Adicionar 50 μl de TE Buffer (Tris-EDTA, pH 8,0), contendo Rnase (10 $\mu\text{g/ml}$), guardar a 4°C enquanto estiver usando a amostra ou a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por longo prazo.

A quantificação do DNA foi determinada através do fluorímetro com a amostra, 10 X TNE (1 M Tris pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; 5 M NaCl pH 8,0; H_2O Milli Q) e o corante Hoeschst 33258.

A qualidade do DNA foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se 500 ng de DNA para cada amostra. A corrida foi em 0,5 X TBE (Tris-borato-EDTA) a 5 V/cm, corando-se o gel em solução de brometo de etídio 0,05%. O marcador utilizado foi o n° 6 da Pharmacia Biotech com 23.130 pares de bases (pb).

Cada amostra apresentava um volume final de 20 µl contendo DNA + Bromofenol blue + H₂O Milli Q. O gel foi fotografado com sistema Kodak EDAS 120.

As reações de amplificação (PCR-RAPD) foram realizadas seguindo uma metodologia previamente testada para outros insetos no IAPAR de Londrina. Usou-se um volume total de 25 µl em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, contendo 100 µM de cada de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5 µM de cada primer, 25 ng de DNA, 1,25 U de *Taq* polimerase, 0,05% de BSA e tampão (10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂ e 50 mM KCl, pH 8,3). As amplificações foram conduzidas em ciclador térmico (M.J. Research), com período inicial de desnaturação 3 min a 94 °C, 3 min a 35 °C e 2 min a 72 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C e 2 min a 72 °C, com extensão final de 5 min a 72 °C. Foram utilizados os primers OPA-05, OPA-07, OPA-10, OPA-16, OPA-18 e OPA-20. Os produtos das amplificações foram visualizados através da eletroforese usando 15 µl da reação em 1,2% gel de agarose, a 5 V/cm, contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio, e em seguida fotografados foram com o sistema de análise de imagens Kodak EDAS 120.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Bioensaios com deltametrina

Os resultados dos bioensaios em papel filtro tratado com deltametrina mostraram que para *S. zeamais* (Tabela II), as populações de Viçosa – MG (Figura 1) e de Campo-Erê - SC (Figura 2), com CL₅₀ 0,5467 e 0,5222 respectivamente, foram mais resistentes que as populações de Videira – SC (Figura 3) e Guarapuava - PR (Figura 4), com CL₅₀ de 0,2264 e 0,1698, respectivamente. O fator de resistência das três primeiras populações com relação à de Guarapuava, considerada a mais suscetível, foi 3,22; 3,07 e 1,34 respectivamente, o que não representa um nível considerável de resistência, FR 5 a 7 vezes não afeta a eficácia do inseticida a campo.

Bioensaios com as populações de *S. oryzae* (Tabela III) mostraram que a população A (Figura 5) apresentou CL₅₀ de 1,209 (concentração de 1,7% de deltametrina), significativamente diferente da população B (Figura 6), cuja CL₅₀ foi 0,1315 (1% de deltametrina).

Esses resultados indicam que a população B é mais suscetível ao inseticida, pois, foi utilizada apenas a metade da concentração da população A, sendo que o fator de resistência foi de 9,2.

Bioensaios com as populações de *R. dominica* (Tabela IV) provenientes da Embrapa-Trigo, Passo Fundo-RS, indicaram que a população de *R. dominica* BR12 (Figura 7), com CL_{50} de 0,4883, apresenta diferença significativa com a população de *R. dominica* BR4 (Figura 8) com CL_{50} de 0,2212. Esta última apresentou maior suscetibilidade ao inseticida mesmo a uma concentração menor do que utilizada na população BR12, confirmando o histórico de resistência dessas raças, as quais foram caracterizadas e previamente testadas na Embrapa-Trigo (Beckel 2000). O fator de resistência da raça BR12 foi 2,2 vezes maior que o da raça BR4. Este resultado diferiu consideravelmente do valor ($FR=873,2$) encontrado por Beckel (2000). Esta diferença pode ser resultante de pressão seletiva a que esta população estava submetida durante a realização dos experimentos da autora. Enquanto que neste experimento as populações já pertenciam a gerações bem mais avançadas e estavam sendo criadas sem pressão seletiva.

O bioensaio realizado com *O. surinamensis* (Tabela V) mostrou uma CL_{50} de 0,1966 (Figura 9), com as menores concentrações utilizadas nos bioensaios, ficando no mesmo nível de suscetibilidade das populações suscetíveis das espécies de *Sitophilus*. Não foi possível obter outra população da espécie para determinar o fator de resistência dessa amostra.

O fator de resistência (FR) menor que 5 a 7 vezes não afeta muito a eficácia do inseticida a campo, não sendo possível, muitas vezes, afirmar se é problema de resistência ou falha na aplicação do produto (A. Rodrigues Pinto Jr., comunicação pessoal). Nesta pesquisa, somente a população de *S. oryzae* A apresentou um valor acima desse nível ($FR = 9,2$), as outras populações testadas ficaram abaixo do valor de referência, porém, os bioensaios forneceram indícios claros de resistência em algumas delas.

Tabela II. Valores da CL₅₀ (µg/cm² de deltametrina) para adultos de *Sitophilus zeamais*, expostos a papel filtro tratado com deltametrina para a determinação do fator de resistência, a 25 °C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

População	CL ₅₀ (95% I.C)*	a	EP _a	B	EP _b	FR
<i>S. zeamais</i> Viçosa – MG	0,5467 (0,4261-0,7584)	0,7606	0,2551	2,900	0,5178	3,22
<i>S. zeamais</i> Campo-Erê – SC	0,5222 (0,4025-0,7329)	0,7714	0,2543	2,734	0,5043	3,07
<i>S. zeamais</i> Videira – SC	0,2264 (0,1558-0,2971)	1,685	0,2998	2,611	0,5000	1,34
<i>S. zeamais</i> Guarapuava -PR	0,1698 (0,0798-0,2479)	1,472	0,2862	1,911	0,4750	—

*Concentração letal de 50 % (CL₅₀) e intervalo de confiança (I.C)

a = coeficiente linear; b= coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de resistência (qualquer CL₅₀ dividida pela CL₅₀ da população mais suscetível)

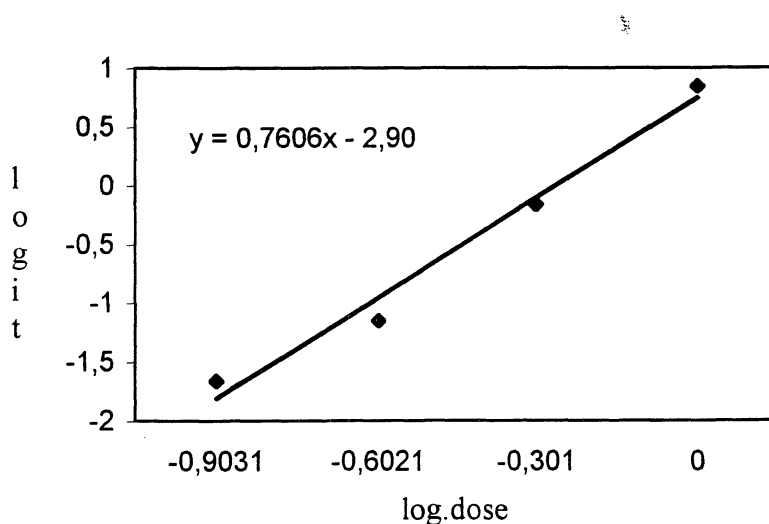


Figura 1. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais*, Viçosa – MG, a diferentes concentrações de deltametrina (µg/cm²), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

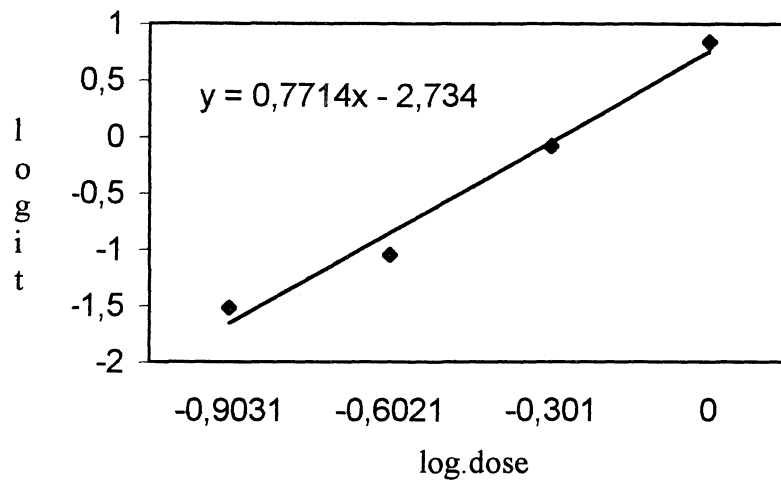


Figura 2. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais*, Campo-Erê - SC, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

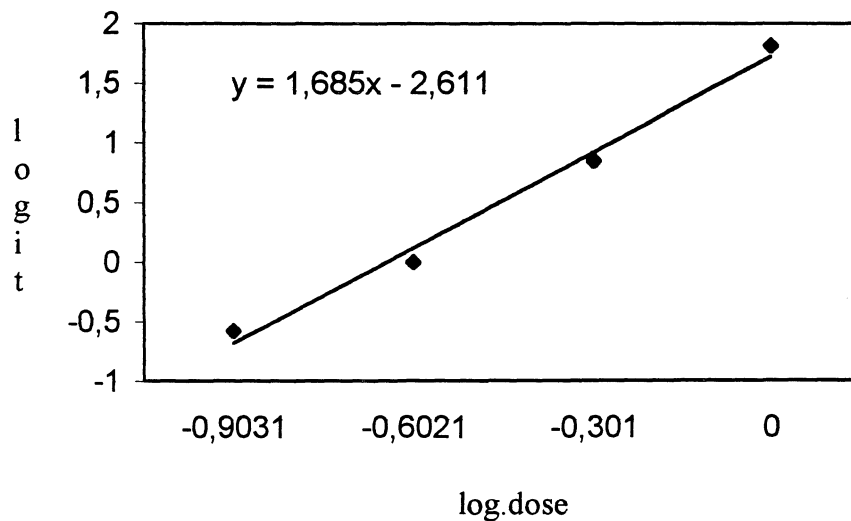


Figura 3. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais*, Videira - SC, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

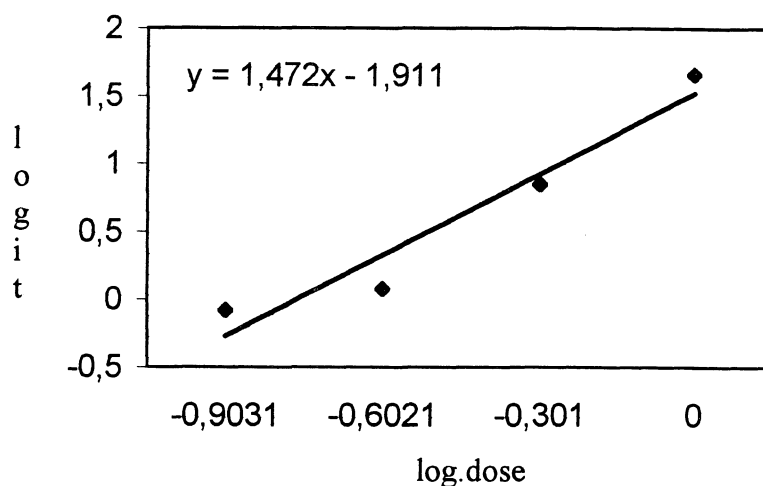


Figura 4. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais*, Guarapuava - PR, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

Tabela III. Valores da CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de deltametrina) para adultos de *Sitophilus oryzae*, expostos a papel filtro tratado com deltametrina para a determinação do fator de resistência, a 25 °C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

População	CL_{50} (95% I.C)*	a	EP_a	b	EP_b	FR
<i>S. oryzae</i> A	1,209 (1,129-1,269)	-1,322	0,3556	16,07	0,2671	9,2
<i>S. oryzae</i> B	0,1315 (0,0675-0,1856)	2,186	0,3480	2,481	0,5398	—

*Concentração letal de 50 % (CL_{50}) e intervalo de confiança (I.C)

a = coeficiente linear; b= coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de resistência (CL_{50} da população A pela CL_{50} da população B)

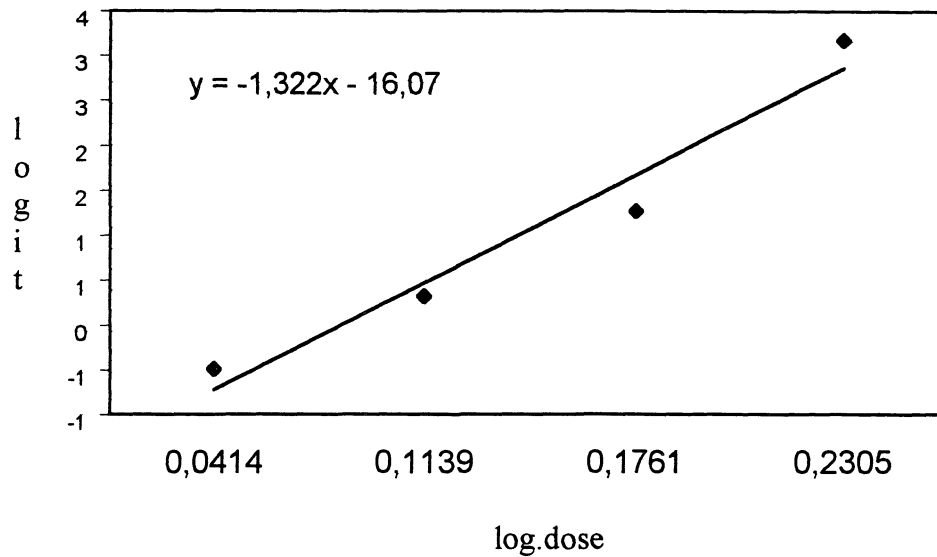


Figura 5. Mortalidade de adultos de *Sitophilus oryzae* da população A, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

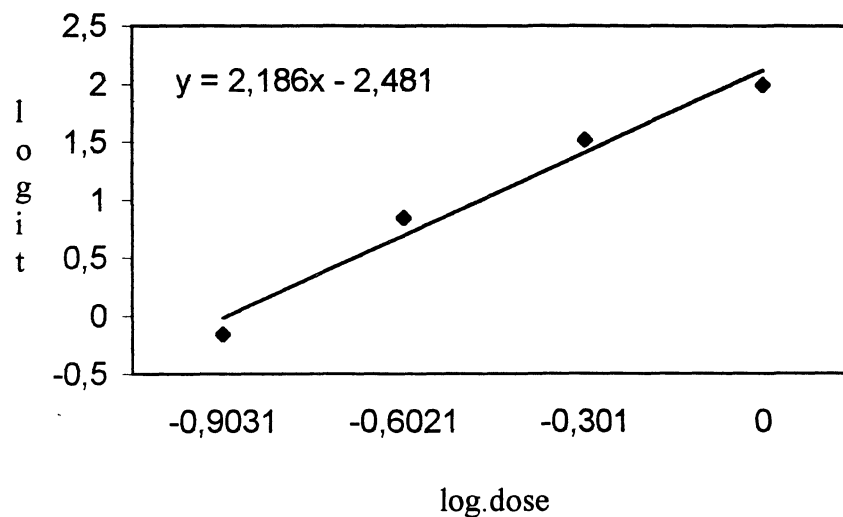


Figura 6. Mortalidade de adultos de *Sitophilus oryzae* da população B, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

Tabela IV. Valores da CL₅₀ (µg/cm² de deltametrina) para adultos de *Rhyzopertha dominica*, expostos a papel filtro tratado com deltametrina para a determinação do fator de resistência, a 25 °C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

População	CL ₅₀ (95% I.C)*	a	EP _a	b	EP _b	FR
<i>R. dominica</i> (BR12)	0,4883 (0,3235-0,6596)	0,7161	0,1784	2,30	0,4791	2,2
<i>R. dominica</i> (BR4)	0,2212 (0,1404-0,3005)	1,489	0,2864	2,272	0,4818	—

*Concentração letal de 50 % (CL₅₀) e intervalo de confiança (I.C)

a = coeficiente linear; b= coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de resistência (CL₅₀ da BR12 dividida pela CL 50 da raça BR4)

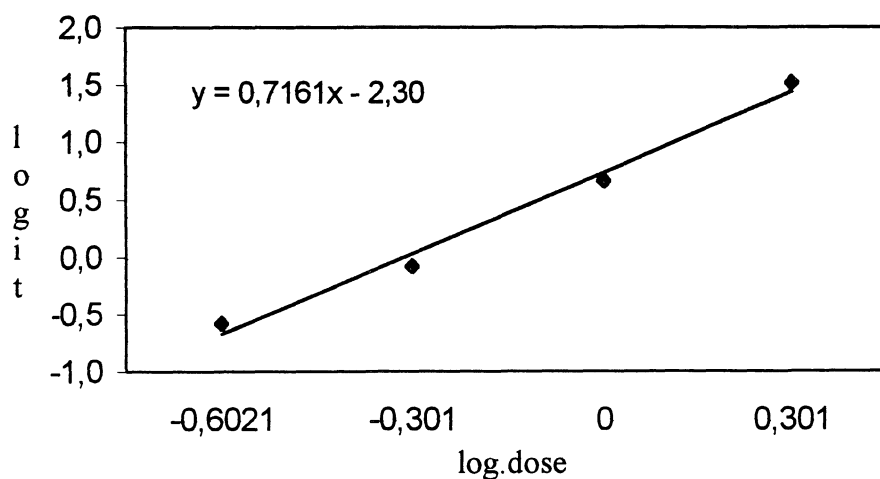


Figura 7. Mortalidade de adultos de *Rhyzopertha dominica* (BR12), a diferentes concentrações de deltametrina (µg/cm²), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

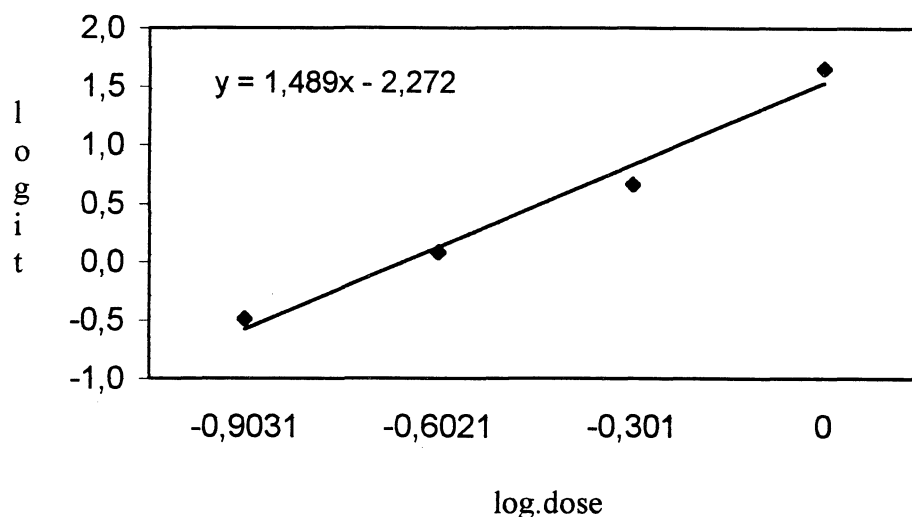


Figura 8. Mortalidade de adultos de *Rhyzopertha dominica* (BR4), a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

Tabela V. Valores da CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de deltametrina) para adultos de *Oryzaephilus surinamensis*, expostos a papel filtro tratado com deltametrina para a determinação do fator de resistência, a 25 °C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

População	CL_{50} (95% I.C)*	A	EP_a	B	EP_b	FR
<i>O. surinamensis</i>	0,1966 (0,1314-0,2581)	1,906	0,3179	2,699	0,5156	—

*Concentração letal de 50 % (CL_{50}) e intervalo de confiança (I.C)

a = coeficiente linear; b= coeficiente angular; EP = Erro Padrão

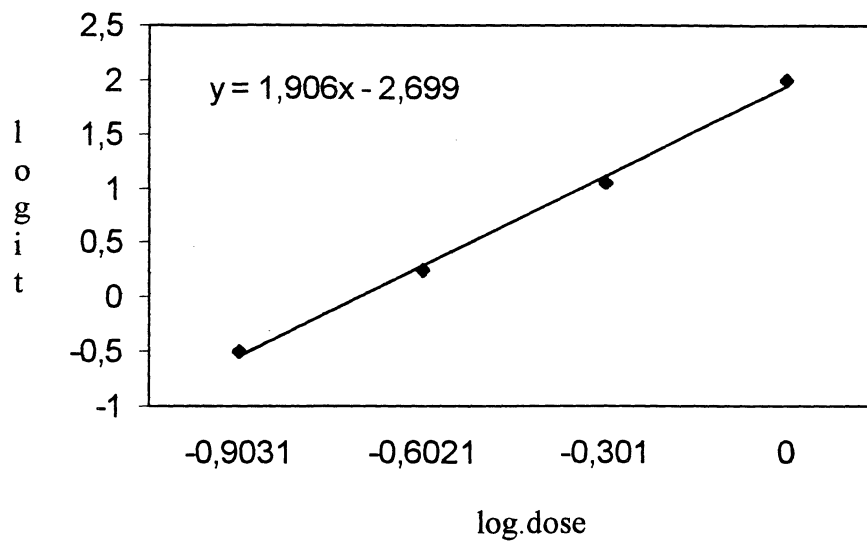


Figura 9. Mortalidade de adultos *Oryzaephilus surinamensis*, a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em 5 repetições, em papel filtro impregnado com o inseticida, a 25°C e UR 70%, Curitiba, PR, 2000.

2. Ensaio de DNA

Extração do DNA

Foi extraído DNA das populações indicadas na Tabela I, utilizando o protocolo modificado descrito por Cheung *et al.* (1993) em diferentes métodos de preservação. Todos os métodos utilizados (*in vivo*, álcool 70% temperatura ambiente e congelados -18°C) mostraram-se eficientes para a preservação e extração sem interferir na quantidade, qualidade do DNA e reações de amplificação realizadas para os testes com marcadores moleculares.

Quantificação do DNA

Os resultados obtidos demonstraram que a extração de DNA teve quantidades satisfatórias para as análises posteriores de sua qualidade, pois o mínimo para as reações de amplificação é de 5 ng de DNA/ μ l. Na tabela VI tem-se as quantidades de DNA obtidas de cada amostra, usando dois espécimes/amostra.

Qualidade do DNA

A Figura 10 indica que todas as amostras tiveram ótima qualidade de DNA, pois as bandas foram bem nítidas, significando que não houve degradação e que as amostras são viáveis para a reação de amplificação. Nota-se que todas as amostras apresentaram DNA de alta qualidade, com peso molecular acima de 23,1 Kb.

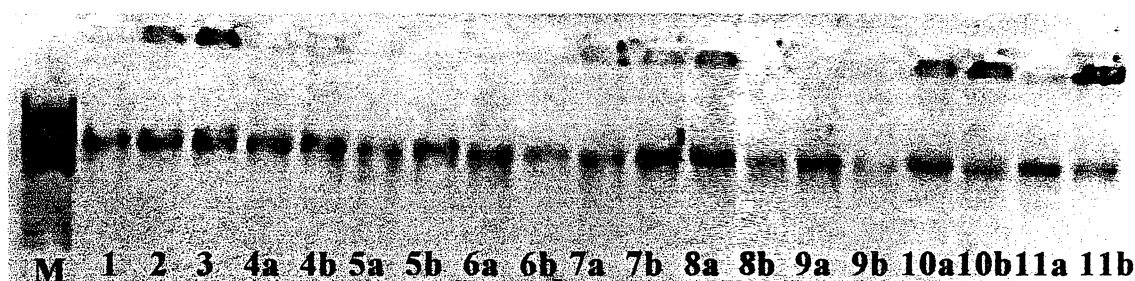


Figura 10. Gel de agarose 0,8% com amostras de insetos de produtos armazenados com bandas de DNA para avaliação da qualidade. O marcador M utilizado foi o nº 6 da Pharmacia Biotech com a banda mostrada na figura com 23.130 pares de bases. Os números indicam as amostras utilizadas no experimento. (Tabela I).

Tabela VI. Quantificação de DNA por fluorimetria, utilizando 10 X TNE e o corante Hoechst 33258 de amostras de insetos de produtos armazenados .

	AMOSTRA	ng DNA/μl	Total DNA (ng)
1	Amostra a – <i>Rhyzopertha Dominica</i> resistente BR12	93	1860
2	Amostra b – <i>Rhyzopertha Dominica</i> resistente BR12	161	3220
3	Amostra a – <i>Rhyzopertha Dominica</i> suscetível BR4	84	1680
4	Amostra b – <i>Rhyzopertha Dominica</i> suscetível BR4	234	4680
5	Amostra a – <i>Oryzaephilus surinamensis</i>	48	960
6	Amostra b – <i>Oryzaephilus surinamensis</i>	87	1740
7	Amostra a – <i>S. zeamais</i> Guarapuava milho seco	186	3720
8	Amostra b – <i>S. zeamais</i> Guarapuava milho seco	300	6000
9	Amostra a – <i>S. zeamais</i> Guarapuava milho úmido	88	1760
10	Amostra b – <i>S. zeamais</i> Guarapuava milho úmido	122	2440
11	Amostra a – <i>Sitophilus zeamais</i> Viçosa – MG	206	4120
12	Amostra b – <i>Sitophilus zeamais</i> Viçosa – MG	131	2620
13	Amostra a – <i>Sitophilus sp.</i> Quirera de milho Videira	85	1700
14	Amostra b – <i>Sitophilus sp.</i> Quirera de milho Videira	132	2640
15	Amostra a – <i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 27/09/00	145	2900
16	Amostra b – <i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 27/09/00	37	740
17	Amostra a – <i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 27/09/00	93	1860
18	Amostra b – <i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 27/09/00	91	1820
19	Amostra a – <i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 03/10/00	128	2560
20	Amostra b – <i>Sitophilus sp.</i> T1 (vivos) 03/10/00	145	2900
21	Amostra a – <i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 03/10/00	96	1920
22	Amostra b – <i>Sitophilus sp.</i> T4 (mortos) 03/10/00	91	1820

3. PCR – RAPD

A Figura 11 apresenta fragmentos de DNA amplificados para *R. dominica* e *O. surinamensis*. Os primers OPA-05 e OPA-07 amplificaram, respectivamente, uma banda com 1.150 pb e 700 pb, ambas para a população suscetível de *R. dominica* (amostras 2 e 4), e nenhum fragmento para a população resistente (amostras 1 e 3). Os primers OPA-18 e OPA-20 amplificaram uma série de fragmentos entre 300 e 2.000 pb para as populações resistentes e suscetíveis de *R. dominica* (amostras 9 a 12), sendo que ambos os primers indicam a possibilidade de existência de variabilidade genética entre estas populações. Os primers OPA-10 e OPA-16 (amostras 5 a 8) não amplificaram nenhum fragmento de DNA.

Para *O. surinamensis*, apenas os primers OPA-18 e OPA-20 amplificaram fragmentos de DNA, sendo que os demais não amplificaram ou, como no caso de OPA-05, os fragmentos amplificados foram pouco visíveis (amostras 13 a 16).

Os resultados de RAPD para *S. zeamais* estão apresentados na Figura 12. Observa-se que os primers OPA-07, OPA-10 e OPA-16 (amostras 4 a 12) amplificaram diversos fragmentos polimórficos para as populações de *S. zeamais* procedentes de Guarapuava, Viçosa e Videira. Os diferentes padrões de bandas apresentados por cada um desses primers, para cada população de *S. zeamais*, embora tenha se utilizado apenas um espécime de cada local, indica a possibilidade de uma ocorrência de variabilidade genética entre essas populações. O primer OPA-05 (amostras 1 a 3) não amplificou satisfatoriamente os fragmentos de DNA das amostras das três populações, não permitindo qualquer inferência. Os primers OPA-18 e OPA-20 (amostras 13 a 18), apresentaram padrões semelhantes para as três populações não caracterizando variabilidade entre as populações.

Apesar de ser possível concluir que o método PCR-RAPD utilizado é adequado para este tipo de análise, ficou evidente que um número maior de primers e populações precisam ser testados para se chegar a resultados mais definitivos quanto à marcação da resistência/suscetibilidade.

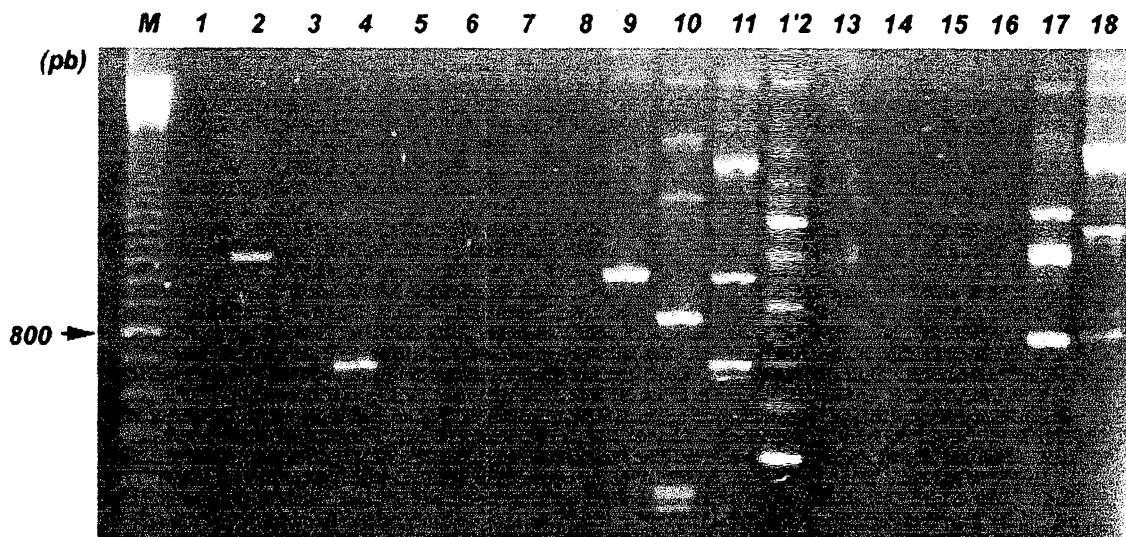


Figura 11. Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD. (M) marcador 100 pb; (1) *Rhizopertha dominica* (R), (2) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-05; (3) *Rhizopertha dominica* (R), (4) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-07; (5) *Rhizopertha dominica* (R), (6) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-10; (7) *Rhizopertha dominica* (R), (8) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-16; (9) *Rhizopertha dominica* (R), (10) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-18; (11) *Rhizopertha dominica* (R), (12) *R. dominica* (S)- amplificados com o primer OPA-20; (13-18) *Oryzaephilus surinamensis*. DNA amplificado respectivamente com os primers OPA-05, OPA-07, OPA-10, OPA-16, OPA-18 e OPA-20.

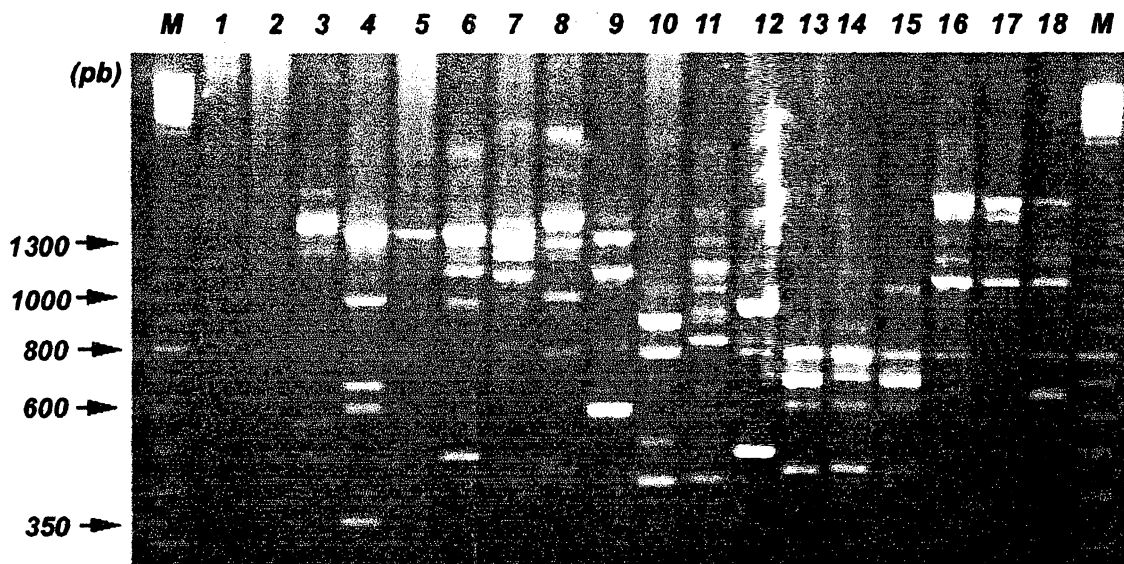


Figura 12. Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD. (M) marcador 100 pb; (1) *Sitophilus* Guar.; (2) *Sitophilus* Viç.; (3) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-05; (4) *Sitophilus* Guar.; (5) *Sitophilus* Viç.; (6) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-07; (7) *Sitophilus* Guar.; (8) *Sitophilus* Viç.; (9) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-10; (10) *Sitophilus* Guar.; (11) *Sitophilus* Viç.; (12) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-16; (13) *Sitophilus* Guar.; (14) *Sitophilus* Viç.; (15) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-18; (16) *Sitophilus* Guar.; (17) *Sitophilus* Viç.; (18) *Sitophilus* Vid., amplificados com o primer OPA-20.

V. CONCLUSÃO

Os coleópteros de produtos armazenados utilizados nos bioensaios: *S. zeamais*, *S. oryzae* e *R. dominica* apresentam populações resistentes ao inseticida deltametrina, com fator de resistência de 3,2; 9,2 e 2,2, respectivamente, com relação às populações suscetíveis das espécies.

Amostras de *S. zeamais*, *S. oryzae*, *R. dominica* e *O. surinamensis* podem ser utilizadas *in vivo*, preservadas em álcool a 70% ou congeladas a - 18° C por pelo menos oito meses, sem alterar a qualidade do DNA para os ensaios de PCR-RAPD.

As análises PCR-RAPD revelam bandas que indicam a variabilidade intraespecífica das populações, indicando que esta técnica pode ser utilizada para a detecção da resistência/suscetibilidade. Porém, um número maior de primers e de populações precisam ser testados para selecionar os mais indicados para a marcação da resistência.

A associação de bioensaios e testes de PCR-RAPD podem representar uma ferramenta precisa e útil em programas de manejo da resistência em armazenagem.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APOSTOL, B. L.; BLACK IV, W. C.; MILLER, B. R.; REITER, P.; BEATY, B. J. 1993. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. **Theor. App. Gen.**, **86**:991-1000.
- BALLINGER-CRABTREE, M. E.; BLACK IV, W.C.; MILLER, B. R. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**:893-901.
- BECKEL, H.S. 2000. **Comportamento de *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) em relação à resistência ao inseticida deltamethrin**. Tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 63 p.
- BROWN, A. W. A. 1958. **Insecticide resistance in arthropods**. Geneva, World Health Organization. 148p.
- CHEUNG, W. Y., HUBERT, N.; LANDRY, B. S. 1993. A simple and rapid microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** **3**:69-70.
- COLLINS, P.J. 1990. A new resistance to pyrethroids in *Tribolium castaneum* (Herbst.) **Pestic. Sci.**, **28**: 101-115.
- COLLINS, P. J., H. A. ROSE & M. WEGECSENYI. 1992. Enzyme activity in strains of the sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) differentially resistant to fenitrothion, malathion and chlorpyrifos-methyl. **J. Econ. Entomol.** **85**: 1571-1575.
- CRAWLEY, M. J. 1993. **Glim for ecologists**. Blackwell Scientific Publications. Oxford, United Kingdom. 379 p.
- FAO 1974. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides. Method for adults of some major pests of stored cereals with malathion or lindane. FAO Method 15. **FAO Plant Protection**, **22**:127-137.

- FRENCH-CONSTANT, R. H. & R. T. ROUSH. 1990. Resistance detection and documentation: The relative roles of pesticidal and biochemical assays. p.4-38. In: **Pesticide resistance in arthropods**. Roush, R.T. & Tabashnik, B. (Eds.) Chapman & Hall, New York/London.
- FUKUTO, T.R. & MALLIPUDI, N.M. 1983. Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification. p.557-578 In: **Pest resistance to pesticides: challenges e prospects**, G. P. Georghiou & T. Saito (Eds.). Plenum Press, New York, United States of America.
- GEORGHIOU, G. P. 1972. The evolution of resistance to pesticides. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 3:133-168.
- GUEDES, R. N. C., KAMBHAMPATI, S., DOVER, B. A. & ZHU, K. Y. 1997. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United State and Brazil. **Bull. Entomol. Res.** 87: 581-586.
- GUEDES, R. N. C. 1993. **Detecção e herança de resistência ao DDT e piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 67p.
- KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W.C.; RAI, K.S. 1992. Random amplified polimorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **Journal of Medical Entomology**, 29:939-945.
- LORINI, I. 1997. **Insecticide resistance in *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrychidae), a pest of stored grain**. London: University of London Ph.D. Thesis.166P.
- LORINI, I. 1998. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa – CNPT (Embrapa – CNPT Documentos, 48), 52 p.

- MATSUMURA, F. 1983. Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. p. 367-383 In: **Pest resistance to pesticide: challenges and prospects**, G. P. Georghiou & T. Saito (Eds.), Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- MENDEL, Z.; NESTEL, D.; GAFNY, R. 1994. Examination of the origin of the israeli population of *Matsucoccus josephi* (Homoptera: Matsucoccidae) using random amplified polymorphic DNA-polimerase chain reaction method. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **87**:165-169.
- PACHECO, I. A. ; M. R. SARTORI & S. BOLONHESI 1991. Resistance to malathion, pirimiphos-methyl and fenitrothion in Coleoptera from stored grains. p.1029-1037. In: **Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored-Product Protection** INRA/SPDV, Bordeaux, France.
- PLAPP, F. W. J. & WANG, T. C. 1983. Genetic origins of insecticide resistance. p. 47-70. In: **Pest resistance to pesticides: challenges and prospects**, G. P. Georghiou & T. Saito (Eds.). Plenum Press, New York, United States of America.
- ROUSH, R.T. 1989. Designing resistance management programs: how can you choose? **Pestic. Sci.**, **26**: 423-441.
- ROUSH, R. T. & DALY, J. C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management. p. 97-152 In: **Pesticide resistance in arthropods**, R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Eds.). Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- SARTORI, M. R.; I. A. PACHECO & R. M. G. VILAR. 1991. Resistance to phosphin in stored grain insects in Brazil. p. 1041-1050 In: **Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored-Product Protection**, INRA/SPDV, Bordeaux, France.
- SMITH, R.F. 1970. Pesticides: their use and limitations in pest management. p. 103-113 In: **Concepts of pest management**. Raleigh, North Carolina State University.

- SUBRAMANYAM, Bh., P.K. HAREIN & L.K. CUTKOMP. 1989. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. **J. Econ Entomol.** **82**:989-995.
- SUBRAMANYAM, Bh. & D. W. HAGSTRUM. 1996. Resistance measure and management. p. 331-397 In: **Integrated management of insects in stored products** Subramanyam, B. & D. W. Hagstrum (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York.
- TABASHNIK, B. E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. **J. Econ. Entomol.** **82**: 1263-1269.