

**Jairo Campos Gaona**

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM POPULAÇÕES DE  
*Simulium (Chirostilbia) pertinax* (DIPTERA, SIMULIIDAE)**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato a)

*Jairo Campos Gaona*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*25/08/97*  
*[Signature]*

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas,  
Área de Biologia Celular.

**Orientador: Dr. Carlos Fernando S. Andrade.**

**Co-orientadora: Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel.**

CAMPINAS

1997

IDADE	BC
CHAMADA:	UNICAMP
	G159 e
Ex.	
ANEXO BC/	320E4
CC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ECO	R\$ 11,00
DATA	15/11/97
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00102273-1

G159  
C157e

Campos Gaona, Jairo  
Estudos cromossômicos em populações de *Simulium*  
(*Chirostilbia*) *pertinax* (Diptera, Simuliidae) / Jairo Campos  
Gaona. -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores : Carlos Fernando S. Andrade e Shirlei  
M. Recco-Pimentel.

Dissertação ( mestrado) - Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Simulídeo. 2. Citogenética. 3. Cromossomos  
gigantes. 4. Resistência a inseticidas. I. Andrade,  
Carlos Fernando S. II. Recco-Pimentel, Shirlei M.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 26 de agosto de 1997

BANCA EXAMINADORA:

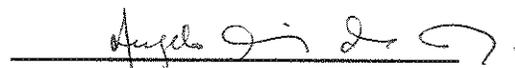
TITULARES:

Prof.Dr. CARLOS FERNANDO S. DE ANDRADE  
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. ANGELO PIRES DO PRADO



Assinatura

Profa.Dra. RITA MARIA P. AVANCINI



Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. MARY ANNE HEIDI DOLDER



Assinatura

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. Andrade pela orientação na realização deste trabalho, pelo incentivo e apoio sempre oferecidos, pela sua contribuição na minha formação como pesquisador e pelo auxílio e amizade incondicional como profissional e como pessoa.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela co-orientação deste trabalho, pelas sugestões no decorrer do mesmo e pelo seu exemplo de dedicação e interesse constante como profissional e pessoa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Fundação M. Brown pela bolsa de aperfeiçoamento científico com a qual fui beneficiado no ano de 1994 permitindo-me iniciar este trabalho.

Aos Profs. Drs. Angelo Pires Prado e Rita Avancini do Departamento de Parasitologia bem como à Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pelas análises prévias do trabalho na forma de relatório e na sua versão de pré-banca, pela revisão criteriosa do texto e pelas importantes sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho e sua compreensão.

Ao Dr. Sixto Coscarón da Facultad de Ciencias y Museo de la Plata, Universidad Nacional de la Plata, R. Argentina, pela identificação taxonômica das espécies de simulídeos.

À Bióloga Gílcia A. de Carvalho Silva, técnica do Laboratório de Patologia de insetos do Departamento de Zoologia e à Klélia A. Carvalho, técnica do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pela atenção e auxílio durante a realização do estudo.

Aos colegas do Departamento de Zoologia, Luciana, Rejane, Giovana, Virgínia, pelos auxílios e contribuições prestados.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular, Luciana, Patrícia, Fernando, João Flávio, Luciano, Márcio, Marco, Marta e Sérgio pelo companheirismo.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Ecologia.

À UNICAMP e em especial, aos funcionários dos Departamentos de Biologia Celular e Zoologia pelo auxílio e serviço prestado ao longo destes anos.

## SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	3
1. Família Simuliidae.....	3
1.1. Classificação e Distribuição Geográfica.....	4
1.2. Importância Médica e Veterinária.....	4
1.3. Importância Sócio-Econômica.....	6
1.4. Resistência aos Inseticidas.....	7
2. A Espécie em Estudo.....	10
2.1. Ciclo de Vida.....	10
2.2. Ecologia.....	11
2.3. Controle.....	12
3. Estudos Cromossômicos.....	13
3.1. Em Simulídeos.....	14
3.1.1. Cariótipo.....	15
3.1.2. Cromossomos politênicos.....	16
3.1.3. Marcadores Cromossômicos.....	18
3.1.4. Polimorfismos Cromossômicos.....	22
III. Materiais e Métodos.....	23
1. Material Biológico e Locais de Coleta.....	23
2. Bioensaios de Resistência ao Temephos.....	26
3. Estudo dos Cromossomos.....	26
3.1. Cromossomos Mitóticos.....	26
3.2. Cromossomos Politênicos.....	27
IV. Resultados.....	28

1. Características das populações.....	28
2. Cromossomos Metafásicos.....	28
3. Aspectos Gerais da Morfologia dos Cromossomos Politênicos.....	32
3.1 Descrição Cromossômica Detalhada.....	33
3.1.1. Braço IS.....	33
3.1.2. Braço IL.....	34
3.1.3. Braço IIS.....	34
3.1.4. Braço IIL.....	34
3.1.5. Braço IIIS.....	34
3.1.6. Braço IIIL.....	35
4. Comparação com a Seqüência de Bandas dos Mapas “Standard” de <i>Simulium</i> .....	39
5. Comparação do Padrão de Bandas dos Cromossomos Politênicos de Seis Populações.....	42
V. Discussão.....	54
1. Resistência a Inseticidas nas Populações.....	54
2. Cariótipo.....	55
3. Os Cromossomos Politênicos.....	56
4. Comparação Interpopulacional dos Cromossomos Politênicos.....	58
5. Comparação com os Mapas “Standard” de <i>Simulium</i> .....	59
6. O Complemento Cromossômico e a Resistência nas Populações.....	62
7. Considerações Finais.....	67
V. Conclusões.....	68
VI. Referências Bibliográficas.....	70

## RESUMO

Foram realizados estudos cromossômicos em seis populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* do Brasil. Pela análise dos gânglios cerebrais larvais da população de Morungaba, SP verificou-se que a espécie apresenta um cariótipo com  $2n=6$  cromossomos, sendo dois pares metacêntricos e um par submetacêntrico. Com base em metodologia padronizada para a família Simuliidae, foram elaborados os mapas dos cromossomos politênicos de glândulas salivares larvais. Os cromossomos politênicos apresentaram constância morfológica no seu padrão de bandas. Não foi registrada qualquer constrição importante e regiões assinápticas foram raras. Também, não foram observados cromossomos B nem segmento diferencial do sexo. A comparação do padrão de bandas dos cromossomos politênicos com aquele "standard" do subgênero *Simulium* mostrou uma semelhança de cerca de 63% para várias regiões nos seis braços cromossômicos.

Além da população de Morungaba ( $n=102$ ), foram analisadas mais cinco populações de *S. pertinax* coletadas nos estados do Paraná (Tibaji,  $n=13$ ), Rio Grande do Sul (Nova Petrópolis,  $n=14$ ), Rio de Janeiro (Muriqui,  $n=40$ ) e São Paulo (Barra do Una,  $n=38$ ; e Ilhabela,  $n=48$ ). Foram feitas comparações dos cromossomos politênicos dentro e entre seis populações. Os cromossomos politênicos apresentaram pareamento dos homólogos e conspícuas regiões centroméricas. As características morfológicas dos cromossomos politênicos, como centrômeros, marcadores universais, região organizadora nucleolar (NOR) e padrão de bandas, não apresentaram variação apreciável dentro e entre as populações, exceto um polimorfismo de expressão, uma região organizadora nucleolar secundária (NOR 2<sup>o</sup>) em um indivíduo. Apesar de quatro das populações apresentarem características bioecológicas diferentes e terem sofrido diferentes tipos de pressão de seleção por inseticidas, não foi observada diferenciação cromossômica. Pela homossequencialidade cromossômica verificada entre as seis populações sugere-se que a espécie seja monomórfica e os fatores genéticos de resistência aos inseticidas estejam espalhados no genoma sem uma expressão aparente em nível cromossômico.

## ABSTRACT

Chromosomic studies were carried out for six populations of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* of Brazil. The analysis of the larval cerebral ganglia from the population found in Morungaba, SP showed that the species presents a karyotype with  $2n=6$  chromosomes, two pairs being metacentric and one pair submetacentric. Based on standard methodology for the Simuliidae family, the polytene chromosome maps were made using the larval salivary glands. Polytene chromosomes banding patterns presented high morphological homology. No important constrictions were recorded and assynaptic regions were rare. Also, neither B chromosomes nor a sex differential segment were observed. Comparison of polytene chromosome band patterns with that considered standard for the subgenus *Simulium* showed a similarity of about 63% for many regions in all the six chromosome arms.

Besides the population obtained from Morungaba ( $n=102$ ) a study was also made of five *S. pertinax* populations collected respectively in the states of Paraná (Tibaji,  $n=13$ ), Rio Grande do Sul (Nova Petrópolis,  $n=14$ ), Rio de Janeiro (Muriqui,  $n=40$ ) and São Paulo (Barra do Una,  $n=38$ ; and Ilhabela,  $n=48$ ). Comparisons for the polytene chromosomes within and among the six populations were carried out. Polytene chromosomes showed band pairing among homologous chromosomes and conspicuous centromeric regions. No difference was observed for any morphological chromosome characteristics such as centromeres, universal markers, nuclear organizer region (NOR) and banding pattern within and among populations, except by one individual expression of polymorphism, a secondary NOR. No chromosomal differentiation associated to insecticide resistance was observed although four of the populations presented different bioecological features and suffered different selection pressures by insecticides. Due to the chromosomal homosequentiality found among the six populations it was suggested that *S. pertinax* is a monomorphic species and that the genetic factors for organophosphorous resistance are spread in the genome with no visually detectable morphologic expressions at the chromosome level.

## I. INTRODUÇÃO

A família Simuliidae compreende atualmente mais de 1.600 espécies conhecidas e embora bem diferenciada taxonômica e bionomicamente de outras famílias de Dípteros, apresenta uma difícil taxonomia. Essa família apresenta grupos de espécies crípticas, sendo algumas de interesse médico e veterinário. Basicamente os estudos citológicos de populações de simulídeos têm sido feitos através da análise dos cromossomos politênicos das larvas. Os resultados destes estudos têm ajudado na determinação da variabilidade intra e interespecífica (Brockhouse *et al.*, 1989a, b; Feraday *et al.*, 1989; Leonhardt & Feraday, 01989), na identificação de espécies crípticas (Rothfels *et al.*, 1978; Rothfels, 1987), e no estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies (Rothfels, 1979; Hunter, 1989). Em Biologia aplicada os estudos cromossômicos de simulídeos têm ajudado a diferenciar espécies em grupos de importância econômica (Weber & Grunewald, 1989), a identificar espécies e citótipos com capacidade vetorial (Procunier, 1989; Charalambous *et al.*, 1993), e a distinguir espécies alvos de controle (vetores e/ou pragas) com desenvolvimento de resistência (Post, 1986).

A espécie *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 distribui-se em vários estados do Brasil e ocorre no norte da Argentina e Paraguai (Coscarón, 1981, 1987, 1991). O hábito hematófago voraz e a antropofilia das fêmeas adultas limita as atividades diárias das pessoas, bem como o desenvolvimento econômico de algumas regiões que vivem quase que exclusivamente do turismo (Souza, 1984). A espécie afeta em maior proporção as populações humanas, também atacando a criação de animais domésticos (Coscarón, 1989; Strieder & Corseuil, 1992) e, em alguma proporção, as populações de animais silvestres de sangue quente. Esta espécie constitui-se uma praga em várias regiões do Brasil, e tem recebido esforços de controle nas últimas décadas.

Populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* do sul e sudeste do Brasil têm apresentado resistência ao controle químico pelo larvicida organofosforado temephos. Essa resistência parece ter-se desenvolvido por processos seletivos diferentes nas populações alvo

de controle e naquelas não sujeitas a controle direto. Desta forma o controle químico outrora eficiente, seguro e técnica e economicamente viável encontra-se comprometido.

Como pré-requisito para o emprego de inseticidas ou para monitorar seu uso em programas de controle, têm sido propostos métodos para se detectar a resistência aos inseticidas organofosforados mais em populações de culicídeos do que em simulídeos. No Brasil, Andrade & Castello Branco Jr. (1990) propuseram para *S. (C.) pertinax* a avaliação dos níveis de esterase em larvas ou bioensaios de aplicação tópica em adultos. A resistência ao temephos nessa espécie, foi demonstrada estar relacionada a uma maior produção de esterase (enzima associada com a resistência aos organofosforados)(Andrade & Castello Branco Jr., 1990) e deve portanto estar associada a fatores gênicos, provavelmente caracterizados por reordenamentos cromossômicos ou conspícua expressão dos genes envolvidos. Alterações cromossômicas têm sido registradas em populações de *Aedes aegypti* (Linn.) e de *A. fluviatilis* (Lutz) (Culicidae) submetidas à pressão de seleção com inseticidas (Lima-Catelani & Bicudo, 1994; 1995). Translocações e diferenças cromossômicas em nível morfométrico têm sido associadas à resistência a inseticidas no afídeo *Myzus persicae* (Sulzer) e no mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, respectivamente (Blackman & Takada, 1977; Blackman *et al.*, 1978; Nance *et al.*, 1990; Blackman *et al.*, 1995). Fatores (alelos e genes) de resistência a carbamatos e organofosforados foram localizados nos cromossomos politênicos, respectivamente associados a translocações em *Anopheles albimanus* Wiedemann (Culicidae) (Kaiser *et al.*, 1979), e à produção de proteínas detoxificantes em *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Drosophilidae). Essas proteínas detoxificantes também são produzidas por nematódeos e mamíferos (Beall *et al.*, 1992; Ringo *et al.*, 1995).

Os poucos estudos cromossômicos em espécies da família Simuliidae, no Brasil, e o desenvolvimento de resistência aos produtos usados no passado para o controle de borrachudos, nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, justificam a investigação de populações susceptíveis e resistentes pelo estudo dos

cromossomos politênicos. A citologia de cromossomos permite estudar populações problema (pragas e/ou vetores) na família Simuliidae.

Não obstante a importância econômica de *S. pertinax*, até agora esta espécie foi pouco estudada por métodos cromossômicos (Campos *et al.*, 1996). O presente trabalho tem o seguinte propósito:

- Caracterizar cromossomicamente essa espécie através da descrição dos cromossomos mitóticos e dos cromossomos politênicos larvais de uma população não submetida a controle químico direto;
- Fazer uma comparação do padrão de bandas dos cromossomos politênicos de *S. (C.) pertinax* com aquele dos mapas “standard” publicados para o subgênero *Simulium* s.str. (Rothfels *et al.*, 1978);
- Comparar cromossomicamente diferentes populações de *S. (C.) pertinax*, submetidas ou não à pressão de seleção pelo inseticida organofosforado temephos;
- Verificar o estado de susceptibilidade das populações de simulídeos a esse organofosforado, e se os estudos citológicos poderiam ser usados como diagnóstico; e
- Discutir alguns dos possíveis mecanismos genéticos envolvidos na resistência, com base em análise cromossômica.

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. A FAMÍLIA SIMULIIDAE**

Os simulídeos são conhecidos popularmente como “piuns” no norte e nordeste e como “borrachudos” no sul e sudeste do Brasil. São insetos cujas larvas procriam em águas correntes e apresentam várias espécies nas quais fêmeas adultas são de hábito hematófago antropofílico e/ou zoofílico. Segundo Crosskey (1990) poucas espécies são incapazes de picar, embora para a região Neotropical, só se tenha para 73 espécies confirmação de hábito hematófago no homem e/ou no gado, ou seja, 22 % das espécies

neotropicais conhecidas (Coscarón, 1989).

## 1.1. CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A família Simuliidae pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, superfamília Chironomoidea (Hennig, 1973; Crosskey, 1990; Pawlowski *et al.*, 1996). Os simulídeos compreendem atualmente mais de 1600 espécies conhecidas, presentes em todo o mundo, exceto na Antártida e em alguns desertos e ilhas sem água corrente.

Está subdividida em duas subfamílias: a Parasimuliinae, presente na região Neártica, e a cosmopolita Simuliinae. Dentre as 1554 espécies descritas para a família até 1989, em torno de 340 e onze gêneros são registrados para a região Neotropical: cerca de 90 em dez gêneros na tribo Prosimuliini, e em torno de 250 no gênero *Simulium*, com pelo menos 15 subgêneros na tribo Simuliini (Coscarón, 1987; Coscarón, 1989; Crosskey, 1987, 1990; Coscarón & Coscarón-Arias, 1995, 1997) o que representa 22% da fauna de Simuliidae conhecida. Mas há outras espécies conhecidas e muitas por descrever. No Brasil são conhecidas 81 espécies (Py-Daniel, 1988) com três gêneros e dez subgêneros (Coscarón, 1987; Coscarón & Coscarón-Arias, 1995).

## 1.2. IMPORTÂNCIA MÉDICA E VETERINÁRIA

Muitas das doenças que afetam o homem são infecções parasitárias transmitidas por insetos como arboviroses, malária, leishmaniose, filarioses e doença de Chagas (Walsh *et al.*, 1993).

Os simulídeos têm importância médica pelo incômodo de sua picada, muitas vezes acompanhada de alergias, e principalmente pelo fato de serem os transmissores da oncocercose ou "cegueira dos rios". A oncocercose é uma doença parasitária não letal, encontrada na África e na região Neotropical, causada pelo nematódeo *Onchocerca volvulus*. Estima-se que aproximadamente 17 milhões de pessoas são portadoras de oncocercose e cerca

de 86 milhões vivem em áreas endêmicas. Entretanto, as estatísticas são incertas e alguns focos provavelmente ainda não foram descobertos. Sua distribuição vai desde o Senegal à Etiópia na África, sul do Yemen e parte da Arábia Saudita (Nelson, 1970; WHO, 1991). Na América Latina encontra-se no México, Guatemala, Colômbia, Equador, Venezuela e no Brasil onde afeta os índios Yanomami e as pessoas que vivem nas terras altas do Parima e Unturán, ao norte da Amazônia (Barreto *et al.*, 1970; Duke, 1970; Nelson, 1970; Little & D'Alessandro, 1970; Trapido *et al.*, 1971; Tidwell *et al.*, 1980; Tidwell *et al.*, 1981; Shelley, 1982; Shelley *et al.*, 1987a, b; Shelley, 1988; WHO, 1991; Guderian & Shelley, 1992; Charalambous *et al.*, 1996; Botto *et al.*, 1997; Shelley *et al.*, 1997).

Outra parasitose transmitida pelos simulídeos na região Neotropical é a mansonelose, filariose que é considerada geralmente assintomática, se bem que têm sido citados alguns sintomas associados com a infecção (Chadee *et al.*, 1996). Esses insetos são hospedeiros intermediários da filaria *Mansonella ozzardi*, distribuída na bacia do Orinoco e principalmente na bacia do Amazonas (Tidwell & Tidwell, 1982).

Muitas espécies de borrachudos que picam o homem causam reações alérgicas, reconhecidas clinicamente como síndrome de “febre de simulídeo” (Crosskey, 1990). Algumas doenças como o “mal de Pinto”, o “pênfigo foliáceo” (fogo selvagem) e o “hemorrágico de Altamira”, entre outras, parecem ser motivadas também pelas suas picadas (Pinheiro *et al.*, 1974; Coscarón, 1989; Patrus, 1989).

Na área veterinária, a importância dos simulídeos está na transmissão de leucocitoozoonose, uma doença que pode ser fatal em perus, patos, gansos e frangos, causada por protozoários parasitas de sangue do gênero *Leucocytozoon*. Este é um problema econômico para as criações e a indústria de perus na América do Norte. Os simulídeos também são transmissores da oncocercose para o gado, uma infecção usualmente não patogênica causada por várias espécies de nematódeos filarídeos do gênero *Onchocerca*. Muitas das espécies picadoras causam reações alérgicas (freqüentemente fatais) e sérios prejuízos em rebanhos (vacas, cavalos, mulas, asnos, ovelhas e porcos), redução na produção

de gado leiteiro, e redução na produção de ovos em aves de criação, entre outros (Crosskey, 1990).

Os simulídeos hematófagos não são pragas apenas por serem transmissores de oncocercose e mansonelose, mas também pela agressividade dos ataques que algumas espécies como *S. pertinax* apresentam.

### 1.3. IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA

Os ataques de simulídeos aos seres humanos causam prejuízo primordialmente na saúde e no conforto das comunidades. Embora não determinado, é notório o custo econômico que representam para empresas madeireiras, de construção, de mineração, agrícolas, de turismo e de desenvolvimento recreativo em geral, entre outras. Ataques intensivos ao gado são freqüentemente uma causa indireta das perdas econômicas, por danos a propriedades de campo pelo estresse provocado nos animais, além de perdas diretas devidas a mortes e doenças, redução na produção do gado leiteiro e redução na produção de ovos em aves de criação, entre outros (Crosskey, 1990).

Na região Neotropical, onde os danos causados pela oncocercose são relativamente menores, o impacto sócio-econômico total é menor que na África. Porém, a oncocercose é um problema sério nas áreas de cultura de café no México e na Guatemala. Há a preocupação de que as áreas endêmicas nas Américas estejam se expandindo, uma vez que a abertura de áreas florestais da bacia Amazônica e de bosques costeiros no Equador, na Colômbia e no México possam ocasionar a expansão da doença em regiões onde existem vetores competentes, e onde a doença ainda não foi introduzida (WHO, 1991). Assim tem acontecido no Equador (Charalambous *et al.*, 1993) e seguramente nas áreas de garimpo do norte da Amazônia, e destas últimas a doença parece ter se dispersado para Minaçú, Goiás, 2.500 Km ao sul (Charalambous *et al.*, 1996).

#### 1.4. RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

A falha no controle das populações de simúlídeos, devido à diminuição da susceptibilidade à concentração operacional do produto químico, é a primeira evidência do desenvolvimento de resistência. Em simúlídeos, o uso de agentes controladores data pelo menos de 1945 na Guatemala, com o uso de DDT, e os primeiros registros da resistência ao DDT foram relatados no Japão, em 1963 e 1966 (Jamnback, 1973). No Brasil, o uso de DDT remonta oficialmente a 1957, no litoral do estado de São Paulo. Posteriormente, com o aparecimento de resistência ao DDT, a partir de 1971 foi usado o larvicida organofosforado temephos (Cyanamid, 1980; Araújo-Coutinho, 1995) que se estendeu até pelo menos o começo da década de noventa em uma área bastante grande, com cerca de 900 km<sup>2</sup> (de Barra do Una a Picinguaba, SP). Para o estado de Santa Catarina relata-se o uso de DDT como larvicida desde 1964. Na mesma década ainda foi usado sem nenhum resultado, o organofosforado malathion como adulticida, e foi registrada tolerância total ao DDT como larvicida (D'Andretta Jr. *et al.*, 1969), o que representa clara evidência de resistência.

No Programa Africano de Controle da Oncocercose (OCP), o temephos começou a ser usado em maior escala em 1974, com o primeiro registro de resistência para *Simulium damnosum* s.l. no ano de 1979 em uma das áreas de controle, após apenas 16 meses de tratamento (Guillet *et al.*, 1980). Na mesma área foi registrada também resistência ao Chlorphoxim, outro organofosforado, em menos de um ano (Kurtak *et al.*, 1982), havendo inclusive registros de desenvolvimento de resistência em apenas cinco meses em algumas populações de simúlídeos da África (Davies, 1994). No Brasil, de forma semelhante, depois de poucos meses de aplicação de temephos foram detectadas no estado do Paraná falhas no controle, seguidas por sucesso depois da interrupção dos tratamentos por três a quatro meses (E.L.G. Guimarães -SUREHMA, comunicação pessoal). Atualmente sabe-se que na área do OCP a resistência ao temephos tem regredido (Kurtak, 1986; Molyneux, 1995). Até o ano de 1985 só se tinha registro oficial de 11 espécies de *Simulium* resistentes a praguicidas (Shidrawi, 1992).

No Brasil, sem um monitoramento adequado da susceptibilidade como é feito na África, o primeiro registro oficial de “ineficiência do temephos” no controle de populações de borrachudos foi feito no estado do Rio Grande do Sul por Ruas Neto (1984), depois de quase doze anos de iniciado o programa de controle (Cyanamid, 1980; Souza *et al.*, 1990). No estado de São Paulo, o mesmo ocorreu para *S. (Inaequalium) inaequale*, *S. (Psaroniocompsa) incrustatum*, *S. (Thyrsopelma) orbitale*, *S. (Chirostilbia) pertinax*, *S. (Chirostilbia) prumirimense*, *S. (Thyrsopelma) scutistriatum* e *S. (Chirostilbia) spinibranchium* em 1987 (Andrade, 1989b), em áreas onde se fazia controle com o organofosforado há 16 anos. Isto não quer dizer que a resistência tenha demorado para se desenvolver, mas sim que os registros foram tardios devido, seguramente, à falta de monitoramento. Também em Morungaba, SP, foi registrada resistência para *S. (Hemicnetha) brachycladum*, *S. (Hemicnetha) rubrithorax* e *S. (Chirostilbia) subpallidum* em 1995; e ainda para *S. (Chirostilbia) pertinax*, *S. (Hemicnetha) rubrithorax*, *S. (Chirostilbia) serranum* e *S. (Inaequalium) subnigrum* e *S. (Thyrsopelma) sp.* no estado do Paraná em 1996 (Campos *et al.*, em preparação).

Evidências obtidas por meio de bioensaios de campo com populações de adultos e larvas (Andrade, 1989a, b; Andrade & Castello Branco Jr., 1990, 1991; Andrade & Campos, 1995), e também pelos níveis de esterase em larvas (Andrade, 1989a; Andrade & Castello Branco Jr., 1990) indicam que a resistência ao temephos desenvolveu-se em muitas das populações alvo de controle no Brasil, não só diretamente como efeito da pressão de seleção exercida pelos programas de controle, mas também indiretamente, em populações sob pressão de seleção pelo uso indiscriminado de produtos químicos na agricultura e na pecuária. Em outros estados como Paraná e Santa Catarina, embora a resistência não tenha sido classicamente detectada no passado, os principais programas de controle optaram pelo uso de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) devido à instabilidade da eficiência das aplicações de temephos.

Para uma revisão da genética e evolução da resistência aos inseticidas pode-se consultar Taylor (1986), Roush & Tabashnik (1990), Hemingway (1992), Morton (1993), Roush (1993), McKenzie & Batterham (1994), Groeters (1995), Tabashnik (1995), Bourguet *et al.* (1996), Taylor & Feyereisen (1996) entre outros. Em estudos particulares com outros dípteros como *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Calliphoridae), os mecanismos genéticos da resistência aos inseticidas demonstraram ser poligênicos e/ou monogênicos, dependendo do tipo de seleção que acontecer na população, e podendo ter diferentes respostas bioquímicas (McKenzie & Batterham, 1994). Mesmo que em um caso particular, o mecanismo seja determinado por um gene principal dominante, pode-se apresentar plasticidade na resposta, ou seja, pode variar de quase completamente dominante a quase recessivo, dependendo de parâmetros ambientais (Bourguet *et al.*, 1996). Variabilidade das populações (dentro e entre) somada à variabilidade no ambiente pode incidir nos mecanismos e nas respostas de pressão de seleção a um ou a vários inseticidas, que estejam atingindo a população de forma direta ou indireta. Extensiva variação na tolerância aos inseticidas usualmente acontece dentro de populações de insetos (Tabashnik, 1995). Uma população que habita um ambiente espacial ou temporalmente heterogêneo pode desenvolver uma constituição genética que permita uma variabilidade fenotípica (plasticidade) para adaptar-se a diferentes microambientes, tanto como para incrementar sua adaptação biológica, isto é, sobrevivência e reprodução em condições adversas (Zhivotovsky *et al.*, 1996). Assim, o desenvolvimento potencial de resistência para qualquer organismo em condições de campo, pode implicar maior complexidade que a simples resposta dominante ou recessiva, que está associada com um ou poucos genes de efeitos maiores e outros genes secundários de efeitos menores. A resistência pode ter não só diferentes mecanismos, mas também diferentes tipos e graus de respostas, envolvendo não só o número de cópias do gene, mas também sua expressão (Field *et al.*, 1996a, b) e a interação do genótipo com o ambiente. Além do mais, sucessão genética e circunvenção, se bem que pouco estudadas, não deixam de ser importantes processos e merecem ser levados em conta nos estudos de resistência (Taylor & Feyereisen, 1996).

## 2. A ESPÉCIE EM ESTUDO

*Simulium (Chirostilbia) pertinax* é a principal espécie antropofílica do sul e sudeste do Brasil (Araújo-Coutinho *et al.*, 1988; Maia-Herzog *et al.*, 1988; Guimarães, 1990; Castello Branco Jr. & Andrade, 1992; Pegoraro, 1993), cuja distribuição inclui Argentina (Entre Rios e Misiones), Paraguai (Asunción e Villarica) e Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Paraíba e Bahia) (Coscarón, 1981, 1987, 1991; Coscarón & Coscarón-Arias, 1997).

### 2.1. CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do *Simulium pertinax* consta de quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (imago). A larva cresce passando por várias mudas, entre estádios sucessivos, que totalizam 7 para *S. pertinax*. A duração de cada fase do ciclo de vida pode variar com o clima e geograficamente: o ovo, quatro a seis dias; a larva, duas a três semanas; a pupa, três a quatro dias; e o adulto, de um a três meses no máximo, e normalmente uma a duas semanas para as fêmeas e alguns dias para o macho (poucos dados reais na natureza). O ciclo de vida desde a pré-oviposição até a morte do adulto pode durar em média 47 dias, a 20°C, e 36 dias a 25°C (Pegoraro, 1993). Como algumas outras espécies, *S. pertinax* pode procriar-se em águas com variações de temperatura (8 a 32 °C) ao longo de todo o ano (Lozovei *et al.*, 1989; observação pessoal).

Para outras espécies o número de gerações anuais varia geograficamente podendo chegar a duas ou mais por mês, em rios de água morna (26 a 32 °C) e de terras baixas nos trópicos, onde o controle com larvicida (s) tem que ser feito a cada duas semanas, ou mesmo semanalmente (Elsen *et al.*, 1981; Davis *et al.*, 1992; Hougard *et al.*, 1993; Molyneux, 1995).

## 2.2. ECOLOGIA

Para os estágios de ovo, larva e pupa, o habitat é aquático, sendo encontrados em rios e riachos, ou seja, ambientes aquáticos em movimento (lóticos). Os ovos ficam aderidos geralmente a superfícies sólidas submersas ou livres no sedimento do fundo, e as larvas e pupas aderidas a objetos inertes (pedras, lixo) ou à vegetação. A oviposição para *S. pertinax* é feita em substratos submersos, como galhos ou pedras; ou superficiais, como folhas. Hábitos de oviposição fora da água são raros na família, como no caso de *S. (Inaequalium) nogueirai* D'Andretta & González, que apresenta o hábito incomum de fazer a oviposição em folhas, ramos e raízes finas de ervas e arbustos, localizados nas margens de cachoeiras (Moreira & Sato, 1996). Junto com Blepharoceridae e Chironomidae, os simulídeos são os dípteros mais comuns em ambientes lóticos, e juntamente com Tricópteros, Plecópteros, Efemerópteros e alguns Coleópteros, constituem os insetos mais comuns em cursos de água (Crosskey, 1990).

*S. pertinax* é uma espécie eurióica encontrada em diversos ambientes, desde águas frias (em torno de 10 °C) até águas com temperatura acima dos 25 °C; desde o nível do mar até aproximadamente 1000 m de altitude (observação pessoal); tanto em águas limpas e rápidas como em águas mais lentas, poluídas e turvas (Andrade, 1989a), e com alto grau de contaminação orgânica (Guimarães & Medeiros, 1985, 1987; Lozovei *et al.*, 1986; Guimarães, 1988; Castello Branco Jr. & Andrade, 1992). Nesses casos a densidade populacional é muito elevada, como ocorre por exemplo nos riachos do alto Vale do Itajaí, SC, gravemente poluídos pela suinocultura (C.F. Andrade, Comunicação pessoal.). No Brasil, as larvas de simulídeos podem estar incluídos na dieta de peixes (Sabino & Corrêa e Castro, 1990), aves (Souza & Magni, 1988), e artrópodes segundo observações do autor e de Magni (1988).

O espectro de hospedeiros para a obtenção de sangue pelos simulídeos está circunscrito a aves e mamíferos (incluindo o homem), vertebrados de sangue quente. A picada, e portanto a dieta de sangue, são restritas às fêmeas, sendo o sangue fisiologicamente

necessário para desenvolver seus ovários. A picada é geralmente exofílica e diurna. Observações sobre a picada e o ciclo gonadotrófico de *S. pertinax* podem ser encontradas em Pegoraro (1993) e Castello Branco Jr (1994a).

Um fator importante relacionado com a dinâmica populacional é a capacidade de vôo, que pode variar com o sexo e com a espécie. Em temperaturas de 8 a 10 °C os adultos permanecem letárgicos. A partir de temperaturas entre 12 e 15 °C, usualmente o vôo tem início, mas quando procuram hospedeiros e para outras atividades, em espécies tropicais o vôo pode acontecer inclusive à temperaturas de 30 a 40 °C (Crosskey, 1990). Para *S. pertinax*, a dispersão também pode depender do regime de ventos (Castello Branco Jr., 1994b). Embora não haja registros na literatura sobre a distância de vôo para esta espécie, pelas observações feitas em Ihabela, o vôo pode cobrir no mínimo algumas centenas de metros, ou chegar a 4 km, na procura de uma refeição de sangue quando seu alvo não está perto do criadouro.

### 2.3. CONTROLE

O controle, que tem sido voltado principalmente contra as larvas, visa manter o número de adultos em níveis aceitáveis, ou seja, que não causem prejuízos sócio-econômicos. Uma ampla revisão do tema e planejamento das estratégias de controle são apresentadas por Jamnback (1973), Laird (1981), Kim & Merrit (1987), Hougard *et al.* (1993) e Molyneux (1995). Para *Simulium pertinax* foram desenvolvidos alguns programas e estudos pilotos incluindo controle mecânico, químico, biológico e controle integrado nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, procurando-se alternativas à falta de sucesso do controle químico (Ruas Neto *et al.*, 1984; Ruas Neto & Matias, 1985; Guimarães, 1986; Magni *et al.*, 1986; Andrade & Castello Branco Jr., 1988; Souza, 1988; Magni, 1988; Andrade 1989b; Souza *et al.*, 1990; Lozovei *et al.*, 1992; Araújo-Coutinho, 1995). A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é o primeiro agente biológico comercializado para seu controle. Atualmente os programas em algumas regiões isoladas do Paraná e dos três

estados já mencionados são feitos via de regra com Bti, sendo o programa de maior abrangência o do Rio Grande do Sul que cobre 119 municípios (L. Mardini -Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul, comunicação pessoal).

Devido ao incômodo causado por seu acentuado ataque antropofílico, *S. pertinax* têm sido alvo de esforços de controle em várias localidades do sul e sudeste do Brasil. No estado de São Paulo, tem sido controlado pelo menos durante as últimas quatro décadas. Além dos organoclorados (DDT e BHC) usados nas décadas de cinquenta e sessenta, foi usado ainda o organofosforado temephos durante as décadas de setenta e oitenta (Cyanamid, 1980; Araújo-Coutinho, 1995) sem que tenha sido possível obter um controle adequado do inseto, e com o agravante das populações terem se tornado resistentes aos inseticidas químicos.

Foram registrados no município de Morungaba, SP, níveis de ataque tão altos quanto 200 borrachudos/hora/homem (b/h/h) (Castello Branco Jr., 1994b), enquanto no município de Ilhabela, SP, os níveis chegaram a 1.500 b/h/h (janeiro de 1994) (observação pessoal). Apesar de Ilhabela ter programa de controle com uso de produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), inquestionavelmente eficiente, a descontinuidade das aplicações pelo descuido da administração pública ainda permite populações de borrachudos extremamente incômodas, até 200 b/h/h (fevereiro de 1996) (observação pessoal). No sul do Brasil, também é notável o ataque dessa espécie às criações de animais domésticos (Strieder & Corseuil, 1992).

### **3. ESTUDOS CROMOSSÔMICOS**

Os estudos cromossômicos se valem não só da morfologia, mas também de ferramentas bioquímicas e moleculares para investigar espécies. Os estudos dos cromossomos são de especial importância em insetos. Do ponto de vista prático, a importância fundamental desses estudos está nos meios que os cromossomos oferecem para o reconhecimento, definição e identificação de alterações cromossômicas usadas principalmente

em citogenética e citotaxonomia. Métodos bioquímicos e moleculares estão sendo utilizados cada vez mais nas análises de complexos de espécies de insetos, solucionando problemas taxonômicos através dos estudos de enzimas, hidrocarbonetos da superfície do corpo, e seqüências de DNA. É importante ressaltar que ainda assim, é a micromorfologia dos cromossomos que tem fornecido muitos caracteres chaves, pelo menos em simulídeos e quironomídeos (Crosskey, 1990; Tang *et al.*, 1995; Kiknadze *et al.*, 1996).

### 3.1. EM SIMULÍDEOS

Estudos cromossômicos de populações de simulídeos, através da análise dos cromossomos politênicos das larvas, têm sido feitos para a determinação da variabilidade intra e interespecífica (Rothfels, 1980; Brockhouse *et al.*, 1989a, b; Feraday *et al.*, 1989; Leonhardt & Feraday, 1989); para a identificação de espécies crípticas (Bedo, 1975a; Rothfels *et al.*, 1978; Rothfels, 1979, 1980, 1981a, b, 1987); para determinar possíveis hibridações (Adler, 1986; Post, 1984); para estabelecer relações filogenéticas entre espécies (Hunter, 1989, Miranda & Muñoz de Hoyos, 1993), para estudos de especiação (Rothfels, 1980, 1989); para diferenciar espécies em grupos de importância econômica (Weber & Grunewald, 1989); para a identificação de espécies e citótipos com capacidade vetorial (Procunier *et al.*, 1987; Procunier, 1989; Charalambous *et al.*, 1993), e também para o esclarecimento de citoespécies com desenvolvimento de resistência e minimizar o risco de dispersão dessa resistência (Post, 1986).

Cromossomicamente, as espécies podem ser descritas a partir das características dos cromossomos politênicos como: comprimento dos braços, posição e morfologia da região centromérica, presença ou ausência de um cromocentro, posição da região organizadora nucleolar (NOR) e do anel de Balbiani (um “puff” grande) e outras características conspícuas. É possível obter bons diagnósticos através de comparações detalhadas do padrão de bandas, os quais podem revelar reordenamentos fixos (principalmente inversões, raramente translocações); diferenças na classe e freqüência de reordenamentos

variáveis ou flutuantes (polimorfismos), e características específicas dos cromossomos sexuais (geralmente o macho é o sexo heterogamético). Esses três caracteres diagnósticos podem revelar a existência de populações reprodutivamente isoladas (Rothfels, 1981b).

A primeira descrição publicada de estudos cromossômicos de simuliídeos da América do Sul foi feita para *S. (Hemicnetha) paynei* Vargas (Chubareva *et al.*, 1976). Posteriormente, foi feito o reconhecimento de três complexos de espécies de simuliídeos da América Central e da América do Sul: *S. (Cerqueirellum) amazonicum* Goeldi, *S. (Cerqueirellum) sanguineum* Knab e *S. (Simulium) metallicum* Bellardi (Peterson, 1982). Os complexos implicados na transmissão de oncocercose nas Américas são *S. (Cerqueirellum) oyapockense* Floch & Abonnenc do grupo *S. (Cerqueirellum) amazonicum*, na Amazônia (Procunier, 1989); *S. (Notolepria) exiguum* Roubaud, no Equador e na Colômbia (Procunier *et al.*, 1985; Charalambous *et al.*, 1993); *S. (Simulium) metallicum* Bellardi, na Venezuela (Hirai & Uemoto, 1983; Conn *et al.*, 1989; Millest, 1992) e *S. (Psilopelmia) ochraceum* Walker, na América Central (Hirai *et al.*, 1994). Do Brasil só foram publicados até o momento estudos cromossômicos para *S. (Trichodagmia) guianense* Wise (Charalambous *et al.*, 1996) e para *S. (Chirostilbia) pertinax* (Campos *et al.*, 1996).

### 3.1.1. CARIÓTIPO

Os Diptera são cromossomicamente incomuns pois têm menor número de pares de cromossomos, geralmente 2-10, do que os números usuais em outros insetos (Crosskey, 1990). Como muitas espécies da família Culicidae (Motara & Rai, 1978; Rao & Rai, 1987; Kumar & Rai, 1990), a maioria das espécies da família Simuliidae são diplóides (2n), com um complemento cromossômico básico de n=3, excepcionalmente n=2, com centrômeros metacêntricos ou submetacêntricos (Rothfels, 1979). O tamanho total do complemento metafásico para espécies da família é aproximadamente de 11  $\mu$ m. Os cromossomos de *Simulium (Eusimulium) aureum* Fries (n=2) têm um comprimento de 7  $\mu$ m e

de 4  $\mu\text{m}$ ; o maior, ao que parece, é produto da fusão dos cromossomos II e III da espécie ancestral (Dunbar, 1958; Leonhardt, 1985).

### 3.1.2. CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

Descritos inicialmente por Balbiani em 1881 como “cordões nucleares”, só trinta anos mais tarde surgiu a suspeita de serem cromossomos (Alverdes, 1912 *apud* Sorsa, 1988). Em muitos tecidos de insetos, além de ciliados, mamíferos e plantas, as células perdem a capacidade de se dividir (mitose) em uma dada fase do desenvolvimento, e os cromossomos replicam-se por um processo de endomitose sem a divisão do núcleo. Tais células são chamadas endopoliplóides, podendo conter em seus núcleos os chamados cromossomos politênicos (White, 1973).

Todas as larvas de simulídeos dos últimos estádios ( $L_4$  a  $L_7$ ) possuem grandes cromossomos politênicos, nos núcleos das enormes células que compõem as paredes das “glândulas salivares” (na realidade, glândulas de seda, com as quais as larvas elaboram fios para se deslocar no substrato). Núcleos politênicos também podem ser encontrados em outros tecidos das larvas, e algumas vezes bem diferenciados, principalmente nos túbulos de Malpighi em adultos, bem como no intestino, corpos gordurosos, e ovários das pupas e fêmeas adultas (Bedo, 1976). Os cromossomos politênicos corados têm padrão característico de bandas escuras, alternadas com regiões pálidas não coradas, as interbandas. Apesar de apresentarem alguma diferença em bandas individuais de tecido para tecido, o padrão de bandas é essencialmente semelhante, e a especificidade apresentada em um tecido está relacionada com a fisiologia e a função do próprio tecido (Swanson *et al.*, 1981).

Estudos feitos em *Drosophila melanogaster* avaliam que seu complemento politênico consta de aproximadamente 5.000 bandas e 5.000 interbandas, estimando-se que nas bandas se encontra 85% do DNA e nas interbandas o restante. Tanto bandas como interbandas contém cerca de 1.024 fibras de cromatina, dependendo do tamanho da banda estima-se que há entre 3.000 e 300.000 pares de nucleotídeos por fibra de cromatina,

e tanto bandas como interbandas podem ter mais de um gene (Zhimulev & Belyaeva, 1991; Alberts *et al.*, 1994). As bandas são formadas por cromatina em estado mais condensado que aquele existente nas interbandas; sua aparência granular é interpretada como cromômeros individuais com um grau de compactação intermediário entre aquele presente nos nucleossomos e aquele existente nos cromômeros meióticos (Swanson *et al.*, 1981). Em estudos tridimensionais de cromossomos politênicos, as bandas aparecem compostas de cerca de 36 subestruturas, com diâmetro de 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$ , e sugere-se que são fibras longitudinais formadas por feixes de cromátides (Urata *et al.*, 1995).

Os estudos de cromossomos politênicos têm mostrado que, nos Simuliidae em geral, as morfoespécies consideradas pelos taxonomistas compreendem um número de espécies crípticas biologicamente diferentes, reprodutivamente isoladas, algumas vezes referidas como citoespécies (Rothfels, 1981a). O reconhecimento de espécies irmãs é de óbvia importância no controle de doenças como a malária, especialmente em *taxa* que ocorrem em simpatria, os quais presume-se também estão diferenciadas bionomicamente (Coluzzi, 1992). No Programa de Controle da Oncocercose na África, estudos das citoformas do complexo *S. (Edwardsellum) damnosum* Theobald têm sido necessários. Usando-se métodos de identificação através dos cromossomos, pode-se detectar mudanças na distribuição das espécies desse complexo relacionadas às mudanças de habitat, pois a competência vetorial varia entre as citoespécies (Walsh *et al.*, 1993).

Os estudos de cromossomos politênicos também serviu para caracterizar unidades de transcrição ativa nos anéis de Balbiani de *Chironomus*. Estas unidades geram moléculas de RNA, encarregadas da produção de polipeptídeos salivares (Lamb & Daneholt, 1979). Alta expressão localizada de genes em cromossomos politênicos pode ser visualizada nos “puffs”, que podem apresentar 10 vezes mais átomos de fósforo marcado por grânulo de ribonucleoproteína do que os grânulos do nucleoplasma (Abolhassani *et al.*, 1996). Por meio da análise dos padrões de pufação, transcrição e síntese protéica, em núcleos politênicos submetidos a choques de calor, considera-se que a resposta ao calor

envolve a ativação de genes específicos que permitem a tolerância a condições adversas produzidas por calor e por agentes químicos (Morcillo *et al.*, 1988).

O gene amplificado responsável pela resistência a inseticidas organofosforados no mosquito *Culex pipiens*, apresentou-se na forma de um “puff” nos cromossomos politênicos das glândulas salivares, que é ausente em mosquitos susceptíveis (Heyse *et al.*, 1996). Neste estudo, tal “puff” dos cromossomos das glândulas salivares não foi associado com processos de transcrição, mas cabe lembrar que cromossomos politênicos também estão presentes em outros tecidos nos dípteros como túbulos de malpighi e intestino, e estes tecidos estão envolvidos em processos de detoxificação. Dependentemente de sua localização, a expressão elevada de um determinado gene (por algum mecanismo) faria com que fosse possível produzir proteína(s) para detoxificar e/ou seqüestrar alguma substância estranha e prejudicial ao organismo. Assim, a proteína detoxificante esterase B1 foi localizada no intestino de larvas de *C. pipiens* resistentes (Heyse *et al.*, 1996). E desta forma com o desenvolvimento das larvas, quanto maior a politenia nos cromossomos maior seria a resistência. Foi observado que larvas dos primeiros estádios (1º a 4º) são mais susceptíveis que larvas dos últimos estádios (5º a 7º) a uma concentração operacional de temephos (Andrade, 1989a).

### 3.1.3. MARCADORES CROMOSSÔMICOS

As diferenças na posição, tamanho, espessura e morfologia de cada uma das bandas nos cromossomos politênicos, dão um padrão de bandas específico do qual depende a identificação das espécies crípticas. Assim, por meio de ferramentas citológicas é feita a determinação de espécies irmãs, ou provisoriamente a caracterização de citótipos. Segundo Rothfels (1987), o citótipo é uma designação provisória para indicar que as coletas regionais (ou temporais) são coesas entre si e podem diferir significativamente de coletas feitas em outra parte ou em outro tempo. Na caracterização do padrão de bandas, empregam-se

mapas cromossômicos elaborados por meio da fotocomposição de imagens dos cromossomos politênicos e localização de marcadores, caracteres cromossômicos de uso citotaxonômico.

Cromossomicamente, para as espécies da família Simuliidae é possível diferenciar “marcadores universais” e “marcadores principais”. Os primeiros são aqueles que são encontrados nos mesmos braços cromossômicos de todas as espécies até agora estudadas e são diagnóstico para a identificação de tais braços, como por exemplo o anel de Balbiani, o parabalbiani e o “blister”, entre outros. Os marcadores principais são aqueles que podem ser representados num ideograma, podendo-se destacar o número cromossômico ( $n$ ), a posição e a morfologia do centrômero, o comprimento dos cromossomos em  $\mu\text{m}$  e/ou em %, a presença ou ausência de inversões, e a diferenciação e localização do segmento sexual. Outras características importantes como a região organizadora nucleolar (NOR), o grau de pareamento entre os homólogos e os segmentos homossequenciais com outras espécies também podem ser representados no ideograma (Duque 1980; Rothfels, 1981b; Moreno, 1982; Duque *et al.*, 1988; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990; Campos *et al.*, 1996). Outros caracteres cromossômicos diagnósticos incluem a presença de cromossomos supranumerários ou cromossomos B e aspectos da meiose dos machos, quiasmática ou aquiasmática (Rothfels, 1979).

Segundo Rothfels (1987), para o braço curto (S) e o braço comprido (L) do cromossomo I não há marcadores universais, mas o padrão de bandas para o extremo IS é altamente conservado, e em *Simulium* s.l. pode-se utilizar o basal “3” e o “cup & saucer”. Os marcadores de uso no braço IL são o “marker” e o subterminal “3”, além do padrão terminal. O braço curto (IIS) é reconhecido pelo “anel de Balbiani” (RB), o “shoestring”, usualmente central na “double bubble” ou “bulges” e em muitas formas cromossomais, pelo marcador basal “trapezoidal”. O braço IIL é universalmente caracterizado por três bandas conspícuas “3 sharp”, junto ao centrômero, e intersticialmente por um “puff” denominado “parabalbiani” (PB). O braço menor IIIS, tem um grupo de bandas conspícuo “heavy”, do lado de uma região protuberante denominada “blister”. O telômero é freqüentemente em forma de leque e o braço

leva um marcador denominado “sawtooth” ou “capsule” usualmente basal. O braço III<sub>L</sub> não tem marcadores universais, se bem que há tendência a preservar-se uma banda simples intensa em posição basal, uma composta “basal marker” e o subterminal “three heavy groups”. Na Tabela I é apresentada uma relação de marcadores usados no gênero *Simulium* e suas características.

Os centrômeros na maioria das espécies estão localizados em regiões expandidas e evidentes, e freqüentemente são morfologicamente semelhantes em dois ou nos três cromossomos. Onde os centrômeros não são muito evidentes por si mesmos, eles podem ser algumas vezes identificados por pareamentos ectópicos recorrentes ou por comparação do padrão de bandas de espécies relacionadas nas quais eles são distinguíveis ou nas quais eles são juntados em um cromocentro (Rothfels, 1979, 1987).

A região organizadora do nucleolar (NOR), devido à variabilidade na sua localização entre espécies da família, não é de uso geral na identificação dos braços dos cromossomos, se bem que sua posição freqüentemente se preserva em espécies relacionadas.

Outros marcadores podem ser considerados secundários e de menor importância por sua carência diagnóstica. Muitos deles utilizados de forma inconsistente foram imortalizados na literatura, mas não são apropriados e por isto nem sempre utilizados atualmente, e por tanto, deveriam ser descartados (Rothfels, 1987).

Tabela I. Principais marcadores cromossômicos encontrados em *Simulium* (*Simulium*).  
(Adaptado de Rothfels *et al.*, 1978).

Braço	Tipo	Característica
IS	“2 Blocks”	dois blocos de bandas espessas e escuras intersticiais
	“crack”	fenda entre dois grupos de bandas escuras, intersticial
	“cup & saucer”	um grupo de três bandas e uma banda espessa, intersticial
	“3” basal	grupo de três bandas duplas perto do centrômero
IL	“marker”	duas bolhas (“puffs”) circundadas por grupos de bandas grossas
	subterminal “3”	duas bandas finas e uma grossa no final do braço
IIS	terminal “4”	grupo de quatro bandas duplas, claras e espaçadas
	“bulges”	duas bolhas, uma maior que a outra
	“shoestring”	grupo de três bandas, central no “bulges”
	“Ring of Balbiani”	bolha ou “puff” maior com expressão típica de amora
	“trapezoidal”	dois grupos de bandas escuras basais
IIL	“3 sharp”	três bandas finas, escuras e basais
	“parabalbiani”	bloco de bandas espessas com um eixo definido e outro difuso
IIS	“heavy”	duas bandas duplas, espessas e escuras
	“blister”	bolha (“puff”) do lado do “heavy”
	“capsule”	pequena bolha, geralmente basal
IIIL	“basal marker”	dois grupos de bandas espessas separados
	“3 heavy groups”	três grupos de bandas compostos e intensas

### 3.1.4. POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS

Segundo Pai (1974), em uma população, às vezes apresentam-se duas ou mais variantes genéticas com uma frequência tal que não podem ser consideradas anomalias. Estas populações e espécies são denominadas polimórficas. As populações de espécies de plantas e animais podem ser polimórficas para variantes estruturais dos cromossomos, inversões e translocações. Os polimorfismos por inversão podem ser paracêntricos ou pericêntricos e ocorrem heterozigoticamente. Outros polimorfismos como diferenças na amplitude da banda (conteúdo de DNA) ou expressão (“puffing”) (Rothfels & Dunbar, 1953), translocações *de novo* (Rothfels, 1980), presença ou ausência de bandas supernumerárias, tamanho das bandas, expressão nucleolar e localização dos organizadores nucleolares secundários (Bedo, 1979b) têm sido esporadicamente registrados.

Os polimorfismos para inversões, translocações e bandas são arranjos alternativos que têm se estabelecido nas populações. Embora suas frequências possam flutuar estacional, altitudinal, ou geograficamente, eles são considerados estáveis ou balanceados (Rothfels, 1980), e portanto ajudam a caracterizar populações e espécies. A grande quantidade de polimorfismos de inversão tem eclipsado outros sistemas polimórficos que ocorrem simultaneamente como os polimorfismos de banda, de regiões organizadoras nucleolares, de bandas C e de material heterocromático supranumerário (Bedo, 1975b, 1977, 1979b; Rothfels & Golini, 1983; Leonhardt, 1985). Nos polimorfismos de banda podem estar incluídas uma ou mais bandas, a presença ou ausência destas, diferenças no tamanho da banda, bandas C positivas ou negativas e diferenças na intensidade das bandas. Os polimorfismos nucleolares relacionam-se com a expressão da região organizadora nucleolar, se acontece nos dois homólogos dos cromossomos politênicos, em um só, ou se não acontece, além da presença de regiões organizadoras nucleolares secundárias e a localização destas e da NOR principal no complemento cromossômico.

Polimorfismos têm sido detectados em complexos de espécies de borrachudos de importância médica como em *S. (Edwardsellum) damnosum* (Procunier &

Muro, 1993), *S. (Notolepria) exiguum* (Procunier *et al.*, 1985), *S. (Trichodagmia) guianense* (Charalambous *et al.*, 1996), *S. (Simulium) metallicum* (Conn *et al.*, 1989; Arteaga & Muñoz de Hoyos, comunicação pessoal) e *S. (Psilopelmia) ochraceum* (Hirai *et al.*, 1994) entre outras.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAIS DE COLETA

As larvas de diferentes estádios (4<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup>) para este estudo foram coletadas entre outubro de 1993 e junho de 1996. As larvas utilizadas para o estudo cromossômico foram identificadas baseando-se nas descrições de D'Andretta Jr. & D'Andretta (1950) e Coscarón (1987). O sexo das larvas foi determinado pela forma das gônadas, visíveis na parede interna do 6<sup>o</sup> segmento abdominal: alongadas, para as fêmeas e esféricas, para os machos (Puri, 1925 *apud* Charalambous *et al.*, 1993). Foram preservadas em fixador Carnoy (75% etanol absoluto: 25% ácido acético glacial), com trocas do fixador na primeira hora e mantidas em geladeira a 4°C.

Foram estudadas seis populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*: uma do Rio Grande do Sul, Nova Petrópolis (n=14); uma do Paraná, Tibaji (n=13); uma do Rio de Janeiro, Muriqui (n=40); e três do estado de São Paulo, Ilhabela (n=48), Barra do Una (n=38), e Morungaba (n=102) (Figura 1).

A caracterização dos cursos de água, em cada área, foi feita principalmente pela altitude com relógio-altímetro 376 Casio, temperatura com termômetro de mercúrio, pH com fita 9535 Merck, e velocidade da corrente com fluxômetro 2030R General Oceanics. Outras características secundárias como substrato das larvas, tamanho do riacho, transparência e presença de materiais em suspensão na água também foram registradas. A descrição dos ambientes terrestres circundantes foi realizada levando-se em conta a topografia, a vegetação predominante, as atividades humanas (moradias, plantios, rebanhos, obras, estradas), e o histórico de controle.

As seis populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* utilizadas no presente trabalho apresentaram as seguintes características: 1. Estarem separadas geograficamente, três no litoral (Barra do Una, Ilhabela, SP e Muriqui, RJ), uma no Planalto Paulista (Morungaba), uma nos Campos Gerais Paranaenses (Tibaji) e uma na Serra Gaúcha (Nova Petrópolis) (Figura 1). 2. Diferenças em seu histórico de pressão de seleção: a população de Muriqui nunca foi submetida a controle; a população de Barra do Una foi submetida a controle com temephos pelo menos na década de 80, com Bti nos anos 90 e, atualmente, recebe controle alternado de Bti e temephos; as populações de Ilhabela e Nova Petrópolis foram submetidas a controle químico direto por muito tempo (Cyanamid, 1980) e, atualmente, são submetidas a controle com Bti (Araújo-Coutinho, 1995; M.A.T. Souza -Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul, comunicação pessoal). A população de Nova Petrópolis está localizada em uma área com atividade agropecuária, como as populações de Morungaba e Tibaji, que nunca foram submetidas a controle direto.

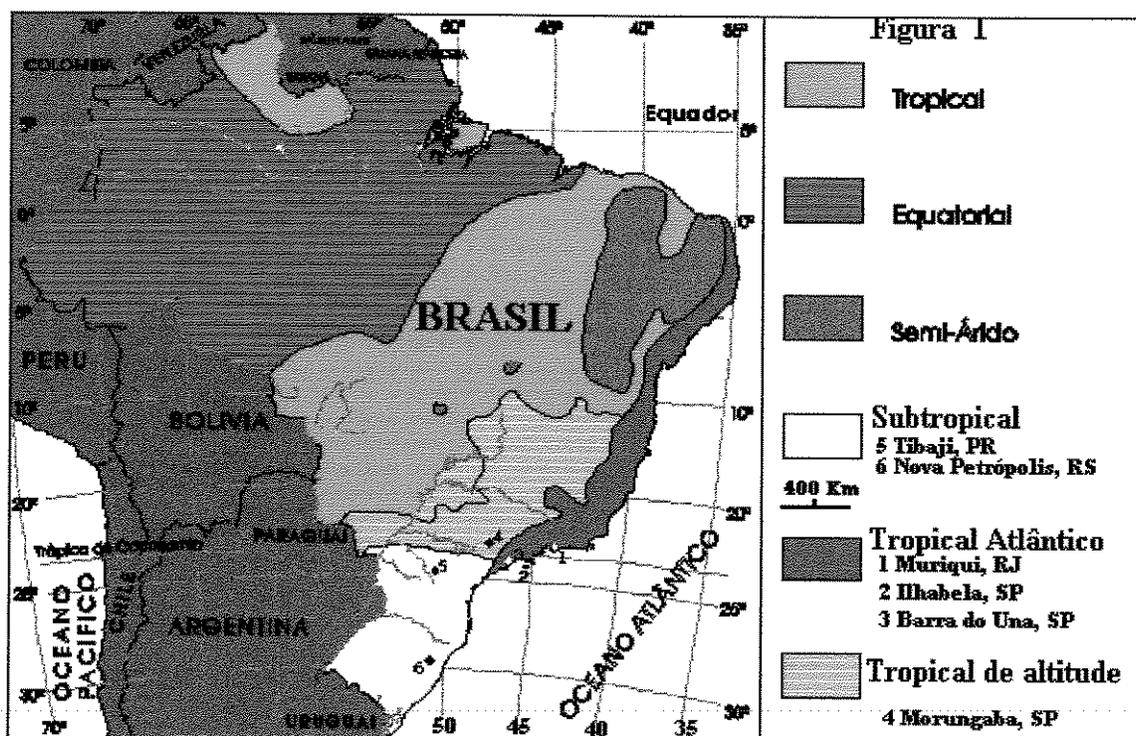


Figura 1. Localização dos sítios de amostragem para seis populações de *Simulium pertinax* e as regiões bioclimáticas do Brasil.

## **2. BIOENSAIOS DE RESISTÊNCIA AO TEMEPHOS**

As populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* foram caracterizadas como populações susceptíveis ou resistentes a partir de bioensaios *in situ* com larvas dos últimos estádios, segundo a técnica de Andrade & Castello Branco Jr. (1990,1991), ou modificação desta (Andrade & Campos, 1995). Entre 100 a 200 larvas de *S. pertinax* foram coletadas e transferidas para rampas de madeira ou amianto arranjadas no próprio leito do riacho. Nessas rampas, a vazão foi calculada na saída, com auxílio de balde e cronômetro. Foi aplicada uma concentração discriminante operacional de 0,1 ppm i.a./ 10 min do organofosforado temephos (Abate 500E). A mortalidade ou a paralisia irreversível das larvas (indicativa da susceptibilidade ao produto) foi verificada 3 horas após o tratamento, mediante um estímulo mecânico com uma pinça; larvas com o típico reflexo de retração foram consideradas vivas e portanto resistentes.

## **3. ESTUDO DOS CROMOSSOMOS**

### **3.1. CROMOSSOMOS MITÓTICOS**

Para obtenção dos cromossomos mitóticos de gânglio cerebral foi utilizada a técnica de coloração com orceína (Breland, 1959; French *et al.*, 1962; modificações segundo Bedo, 1975b; Imai *et al.*, 1988).

Os cromossomos metafásicos da população de Morungaba, SP foram analisados em preparações de gânglios cerebrais de larvas de 6<sup>o</sup> ou 7<sup>o</sup> estágio trazidas vivas ao laboratório. As larvas foram dissecadas em solução hipotônica de citrato de sódio a 1%, adicionada de colchicina a 0,1% (19:1). Os gânglios cerebrais foram transferidos para solução hipotônica por 20 min, fixados em ácido acético a 45% (1 a 3 min) e esmagados em orceína a 2% (5 a 20 min). A nomenclatura foi feita segundo Levan *et al.* (1964) e Green *et al.* (1980).

### 3.2. CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

As larvas dos três últimos estádios, fixadas em Carnoy modificado (etanol 99%: ácido acético glacial, 3:1), foram utilizadas para a obtenção de cromossomos politênicos. Na preparação das lâminas foi usado o método de Feulgen (Dunbar, 1972), seguindo o protocolo de Charalambous *et al.* (1993), com modificação na recoloração pela orceína lacto-acética.

As larvas foram dissecadas em fixador de Carnoy fresco, para expor as “glândulas salivares”, e a seguir colocadas em água destilada por 30 min a 1 h e depois em HCl 5N de 30 min a 1 h à temperatura ambiente (20 a 25°C). Após a hidrólise, as larvas foram lavadas duas vezes (2 min) em água destilada e colocadas em reativo de Schiff por 1 a 2 h. O reativo foi substituído por água sulfurosa (1 g de metabissulfito de potássio em 200 ml de água destilada mais 10 ml de HCl 1N) por 10 min e finalmente lavadas com água corrente. O epitélio glandular foi removido sobre uma lamínula siliconizada e a recoloração feita com orceína lacto-acética a 2% por 5 a 20 min. O excesso de corante foi retirado e o esmagamento das células (quando necessário) foi feito em ácido acético a 60%. As lâminas com as preparações cromossômicas tiveram as lamínulas lacradas com esmalte e foram guardadas em geladeira.

Eventualmente foi utilizada a técnica de bandamento C em cromossomos politênicos com o objetivo de evidenciar regiões que normalmente não aparecem com o uso desta técnica nos cromossomos mitóticos dos Simuliidae (Bedo, 1975b).

As análises dos cromossomos foram feitas sob microscópio Zeiss e para as fotografias foram usados os filmes Kodak Plus-X-Pan 125, T-max 100 e Agfa-Copex 12.

Os mapas dos cromossomos politênicos foram elaborados com base em fotografias, identificando seus respectivos marcadores e registrando as características micromorfológicas que caracterizaram esta espécie e as respectivas populações. A nomenclatura dos cromossomos foi feita segundo Rothfels (1987).

A seqüência de bandas dos cromossomos politênicos de *S. pertinax* foi comparada com aquela dos mapas “standard” dos cromossomos do subgênero *Simulium* Davies (Rothfels *et al.*, 1978) para verificar as semelhanças.

## IV. RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES

Os riachos diferiram em aspectos físico-químicos como altitude, temperatura da água, pH e velocidade da corrente nos criadouros. A altitude dos criadouros variou do nível do mar (Barra do Una) aos 900 metros (Morungaba), as larvas criavam-se à temperaturas de 13 a 24 °C, com a velocidade da água variando de 65 a 177 cm/seg conforme mostrado na Tabela II. As populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* apresentaram diferenças quanto à susceptibilidade ao organofosforado temephos, sendo esta completa (S) em Muriqui, RJ e Barra do Una, SP; nenhuma (R) em Ihabela, Morungaba, SP e Tibaji, PR; e desconhecida (?S/R) em Nova Petrópolis, RS (Tabela III).

De acordo com observações comportamentais sobre a preferência das larvas por determinados substratos, pode-se afirmar que *S. pertinax* não tem uma preferência específica, e podem ser encontradas tanto em pedras como em vegetações submersas; em riachos de porte pequeno (menos de 3 m de largura) a mediano (de 3 a 12 metros de largura) e tanto em águas transparentes como ligeiramente turvas.

### 2. CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

Nas preparações dos gânglios cerebrais de larvas de 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> estágio, observou-se que *S. (C.) pertinax* apresenta um cariótipo com três pares de cromossomos (2n=6). São cromossomos bem definidos com centrômeros conspícuos, caracterizados por uma constrição primária que divide os cromossomos em dois braços, curto (S) e comprido (L). O par maior, designado como I, é metacêntrico. O segundo (II) e o terceiro (III) pares

apresentam pouca diferença entre si quanto ao tamanho, sendo o II metacêntrico e o III submetacêntrico; mas o par III difere do II por ter um índice centromérico menor, isto é, o braço curto é menor que aquele do par II (Figura 2, Tabela IV). O cromossomo I apresentou um comprimento de  $4,58 \pm 0,77 \mu\text{m}$ , o cromossomo II  $3,27 \pm 0,13 \mu\text{m}$  e o cromossomo III  $3,11 \pm 0,25 \mu\text{m}$ . O complemento metafásico completo chegou a medir cerca de  $10,96 \pm 0,79 \mu\text{m}$  (n=4).

Tabela II. Características físico-químicas dos criadouros das populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* estudadas.

População	Localização	Altitude (msnm)	Temperatura °C	pH	Velocidade da água (cm/seg)
Muriqui, RJ	43°57' LW 22°56' LS	~125	20	5	120
Barra do Una, SP	45°46' LW 23°44' LS	~ 10	21	5,5	80
Ilhabela, SP (Canudos)	45°21' LW 23°50' LS	~ 75	18-23	4-5,5	65-177 ( $\bar{x}$ ~118)
Morungaba, SP	46°47' LW 22°50' LS	~900	13-24	5-5,5	107-138 ( $\bar{x}$ ~123)
Tibaji, PR	50°22' LW 24°39' LS	~780	16	5	~90
Nova Petrópolis, RS	51°12' LW 29°25' LS	~580	18	5,5	85

Tabela III. Mortalidade e susceptibilidade larval para as populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (últimos estádios), sujeitas a uma concentração operacional de 0,1 ppm i.a./10 min de temephos. S= susceptível; R= resistente; ?S/R= susceptibilidade indeterminada.

População (Data Bioensaio)	Mortalidade		Susceptibilidade
	3 h após	24 h após	
Muriqui, RJ (29-Jul-94)	100 %	-	S
Barra do Una, SP (16-Mar-96)	100 %	-	S
Ilhabela, SP (8-Jan-94)	0 %	0 %	R
Morungaba, SP (15-Abr-95)	0 %	0,5 %	R
Tibaji, PR (8-Jun-96)	0 %	0 %	R
Nova Petrópolis, RS	-	-	?S/R

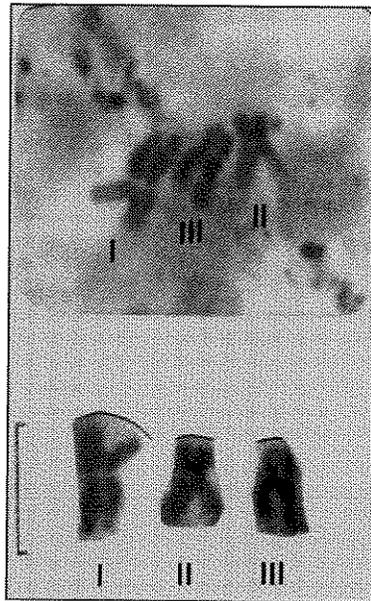


Figura 2. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de gânglio cerebral larval de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* com conspícuas regiões centroméricas. Coloração orceína. Barra= 5,7  $\mu\text{m}$ .

Tabela IV. Classificação dos cromossomos metafásicos de gânglio cerebral de larvas de 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> estágio de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*.

Cromossomos	I	II	III
Comprimento ( $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ )	4,58 $\pm$ 0,77	3,27 $\pm$ 0,13	3,11 $\pm$ 0,25
Razão de Braços (L/S)	1,35	1,40	1,80
Índice Centromérico	42,58%	41,59%	35,69%
Comprimento Relativo	41,79	29,83	28,38
Classificação	metacêntrico	metacêntrico	submetacêntrico
Comprimento do complemento metafásico: 10,96 $\pm$ 0,91 (n=4)			

### 3. ASPECTOS GERAIS DA MORFOLOGIA DOS CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

As “glândulas salivares” de larvas de 5<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup> estágio apresentaram núcleos com conspícuos cromossomos politênicos, sendo as larvas de 6<sup>o</sup> estágio as que, em geral, apresentam o melhor espalhamento dos cromossomos e níveis elevados de politenia em seus cromossomos. Os cromossomos politênicos, via de regra, mostraram um estreito pareamento entre os dois homólogos dando a aparência de só existirem três cromossomos, I, II e III, em vez de seis como aparece nos cromossomos metafásicos (Figura 2), cada cromossomo com seus braços curto (S) e comprido (L) separados pelo centrômero (Figuras 3 a 5). No cromossomo I com um comprimento de 373,60  $\mu\text{m}$ , o padrão de bandas das regiões terminais foi utilizado para diferenciar os braços IS e IL. Os cromossomos II e III, muito semelhantes em tamanho, 254,93 e 261,20  $\mu\text{m}$  respectivamente, são caracterizados por marcadores universais ou “standard”, e a posição da região centromérica serve para diferenciar os braços, sendo que o IIIS é o braço menor. O complemento politênico completo chegou a medir  $890,53 \pm 116,69 \mu\text{m}$  (n=12). De acordo com o comprimento relativo o complemento cromossômico foi dividido em 100 seções, 42 para o cromossomo I, 29 para o II e 29 para o III (Tabela V).

As regiões centroméricas mostraram-se bastante conspícuas nos três cromossomos politênicos, especialmente nos cromossomos I e III, onde as bandas centroméricas são mais uniformes na sua morfologia e coram-se profundamente. No cromossomo II, a expressão do centrômero variou algumas vezes, corando-se menos. A espécie em estudo não apresentou cromocentro e as regiões de despareamento foram poucas. Em algumas preparações foi possível observar pareamentos ectópicos dos cromossomos em algumas regiões dos braços. Não foram observados cromossomos B, nem segmentos cromossômicos diferenciais do sexo.

Tabela V. Classificação dos cromossomos politênicos de “glândula salivar” de larvas de 5º e 7º estágio de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*.

Cromossomos	I	II	III
Comprimento (µm)	373,60	254,93	261,20
Razão de Braços (L/S)	1,16	1,41	1,99
Índice Centromérico	46,34%	41,55%	33,38%
Comprimento Relativo	41,94	28,62	29,44
Classificação	metacêntrico	metacêntrico	submetacêntrico
Comprimento do complemento politênico: 890,53 ± 116,69 (n=12)			

### 3.1. DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA DETALHADA

Para análise do padrão de bandas dos cromossomos politênicos de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, foram utilizadas as larvas das seis populações estudadas neste trabalho.

#### 3.1.1. BRAÇO IS (Figura 3)

O braço IS com  $173,13 \pm 22,96 \mu\text{m}$  apresenta 20 seções, e é identificado pelo padrão de bandas da região telomérica (seção 1). Este braço pode ainda ser caracterizado por alguns marcadores como o "2 blocks" na seção 5; o "crack" na seção 11A; a região organizadora nucleolar (NOR) entre as seções 11C e 12A; o "cup & saucer" entre as seções 16C e 17A1, e o "3" basal na seção 18A/18B1. Pequenos "puffs" apresentam-se nas seções 1, 13 e 19. Não foi observado qualquer polimorfismo.

### **3.1.2. BRAÇO IL (Figura 3)**

O braço IL com  $200,47 \pm 26,96 \mu\text{m}$  apresenta 22 seções (21 a 42), e é identificado pela região centromérica expandida (seção 21A), pelos marcadores "marker" entre as seções 27C e 28C, e pelo subterminal "3" na seção 41C, junto ao padrão terminal (seção 42). Há "puffs" nas seções 22 e 39. Nenhum polimorfismo de banda ou inversão foi observado. Só uma larva, entre 255, apresentou expressão diferenciada na base do braço em um dos cromossomos homólogos (seção 26), identificada como uma região organizadora nucleolar secundária, NOR 2° (Figura 16).

### **3.1.3. BRAÇO IIS (Figura 4)**

O braço IIS com  $105,93 \pm 18,22 \mu\text{m}$  apresenta 12 seções (43 a 54B), e é identificado por dois "puffs" que são marcadores universais: o anel de Balbiani (RB) na seção 51A e o "bulges" entre as seções 48C e 49B, além do "shoestring" (Sh) na seção 49A. Outros marcadores importantes são o terminal "4", na seção 43B/43C1 e o basal "trapezoidal" (TR) entre as seções 52C2 e 53B. Há "puffs" adicionais nas seções 43, 44 e 47. Não foram observados polimorfismos.

### **3.1.4. BRAÇO IIL (Figura 4)**

O braço IIL com  $149 \pm 20,30 \mu\text{m}$  apresenta 17 seções (54C a 71), e é reconhecido por dois marcadores universais: as bandas "3 sharp" na seção 55A, adjacentes ao centrômero (seção 54C), e um "puff" característico, o parabalbiani (PB) entre as seções 66C e 67A. "Puffs" adicionais foram detectados nas seções 60, 62 e 70. Não foram observados polimorfismos.

### **3.1.5. BRAÇO IIIS (Figura 5)**

O braço IIIS com  $87,53 \pm 13,13 \mu\text{m}$  apresenta 10,5 seções (72 a 82A), e é caracterizado por um marcador universal: o grupo de bandas "heavy" nas seções 76C a 77A,

demarcado distalmente por duas bandas conspícuas (seção 76B) e basalmente por uma região expandida, o "blister" (seção 77B). Outras características do braço IIIS são o telômero, ligeiramente em forma de leque, e o marcador basal "cápsula" na seção 78A. Há também pequenos "puffs" nas seções 74 e 79. Não foram observados polimorfismos.

### **3.1.6. BRAÇO IIIL (Figura 5)**

O braço IIIL com  $174,67 \pm 26,55 \mu\text{m}$  apresenta 18,5 seções (82B a 100) e não tem marcadores universais, podendo ser diferenciado pelo "basal marker" (BM), na seção 94B/C, e o marcador subterminal "3 heavy groups" entre as seções 98A2 e 99B. Nas seções 83, 87 e 91, apresentam-se pequenos "puffs". Não foram também observados polimorfismos.

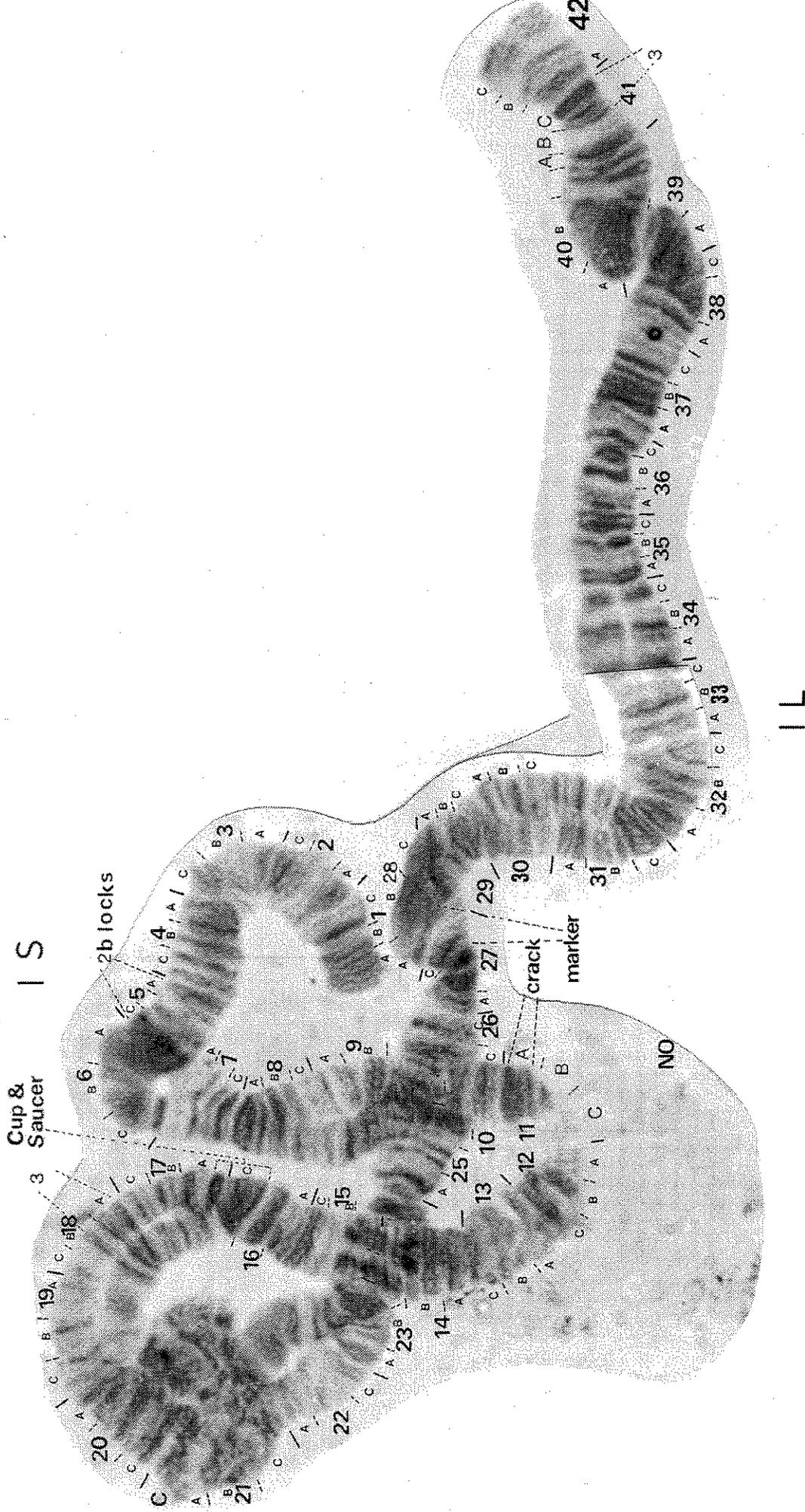


Figura 3. Mapa do cromossomo politênico I de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. No braço curto IS (seções 1 a 20), podem-se observar os marcadores "2 blocks" (seção 5), o "crack" (seção 11A), a região organizadora nucleolar (NOR) (seções 11C e 12A), o "cup & saucer" (seções 16C e 17A1) e o "3" (seção 18A/18B1). No braço comprido IL (seções 21 a 42) pode-se observar o centrômero, C (seção 21A), o "marker" (seções 27C a 28C) e o subterminal "3" (seção 41C). Barra= 5,3  $\mu$ m.

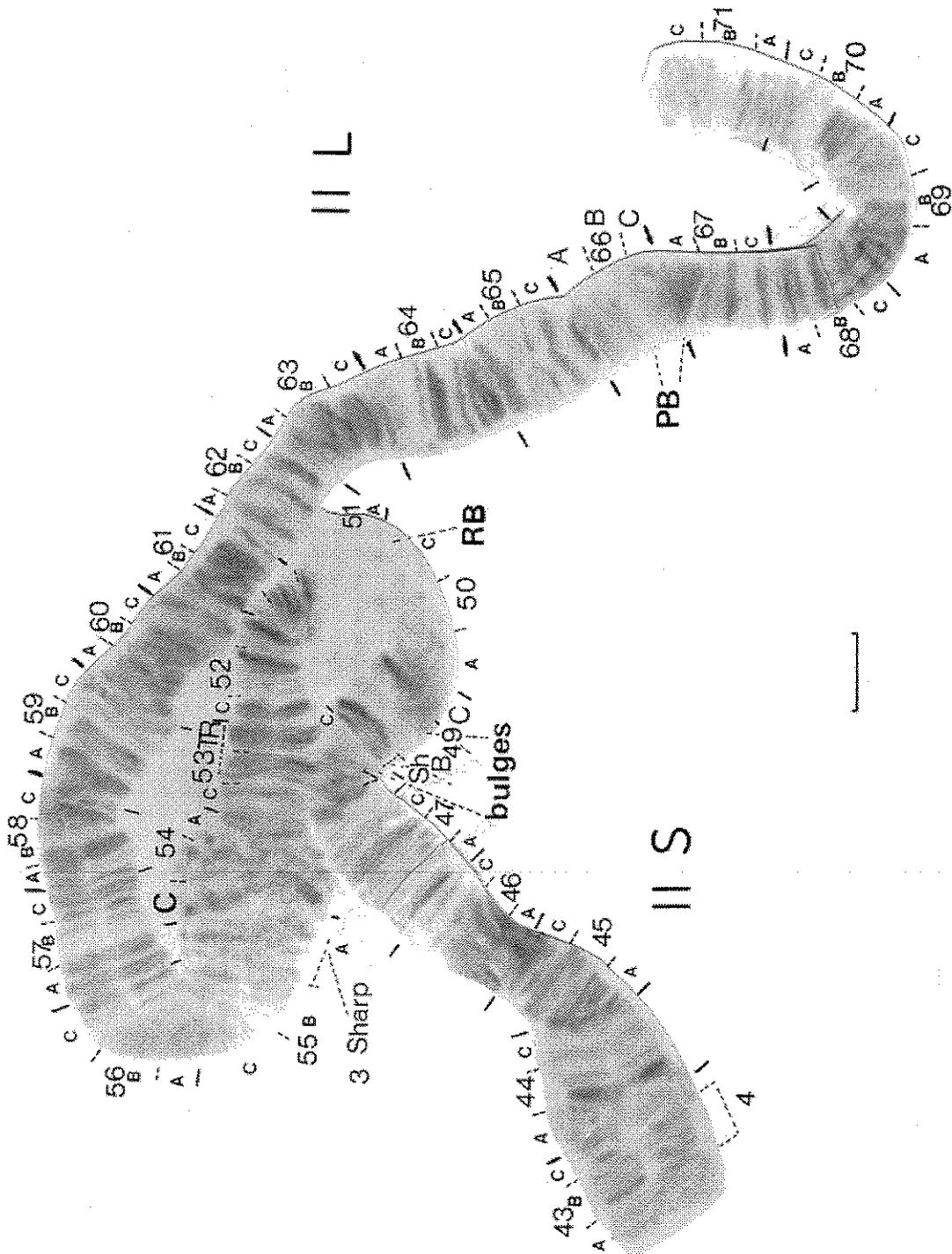
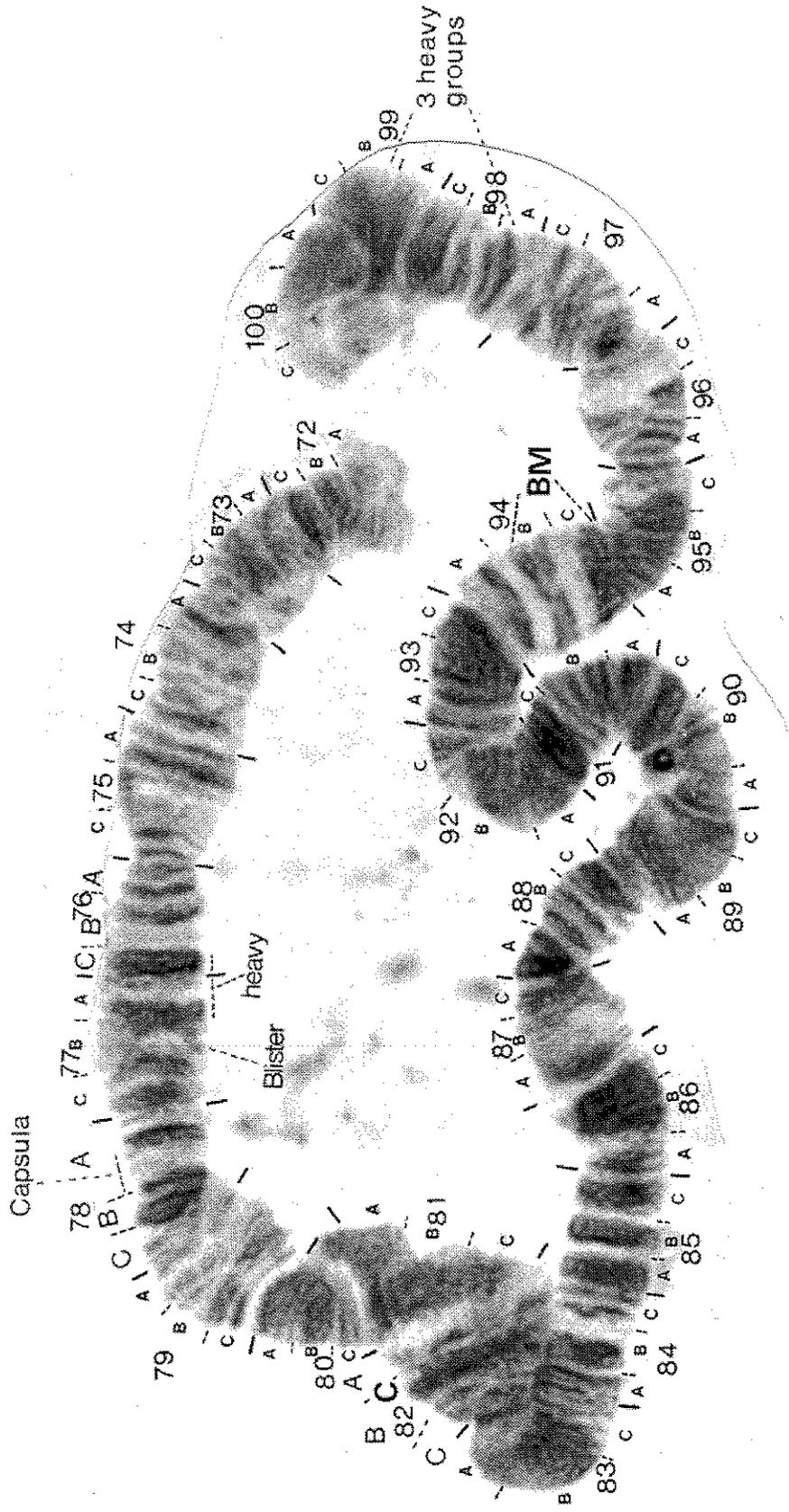


Figura 4. Mapa do cromossomo politênico II de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. Notar no braço curto IIS (seções 43 a 54B), os marcadores "4" (seção 43B/43C1), o "shoestring" (Sh) (seção 49A) central ao "bulges" (seções 48C e 49B), o anel de Balbiani (RB) (seção 51A), e o "trapezoidal" (TR) (seções 52C1 a 53B). No braço comprido III L (seções 54C a 71) observa-se o centrômero, C (seção 54C), o "3 sharp" (seção 55A) e o parabalbiani (PB) (seções 66C e 67A). Barra= 5,3 µm.

# IIS



# III L

Figura 5. Mapa do cromossomo politênico III de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. No braço curto IIS (seções 72 a 82A), observam-se os marcadores "heavy" e "blister" (seções 76C a 77B), e o marcador "cápsula" (seção 78A). No braço comprido III L (seções 82C a 100) são observados o centrômero, C (seção 82B), os marcadores "basal marker" (BM) (seção 94B/C) e o subterminal "3 heavy groups" (seções 98A2 e 99B). Barra= 5,3 µm.

#### 4. COMPARAÇÃO COM A SEQUÊNCIA DE BANDAS DOS MAPAS "STANDARD" DE *Simulium*

O padrão de bandas encontrado para *Simulium pertinax*, que pertence ao subgênero *Chirostilbia*, mostrou várias regiões semelhantes ao padrão dos mapas "standard" do subgênero *Simulium* (Rothfels *et al.*, 1978) (Figura 6).

O cromossomo I mostrou a maior semelhança de bandas, 69 % (segmentos A-E), com reordenação e reorientação dos segmentos B e C. Outras diferenças importantes, além dos segmentos não semelhantes, são a NOR no braço IS, que em *Simulium* está no braço III, e a região centromérica, mais expandida em *S. pertinax*.

O cromossomo II apresentou uma semelhança de 67 % (segmentos A-G) com reordenação dos segmentos B e C, onde estão o anel de Balbiani (RB) e o "bulges" que, ao contrário de *S. (Simulium)*, estão em posição basal e distal, respectivamente, em relação ao centrômero.

O cromossomo III, com a menor semelhança de bandas, 54 %, (segmentos A-I), foi o que apresentou a menor homologia com a sequência de bandas de *S. (Simulium)*.

Na Tabela VI são apresentados os segmentos semelhantes entre *S. (Chirostilbia) pertinax* e o "standard" do subgênero *Simulium*, e a porcentagem de semelhança por cromossomo.

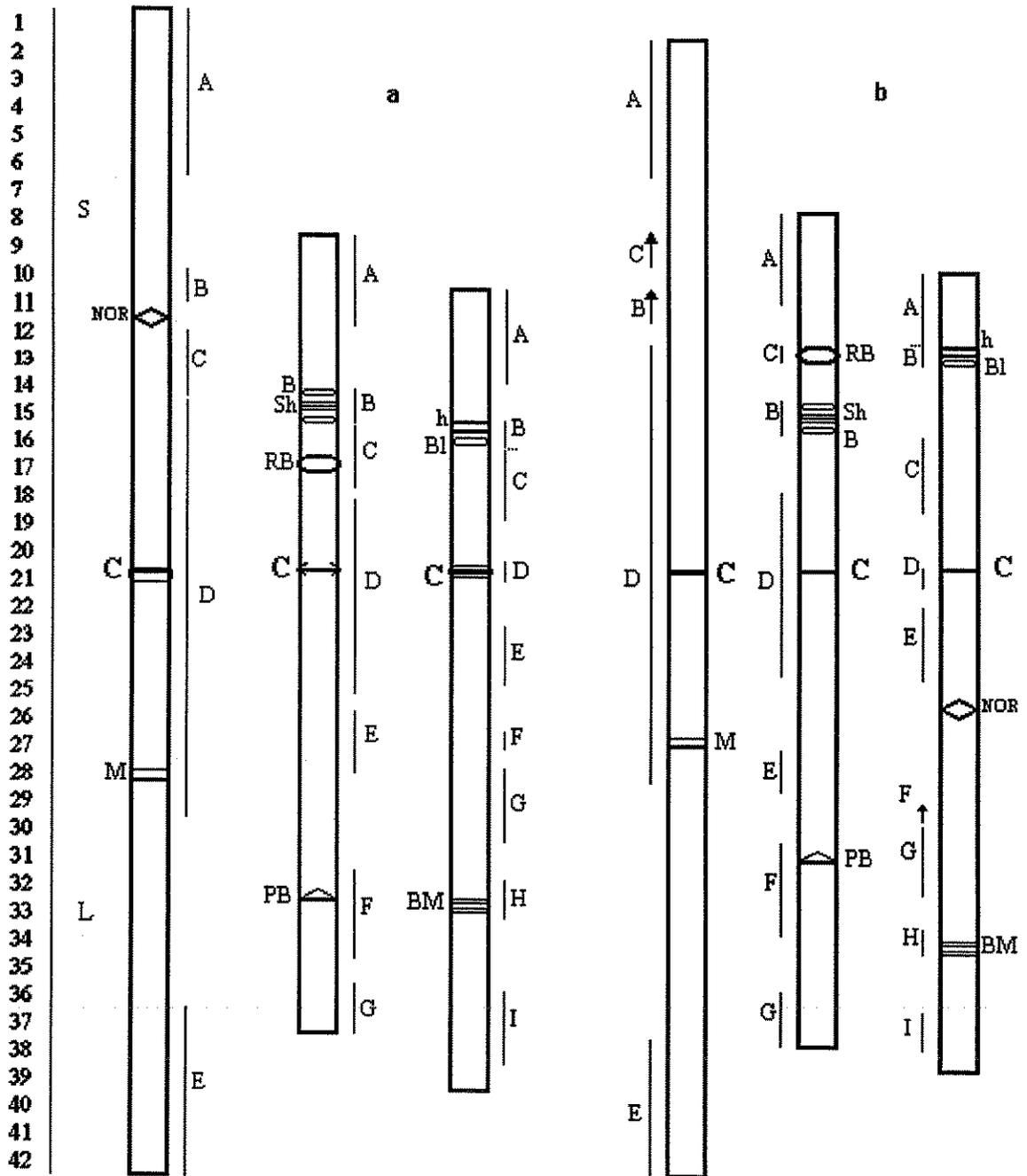


Figura 6. Ideograma de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (a) e *S. (Simulium) "standard"* (b). Os cromossomos estão ordenados do maior (I) ao menor (III). Os braços curtos (S) estão representados na parte superior e os braços compridos (L) na inferior. A posição dos marcadores principais apresentada é aproximada. C, centrômero; NOR, região organizadora nucleolar; M, "marker"; B, "bulges; Sh, "shoestring"; RB, anel de Balbiani; PB, parabalbiani; h, "heavy"; Bl, "blister"; BM, "basal marker". As letras em maiúscula representam os segmentos semelhantes entre as duas espécies em cada cromossomo: A a E para o cromossomo I, A a G para o cromossomo II, e A a I para o cromossomo III. As setas indicam reorientação de segmentos, C e B no braço IS e F no braço IIIS de *S. (Simulium)*. O complemento completo I a III tem 100 seções.

Tabela VI. Comparação da seqüência de bandas dos cromossomos politênicos de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* com a do “standard” do subgênero *Simulium*. Delimitação dos segmentos semelhantes.

Segmento	Cromossomo I		Cromossomo II		Cromossomo III	
	( <i>Simulium</i> )	<i>S. (C.) pertinax</i>	( <i>Simulium</i> )	<i>S. (C.) pertinax</i>	( <i>Simulium</i> )	<i>S. (C.) pertinax</i>
A	1-5	1-6	42-45	43-45	72-74	72-75C1
B	9B-11A1	11B-10B	48C-49	48B3-49	75A-75B	76C-77
C	7C-8	14A-12B	46B-47	50-52A1	78-80	78-80B
D	12B-28B	15-30	52B2-58	52B2-59B	82C2-83A1	82B
E	36C2-41	37B-42	61-62	60-62A	84B-86B	84B-86B
F			64C-67	66-69A2	91B-91C	88B1-88A
G			70-71	70-71	92-94	88C2-91
H					95B-96B1	93B-95A2
I					98B-99	97C-99
% semelhança		69		67		54

## 5. COMPARAÇÃO DO PADRÃO DE BANDAS NOS CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DAS SEIS POPULAÇÕES

As figuras 7-15 apresentam o padrão de bandas para as 100 seções do complemento cromossômico de indivíduos representativos das seis populações. A comparação da seqüência de bandas, seção por seção, nos seis braços dos cromossomos politênicos das seis populações, não detectou grandes diferenças (Figuras 7 a 15). Os marcadores cromossômicos tais como centrômeros, marcadores universais, região organizadora nucleolar (NOR) e pareamento das bandas entre os cromossomos homólogos não apresentaram variação apreciável entre as populações.

As figuras 7, 8 e 13 mostram a seqüência de bandas para as 42 seções do cromossomo I. Algumas diferenças na intensidade das bandas, entre as figuras a, b e c, são causadas pelo menor grau de espalhamento dos cromossomos em determinada seção; por exemplo, na seção 9 da figura 7b.

Outras pequenas diferenças foram detectadas pela expressão de genes em algumas regiões dos cromossomos. Assim, entre as seções 11 e 12 (Figura 7) é possível notar a região organizadora nucleolar (NOR), expressa com o nucléolo ao redor (Figura 7a), não expressa (Figura 7b), e expressa sem o nucléolo (Figura 7c). Outra pequena diferença é o “puff” da seção 13, não evidente na figura 7a, pouco evidente em 7b e maior em 7c. No braço longo (IL) apresentam-se algumas diferenças em pequenos “puffs”, evidentes por exemplo nas seções 33 e 36 (Figura 8b) e pouco expressos nas figuras 8a e 8c. O “puff” da seção 28 é conspícuo na figura 8c, pouco visível na figura 8b e não aparente na figura 8a, fato que se deve à falta de visibilidade nessa região.

As figuras 9, 10 e 14 apresentam o padrão de bandas das 29 seções do cromossomo II. Nas figuras 9b e 9c, é possível observar os telômeros em forma de leque e, na figura 9a, a banda centromérica mais conspícuo. Exceto para essas pequenas diferenças, o padrão de bandas aparece homogêneo para o braço curto. No braço longo (IIL), apesar do menor espalhamento que apresenta o braço IIL, da figura 10b, foi possível relacionar a

seqüência de bandas com os braços das figuras 10a e 10c. Algumas diferenças nas seções 57 e 59 da figura 10c são dadas por bandas expressas formando “puffs” e, pelo “puff” da seção 60 que apresenta-se mais expresso na mesma figura e formando uma interbanda na figura 10b.

As figuras 11, 12 e 15 apresentam a seqüência de bandas para as 29 seções do cromossomo III, aparentemente sem diferenças. Na figura 11c, parte da seção 82 está dobrada sobre a seção 81, sugerindo erroneamente que o centrômero encontra-se na seção 81. No braço longo (III<sub>L</sub>), as únicas variações observáveis são devidas ao fato de parte dos braços apresentarem-se dobrados na preparação, por exemplo na seção 85 da figura 12b e nos telômeros, seção 100 nas figuras 12a e 12b.

As populações, exceto por alguns despareamentos não associados a inversões, são cromossomicamente muito homogêneas no padrão de bandas, tanto intra, como interpopulacionalmente. As populações não apresentaram polimorfismos de inversão ou polimorfismos de banda no material examinado (255 larvas). O único polimorfismo registrado foi de expressão e ocorreu na população do Rio de Janeiro, sendo caracterizado como uma região organizadora nucleolar secundária (NOR 2<sup>o</sup>), localizada na base do braço IL, seção 26A/B (Figura 16). Pode-se observar que entre os dois primeiros grupos de bandas, da seção 26, encontra-se a região que se expressa, evidenciando a NOR secundária. Nesta figura, o cromossomo homólogo apresenta a seqüência não expressa ou “standard” (str). A expressão da NOR secundária em apenas um dos homólogos sugere um caráter heterozigoto, com uma freqüência de polimorfismo de 0,025 (n=40).

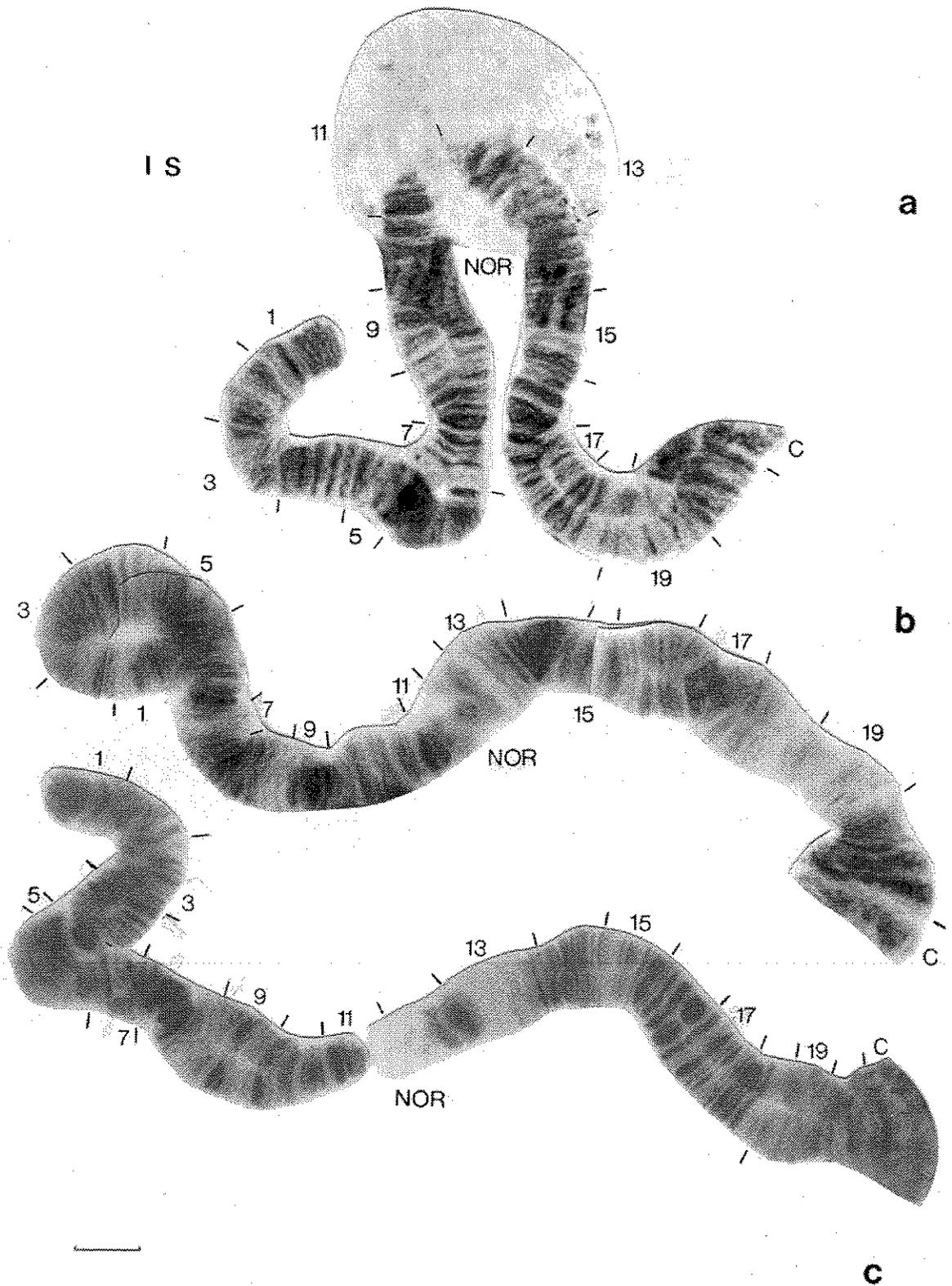


Figura 7. Comparação do padrão de bandas do braço IS de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Morungaba, SP, 6<sup>o</sup> estágio/sexo indeterminado (?); b. Ilhabela, SP, 6<sup>o</sup>/fêmea, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>o</sup>/fêmea. C, centrômero; NOR, região organizadora nucleolar. Barra= 8  $\mu$ m.



Figura 8. Comparação do padrão de bandas do braço IL de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax*. a. Morungaba, SP, 6<sup>0</sup>/?; b. Ilhabela, SP, 6<sup>0</sup>/f, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>0</sup>/f. C, centrômero; M, "marker"; str/str, "NOR secundário". Barra= 8 μm.

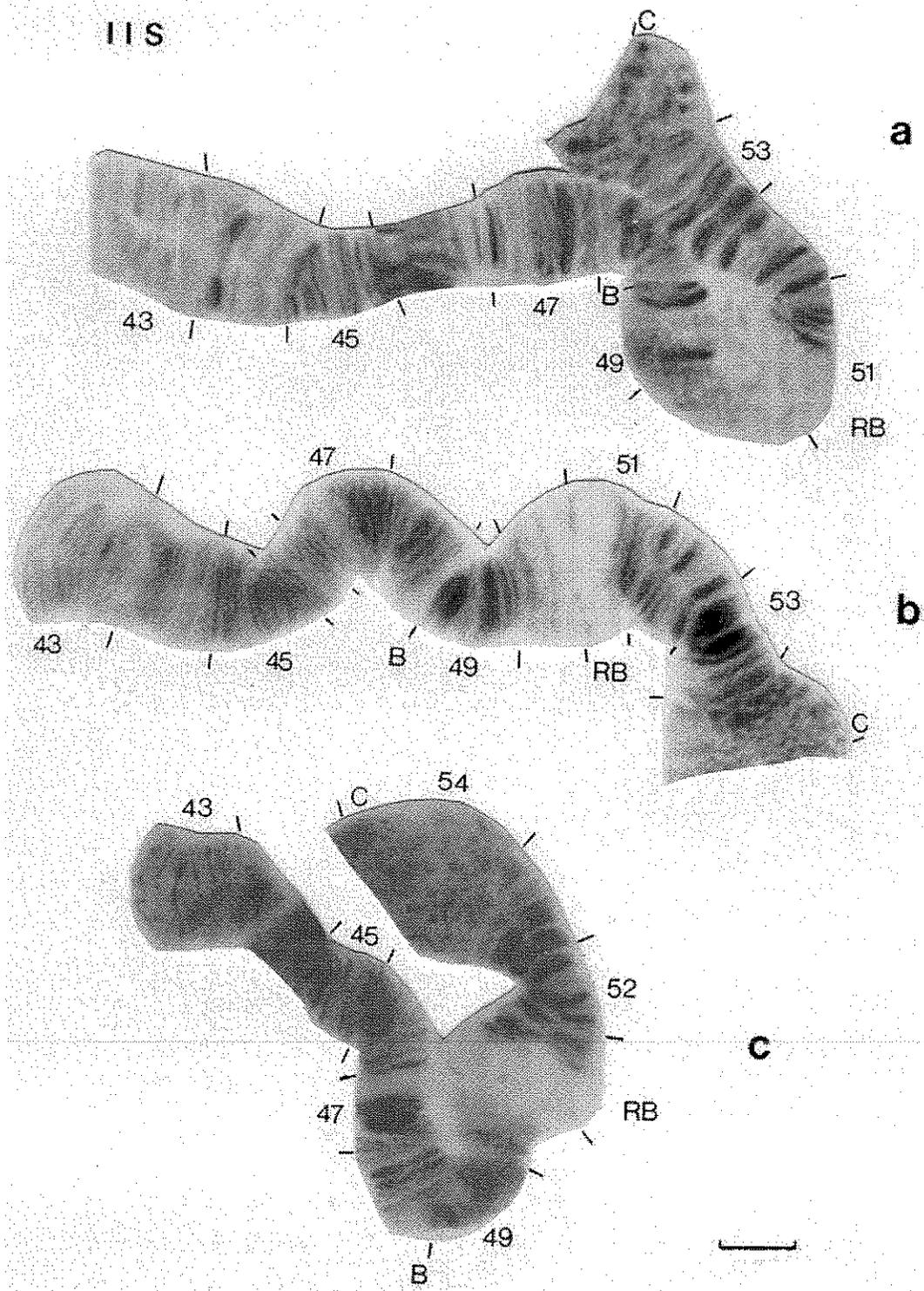


Figura 9. Comparação do padrão de bandas do braço IIS de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Morungaba, SP, 7<sup>0</sup>/f; b. Ilhabela, SP, 6<sup>0</sup>/f, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>0</sup>/f. B, “bulges”; C, centrômero; RB, “anel de Balbiani”. Barra= 8 µm.



Figura 10. Comparação do padrão de bandas do braço IIL de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax*. a. Morungaba, SP, 7<sup>o</sup>/?; b. Ilhabela, SP, 6<sup>o</sup>/f, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>o</sup>/f. C, centrômero; PB, “parabalbiani”. Barra= 8  $\mu$ m.

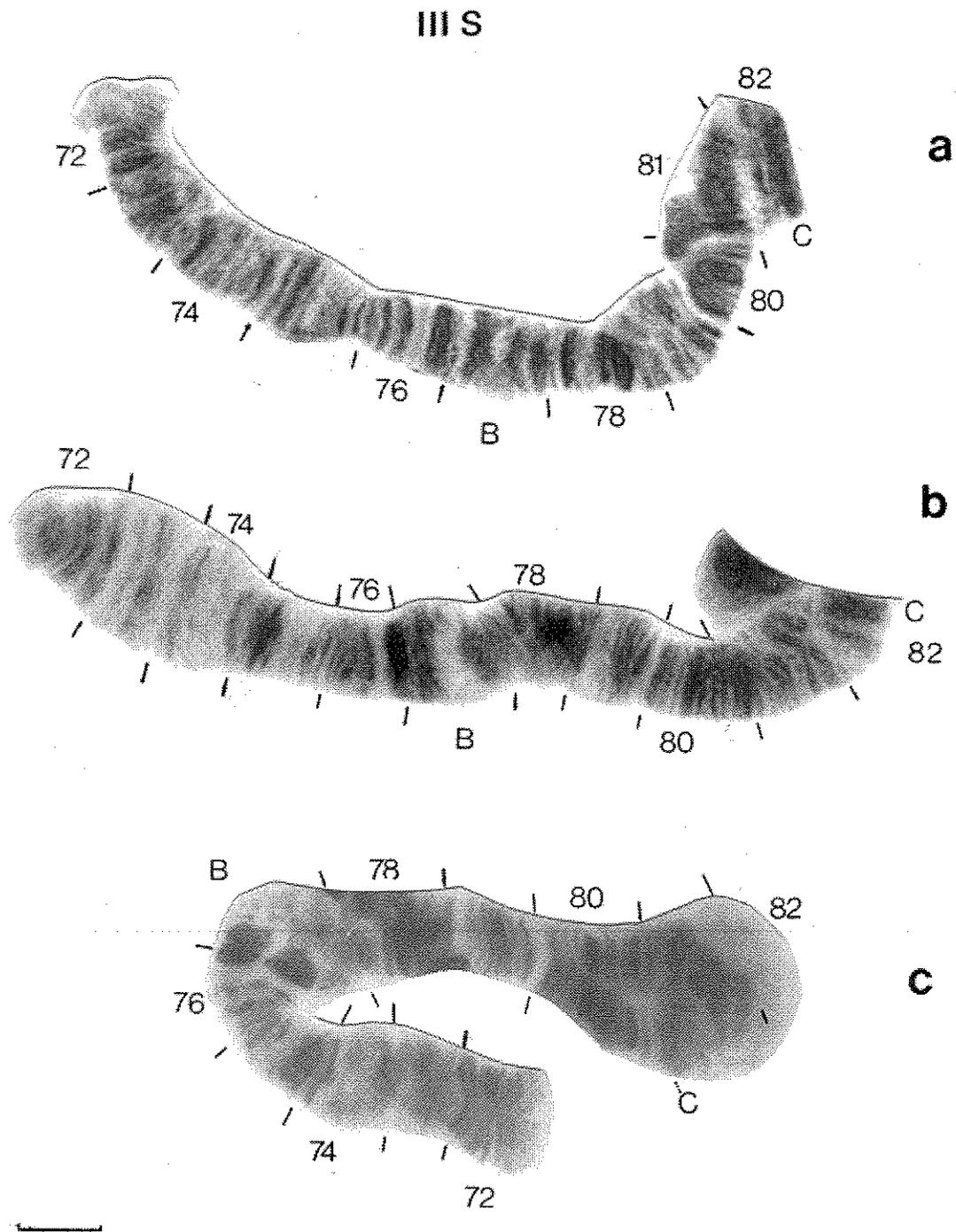


Figura 11. Comparação do padrão de bandas do braço III S de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Morungaba, SP, 6<sup>o</sup>/f.; b. Ilhabela, SP, 6<sup>o</sup>/f, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>o</sup>/f. C, centrômero; B, "blister". Barra= 8  $\mu$ m.



Figura 12. Comparação do padrão de bandas do braço III L de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Morungaba, SP, 6<sup>0</sup>/?; b. Ilhabela, SP, 6<sup>0</sup>/f, e c. Muriqui, RJ, 6<sup>0</sup>/f. C, centrômero; BM, "basal marker". Barra= 8  $\mu$ m.

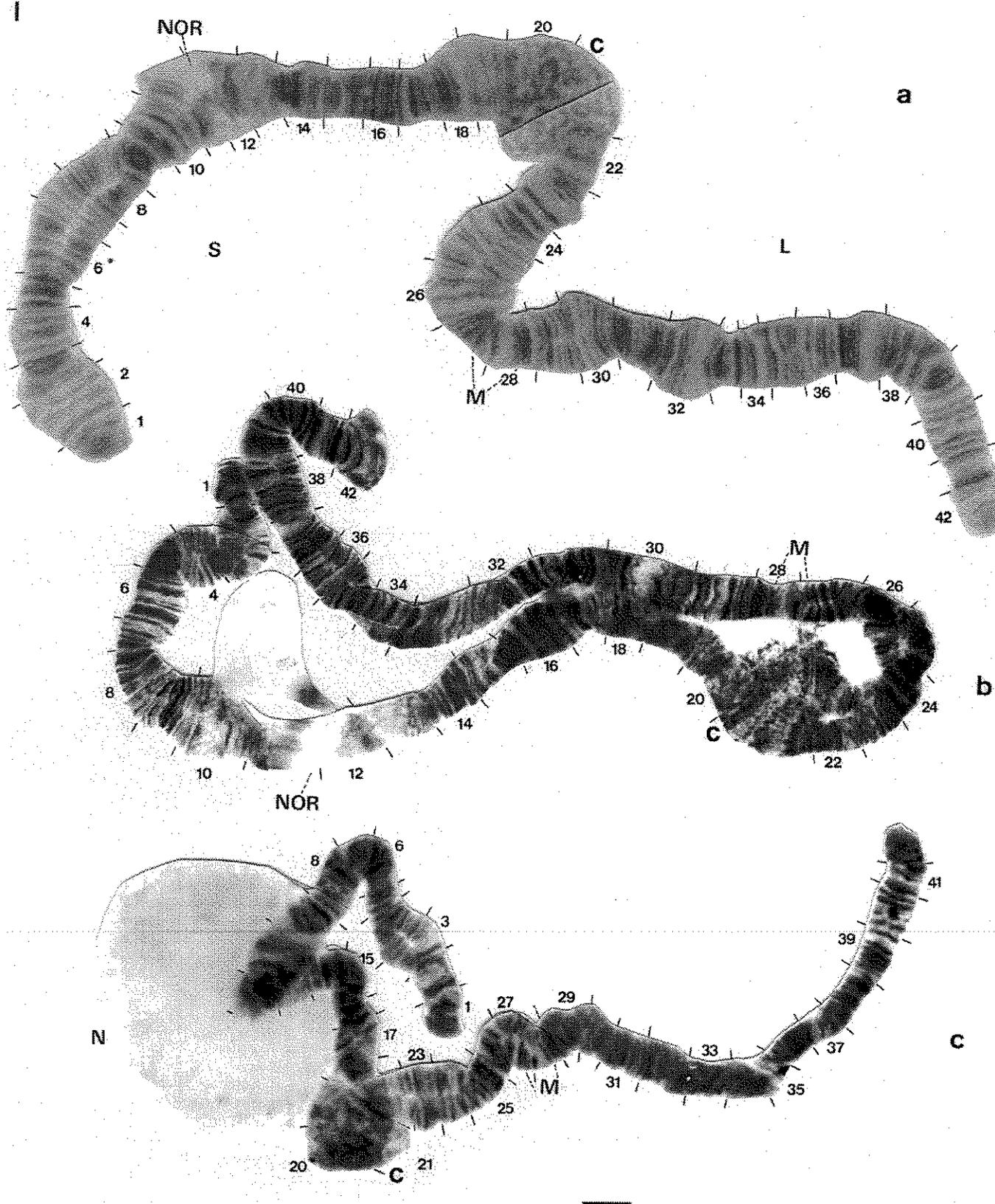


Figura 13. Comparação do padrão de bandas do cromossomo I de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Nova Petrópolis, RS, 7<sup>o</sup> estágio/fêmea; b. Tibaji, PR, 6<sup>o</sup>/ macho, e c. Barra do Una, SP, 6<sup>o</sup>/macho. C, centrômero; S, braço curto; L, braço longo; N, nucléolo; NOR, região organizadora nucleolar; M, "marker". Barra: a,b= 8  $\mu$ m; c= 10,4  $\mu$ m.



Figura 14. Comparação do padrão de bandas do cromossomo II de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Nova Petrópolis, RS, 7<sup>o</sup>/f; b. Tibaji, PR, 6<sup>o</sup>/m, e c. Barra do Una, SP, 6<sup>o</sup>/m. C, centrômero; S, braço curto; L, braço longo; RB, “anel de Balbiani”; PB, “parabalbiani”. Barra: a,b= 8 μm; c= 10,4 μm.

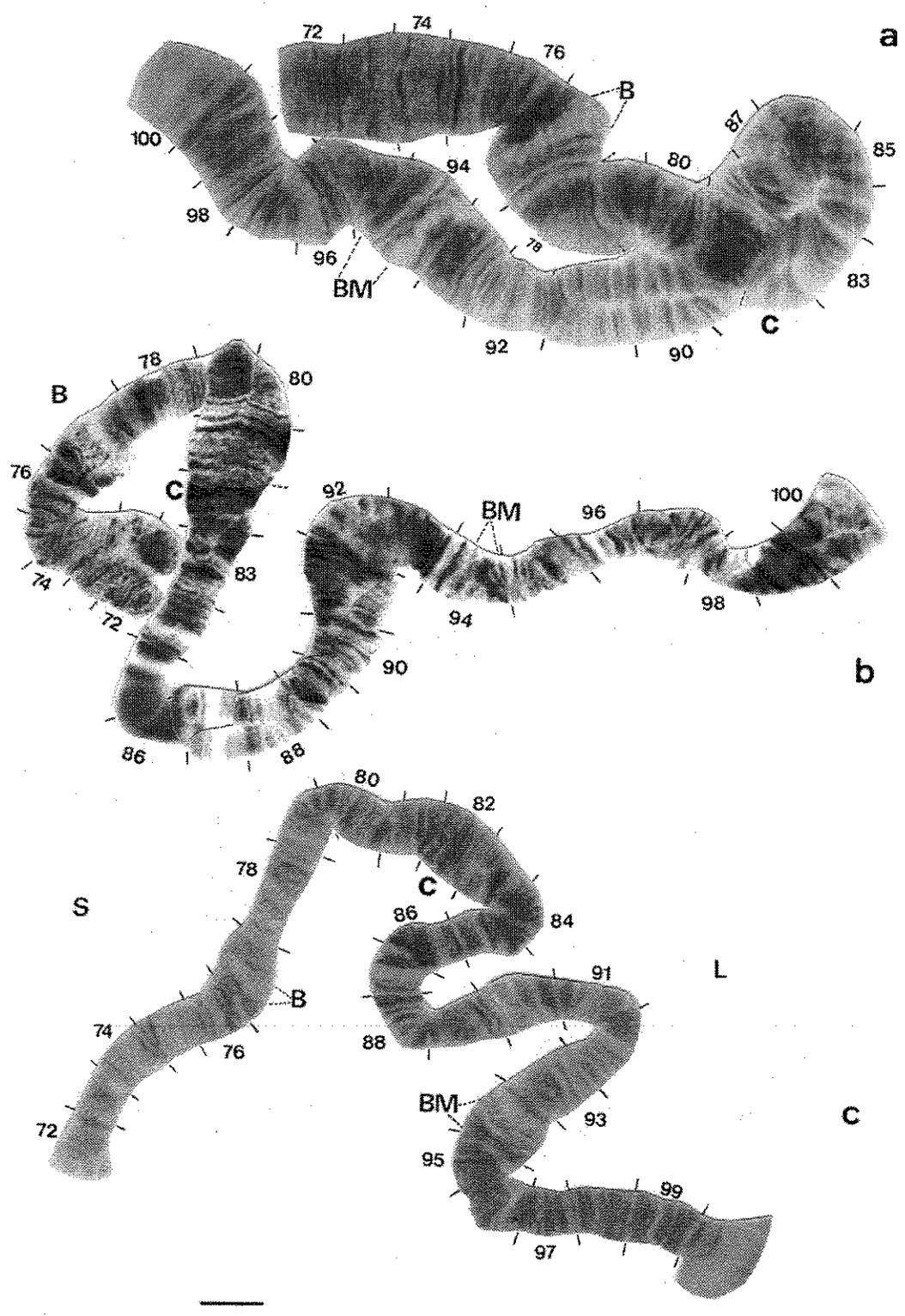


Figura 15. Comparação do padrão de bandas do cromossomo III de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*. a. Nova Petrópolis, RS, 7<sup>o</sup>/f; b. Tibaji, PR, 6<sup>o</sup>/m, e c. Barra do Una, SP, 6<sup>o</sup>/f. C, Centrômero; S, braço curto; L, braço longo; B, "blister"; BM, "basal marker". Barra= 8  $\mu$ m.

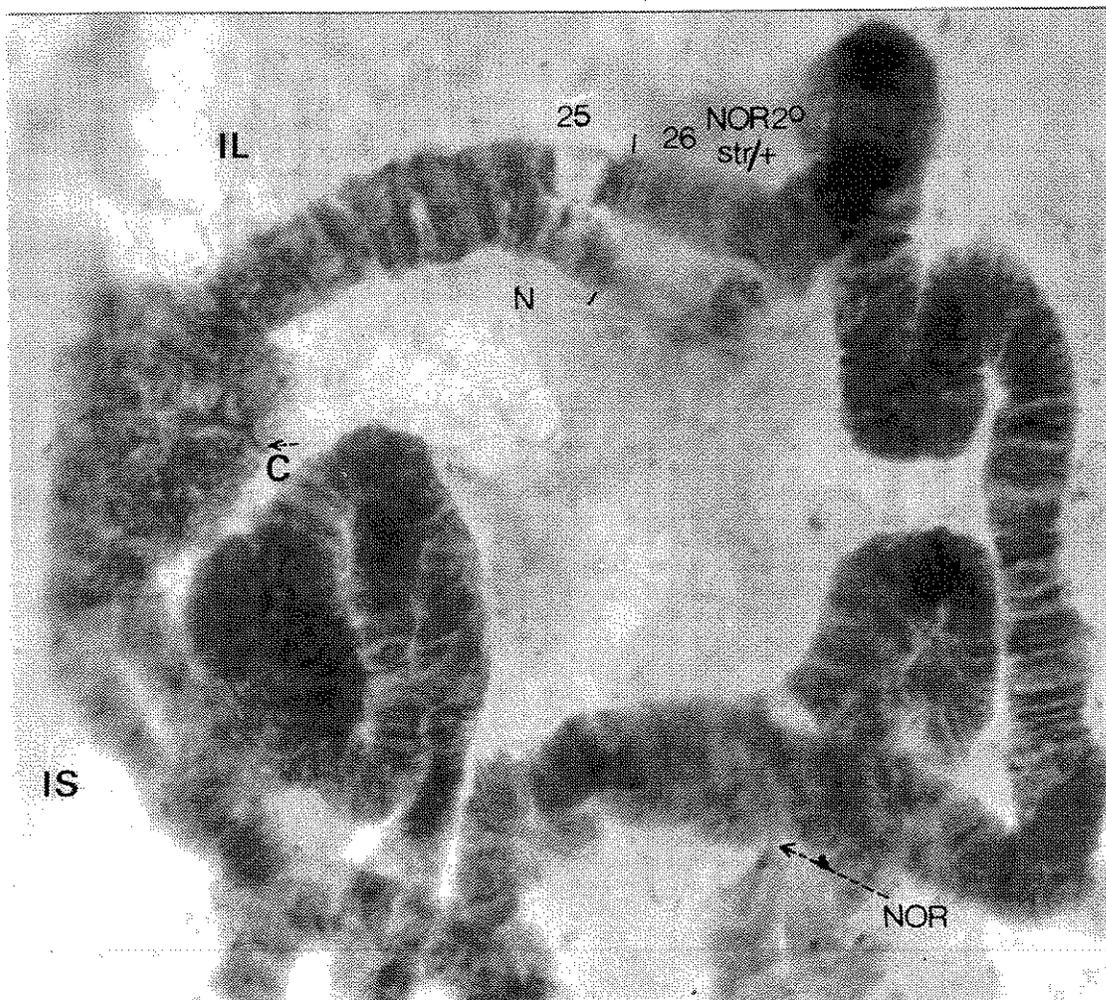


Figura 16. Polimorfismo no braço IL, *Simulium (Chirostilbia) pertinax* de Muriqui, RJ, 6<sup>o</sup>/macho. Região organizadora nucleolar secundária, NOR2<sup>o</sup> str/+ (seção 26). C, centrômero; N, nucléolo; NOR, região organizadora nucleolar; str, cromossomo standard; +, cromossomo expressado. Barra= 8  $\mu$ m.

## V. DISCUSSÃO

### 1. RESISTÊNCIA A INSETICIDAS NAS POPULAÇÕES

*Simulium (Chirostilbia) pertinax* é uma espécie Neotropical, ao que tudo indica com grande capacidade de adaptação. No presente estudo foi verificada sua ocorrência em criadouros localizados em quatro estados, com variações consideráveis dos parâmetros físicos como a altitude, a temperatura e a velocidade da água. Sua ampla distribuição geográfica (Coscarón, 1987) e mesmo sua capacidade de ocorrer tanto em águas limpas e rápidas de ambientes naturais, quanto em águas poluídas e lentas de ambientes antrópicos (Castello Branco Jr. & Andrade, 1992) apóiam essa idéia. As populações de Barra do Una (S, susceptível ao temephos), Ilhabela (R, resistente ao temephos) e Muriqui (S) encontram-se em criadouros de águas transparentes, em ambientes com pouca intervenção humana, enquanto as populações de Morungaba (R), Nova Petrópolis (?S/R, susceptibilidade indeterminada) e Tibaji (R) apresentam-se em criadouros de ambientes com grande intervenção por causa de fazendas com atividades intensivas de agropecuária. O baixo pH registrado para todos os criadouros (4,5 a 5,5) pode ter sido devido ao método de medição e à qualidade da fita, se bem que pH de 5,4 a 6,3 são registrados para águas minerais onde podem-se criar simúlideos. Populações de *S. pertinax* podem-se encontrar em águas com pH de 5,6 a 7,6 (Dellome-Filho, 1985), de 6,0 (Andrade & Castello Branco Jr., 1991; Castello Branco Jr. & Andrade, 1992), em torno de 7,0 (Sabino & Corrêa e Castro, 1990) ou 7,4 (Pegoraro, 1993).

Esperava-se que as populações de Morungaba, SP e Tibaji, PR, fossem completamente susceptíveis ao temephos, por nunca ter ocorrido programas de controle químico nestas regiões. Em Morungaba, uma avaliação preliminar (Julho/1994) contrariou o pressuposto detectando-se resistência nessa população. Posteriormente (Abril/1995), completa resistência pôde ser confirmada por meio de teste com larvas em rampas dispostas no leito do riacho (Andrade & Campos, 1995). Esta resistência não esperada pode ser explicada menos pela migração de indivíduos de populações resistentes, do que pelo desenvolvimento de

resistência cruzada a produtos de uso agrícola ou pecuário na fazenda onde se situa o riacho. Da mesma forma, é possível que tenha acontecido resistência cruzada na população de Tibaji. Tal fato tem sido documentado outras vezes para simulídeos (Kurtak *et al.*, 1987a; Lines, 1988; Andrade & Castello Branco Jr., 1991).

A população de Nova Petrópolis (?S/R) está localizada em uma área com um histórico de pelo menos 50 anos de atividade agrícola e/ou agropecuária. Nesta área têm sido usados agrotóxicos, e já em 1984 foi registrada a ineficiência do controle ao borrachudo no programa de controle com uso de temephos, iniciado em 1972. Apesar desta população estar sendo controlada há mais de 10 anos com Bti, pode-se pensar que continue resistente ao organofosforado, pois a pressão indireta da atividade agrícola não tem diminuído.

## 2. CARIÓTIPO

A espécie *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, como a maioria das espécies da família Simuliidae, tem um cariótipo com três pares de cromossomos ( $2n=6$ ). Excepcionalmente são encontradas espécies com  $n=2$ , como acontece em todos os membros do grupo *S. (Eusimulium) aureum* Fries, em *Cnephia lapponica* (Enderlein) e em *S. (Fremanellum) manense* Elsen & Escaffre (Rothfels, 1980; Crosskey, 1990). Igualmente, a maioria das espécies é diplóide ( $2n$ ), com exceção de *Prosimulium (Stegopterna) mutata* (Malloch) (antes *Cnephia mutata*) que é  $3n$  (Rothfels & Dunbar, 1953; Leonhardt, 1985). O cariótipo característico de  $2n=6$  também é encontrado em muitas espécies de Culicidae (Jost, 1971; Motara & Rai, 1978; Rao & Rai, 1987; Kumar & Rai, 1990; Marchi & Pili, 1994). Pela posição do centrômero, a espécie estudada apresenta cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, o que está em concordância com as espécies de todos os gêneros estudados (Rothfels, 1979). Como em outros insetos, os cromossomos metafásicos de *S. pertinax* sempre foram encontrados em pares apresentando pareamento somático. O tamanho total do complemento de  $10,96 \pm 0,91 \mu\text{m}$ , encontrado em *S. (Chirostilbia) pertinax*, é comparável ao

de outras espécies da família: 10,2  $\mu\text{m}$  em *S. (Nevermannia) ornatipes* Skuse (n=3) (Rothfels, 1979), 11  $\mu\text{m}$  em *S. (Eusimulium) aureum* (n=2) com comprimento de 7  $\mu\text{m}$  e 4  $\mu\text{m}$ ; o maior, ao que parece, é produto da fusão dos cromossomos II e III da espécie ancestral (Dunbar, 1958; Leonhardt, 1985) e ~11,8  $\mu\text{m}$  em *S. (Ectemnaspis) furcillatum* Wygodzinsky & Coscarón (n=3) (Campos, *não publicado*). É possível que a considerável variação no tamanho, como refletida pelo desvio padrão, seja devida ao pequeno tamanho da amostra para as medições de núcleos metafásicos (n=4) de gânglios larvais da população de Morungaba, SP.

### 3. OS CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

Os cromossomos politênicos das “glândulas salivares” de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* foram facilmente diferenciados pelo seu tamanho e pelos marcadores. Os marcadores cromossômicos são características micromorfológicas altamente conservadas, não só dentro da família mas também dentro da Ordem, que são usados na caracterização dos cromossomos e alguns deles na identificação dos braços. Como na maioria das espécies estudadas da família, *S. (Chirostilbia) pertinax* apresenta regiões centroméricas expandidas (Rothfels, 1979), mas a proporção de braços para o cromossomo I não foi a mesma que aquela dos cromossomos metafásicos,  $r=1,16$  nos politênicos e  $r=1,35$  nos mitóticos. Isto pode ser devido ao pouco número de núcleos metafásicos medido (n=4) e a uma maior variação das medidas. A relação de braços 2:1 entre o braço IIII e o IIIS, um caracter plesiomórfico (comum) para a maioria de *taxa* da família Simuliidae (Procunier & Muro, 1994) quase se mantém na espécie em estudo ( $r=1,80$  dos mitóticos,  $r=1,99$  dos politênicos) e pode ser verificada também nos ideogramas de outras espécies neotropicais dos subgêneros *Ectemnaspis* e *Hemicnetha* (Campos & Muñoz de Hoyos, 1990). A análise feita mostrou que os seis braços apresentam correspondência com os “standard” do subgênero *Simulium* (Rothfels *et al.*, 1978). Os marcadores, via de regra, podem ser estáveis em sua posição dentro da espécie, como a região organizadora do nucléolo (NOR) que quase sempre aparece formando um grande nucléolo. A NOR, na base do braço IS de *S. (Chirostilbia) pertinax*,

também se apresenta na mesma posição em outras espécies neotropicais como em *S. (Notolepria) exiguum* s.l. (Procunier *et al.*, 1985), *S. (Ectemnaspis) tunja* Coscarón (antes *Simulium* 'C') (Duque *et al.*, 1988), *S. (Ectemnaspis) furcillatum* (Campos, 1989; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990), *S. (Psilopelmia) ochraceum* s.l. (Hirai *et al.*, 1994), e na espécie africana *S. (Edwardsellum) damnosum* s.l. (Boakye, 1993), entre outras. Outros marcadores como o anel de Balbiani e o parabalbiani são mais conservados na família, sendo restritos aos braços IIS e IIL respectivamente, mas sua posição no braço pode se tornar característica específica.

A espécie *S. (Chirostilbia) pertinax* distinguiu-se por apresentar, nos cromossomos politênicos, um padrão de bandas homogêneo e constante, isto é, não mostrou polimorfismo algum, nem de banda nem de inversão. Os polimorfismos cromossomais ajudam a caracterizar citologicamente as espécies de simulídeos, e sua frequência pode variar em função da estação, da altitude ou da região geográfica (Rothfels, 1979). Embora possa existir variação na frequência, algumas espécies podem apresentar muitos polimorfismos cromossomais, enquanto que para outras, aparentemente isto não ocorre na mesma proporção. Estudos feitos com *S. (Wilhelmia) lineata* (Meigen) e *S. (W.) equina* (Linné), duas espécies paleárticas, obtidas de 13 locais do sudeste da Alemanha, mostraram muitos polimorfismos cromossomais na primeira (n=45), e um genoma mais homogêneo para a segunda espécie (n=203) (Weber & Grunewald, 1989). Polimorfismos também podem aparecer em estudos feitos em grandes áreas ou em locais restritos, mesmo em espécies neotropicais (Duque, 1980; Moreno, 1982; Duque *et al.*, 1988; Conn *et al.*, 1989; Moreno, 1990; Hirai *et al.*, 1994; Moreno & Muñoz de Hoyos, 1995; Arteaga, 1996; Moreno, 1997) inclusive em avaliações feitas em poucos indivíduos (n=26) (Campos, 1989). Estudos realizados em diferentes locais confirmam a observação inicial, feita na população de Morungaba, SP (Campos *et al.*, 1996), de que *S. (Chirostilbia) pertinax* é uma espécie monotípica em termos de morfologia dos cromossomos politênicos, apresentando pouca variação.

Regiões assinápticas ou sem pareamento entre os cromossomos homólogos podem ser registradas notoriamente para algumas espécies de simulídeos (Rothfels & Featherston, 1981) mas não foram observadas com frequência para as populações analisadas neste trabalho. Em outros dípteros, como em *Chrysomya bezziana* (Villeneuve) (Calliphoridae), onde os polimorfismos de inversão são raros e as populações exibem o mesmo padrão de bandas nos cromossomos politênicos, assinapses dos pares de cromossomos homólogos e diferenças na expressão e grossura das bandas podem ser utilizadas para estimar variação cromossômica (Bedo *et al.*, 1994).

*S. (Chirostilbia) pertinax* também não apresentou cromossomos B, que ocorrem comumente em pelo menos quatro gêneros da família Simuliidae (Rothfels, 1979; Brockhouse *et al.*, 1989a). A espécie também não apresentou diferenciação dos cromossomos sexuais, com padrão de bandas politênicas idênticas para fêmeas e machos, como é encontrado em muitas espécies de simulídeos (Feraday *et al.*, 1989).

#### **4. COMPARAÇÃO COM OS MAPAS “STANDARD” DE *Simulium***

Os mapas cromossômicos “standard” são de grande utilidade como ponto de relação para muitas espécies do gênero *Simulium* que apresentam importância médica e econômica (Rothfels, 1979). A partir da comparação com os mapas do subgênero *Simulium* (Rothfels *et al.*, 1978) observou-se no presente estudo uma associação de braços, com uma homologia de bandas de 63 % nos três cromossomos. A maioria dos segmentos homólogos encontrados entre *S. (Chirostilbia) pertinax* e *S. (Simulium)* nos seis braços coincidem, em boa parte de sua extensão, com aqueles segmentos homólogos encontrados em comparações feitas entre o subgênero *Simulium* e algumas espécies do subgênero *Ectemnaspis* (Duque *et al.*, 1988; Campos, 1989; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990; Miranda & Muñoz de Hoyos, 1993). Semelhanças intersubgenéricas na comparação de cromossomos politênicos reforçam a idéia de um agrupamento Neotropical de espécies de *Simulium* s.l. Assim, os segmentos conservados no padrão de bandamento dos cromossomos politênicos facilitariam a construção

de filogenias (Bedo, 1992). As diferenças cromossômicas seguramente refletem distâncias filogenéticas, como pode ser o caso na comparação do braço IIIS entre espécies de diferentes subgêneros como *Ectemnaspis*, *Hemicnetha*, *Notolepria* e *Simulium* (Campos & Muñoz de Hoyos, 1990). Em espécies do subgênero *Simulium* s.str. este braço é altamente conservado (Rothfels, 1979) reproduzindo coesão dentro do subgênero.

Pelas comparações feitas com outras espécies neotropicais como *S. (Notolepria) exiguum*, *S. (Hemicnetha) muiscorum* Bueno, Moncada & Muñoz [*S. (Grenierella) sensu* Coscarón (1987) ou *S. (Trichodagmia) sensu* Crosskey & Howard (1997)] (Campos & Muñoz de Hoyos, 1990; Miranda & Muñoz de Hoyos, 1993) e pelas semelhanças cromossômicas dos subgêneros *Ectemnaspis* e *Chirostilbia* com os mapas “standard” do subgênero *Simulium* pode-se sugerir que um agrupamento supraespecífico por morfologia dos cromossomos reforça o agrupamento feito por morfologia clássica para o gênero *Simulium* na região Neotropical (Coscarón, 1987), e assim melhorar o embasamento na filogenia da família nesta região. Relações de parentesco inicialmente observadas para algumas espécies, por meio de estudos cromossômicos (Campos, 1989; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990), foram reforçadas por meio de estudos filogenéticos baseados na cladística dos cromossomos politênicos (Miranda & Muñoz de Hoyos, 1993).

## 5. COMPARAÇÃO INTERPOPULACIONAL DOS CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

Os recursos da citotaxonomia têm sido utilizados na diferenciação de grupos crípticos, embora tenham sido registradas formas cromossômicas homossequenciais em complexos de espécies da família Simuliidae (Bedo, 1979a; Rothfels & Featherston, 1981; Henderson, 1986). No presente estudo, a análise das 255 larvas evidenciou homossequencialidade cromossômica dentre as seis populações, caracterizando *Simulium (Chirostilbia) pertinax* como uma espécie cromossomicamente monomórfica. Embora seja uma exceção em Simuliidae, a homossequencialidade cromossômica pode se apresentar

também entre espécies diferentes, como foi registrada entre duas espécies do grupo *Eusimulium aureum* (*E. azorense* e *E. petricolum*), que apresentaram no entanto claras diferenças morfológicas (Leonhardt & Feraday, 1989). Em outros insetos, também foi registrada a mesma seqüência básica do padrão de bandas entre populações de *Anopheles albimanus* (Keppler & Kitzmiller, 1969; Keppler *et al.*, 1973), de *A. aquasalis* (Pérez & Conn, 1992), de *Drosophila seriema* (Kuhn *et al.*, 1996) e de *Chrysomya bezziana* (Bedo *et al.*, 1994).

A família Simuliidae, com mais de 1600 espécies conhecidas, registra muitas citoformas e citoespécies. Nessa família, é usual o registro de polimorfismos cromossômicos, podendo-se apresentar variabilidade geográfica e/ou temporal (Bedo, 1979a; Henderson, 1986), o que não tem sido verificado até agora em *S. (Chirostilbia) pertinax*. Embora as seis populações tenham apresentado algumas diferenças como o fato de estarem em diferentes regiões geográficas, sob diferentes regimes climáticos (Figura 1) e terem sido expostas direta e/ou indiretamente a inseticidas, não apresentaram variações cromossômicas como polimorfismos de banda ou de inversão. As diferenças de comprimento e largura nos braços, observadas nas figuras 7-15, não podem ser consideradas como polimorfismos. Essas diferenças podem depender do grau de politenia e do espalhamento dos cromossomos, fato comum neste tipo de preparações. Núcleos com diferentes graus de politenia podem ser encontrados inclusive no mesmo tecido.

A falta de variabilidade cromossômica encontrada entre essas populações pode estar ainda associada em parte ao tamanho da maioria das amostras analisadas ( $N < 50$ ), refletindo portanto amostragens limitadas (Bedo, 1989). De fato, herdabilidade (variância fenotípica causada por variação genética) que não seja significativamente diferente de zero, pode ser resultado de um tamanho de amostra pequeno mais que da falta de diversidade genética (Klein, 1974; Storfer, 1996). Por outro lado não se pode descartar também a possibilidade de que pouca variabilidade em nível cromossômico seja realmente a condição dessas populações, com uma tendência para o monomorfismo,

semelhante ao encontrado em populações insulares e marginais (Carson, 1959; Heed & Rusell, 1971; Rothfels & Featherston, 1981).

Semelhança e estabilidade cromossômica em *S. (Chirostilbia) pertinax* sugerindo pouca variação genética dentro e entre as populações estudadas, pode estar em concordância com alguns estudos indicando que existe pouca variação genética nas populações desta família de insetos, sustentada também pela análise eletroforética de alozimas (Feraday & Leonhardth, 1989) e pela baixa frequência de polimorfismos (Hirai *et al.*, 1994). Nos simúlideos, baixa frequência de polimorfismos não é um fato ignorado visto que áreas cromossômicas altamente conservadas são encontradas em algumas espécies, como o braço III em espécies do subgênero *Simulium* (Rothfels, 1979; Procunier, 1989) ou os cromossomos I e III em espécies do subgênero *Ectemnaspis* (Campos, 1989; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990). Porém, levando-se em conta que a ausência de polimorfismos cromossômicos não seja uma evidência conclusiva para ausência de variabilidade genética entre as populações, só estudos com uma abordagem molecular poderão esclarecer esta situação. Assim, a semelhança cromossômica intra e interpopulacional encontrada para *S. pertinax* no presente estudo deve servir como ponto de partida para a discussão, pelo menos até que se obtenham maiores dados sobre esta ou outras espécies neotropicais que sustentem este fato. Segundo Crosskey (1987, 1990), menos de 10 % das espécies conhecidas de borrachudos foram estudadas citologicamente, e segundo nosso levantamento, isso envolveria menos de 5 % das espécies neotropicais.

Variação na localização ou na forma dos marcadores e/ou alterações do pareamento podem ajudar a evidenciar polimorfismos cromossômicos (Rothfels, 1979, 1987). Polimorfismos têm sido detectados em complexos de espécies de simúlideos de importância médico-veterinária como em *Simulium (Cerqueirellum) amazonicum* (Procunier, 1989), *S. (Edwardsellum) damnosum* (Procunier & Muro, 1993), *S. (Notolepria) exiguum* (Procunier *et al.*, 1985), *S. (Simulium) metallicum* (Conn, 1988; Conn *et al.*, 1989; Arteaga, 1996), *S. (Psilopelmia) ochraceum* (Hirai *et al.*, 1994), e em outras espécies neotropicais em que foram

também analisadas amostras relativamente pequenas (Moreno, 1982; Duque *et al.*, 1988; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990; Moreno, 1990; Moreno & Muñoz de Hoyos, 1995; Moreno, 1997). Em espécies de outras famílias de dípteros, como Chironomidae, também são comuns altos níveis de polimorfismos cromossômicos entre as populações, mesmo em análises feitas em menos de 50 indivíduos. Porém, populações paleárticas de *Chironomus (Camptochironomus) tentans* (Fabricius) apresentam padrões de bandas semelhantes nos seus cromossomos politênicos. Nesse caso, unicamente os polimorfismos de inversão diferenciam as populações (Kiknadze *et al.*, 1996).

No presente estudo, o único polimorfismo cromossômico encontrado foi caracterizado como sendo uma região organizadora nucleolar secundária (NOR 2<sup>o</sup>). A região organizadora nucleolar principal (NOR) é variável na sua localização nos cromossomos, entre diferentes espécies, podendo se encontrar em braços diferentes entre espécies não relacionadas, e algumas vezes em número superior a um, como NORs secundárias (Bedo, 1977, 1979b; Rothfels & Golini, 1983; Leonhardt, 1985), refletindo polimorfismos de expressão. Outros polimorfismos de expressão como os de banda, que podem ocorrer em simulídeos (Bedo, 1977, 1979b; Campos & Muñoz de Hoyos, 1990), não foram registrados para *S. pertinax*. Baixa frequência de polimorfismo cromossômico pode ser também uma consequência de reduzida diversidade do microhabitat, como parece estar acontecendo para *Anopheles bellator* (Ramirez & Dessen, 1996), mas como foi discutido não seria o caso para *S. pertinax*.

## **6. O COMPLEMENTO CROMOSSÔMICO E A RESISTÊNCIA NAS POPULAÇÕES**

Resistência a inseticidas têm sido associada com translocações no afídeo *Myzus persicae*, com diferenças cromossômicas em nível morfométrico no mosquito *Culex quinquefasciatus* (Blackman & Takada, 1977; Blackman *et al.*, 1978; Nance *et al.*, 1990; Blackman *et al.*, 1995), e com um “puff” nos cromossomos politênicos do mosquito *Culex pipiens* (Heyse *et al.*, 1996). Para as populações resistentes de *S. (Chirostilbia)*

*pertinax*, não ficou evidente qualquer associação refletida em algum rearranjo cromossômico, em algum “puff”, ou em alguma diferença no padrão de bandas e interbandas dos cromossomos politênicos. Embora já tenham sido registrados altos níveis de resistência ao organofosforado temephos, com aumento de 50 vezes na  $CL_{99}$  ( $FR_{99}$ ) para larvas de *S. pertinax* e de 300 vezes para larvas de *S. inaequale*, em populações do litoral norte de São Paulo, Ilhabela e Ubatuba (Andrade, 1989a, b), tenha sido detectado ainda um aumento na atividade de esterases associado com a resistência ao organofosforado, e tenha sido registrado resistência ao mesmo por fatores de até pelo menos oito vezes na  $CL_{50}$  ( $FR_{50}$ ) para adultos, o que poderia significar um aumento do fator de resistência de 1.000 vezes na  $CL_{50}$  para as larvas (Andrade, 1989a; Andrade & Castello Branco Jr., 1990).

Por causa dos altos níveis de resistência registrados no passado recente e o histórico de forte pressão de seleção com inseticidas, uma das primeiras hipóteses que surgiu para explicar a resistência detectada em *S. (C.) pertinax* foi a de amplificação gênica, embora segundo Devonshire & Field (1991) o fenômeno de amplificação gênica com a associação real das esterases de resistência seja conhecido até agora só para poucas espécies de insetos. No mosquito *Culex quinquefasciatus* foi observada uma alta produção de esterases, por fatores de até 500 vezes o normal (Mouchès *et al.*, 1987). Em simuliídeos, estudos enzimáticos feitos para caracterizar a resistência ao temephos em citoespécies de *S. (Edwardsellum) damnosum* s.l. mostraram que, “ao que parece, não existe similaridade entre as esterases de *Simulium* e de *Culex quinquefasciatus*” (Hemingway & Callaghan, 1989). Além disso, o aumento dos níveis de atividade esterásica no complexo *S. (E.) damnosum* não está fortemente associado a alguma banda eletroforética, como acontece para afídeos e para o mosquito *Culex* (Hemingway *et al.*, 1991). Levando-se em conta esses fatos, seria prematuro colocar como hipótese que a resistência detectada nas populações de *S. (C.) pertinax* e anteriormente caracterizada por aumento da produção de esterases possa estar associada à amplificação gênica.

Outro fator que tem que ser levado em conta, considerando a hipótese de amplificação, é o tamanho das bandas e interbandas e o fato de que tanto bandas como interbandas podem ser poligênicas e ter atividade de transcrição (Zhimulev & Belyaeva, 1991). Variações no tamanho de regiões amplificadas relacionadas com a resistência foram detectadas em *Drosophila melanogaster*, onde o “cluster” de amplificação de 11 genes carboxil/colinesterase pode ter um comprimento de 65 kb (Russell *et al.*, 1996); e em *Myzus persicae* que possui o “cluster” de 12 “amplicons” com comprimento de 24 kb por “amplicon” (Field *et al.*, 1996b). Segundo Alberts *et al.* (1994), cada fibra de cromatina dos cromossomos politênicos pode ter entre 3 e 300 kb de comprimento em cada uma das bandas, dependendo do tamanho destas. Portanto, dependendo de onde acontecer a amplificação ou seja, se em um gene dentro de uma banda ou de uma interbanda, e da extensão da amplificação, grande ou pequena, ela pode ou não se evidenciar em nível cromossômico.

Como no caso de *S. (Edwardsellum) damnosum*, explicações para a origem e difusão da resistência em populações de *S. (Chirostilbia) pertinax*, submetidas ou não a controle, poderiam também estar baseadas em complexos gênicos coadaptados (Kurtat *et al.*, 1987b). No entanto, grandes seqüências coadaptadas como polimorfismos de inversão ou de banda, que podem conferir uma vantagem seletiva (Procunier, 1989), não foram tampouco encontrados nas populações estudadas. Porém, pequenos complexos de genes dentro de uma única banda ou interbanda poderiam acontecer.

A resistência nas populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* pode ter-se desenvolvido de outro modo. Sabe-se que de maneira geral, a resistência monogênica pode se fixar e se espalhar em algumas espécies muito mais rapidamente do que a poligênica (Roush & McKenzie, 1987; Hemingway, 1992). Esta idéia de resistência monogênica pode explicar o rápido desenvolvimento (14 a 16 meses) de resistência aos organofosforados (Guillet *et al.*, 1980) ou até mesmo em apenas cinco meses como foi descrito para algumas populações de simulídeos da África (Davies, 1994) ou ainda depois de poucos meses de aplicação de temephos para o controle de simulídeos no estado do Paraná (E.L.G. Guimarães -SUREHMA,

comunicação pessoal). Isto fortemente sugere rápida seleção de um fator monogênico que confere maior adaptação biológica, na presença do inseticida.

Baseando-se no exposto anteriormente, pode-se sugerir que resistência monogênica, foi selecionada e espalhada por migração em *S. pertinax* no Brasil. No entanto, reversão da resistência ao temephos para simulídeos foi registrada na África (Kurtak, 1986; Molyneux, 1995) e ocorreu nas aplicações feitas pela SUREHMA, depois da interrupção dos tratamentos por 3 a 4 meses. Reversão pode implicar mudanças transcricionais, sem perda da seqüência relacionada com a resistência (Field *et al.*, 1996a; Hick *et al.*, 1996) ou implicar diminuição do gene resistente na população. Assim, a susceptibilidade na população de *S. pertinax* de Barra do Una, pode ser produto da reversão da resistência pela suspensão do controle químico, permitindo que indivíduos susceptíveis tivessem maior adaptação biológica na ausência do organofosforado e portanto diluindo os genes de resistência dentro da população. Foi observado que três genes para resistência (dois com alta produção de esterases e um com acetilcolinesterase insensitiva) apresentam altas freqüências só onde inseticidas organofosforados foram usados para controle de mosquitos, sugerindo que estes genes têm maior adaptação biológica nos ambientes onde tais inseticidas são usados, mas não quando estão ausentes (Pasteur & Raymond, 1996). Mesmo que a migração possa ter exercido um papel importante na dispersão da resistência dentro das espécies da família Simuliidae, algumas populações de *S. pertinax* podem ter ficado isoladas em refúgios, como no caso de Muriqui, afastada das áreas de controle nos estados de Rio de Janeiro e São Paulo, com pouco fluxo gênico com populações resistentes e assim mantendo sua condição natural, sem seleção de genes resistentes. Difusão dos genes resistentes é governada por seleção e migração (Pasteur & Raymond, 1996).

Sabe-se que dentro de uma distribuição fenotípica, é possível encontrar tanto indivíduos muito resistentes como indivíduos moderadamente resistentes, e os dois tipos podem ser selecionados. Desta forma, resistência baseada em fatores monogênicos e poligênicos pode surgir de uma seleção fraca (Groeters, 1995). O histórico de muitos anos de

pressão de seleção direta, nas populações de simulídeos de Ilhabela e Nova Petrópolis, e indireta, nas populações de Morungaba e Tibaji, junto com um pressuposto de aplicações instáveis em espaço e tempo, permite supor que teria dado tempo suficiente para um desenvolvimento poligênico da resistência, em seqüência ou simultaneamente ao provável desenvolvimento monogênico nos primeiros anos, ou inclusive nos primeiros meses, por causa de aplicações maciças (pelo menos em Ilhabela). A população de Nova Petrópolis recebeu controle químico direto e indireto por muito tempo e atualmente está exposta a produtos químicos da agropecuária. Na expressão da resistência podem estar envolvidos um ou dois genes principais e alguns genes secundários de incidência menor, às vezes pouco significativos (Roush & Daly, 1990). Isto implicaria em vários fatores de resistência distribuídos no genoma (em bandas e/ou interbandas), sem expressão aparente, e podendo não apresentar diferenças cromossômicas evidentes entre as populações resistentes e susceptíveis. Desta forma, poder-se-ia explicar a homossequencialidade encontrada entre as populações susceptíveis e resistentes de *S. pertinax* aqui estudadas. Mais estudos populacionais e evidências moleculares poderiam confirmar tal hipótese.

Considerando-se que as populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* estudadas no presente trabalho foram submetidas a diferentes processos de pressão de seleção, e que há evidências para o pressuposto de fluxo gênico com populações vizinhas (Andrade, 1989a; Andrade & Castello Branco Jr., 1990), é possível que a resistência ao temephos possa ter envolvido mais de um fator genético e apresente respostas diversas. Essa idéia estaria em concordância com o afirmado a respeito de *S. (Edwardsellum) damnosum* na África (Procunier, 1989) de que “a resistência provavelmente surgiu por vias diferentes e o tipo de resistência metabólica muda, dependendo do sistema enzimático envolvido”. É possível que o processo bioquímico envolvido na resistência de duas populações seja o mesmo (esterases), mas a adaptação biológica para cada população pode não ser a mesma quando diferentes tipos de pressão (direta ou indireta, constante ou esporádica) acontecem. Mesmo que seja selecionado o mesmo gene (ou genes), este pode apresentar expressão variável entre as

populações. Processos de seleção e adaptação têm a ver com a estrutura geográfica (estrutura demográfica e estrutura genética) das populações (Roderick, 1996). Linhagens de artrópodes resistentes estudados em laboratório frequentemente apresentam desvantagens no tempo de desenvolvimento, fecundidade, e fertilidade. No campo, as frequências de indivíduos resistentes usualmente diminuem com o tempo na ausência do praguicida; e desvantagens significativas na adaptação biológica parecem estar associadas unicamente com mecanismos particulares de resistência. Em alguns casos onde a resistência é revertida no campo, pode ser devido a diluição desta por imigração de indivíduos susceptíveis, mais do que pelas desvantagens na adaptação biológica (Roush & McKenzie, 1987; Roush & Daly, 1990).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu caracterizar cromossomicamente a espécie *Simulium (Chirostilbia) pertinax* mas não permitiu diferenciar, através da análise morfológica dos cromossomos politênicos, as seis populações, o que indica que *S. pertinax* seja cromossomicamente uma espécie monotípica e apresente pouca variabilidade cromossômica detectável em nível de microscopia óptica. Quanto à resistência, os dados obtidos nos permitiram apoiar algumas hipóteses. São necessários outros estudos e a sugestão de se determinar fatores em nível molecular que poderiam esclarecer esta situação. Os bioensaios ratificaram e revelaram resistência ao temephos para três das populações estudadas: uma submetida a controle direto no passado, caso de Ihabela, SP, e duas com pressão de seleção indireta (produtos usados na lavoura e/ou pecuária), Morungaba, SP e Tibaji, PR. A população de Nova Petrópolis, RS, submetida a controle direto e indireto foi considerada resistente. Assim, provavelmente seja mais sensato supor processos de seleção para genes resistentes e/ou tolerantes, pois seleção por inseticidas favorece a adaptação destes genes. A maioria dos modelos quantitativos de evolução da resistência em artrópodes, assumem que a frequência inicial de um alelo de resistência é suficientemente alta ( $> 10^{-5}$ ) para que a

resistência esteja presente em populações locais antes do início da seleção pelo praguicida (Tabashnik, 1990; Rosenheim, *et al.*, 1996).

Estudos temporais e espaciais nestas e em outras populações de *S. (Chirostilbia) pertinax* poderão ajudar a esclarecer melhor a homossequencialidade cromossômica observada até o momento. Por serem poucos os estudos citológicos na família Simuliidae no Brasil, são necessários estudos básicos em outras espécies de interesse médico e veterinário, e de importância sócio-econômica. Estando atualmente comprometida a opção de controle químico de algumas populações de *S. pertinax*, torna-se preciso avaliar por meio de bioensaios qualquer população que se pretenda controlar. Além de outros estudos cromossômicos como morfometria e estudos mitóticos e meióticos, uma abordagem bioquímica por análise eletroforética de isoenzimas, e uma abordagem molecular, com uso de marcadores, poderão ajudar no esclarecimento da variabilidade genética nas populações e dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência, com sua possível localização no genoma.

## V. CONCLUSÕES

1. *Simulium (Chirostilbia) pertinax* como a maioria das espécies estudadas da família Simuliidae é uma espécie diplóide ( $2n=6$ ), com cromossomos mitóticos metacêntricos (pares I e II) e submetacêntricos (par III);
2. A espécie apresenta nas “glândulas salivares” de penúltimo e último estágio larval, cromossomos politênicos que podem ser caracterizados morfologicamente, sendo os de penúltimo estágio os mais adequados para estudo do padrão de bandas por possibilitarem um melhor espalhamento;
3. Assim como a maioria das espécies da família Simuliidae estudadas cromossomicamente, *S. (Chirostilbia) pertinax* apresenta três cromossomos politênicos com bom pareamento somático de seus homólogos, regiões centroméricas expandidas e marcadores conspícuos;

4. A espécie pôde ser caracterizada cromossomicamente pelo padrão de bandas nos cromossomos politênicos, por marcadores como a região organizadora nucleolar (NOR) intersticial no braço IS, o anel de Balbiani (RB) basal, no braço IIS, o parabalbiani (PB) distal, no braço IIL, o “heavy” e “blister” intersticiais, no braço IIIS;
5. Com base na análise das seis populações estudadas neste trabalho, *S. (Chirostilbia) pertinax* pode ser considerada uma espécie cromossomicamente monomórfica, com pouca variabilidade, uma vez que os estudos envolveram diferentes regiões e épocas de coleta;
6. A comparação do padrão de bandas dos cromossomos politênicos de *S. (Chirostilbia) pertinax*, com os mapas “standard” de *Simulium* s.str., permitiu verificar a presença de vários segmentos semelhantes nos três cromossomos, apresentando uma homologia de cerca de 63%;
7. A semelhança do padrão de bandas dos cromossomos politênicos de *S. pertinax*, subgênero *Chirostilbia*, com os mapas padrão do subgênero *Simulium*, reforça a proposta de um agrupamento intersubgenérico de espécies neotropicais;
8. Embora tenham sido encontradas populações de *S. pertinax* resistentes (R) e susceptíveis (S) ao organofosforado temephos, com algumas delas apresentando um histórico com forte pressão de seleção, não foi possível qualquer associação da resistência com aspectos cromossômicos, pelo menos em nível morfológico, para o presente estudo.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abolhassani, D.S., Vazquez, N.G.H., Echeverria, O.M. & Fakan, S. Image-EELS for *in situ* estimation of the phosphorus content of RNP granules. *J. Microscopy* **183** (3): 215-222, 1996.
- Adler, P.H. Ecology and cytology of some Alberta blackflies (Diptera: Simuliidae). *Quaestiones Entomologicae* **22** (1): 1-18, 1986.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. The global structure of chromosomes. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York & London, 1994. p. 348-352.
- Alverdes, F. Die Kerne in den Speicheldrüsen der *Chironomus*-Larvae. *Arch. Zellforsch.* **9**: 168-204, 1912.\*
- Andrade, C.F.S. Ecologia da Supressão de Populações de Culicídeos e Simulídeos. Tese de Doutorado, Área de Ecologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, 1989a. 253 p.+ 89pp.
- Andrade, C.F.S. Manejo Integrado de Borrachudos. Anais do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, 1987, Campinas, 1989b. p. 141-157.
- Andrade, C.F.S. & Campos, J. Efetividade de Bactivec, a base de *Bacillus thuringiensis* H-14 no controle de *Simulium pertinax* (Diptera, Simuliidae). *Rev. Pat. Trop.* **24** (2): 275-281, 1995.
- Andrade, C.F.S. & Castello Branco Jr., A. Influência do tipo de criadouro no controle de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Dip. Simuliidae). Resumos do 1º Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores / Primeira reunião nacional sobre a utilidade de microorganismos entomopatogênicos, Rio de Janeiro, 1988. 47.
- Andrade, C.F.S. & Castello Branco Jr., A. Methods for field detection of resistance to temephos in simuliids. Larvae esterase level and topical application of the insecticide to adults. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **85** (3): 291-297, 1990.
- Andrade, C.F.S. & Castello Branco Jr., A. Susceptibilidade de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Rev. Saúde Pública* **25** (5): 367-370, 1991.
- Araújo-Coutinho, C.J.P.C., Maia-Herzog, M. & Souza, B.C.. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latrielle (Díptera, Simuliidae) no litoral norte do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Ent.* **32** (1): 11-17, 1988.
- Araújo-Coutinho, C.J.P.C. Biological control program against simuliids in the state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90** (1): 131-133, 1995.

\* Não consultado no original

- Arteaga, L. Estudio citológico de *Simulium (Simulium) metallicum* presente en el transecto Bogotá-Honda. Trabajo de Grado (Biólogo). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1996. 80 p.
- Barreto, P., Trapido, H. & Lee, V.H. Onchocerciasis in Colombia. Entomologic findings in the first observed focus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19** (5): 837-841, 1970.
- Beall, C., Fyrberg, C., Song, S. & Fyrberg, E. Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase. *Biochem. Genet.* **30** (9/10): 515-527, 1992.
- Bedo, D.G. Polytene chromosomes of three species of blackflies in the *Simulium pictipes* group (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* **53**: 1147-1164, 1975a.
- Bedo, D.G. C banding in polytene chromosomes of *Simulium ornatipes* and *S. melatum* (Diptera: Simuliidae). *Chromosoma* **51**: 291-300, 1975b.
- Bedo, D.G. Polytene chromosomes in pupal and adult blackflies (Diptera: Simuliidae). *Chromosoma* **57**: 387-396, 1976.
- Bedo, D.G. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae) I. Sibling speciation. *Chromosoma* **64**: 37-65, 1977.
- Bedo, D.G. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). II. Temporal variation in chromosomal polymorphisms and homosequential sibling species. *Evolution* **33** (1): 296-308, 1979a.
- Bedo, D.G. Band and nucleolar polymorphisms in polytene chromosomes of *Simulium ornatipes*. *Cytobios* **21**: 113-133, 1979b.
- Bedo, D.G. A cytological study of *Simulium ruficorne* (Diptera: Simuliidae) and its relationship to the *S. ornatipes* species complex. *Genome* **32**: 570-579, 1989.
- Bedo, D.G. Polytene chromosomes of the Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*) and its evolutionary relationships with *Lucilia cuprina* and *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* **35** (2): 294-303, 1992.
- Bedo, D.G., Spradbery, J.P. & Mahon, R.J. Cytogenetic variation in natural populations of the Old World screwworm fly *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* **37** (3): 390-398, 1994.
- Blackman, R.L. & Takada, H. The inheritance of natural polymorphisms in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Genetica* **47**: 9-15, 1977.
- Blackman, R.L., Takada, H. & Kawakami, K. Chromosomal rearrangement involved in insecticide resistance of *Myzus persicae*. *Nature* **271**: 450-452, 1978.

- Blackman, R.L., Spence, J.M., Field, L.M. & Devonshire, A.L. Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Heredity* **75**: 297-302, 1995.
- Boakye, D.A. A pictorial guide to the chromosomal identification of members of the *Simulium damnosum* Theobald complex in West Africa with particular reference to the Onchocerciasis Control Programme Area. *Trop. Med. Parasitol.* **44**: 223-244, 1993.
- Botto, C., Planchart, S., Martínez, N., Castro, L., Gelrud, A. Vivas, L. & Grillet, M.E. Onchocerciasis hyperendemic in the Unturán mountains: an extension of the endemic region in southern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 150-152, 1997.
- Bourguet, D., Prout, M. & Raymond, M. Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. *Genetics* **143**: 407-416, 1996.
- Breland, P.O. Preliminary observations on the use of the squash technique for the study of the chromosomes of mosquitoes. *Texas J. Science.* **XI** (2): 183-190, 1959.
- Brockhouse, C., Bass, J.A.B. & Strauss, N.A. Chromocentre polymorphism in polytene chromosomes of *Simulium costatum* (Diptera: Simuliidae). *Genome* **32**: 510-515, 1989b.
- Brockhouse, C., Bass, J.A.B., Feraday, R.M. & Strauss, N.A. Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* **32**: 516-521, 1989a.
- Campos, J. Estudio citológico de *Simulium furcillatum* (Diptera: Simuliidae) Páramo de Chisacá. Trabajo de Grado (Biólogo). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1989. 120 p.
- Campos, J. & Muñoz de Hoyos, P. Los cromosomas politénicos de *Simulium furcillatum* (Diptera: Simuliidae) Chisacá, Cundinamarca, Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **17** (67): 715-723, 1990.
- Campos, J., Recco-Pimentel, S.M. & Andrade, C.F.S. Polytene chromosome analysis of a population of *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae). *Rev. Bras. Genet.* **19** (1): 47-52, 1996.
- Carson, H.L. Genetic conditions which promote or retard the formation of the species. *Quant. Biol.* **24**: 87-105, 1959.
- Castello Branco Jr. A. Patologia e epizootiologia de *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae) infectado por *Polidispyrenia simulii* (Microspora; Duboscqiidae) e *Gastromermis viridis* (Nematoda; Mermithidae). Tese de Doutorado, Área de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, 1994a. 120 p.
- Castello Branco Jr., A. Influência do regime de ventos na dispersão de adultos de *Simulium pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* **23** (3): 571-573, 1994b.

- Castello Branco Jr., A. & Andrade, C.F.S. Susceptibility of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollard, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in an atypical breeding habitat. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **87** (2): 317-318, 1992.
- Chadee, D.D., Tilluckdharry, C.C., Doon, R., Rawlins, S.C., Narayansingh, V., Ariyanayagam, D.C., Teelucksingh, S. & Gaxotte, P. Ivermectin treatment of mansonellosis in Blanchisseuse, Trinidad, West Indies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **90** (6): 645-649, 1996.
- Charalambous, M., Ready, P.D., Shelley, A.J., Arzube, M. & Lowry, C.A. Cytological and isoenzyme analysis of the Bucay and Quevedo cytotypes of the onchocerciasis vector *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae) in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88** (1): 39-48, 1993.
- Charalambous, M., Shelley, A.J., Maia Herzog, M. & Luna Dias, A.P.A. Four new cytotypes of the onchocerciasis vector blackfly *Simulium guianense* in Brazil. *Med. Vet. Entomol.* **10**: 111-120, 1996.
- Chubareva, L.A., Rubzov, I.A. & Petrova, N.A. Morphological and caryological similarities and differences of the paleartic and Neotropical species of the genus *Hemicnetha* End. *Rev. Entomol. U.S.S.R.* **2**: 452-457, 1976.
- Coluzzi, M. Malaria vector analysis and control. *Parasitology Today* **8** (4): 113-118, 1992.
- Conn, J. A cytological study of the *Simulium metallicum* complex (Diptera: Simuliidae) from Central and South America. in: Service, M.W. *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Systematics Association, Special Volume No. 37, Clarendon Press, Oxford, 1988. p. 221-243.
- Conn, J., Rothfels, K., Procunier, W.S. & Hirai, M. The *Simulium metallicum* species complex (Diptera: Simuliidae) in Latin America: A cytological study. *Can. J. Zool.* **67**: 1217-1245, 1989.
- Coscarón, S. Insecta Diptera Simuliidae. In: *Fauna de agua dulce de la República Argentina*. Director Raúl Adolfo Ringuelet. Volumen XXXVIII, Fascículo 1 Simuliidae, 1981. 105 p.
- Coscarón, S. El género *Simulium* Latrielle en la Región Neotropical: Análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae, Diptera). Museu Paraense Emilio Goeldi. Belém, 1987. 112 p.
- Coscarón, S. Los Estudios Ecológicos en Simúlidos Neotropicales (Diptera: Insecta). Anais do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, 1987, Campinas, 1989. p. 69-98.
- Coscarón, S. Insecta Diptera Simuliidae. In: *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina*. Director Zulma A. de Castellanos. Volumen XXXVIII Insecta Diptera, Fascículo 2 Simuliidae, 1991. p. 304 + Laminas.

- Coscarón, S. & Coscarón-Arias, C.L. Distribution of Neotropical Simuliidae (Insecta, Diptera) and its areas of endemism. *Rev. Acad. Colom. Cienc.* **19** (75): 717-732, 1995.
- Coscarón, S. & Coscarón-Arias, C.L. Cladistic analysis of the subgenera *Inaequalium*, *Psaroniocompsa* and *Chirostilbia* of the genus *Simulium*, with comments on their distribution (Diptera: Simuliidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **56** (1-4): 109-121, 1997.
- Crosskey, R.W. An annotated checklist of the world black flies (Diptera: Simuliidae). In: Kim, K.C. & Merrit, R.W. (Eds), *Black flies: ecology, population management and annotated world list*. Pennsylvania State University Press, University Park & London, 1987. p. 425-520.
- Crosskey, R.W. *The Natural History of Blackflies*. Edit. John Wiley & Sons. New York, 1990. 711 p.
- Crosskey, R.W. & Howard, T.M. *A New Taxonomic and Geographical Inventory of World Blackflies (Diptera: Simuliidae)*. Entomol. Depart. Nat. Hist. Mus., London, 1997. 144 p.
- Cyanamid. "Abate Larvicida". Cyanamid Agricultural Research Division. American Cyanamid Co., Manual Técnico. Princeton, 1980. 39 p.
- D'Andretta Jr., C. & D'Andretta, M.A.V. Espécies neotropicais da família Simuliidae Schiner (Diptera Nematocera) VI - Redescricao de *Simulium pertinax* Kollar, 1832. *Papéis Avulsos Dep. Zool. São Paulo* **9**: 193-213, 1950.
- D'Andretta Jr., C., Leal, H., Souza Dias, L.C. & Hernandez, R.J. Relatório inicial sobre o combate aos simulídeos no Município de Joinville, SC. *Rev. Paul. Med.* **74** (5): 332, 1969.
- Davies, J.B. Sixty years of onchocerciasis vector control: A chronological summary with comments on eradication, reinvasion, and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol* **39**: 23-45, 1994.
- Davis, J.R., Barbiero, V.K. & Trpis, M. Duration of larval development of *Simulium yahense* (Diptera: Simuliidae) under natural conditions. *J. Med. Entomol.* **29**: 108-200, 1992.
- Delome-Filho, J. Simuliofauna do rio Marumbi (Morretes, Paraná): aspectos bionômicos com ênfase na alimentação das larvas de *Simulium incustratum* Lutz, 1910. (Diptera, Simuliidae). Tese de Doutorado, Un. Federal do Paraná. Curitiba, 1985. 126 p.
- Devonshire, A.L. & Field, L.M. Gene duplication and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **36**:1-23, 1991.
- Dunbar, R.W. The salivary gland chromosome of two sibling species of black flies included in *Eusimulium aureum* Fries. *Can. J. Zool.* **36**: 23-44, 1958.

- Dunbar, R.W. Polytene chromosome preparations from tropical Simuliidae. *WHO/ONCHO/Geneva* **72.95**: 1-16, 1972.
- Duke, B.O.L. *Onchocerca-Simulium* complexes. VI.-Experimental studies on the transmission of Venezuelan and West African strains of *Onchocerca volvulus* by *Simulium metallicum* and *S. exiguum* in Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **64** (4): 421-431, 1970.
- Duque, S. Estudio citogenético de *Simulium ignescens* Roubaud 1906. Trabajo de Grado (Biólogo). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1980. 102 p.
- Duque, S., Muñoz de Hoyos, P. & Rothfels, K.H. The polytene chromosomes of *Simulium (Ectemnaspis) ignescens* Roubaud and related species *Simulium "C"*, both from Colombia. *Can. J. Zool.* **66**: 300-309, 1988.
- Elsen, P., Bellec, C. & Hébrard, G. Speed of recolonization of an Ivory Coast breeding site by *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) after experimental suspending of larvicide treatments and its consequence on strategy of fight against this vector of Onchocerciasis. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. Parasitol.* **19** : 5-9, 1981.
- Feraday, R.M. & Leonhardt, K.G. Absence of population structure in black flies as revealed by enzyme electrophoresis. *Genome* **32**: 531-537, 1989.
- Feraday, R.M., Leonhardt, K.G., & Brockhouse, C.L. The role of sex chromosomes in black fly evolution. *Genome* **32**: 538-542, 1989.
- Field, L.M., Crick, S.E. & Devonshire, A.L. Polymerase chain reaction-based identification of insecticide resistance genes and DNA methylation in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molec. Biol.* **5** (3): 197-202, 1996a.
- Field, L.M., Devonshire, A.L. & Tyler-Smith, C. Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* **313**: 543-547, 1996b.
- French, W.L., Baker, R.H. & Kitzmiller, J.B. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito News* **22**(4): 377-383, 1962.
- Guderian, R.H. & Shelley, A.J. 1992. Onchocerciasis in Ecuador: the situation in 1989. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87** (3): 405-415, 1992.
- Green, D.M., Bogart, J.P. & Anthony, E.H. An interactive, microcomputer-based karyotype analysis system for phylogenetic cytotaxonomy. *Comput. Biol. Med.* **10**: 219-227, 1980.
- Groeters, F.R. Insecticide resistance. *TREE* **10** (4): 164, 1995.
- Guillet, P., Escaffre, M., Ouédraogo, M. & Quillévééré, D. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en

- Côte d'Ivoire (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. Parasitol. 18 (3): 291-299, 1980.
- Guimarães, E.L.G. Biologia e controle de simuliídeos no estado do Paraná. Resumos do 1º Seminário sobre vetores urbanos e animais sinantrópicos, São Paulo, 1986. p. 24.
- Guimarães, E.L.G. Biologia do *Simulium pertinax* Kollar, no estado do Paraná. Resumos do II Seminário Nacional de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 3ª Reunião Brasileira sobre Simuliídeos, Porto Alegre, 1988. p. 82-83.
- Guimarães, E.L.G. Controle de simuliídeos no estado de Paraná. Resumos do III Seminário Nacional de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 4ª Reunião Brasileira sobre simuliídeos, Rio de Janeiro, 1990. p. 36.
- Guimarães, E.L.G. & Medeiros, M.L.M.B. Efeito de poluição por despejo orgânico no ciclo vital do *Simulium pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). Informe SUREHMA, estado do Paraná., Doc. Mimeo., 1985. 73 p
- Guimarães, E.L.G. & Medeiros, M.L.M.B. Efeito de poluição por despejo orgânico no período larval do *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae). Resumos. do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas, 1987. p. 409.
- Heen, W.B. & Russell, J.S. Phylogeny and population structure in island and continental species of the *Cardini* group of *Drosophila* studied by inversion analysis. *Univ. Tex. Publ.* 7103: 91-130, 1971.
- Hemingway, J. Genetics of insecticide resistance in mosquito vectors of disease. *Parasitology Today* 8 (9): 296-298, 1992.
- Hemingway, J. & Callaghan, A. temephos resistance in *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae): A comparative study between larvae and adults of the forest and savana strains of this species complex. *Bull. Ent. Res.* 79: 659-669, 1989.
- Hemingway, J., Callaghan, A. & Kurtak, D.C. Biochemical characterization of chlorphoxim resistance in adults and larvae of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae). *Bull. Ent. Res.* 81: 401-406, 1991.
- Henderson, C.A. Homosequential species 2a and 2b within the *Prosimulium onychodactylum* complex (Diptera): Temporal heterogeneity, linkage disequilibrium, and Wahlund effect. *Can. J. Zool.* 64: 859-866, 1986.
- Hennig, W. Ordnung Diptera (Zweiflüger). *Handb. Zool.* 4: 1-337, 1973.
- Heyse, D., Catalan, J., Nance, E., Britton-Davidian, J. & Pasteur, N. Unconventional organization of amplified esterase B gene in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12 (2/1): 199-205, 1996.

- Hick, C.A., Field, L.M. & Devonshire, A.L. Changes in the methylation of amplified esterase DNA during loss and reselection of insecticide resistance in the peach-potato aphids, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26** (1): 41-47, 1996.
- Hirai, H. & Uemoto, K. The analysis of the salivary gland chromosomes of *Simulium ochraceum* from Guatemala and Mexico. *Jap. J. Sanit. Zoo.* **31**: 261-270, 1983.
- Hirai, H., Procunier, W.S. Ochoa, J.O. & Uemoto, K. A cytogenetic analysis of the *Simulium ochraceum* species complex (Diptera: Simuliidae) in Central America. *Genome* **37**: 36-53, 1994.
- Hougard, J.M., Poudiougou, P., Guillet, P., Back, C., Akpoboua, L.K.B. & Quillévéré, D. Criteria for the selection of larvicides by the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **87** (5): 435-442, 1993.
- Hunter, F.F. The polytene chromosomes of *Simulium furculatum* (Shewell) (Diptera: Simuliidae). *Genome* **32**: 522-530, 1989.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W.J. & Crozier, R.H. Modes of spontaneous mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. Genet.* **63**: 159-185, 1988.
- Jamnback, H. Recent developments in control of blackflies. *Ann. Rev. Entomol.* **18**: 281-304, 1973.
- Jost, E. Meiosis in the male of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* and fertilization in the *Culex pipiens*-complex. *Can. J. Genet. Cytol.* **13**: 237-250, 1971.
- Kaiser, P.E., Seawright, J.A. & Joslyn, D.J. Cytology of genetic sexing in *Anopheles albimanus*. *Can. J. Genet. Cytol.* **21**: 201-211, 1979.
- Keppler, W.J. & Kitzmiller, J.B. Reciprocal fertility among five populations of the *Anopheles albimanus*. *Genetics* **61**: s31, 1969.
- Keppler, W.J., Kitzmiller, J.B. & Rabbani, M.G. 1973. The salivary gland chromosomes of the *Anopheles albimanus*. *Mosquito News* **33**: 42-49, 1973.
- Kiknadze, I.I., Butler, M.G., Aimanova, K.G., Gunderina, L.I. & Cooper, J.K. Geographic variation in the polytene chromosome banding pattern of the Holarctic midge *Chironomus (Camptochironomus) tentans* (Fabricius). *Can. J. Zool.* **74**: 171-191, 1996.
- Kim, K.C. & Merrit, R.W. (Eds), *Black flies: ecology, population management and annotated word list*. Pennsylvania State University Press, University Park & London, 1987. xv +528 p.
- Klein, T. W. Heritability and genetic correlation: statistical power, population comparisons and sample size. *Behav. Genet.* **4**: 171-189, 1974.

- Kumar, A. & Rai, K.S. Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Hereditas* **113**: 277-289, 1990.
- Kunh, G.C.S., Ruiz, A., Alves, M.A.R. & Sene, F.M. The metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila seriema* (repleta group; mulleri subgroup). *Braz. J. Genet.* **19** (2): 209-216, 1996.
- Kurtak, D.C. Insecticide resistance in the Onchocerciasis Control Programme. *Parasitology Today* **2** (1): 20-21, 1986.
- Kurtak, D.C., Ouedraogo, M., Ocran, M., Tele, B. & Guillet, P. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to clorphoxim in the *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). *Doc. Mimeo. WHO/VBC/82.850*, 1982.
- Kurtak, D., Jamnback, H., Myer, R., Ocran, M. & Renaud, P. Evaluation of larvicides for the control of *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) in West Africa. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **3** (2): 201-210, 1987a.
- Kurtak, D., Meyer, R., Ocran, M., Ouedraogo, M., Renaud, P., Sawadogo, R.O. & Tele, B. Management of insecticide resistance in the control of *Simulium damnosum* complex by the Onchocerciasis Control Programme, West Africa: potential use of negative correlation between organophosphate resistance and pyrethroid susceptibility. *Med. Vet. Entomol.* **1**: 137-146, 1987b.
- Lamb, M.M. & Danehold, B. Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*. *Cell* **17**: 835-848, 1979.
- Laird, M. (Ed), *Blackflies, the future for biological methods in integrated control*. Academic Press. London, 1981. 398 p.
- Leonhardt, K.G. A cytological study of species of sibling species in the *Eusimulium aureum* group (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* **63**: 2043-2061, 1985.
- Leonhardt, K.G. & Feraday, R.M. Sex chromosome evolution and population differentiation in the *Eusimulium aureum* group of Black flies. *Genome* **32**: 543-549, 1989.
- Levan, A.D., Fredga, D. & Sandberg, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220, 1964.
- Lines, J.D. Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at the evidence. *Parasitology Today* **4**: s17-s20, 1988.
- Lima-Catelani, A.R.A. & Bicudo, H.E.M.C. Chromosome studies in two Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Cytobios* **79**: 241-251, 1994.
- Lima-Catelani, A.R.A. & Bicudo, H.E.M.C. Cytogenetics of *Aedes fluviatilis*. *Cytobios* **81**: 189-194, 1995.

- Little, M.D. & D'Alessandro, A. Onchocerciasis in Colombia. Parasitologic findings in the first observed focus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19** (5): 831-836, 1970.
- Lozovei, A.L., Cunha, M.C.I., Dellome Filho, J. & Oliveira, U.L.R.. Considerações sobre microalgas do conteúdo entérico das larvas de simulídeos, (Diptera-Simuliidae), Rio Passaúna, Curitiba, Paraná. Resumos do 1º Seminário sobre vetores urbanos e animais sinantrópicos, São Paulo, 1986. p. 25.
- Lozovei, A.L., Cunha, M.C.I. & Bassi, R.M.A. Estudo das espécies de Simulídeos (Diptera, Simuliidae) que se procriam em "vertedouros" de Açudes de Piscicultura, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. Anais do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, 1987, Campinas, 1989. p. 103-111.
- Lozovei, A.L., Cunha, M.C.I & Bassi, R.M.A. Controle físico de simulídeos (Diptera, Simuliidae) em vertedouros de açudes de piscicultura e no leito do Rio Dom Rodrigo em Campo Largo, Paraná, Brasil. *Arq. Biol. Tecnol.* **35** (4): 679-684, 1992.
- Maia-Herzog, M., Felipe-Bauer, M.L., Malaguti, R. & Carvalho Leite, T.C. A contribution to the study of *Simulium* and *Culicoides* of Rio de Janeiro: Monthly incidence and biting activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83** (1): 95-99, 1988.
- Magni, S.T. Métodos alternativos de controle de simulídeos no R.S. Resumos do II Sem. Nac. de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 3ª Reunião Brasileira sobre Simulídeos, Porto Alegre, 1988. p. 66.
- Magni, S.T., Ruas Neto, A.L., Souza, M.A.T., Severino, S., de Melo, J.L.B., Silveira, S.M. & de Fortes, N.N.D.F. Controle de simulídeos no Rio Grande do Sul: utilização de calhas "SC" para os tratamentos com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Resumos do 1º Seminário sobre vetores urbanos e animais sinantrópicos, São Paulo, 1986. p. 23.
- Marchi, A. & Pili, E. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity* **72**: 599-605, 1994.
- Mckenzie, J.A. & Batterham, P. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *TREE* **9** (5): 166-169, 1994.
- Millest, A.L. Identification of members of the *Simulium ochraceum* species complex in three onchocerciasis foci in Mexico. *Med. Vet. Entomol.* **6**: 23-28, 1992.
- Miranda, D.R. & Muñoz de Hoyos, P. Relaciones filogenéticas del subgénero *Ectemnaspis* subgrupo *bicoloratum* (Simuliidae: *Simulium*). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **18** (71): 571-577, 1993.
- Molyneux, D.H. Onchocerciasis control in West Africa: current status and future of the Onchocerciasis Control Programme. *Parasitology Today* **11** (11): 399-402, 1995.

- Morcillo, G., Baretino, D., Carmona, M.J., Carretero, M.T. & Díez, J.L. Telomeric DNA sequences differentially activated by heat shock in two *Chironomus* subspecies. *Chromosoma* **96**: 139-144, 1988.
- Moreira, G.R.P. & Sato, G. Blackfly oviposition on riparian vegetation of waterfalls in an Atlantic rain forest stream. *An. Soc. Entomol. Brasil* **25** (3): 557-562, 1996.
- Moreno, C.H. Estudio citogenético de *Simulium (Hemicnetha) muiscorum* Bueno, Moncada & Muñoz de Hoyos, 1979. Trabajo de Grado (Biólogo). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1982. 80 p.
- Moreno, C. Estudio citogenético de *Gigantodax ortizi* Wygodzinsky, 1973 (Diptera: Simuliidae) de la región de Chisacá. Trabajo de Grado (Biólogo). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1990. 61 p.
- Moreno, C. Estudio morfológico y citológico integrado de algunas especies del subgénero *Ectemnaspis (Simulium: Simuliidae) sensu* Coscarón. Trabajo de Magister em Biología - Línea Sistemática. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, 1997.
- Moreno, C. & Muñoz de Hoyos, P. Los cromosomas politénicos de *Gigantodax ortizi* (Diptera: Simuliidae) de Chisacá. Resumos do XXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Santafé de Bogotá, 1995. p.124.
- Motara, M.A. & Rai, K.S. Giemsa C-banding patterns in *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Chromosoma* **70**: 51-58, 1978.
- Morton, R.A. Evolution of *Drosophila* insecticide resistance. *Genome* **36**: 1-7, 1993.
- Mouchès, C., Magnin, M., Berge, J.B., de Silvestri, M., Beyssat, V., Pasteur, N., & Geourghiou, G.P. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 2113-2116, 1987.
- Nance, E., Heyse, D., Britton-Davidian, J., & Pasteur, N. Chromosomal organization of the amplified esterase B1 gene in organophosphate-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). *Genome* **33**: 148-152, 1990.
- Nelson, G.S. Onchocerciasis. *Advances Parasitol.* **8**: 173-224, 1970.
- Pai, A.C. *Foundations of Genetics, A Science for Society*. McGraw-Hill. New York, 1974. 836 p.
- Pasteur, N. & Raymond, M. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. *J. Heredity* **87** (6): 444-449, 1996.
- Patrus, O.A. Fogo selvagem, endemia brasileira. *Ciência Hoje* **10** (56): 8-9, 1989.

- Pawlowski, J., Szadziewski, R., Kmiecik, D., Fahrni, J. & Bittar, G. Phylogeny of the infraorder Culicomorpha (Diptera: Nematocera) based on 28S RNA gene sequences. *Systemat. Entomol.* **21**: 167-178, 1996.
- Pegoraro, R.A. Ciclo biológico de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae). *An. Soc. Ent. Bras.* **22** (1): 29-38, 1993.
- Pérez, A.M. & Conn, J. A polytene study of four populations of *Anopheles aquasalis* from Venezuela. *Genome* **35**: 327-331, 1992.
- Peterson, J.L. Population genetics of the some New World Simuliidae. in: *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*. Stipes Publis. Co., Champaign (USA), 1982. p. 628-642.
- Pinheiro, F.P., Bensabath, G., Costa, D., Maroja, O.M., Lins, Z.C. & Andrade, A.H.P. Hemorrhagic syndrome of Altamira. *The Lancet* (Abril, 13): 639-642, 1974.
- Post, R.J. The citotaxonomy of *Simulium sanctipauli* and *Simulium soubrense* (Diptera: Simuliidae). *Genetica* **69**: 191-207, 1986.
- Post, R.J. Natural interespecific hybridization of *Simulium sanctipauli* s.l. with *Simulium squamosum* and *Simulium yahense* (Diptera: Simuliidae). *Tropenmed. Parasit.* **35**: 58-60, 1984.
- Procunier, W.S. Cytological approaches to simuliid biosystematics in relation to the epidemiology and control of human onchocerciasis. *Genome* **32**: 559-569, 1989.
- Procunier, W.S. & Muro, A.I. Cytotaxonomy of the *Simulium damnosum* complex from Central and Northeastern Tanzania. *Genome* **36**: 112-130, 1993.
- Procunier, W.S. & Muro, A.I. A mid-arm interchange as a potential isolating mechanism in the medical important *Simulium neavei* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* **37**: 957-969, 1994.
- Procunier, W.S., Shelley, A.J. & Arzube, M. Sibling species of *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae), the primary vector of onchocerciasis in Equador. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* **35**: 49-59, 1985.
- Procunier, W.S., Shelley, A.J. & Arzube, M. Cytological identification of *Simulium oyapockense* manabi form (Diptera: Simuliidae): a potencial vector of onchocerciasis in Ecuador. *Trop. Med. Parasit.*, **38**: 71, 1987.
- Py-Daniel, V. Simuliidae no Brasil. Resumos do II Sem. Nac. de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 3ª Reunião Brasileira sobre Simulídeos, Porto Alegre, 1988. p. 95.
- Ramirez, C.C.L. & Dessen, E.M.B. The polytene chromosomes of the *Anopheles bellator* compared with those of the *Anopheles cruzii*. *Rev. Bras. Genet.* **19** (4): 555-558, 1996.

- Rao, P.N. & Rai, K.S. Comparative karyotypes and chromosomal evolution in some genera of Nematocerous (Diptera: Nematocera) families. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **80**: 321-332, 1987.
- Ringo, J., Jona, G., Rockwell, R., Segal, D. & Cohen, E. Genetic variation for resistance to chlorpyrifos in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) infesting grapes in Israel. *J. Econ. Entomol.* **88**: 1158-1163, 1995.
- Roderick, G.K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* **41**: 325-352, 1996.
- Rosenheim, J.A., Johnson, M.W., Mau, R.F.L., Welter, S.C. & Tabashnik, B.E. Biochemical preadaptations, founder events, and the evolution resistance in arthropods. *J. Econ. Entomol.* **89** (2): 263-273, 1996.
- Rothfels, K.H. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Ann. Rev. Entomol.* **24**: 507-539, 1979.
- Rothfels, K.H. Chromosomal variability and speciation in blackflies. In: Blackman, R.L., G.M. Hewitt & M. Ashburner (Eds), *Insect cytogenetics*, Symp. R. Entomol. Soc. London: n° 10. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980. p. 207-224.
- Rothfels, K.H. Cytotaxonomy: Principles and their application to some northern species-complexes in *Simulium*. In: Laird, M. (Ed), *Blackflies, the future for biological methods in integrated control*. Academic Press, London, 1981a. p. 19-29.
- Rothfels, K.H. Cytological approaches to the study of blackfly systematics and evolution. In: Stock, M. W. (Ed), *Application of genetics and cytology in insect systematics and evolution*. Proc. Symp. Nat. M. Entomol. Soc. Am., 1980, Atlanta, 1981b. p. 67-83.
- Rothfels, K.H. Cytological approaches to black fly taxonomy. In: Kim, K.C. & R. Merritt (Eds), *Black Flies: Ecology, population management, and annotated world list*. The Pennsylvania State University Press, University Park & London, 1987. p. 39-52.
- Rothfels, K.H. Speciation in black flies. *Genome* **32**: 500-509, 1989.
- Rothfels, K.H. & Dunbar, R.W. The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Can. J. Zool.* **31**: 226-241, 1953.
- Rothfels, K.H. & Featherston, D. The population structure of *Simulium vittatum* (Zett.): the IIL-1 and IS-7 sibling species. *Can. J. Zool.* **59**: 1857-1883, 1981.
- Rothfels, K.H. & Golini, V.I. The polytene chromosomes of species of *Eusimulium* (*Hellichiella*) (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* **61** (6): 1220-1231, 1983.
- Rothfels, K.H., Feraday R. & Kaneps, A. A cytological description of sibling species of *Simulium venustum* and *S. verecundum* with standard maps for the subgenus *Simulium* Davies (Diptera). *Can. J. Zool.* **56**: 1110-1128, 1978.

- Roush, R.T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitology Today* **9** (5): 174-179, 1993.
- Roush, R.T. & Daly, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (Eds), *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, New York, 1990. p. 97-152.
- Roush, R.T. & McKenzie, J.A. Ecological genetics of insecticide acaricide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **32**: 361-380, 1987.
- Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (Eds). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman & Hall, New York, 1990, 303 p.
- Ruas Neto, A.L. Avaliação do uso de temephos para o controle de simúlídeos, no Rio Grande do Sul. *B. Saúde, Porto Alegre* **11** (2): 27-31, 1984.
- Ruas Neto, A.L., Pacheco, E. & Torres, M.A. Projeto de controle de simúlídeos, plano de pesquisa e dados coligidos. *B. Saúde, Porto Alegre* **11** (2): 17-20, 1984.
- Ruas Neto, A.L. & Matias, R.S. Controle integrado do *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832. 2. A competição interespecífica como possível método de controle natural. *B. Saúde, Porto Alegre* **12** (2): 21-24, 1985.
- Rusell, R.J., Robin, G.C., Kostakos, P., Newcomb, R.D., Boyce, T.M., Medveczky, K.M. & Oakeshott, J.G. Molecular cloning of an  $\alpha$ -esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26** (3): 235-247, 1996.
- Sabino, J. & Corrêa e Castro, R.M. Alimentação, período de atividades e distribuição dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (sudeste do Brasil). *Rev. Brasil. Biol.* **50** (1): 23-36, 1990.
- Shidrawi, G.R. Programa mundial de la OMS para la vigilancia de vectores resistentes a los plaguicidas. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **113**: 223-232, 1992.
- Shelley, A.J. Vector aspects of the epidemiology of onchocerciasis in Latin America. *Ann. Rev. Entomol.* **30**: 337-366, 1988.
- Shelley, A.J., Pinger, R.R. & Moraes, M.A.P. The taxonomy, biology and medical importance of *Simulium amazonicum* Goeldi (Diptera: Simuliidae), with a review of related species. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.), (Entomol.)* **44** (1): 1-29, 1982.
- Shelley, A.J., Luna Dias, A.P.A., Maia-Herzog, M., Procunier, W.S. & Moraes, M.A.P. Identification of vector species (Diptera: Simuliidae) of human onchocerciasis in the Amazonia focus of Brasil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82** (4): 461-465, 1987a.

- Shelley, A.J., Luna Dias, A.P.A., Moraes, M.A.P. & Procunier, W.S. The status of *Simulium oyapockense* and *S. limbatum* as vectors of human onchocerciasis in Brazilian Amazonian. *Med. Vet. Entomol.* **1**: 219-234, 1987b.
- Shelley, A.J., Lowry, C.A., Maia-Herzog, M. Luna Dias, A.P.A. & Moraes, M.A.P. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. *Bull. Brit. Mus.(Nat. Hist.), (Entomol.)*. **66** (1): 1-121, 1997.
- Sorsa, V. *Polytene Chromosomes in Genetic Research*. Edit. Ellis Horwood Limited. Chichester, 1988. 289 p.
- Souza, M.A.T. Atendimento médico por picadas de simulídeos. *B. Saúde, Porto Alegre* **11** (2): 8-11, 1984.
- Souza, M.A.T. Controle de simulídeos no Rio Grande do Sul, usando *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Resumos do II Sem. Nac. de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 3ª Reunião Brasileira sobre Simulídeos, Porto Alegre, 1988. p. 68.
- Souza, M.A.T. & Magni S.T. Observações preliminares sobre predação de estágios imaturos de simulídeos por pássaros Resumos do II Sem. Nac. de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 3ª Reunião Brasileira sobre Simulídeos, Porto Alegre, 1988. p. 70.
- Souza, M.A.T., Mardini, L.B.L.F., Ruas Neto, A.L., Silveira, S.M. & Gomes, E.C. Simulídeos no Rio Grande do Sul, Brasil. 1- Controle de 1976 a 1990. Resumos do III Seminário Nacional de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / 4ª Reunião Brasileira sobre simulídeos, Rio de Janeiro, 1990. p. 38.
- Storfer, A. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *TREE* **11** (8): 343-348, 1996.
- Strieder, M.S. & Corseuil, E. Atividades de hematofagia em Simuliidae (Diptera, Nematocera) na Picada Verão, Sapiranga, RS - Brasil. *Act. Biol. Leopoldensia* **14**: 75-98, 1992.
- Swanson, C.P., Merz, T. & Young, W.J. *Cytogenetics, The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution*. Prentice-Hall, London, 1981. p 162-169.
- Tabashnik, B.E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. In: Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (Eds), *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, New York, 1990. p. 153-182.
- Tabashnik, B.E. Insecticide resistance. *TREE* **10** (4): 164-165, 1995.
- Tang, J., Toè, L., Back, C., Zimmerman, P.A., Pruess, K. & Unnasch, T.R. The *Simulium damnosum* species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. *Insect Mol. Biol.* **4** (2): 79-88, 1995.
- Taylor, C.E. Genetics and evolution of resistance to insecticides. *Biol. J. Linn. Soc.* **27**: 103-112, 1986.

- Taylor, M. & Feyereisen, R. Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Mol. Biol. Evol.* **13** (6): 719-734, 1996.
- Tidwell, M.A. & Tidwell, M. Development of *Mansonella ozzardi* in *Simulium amazonicum*, *S. argentiscutum* and *Culicoides ansinatus* from Amazonas, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31** (6): 1137-1141, 1982.
- Tidwell, M.A., Tidwell, M.A., Muñoz de Hoyos, P. & Corredor, A. *Simulium exiguum*, the vector of *Onchocerca volvulus* on the río Micay, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29** (3): 377-381, 1980.
- Tidwell, M.A., Peterson, B.V., Ramírez P., J., Tidwell, M. & Lacey, L.A. Notas y claves preliminares de los jevenes Neotropicales pertenecientes a los grupos *Simulium amazonicum* y *S. sanguineum* (Diptera: Simuliidae) incluyendo los vectores de *Onchocerca volvulus* y *Mansonella ozzardi*. *Bol. Div. Mar. San. Amb.* **21** (2): 79-89, 1981.
- Trapido, H., D'Alessandro, A. & Little, M.D. Onchocerciasis in Colombia. Historical background and ecologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20** (1): 104-108, 1971.
- Urata, Y., Parmelee, S.J., Agard, D.A. & Sedat, J.W. A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Biol.* **131**: 270-295, 1995.
- Walsh, J.F., Molyneux, D.H. & Birley, M.H. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology* **106**: 555-575, 1993.
- Weber, E.A. & Grunewald, J. Cytotaxonomic differentiation of *Wilhelmia equina* (Linné, 1747) and *Wilhelmia lineata* (Meigen, 1804). *Genome* **32**: 589-595, 1989.
- White, M.J.D. Giant chromosomes - the polytene type. In: *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, London, 1973. p. 87-127.
- WHO Vector Control Series. *Simulium, Training and information guide*. Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization. WHO/VBC/91.992. Geneva, 1991. 115 p.
- Zhimulev, I.F. & Belyaeva, E.S. Chromomeric organization of polytene chromosomes. *Genetica* **85**: 65-72, 1991.
- Zhivotovsky, L.A., Feldman, M.W. & Bergman, A. On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution* **50** (2): 547-558, 1996.