



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis*
para o controle de *Alphitobius diaperinus*
(Coleoptera: Tenebrionidae)

Lunalva Aurélio Pedroso Sallet

Orientadora: Dr^a Rose Gomes Monnerat

Brasília, agosto de 2013.

Lunalva Aurélio Pedroso Sallet

Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis*
para o controle de *Alphitobius diaperinus*
(Coleoptera: Tenebrionidae)

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e Molecular da
Universidade de Brasília para a obtenção
do título de doutor em Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a Rose Gomes Monnerat

Brasília, agosto de 2013.

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Lunalva Aurélio Pedroso Sallet

Comissão Examinadora

Dra. Rose Gomes Monnerat
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Orientadora)

Dra. Cynthia Kyaw
Universidade de Brasília (Membro titular interno)

Dra. Carmen S. Soares Pires
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Membro titular externo)

Dr. Paulo Roberto Queiroz
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Membro titular externo)

Dr. Cesar Augusto D. Teixeira
Embrapa Rondônia (Membro titular externo)

Dr. Rogerio Biaggioni Lopes
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Membro suplente externo)

Dedicatória

*Este trabalho é dedicado aos meus
amores Giovane e Leonardo que sempre
estiveram ao meu lado.*

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ter atingido este ponto se não tivesse tido a colaboração de muitos que, na sua humildade e dignidade contribuíram para a execução do mesmo.

- Primeiramente, agradeço a Deus pela energia que me encoraja a persistir.
- A minha mãe pela educação e ensinamentos de sempre trabalhar e ser persistente para conquistar os objetivos.
- Ao meu pai “*in memoriam*” pela educação, ensinamentos e por sempre acreditar e confiar no meu trabalho.
- Um agradecimento especial ao meu querido filho, Leonardo, que soube suportar durante estes anos que estive ausente em vários momentos da sua vida,
- Um agradecimento especial ao meu esposo, Giovane, pelo espírito de sacrifício e de compreensão que teve durante estes quatro anos, deixando os seus sonhos de lado para sonhar os meus.
- À Universidade de Brasília, pela oportunidade dada a minha formação profissional.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.
- A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular auxiliaram no desenvolvimento profissional.
- Ao meu orientador de mestrado, Dr^o César Augusto Teixeira, por ter acreditado no meu trabalho e me apresentado a Dr^a Rose Monnerat.
- A minha orientadora Dr^a Rose Monnerat pela compreensão nos momentos necessários, pela confiança na realização deste trabalho, pelos ensinamentos acadêmicos e, por demonstrar o verdadeiro valor da pesquisa. Uma segunda mãe dentro do laboratório. Muito obrigada.
- A Dr^a Erica Soares Martins e ao Dr^o Paulo Roberto Queiroz pelos ensinamentos, paciência e amizade. Muito Obrigada! Não tenho palavras para agradecer.
- Aos amigos e colegas do laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, Cristina, Carla, Clara, Elias, Sandro, Luiza, Lilian, Fernanda, Gúbio, Zezinho e demais colegas que trabalharam no LBE nestes 4 anos.

- A Fernanda minha “filha postíça” que sempre me ajudou nas atividades do laboratório e de casa. Muito obrigada Fê.
- A Flávia pela auxílio na execução dos trabalhos e pela paciência em me ouvir nos momentos de desabafos.
- Ao Marcelo Castro pelos auxílios em informática e pelas risadas agradabilíssimas.
- Em especial ao Marcelo Araújo que me auxiliou em todos os trabalhos sempre com muita responsabilidade e dedicação.
- A Ana da secretaria de Pós-graduação pela atenção e paciência. Muito obrigada.
- A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	VI
ÍNDICE.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUÇÃO.....	1
CAPITULO I.....	4
1. Avicultura.....	5
2. <i>Alphitobius diaperinus</i> (Cascudinho da cama de frangos).....	6
2.1 Aspectos gerais.....	6
2.2 Biologia do inseto.....	7
2.3 Controle do <i>A. diaperinus</i>	10
2.4 Controle químico.....	10
2.5 Controle biológico.....	11
3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3.1 Breve histórico.....	12
3.2 Características gerais.....	13
3.3 Toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	15
3.4 Proteínas Cry e seu mecanismo de ação.....	15
4. HIPOTESE.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo geral.....	19
5.2 Objetivos específicos:.....	19
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	20
CAPÍTULO II.....	25

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Coleta dos insetos.....	27
2.2 Criação de <i>A. diaperinus</i>	28
2.3 Avaliação do desenvolvimento de <i>A. diaperinus</i> em diferentes dietas.....	29
3. RESULTADOS.....	31
4. DISCUSSÃO.....	35
4. CONCLUSÃO.....	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO III.....	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 – Insetos.....	42
2.2 - Estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
2.3- Bioensaios.....	43
3. Ensaio com proteínas Cry individuais e detecção de receptores.....	44
3.1 Purificação, solubilização e quantificação das proteínas.....	45
3.2 Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais.....	46
3.3 Ativação das proteínas com tripsina.....	46
3.4 Ativação das proteínas com suco gástrico.....	47
3.5 Biotinilação das proteínas.....	47
3.6 Extração de BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles” - Vesículas da Borda Escovada da Membrana Apical das Células do Intestino).....	48
3.7 Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV’s).....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 Bioensaios para <i>A. diaperinus</i>	49
4.2 Purificação e solubilização das proteínas.....	54
4.3 Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais.....	55
4.4 Ativação das proteínas com tripsina e com proteases do intestino do inseto.....	56
4.5 Biotinilação das proteínas.....	57

4.6 Ensaio de ligação.....	58
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPÍTULO IV.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. Marcadores moleculares.....	67
2.1 DNA mitocondrial e o gene citocromo oxidase subunidade I.....	68
2.2.1 PCR.....	69
2.2.2 PCR-RFLP.....	69
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.1 Origem dos indivíduos de <i>A. diaperinus</i>	70
3.2 Extração de DNA.....	71
3.3 Quantificação dos DNAs das amostras.....	72
3.5 Reação de PCR para o gene DNA mitocondrial Citocromo Oxidase I.....	73
3.5 Sequenciamento.....	73
3.6 Análise das sequências.....	74
3.7 Digestão do DNA mitocondrial.....	74
3.8 Validação do marcador mitocondrial.....	75
4. RESULTADOS.....	75
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÃO.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *A. diaperinus*. A: ovo; B; larva de 8º estágio; C: pupa; D: inseto adulto. (Fonte: Lambkin , 2006).

Figura 2: Dimorfismo sexual de pupas de *A. diaperinus*. A: pupa macho e B: pupa fêmea (Foto: Esquivel, *et al.* 2012).

Figura 3. Morfologia da célula vegetativa de *B. thuringiensis*. A) Célula vegetativa de *B. thuringiensis* (sp. Esporo e c. Cristal); B) Cristais de *B. thuringiensis* (Foto de Swiecicka *et al.*, 2008).

Figura 4. Estrutura terciária das proteínas Cry.

Figura 5. Esquema de processamento e ativação de toxina Cry1. Protoxina (130 kDa) e toxina ativa (60 kDa).

Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de ação das toxinas Cry em Lepidoptera a nível molecular (Pardo-López *et al.*, 2013).

Figura 7 – Vista parcial interna do galpão de criação de aves domésticas da Granja Pito Aceso, DF, onde foi coletada a população inicial de *Alphitobius diaperinus* (Foto: Lunalva Sallet)

Figura 8: Caixas plásticas com dieta de criação (Foto: Lunalva Sallet)

Figura 9: Dimorfismo sexual das pupas de *A. diaperinus*: A: Macho; B: Fêmea, para sexagem das pupas de *A. diaperinus*, utilizadas no bioensaio (Foto: Esquivel, *et al.* 2012).

Figura 10: Emergência de adultos (machos e fêmeas) de *A. diaperinus* ao longo de 5 dias após a empupação provenientes de larvas criadas em dois tipos de dieta: dieta 1: ração de coelhos e dieta 2: ração de frangos.

Figura 11: Número de ovos (média \pm desvio padrão) de *A. diaperinus* produzidos ao longo de 32 dias de período de oviposição. A oviposição iniciou-se 15 dias após a emergência dos adultos e 2 dias após o acasalamento. As larvas e adultos foram criados em dois tipos de dietas. Dieta 1: ração de coelhos e dieta 2: ração de frangos.

Figura 12: Percentual de larvas de *A. diaperinus* produzidos ao longo de 8 estádios larvais. As larvas emergiram 48h após o início da oviposição e o ciclo de desenvolvimento foi de 35 dias. As larvas foram criadas em dois tipos de dietas. Dieta 1: ração de coelhos e dieta 2: ração de frangos.

Figura 13: Ilustração da montagem e avaliação do bioensaio: A1 e A2. Montagem do bioensaio, B. Avaliação do bioensaio (Foto: Lunalva Sallet).

Figura 14: Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS de diferentes proteínas de *B. thuringiensis* ativadas com tripsina ou proteases do intestino de *A. diaperinus*

Figura 15: Biotinilação das proteínas de *B. thuringiensis*: M: marcador; Cry1B, Cry3A, Cry1Ab, Cry4B, Cry10, Cry11 e Cyt1A.

Figura 16: Ensaio de ligação das proteínas biotiniladas Cry10, Cry4B e Cry1Ab aos possíveis receptores intestinais de *A. diaperinus*.

Figura 17: Mapa do Brasil mostrando os locais de coletas e manutenção.

Figura 18: Amplificação do gene mitocondrial da citocromo oxidase I das várias populações de *A. diaperinus* coletadas em granjas das regiões Centro-Oeste e Sul

Figura 19: Alinhamento de uma sequência de 117 nucleotídeos da subunidade I do gene da região citocromo oxidase de diferentes espécies de coleópteros que apresentaram identidade com *A. diaperinus*.

Figura 20: Mutações encontradas na sequência de DNA do *A. diaperinus* em relação às sequências de *Anaspisthoracica*, *Gonocephalum sp.*, *Litostylus sp.*, *Necrophila americana*. Os números indicam os nucleotídeos da sequência e como referência o primeiro nucleotídeo encontrado é o de *A. diaperinus*

Figura 21 – Digestão do produto de PCR do gene mitocondrial COI com a enzima de restrição *HaeIII* das amostras de *A. diaperinus* coletadas a partir de granjas das regiões Centro-Oeste e Sul,

Figura 22: Produto de amplificação do gene mitocondrial COI em diferentes insetos. M: marcador 100 pb; CN: controle negativo com água, 1: *A. diaperinus*; 2: *A. grandis*;

3: *T.molitor*; 4: *T. castaneun*; 5: *P. xylostela*, 6: *A. gemmatalis*, 7: *S. frugiperda*, 8: *A. aegypti*, 9: *C. quinquefasciatus*.

Figura 23: Perfil da digestão do gene *COI* com a enzima *HaeIII* de diferentes insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera. M: marcador 100 pb; 1: *A. diaperinus*; 2: *A. grandis*; 3: *T.molitor*; 4: *T. castaneun*; 5: *P. xylostela*, 6: *A. gemmatalis*, 7: *S. frugiperda*, 8: *A. aegypti*, 9: *C. quinquefasciatus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ciclo de desenvolvimento do *A. diaperinus* criado em laboratório sob as condições de temperatura em torno de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e fotofase de 14:10h.

Tabela 2: Resultado de bioensaio de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de *A. diaperinus* a partir de uma dose diagnóstica.

Tabela 3: Resultados da mortalidade dos insetos na concentração de $4000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a caracterização das proteínas.

Tabela 4: Resultados da mortalidade dos insetos na concentração de $4000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a caracterização das proteínas.

Tabela 5: Peso molecular das proteínas recombinantes solúveis e ativadas

Tabela 6: Resultado de bioensaio contra *A. diaperinus* utilizando as proteínas puras Cry1Ab, Cry1B, Cry11, Cry3A, Cry4B, Cry10 e Cyt1A, na concentração de $250 \text{ ng}/\text{cm}^2$.

Tabela 7: Identidade da sequência do gene citocromo oxidase I entre as várias espécies de Coleoptera quando comparadas com *A. diaperinus*.

Tabela 8: Aminoácidos encontrados na conversão da sequência de nucleotídeos do DNA de *A. diaperinus* em relação aos aminoácidos de *Anaspisthoracica*, *Gonocephalum sp.*, *Litostylus sp.*, *Necrophila americana*.

Tabela 9: Principais sítios de restrição obtidos a partir da análise da sequência do gene da citocromo oxidase I de *A. diaperinus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANP	Aminopeptidase
β	Beta
BBMVs	Brush-border membrane vesicle – vesículas da borda escovada da membrana apical de células do intestino
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CADR	Caderina
cm ²	Centímetros quadrado
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
dH ₂ O	Água destilada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
g	Grama
g/mL	Grama/mililitro
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopirasonideo
Kb	Quilo bases (1000 pares de bases)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KH ₂ PO ₄	Diidrogenofosfato de potássio
L	Litro
M	Molar

mA	Miliampère
MES	Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfônico
mg	Miligrama
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milímolar
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de Manganês Tetra hidratado
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma = 10 ⁻⁹ grama
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoride
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
TBE	Tris-base
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volt
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar (micromol por litro)
%	Porcentagem

RESUMO

Sallet, L.A.P. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2013. Tese de doutorado. Universidade de Brasília.

A avicultura industrial brasileira destaca-se como uma das atividades mais dinâmicas no país, entretanto os ataques de insetos-praga estão aumentando e preocupando os produtores. Dentre estas pragas avícolas, destaca-se o *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente conhecido como cascudinho da cama de frangos. Uma alternativa para o controle desses insetos é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis*, bactéria que sintetiza diferentes proteínas tóxicas a muitas pragas. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas ao cascudinho da cama de frangos. Este trabalho está dividido em quatro etapas. Na primeira foi feita uma revisão sobre avicultura, *A. diaperinus* e *B. thuringiensis*, ecologia e modo de ação. Na segunda parte descreve o estabelecimento de uma criação massal de *A. diaperinus* em laboratório. Esta criação está estabelecida e encontra-se na oitava geração de laboratório, fato ainda não descrito na literatura. A terceira parte descreve a identificação de estirpes tóxicas a *A. diaperinus*, a caracterização bioquímica e molecular, a toxicidade das estirpes e a ligação das toxinas a proteínas localizadas na borda escovada de células do intestino médio de *A. diaperinus*. Foram testadas 193 estirpes de *B. thuringiensis* e dessas duas estirpes se destacaram: a estirpe nativa S1806 que causou 60% de mortalidade e a estirpe de *B. thuringiensis* recombinante S2492 que causou mortalidade de 80% a *A. diaperinus*. Os resultados obtidos no ensaio de ligação com as membranas contendo as BBMV's das larvas de *A. diaperinus* demonstraram ligações à marcação com biotina das proteínas Cry10, Cry1Ab e Cry4B, sendo a marcação mais forte com a proteína Cry10. A quarta parte descreve o estabelecimento de um marcador para a identificação de *A. diaperinus*. Para este estudo foi utilizado oligonucleotídios de mtDNA, seguido de análises por PCR-RFLP que apresentaram perfis eletroforéticos, que permitiram o estabelecimento de um marcador para identificação de *A. diaperinus*.

Palavras-chave: bactérias entomopatogênicas, cascudinho da cama de frangos, PCR-RFLP, proteínas Cry e DNA mitocondrial.

ABSTRACT

Sallet , L.A.P. **Selection of *Bacillus thuringiensis* strains for the control *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)** . In 2013 . PhD thesis . University of Brasilia.

The Brazilian poultry industry stands out as one of the most dynamic in the country, however the attacks of insect pests are increasing and worrying producers. Among these pests poultry, highlight the *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), popularly known as mealworm from broiler litter. An alternative for the control of these insects is the use of biological control agents such as *Bacillus thuringiensis*, a bacterium that synthesizes proteins toxic to many different pests. The aim of this study was to identify and characterize strains of *B. thuringiensis* toxic to catfish from broiler litter. This paper is divided into four stages. The first was made a revision on poultry, *A. diaperinus* and *B. thuringiensis*, ecology and mode of action. The second part describes the establishment of a mass rearing of *A. diaperinus* laboratory. This creation is established and is the eighth generation of the laboratory, a fact not yet described in the literature. The third section describes the identification of strains toxic to *A. diaperinus*, the biochemical and molecular characterization, the toxicity of strains and toxins binding to proteins located on the edge brushed midgut cells of *A. diaperinus*. 193 were tested strains of *B. thuringiensis* strains and these two stood out: S1806 native strain that caused 60 % mortality and strain of *B. thuringiensis* recombinant S2492 that caused 80% mortality to *A. diaperinus* . The results of the binding assay with membranes containing the BBMV 's larvae of *A. diaperinus* connections shown biotin labeling of proteins Cry10 , Cry1Ab and Cry4B , the marking being stronger with the protein Cry10 . The fourth section describes the establishment of a marker identifying *A. diaperinus*. For this study we used primers of mtDNA, followed by PCR-RFLP analysis showed that electrophoretic profiles, allowing the establishment of a marker for identification of *A. diaperinus*.

Keywords : entomopathogenic bacteria , mealworm from broiler litter , PCR - RFLP , Cry proteins and mitochondrial DNA .

Introdução

A avicultura industrial brasileira destaca-se como uma das atividades mais dinâmicas, avançada tecnologicamente, competitiva e fortemente consolidada no mercado interno e externo do País. Esta atividade absorve uma porcentagem bastante expressiva da produção nacional de grãos e possibilita o desenvolvimento de novas regiões produtoras, fixação do agricultor no campo e a conseqüente geração de riquezas.

As aves são criadas em regime de confinamento, em ciclos que variam entre 35 e 50 dias, com intervalos entre lotes de uma a quatro semanas, portanto uma atividade bastante intensa e dinâmica. Neste sistema, as condições físicas e climáticas favorecem a proliferação de insetos (Pinto *et al.*, 2007).

Em todo mundo, os ataques de insetos-praga estão aumentando e preocupando os produtores com os impactos causados na produção. Na avicultura, os insetos-praga provocam danos econômicos significativos todos os anos. Dentre as principais pragas avícolas, destaca-se *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente conhecido como cascudinho da cama de frangos e considerado o principal inseto-praga da avicultura mundial.

A. diaperinus tem maior importância em criações de aves destinadas à corte, devido ao sistema de criação utilizado: o piso é revestido por serragem (maravalhas), que misturado a fezes, ração excedente e água, tornam o ambiente propício ao desenvolvimento deste inseto. A população de cascudinho está localizada no solo, preferencialmente embaixo dos comedouros e bebedouros onde existe alimento abundante e umidade alta (Salin *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2007). Um dos principais problemas causados pelo inseto é o fato das aves deixarem de se alimentar da ração balanceada e passarem a se alimentar de larvas e adultos do coleóptero, resultando em heterogeneidade de animais. Além disso, é um veiculador de diversos patógenos, destacando-se enterobactérias, protozoários, fungos e viroses aviárias que podem levar às aves a morte (Chernaki *et al.*, 2002).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos no controle das pragas agrícolas, como organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos é tóxico para *A. diaperinus* com residual na estrutura e cama.

Da mesma forma, inibidores de crescimento, juvenóides e avermectinas apresentam eficácia em laboratório, mas não em campo (Pinto *et al.*, 2005). Na maioria das vezes, os inseticidas são aplicados de forma inadequada, tem deixado resíduos na carne dos frangos e estes não podem ser exportados para o mercado europeu. Além

disso, causam desequilíbrios nos ecossistemas, poluem o meio ambiente, são tóxicos ao ser humano e podem selecionar populações de insetos resistentes (Japp *et al.*, 2010).

Pela exigência do mercado de exportação e conscientização da população, tem-se buscado novas alternativas de controle de pragas que sejam economicamente viáveis e menos danosas ao meio ambiente e a saúde pública em geral.

Diante dessa situação, o controle biológico deixou de ser, em muitos casos, um método alternativo de controle, se tornando hoje uma realidade em muitos agroecossistemas. O controle biológico por meio do emprego de microrganismos vem se destacando dentre as alternativas que visam o controle de insetos-praga. A disponibilidade de microrganismos é muito ampla, fornecendo uma grande variedade de matéria prima para estudos biológicos. Estudos inferem o potencial de alguns ácaros, nematóides e fungos entomopatogênicos no controle de *A. diaperinus*.

Entre os agentes microbianos com atividade entomopatogênica, destaca-se *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram-positiva, que apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Durante a fase de esporulação, o Bt produz inclusões protéicas cristalinas, que são tóxicas para vários grupos de insetos. Estas inclusões são compostas por proteínas, conhecidas como proteínas Cry, que são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino e de proteases. A proteína quando ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Bravo *et al.*, 2007).

A utilização de *B. thuringiensis* no controle de insetos-praga é vantajosa pela especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas, além de não poluir o meio ambiente, e não apresentar toxicidade aos mamíferos, outros invertebrados e às plantas (Alves, 2005).

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao cascudinho da cama de frangos, *Alphitobius diaperinus*.

Capítulo I

1. Avicultura

A avicultura no Brasil tem se diferenciado pelo seu dinamismo produtivo. Em meados da década de 1970, a produção de frangos evoluiu da criação doméstica, para um sistema produtivo profissional. Neste período iniciaram-se as exportações brasileiras de carne de frango, e o Brasil se tornou um dos maiores exportadores mundiais (Belusso e Hespanhol, 2010). No Brasil a sua produção de corte é destinada principalmente ao mercado externo e estão concentradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (Alves *et al.*, 2005).

No mês de junho de 2011 o Brasil bateu novo recorde mensal na produção de carne de frango ao atingir a marca dos 1.121 milhões de toneladas (AVISITE, 2011).

Esse crescimento se deu principalmente em razão dos investimentos que possibilitaram maior incremento tecnológico, tanto nas áreas biológica e sanitária, como na econômica, e a busca constante por maior eficiência produtiva e diversificação de produtos. Assim, a cadeia tem demonstrado grande capacidade para captar novas tecnologias e transferi-las com maior eficiência aos consumidores finais, sob a forma de um produto mais acessível e de melhor qualidade.

O mercado consumidor, principalmente a Europa, tem sido cada vez mais exigente e vem buscando adquirir alimentos mais saudáveis, com menores concentrações de resíduos químicos, que causem um menor impacto ambiental e que garantam o mínimo de segurança alimentar ao consumidor.

Mesmo com o grande avanço tecnológico e organizacional a avicultura ainda se depara com diversos problemas como enfermidades e pragas. Dentre alguns dos procedimentos utilizados para a prevenção de enfermidades, destacam-se a utilização de aditivos, como os antimicrobianos, na composição da ração.

Os aditivos têm a função de melhorar o desempenho da criação quanto aos parâmetros de produtividade e os agentes antimicrobianos são compostos que, em concentrações baixas, reduzem ou inibem o crescimento de microrganismos (Cromwell, 2004).

O desenvolvimento da avicultura de corte conta com importante contribuição de empresas que possuem abatedouros e fazem uma produção descentralizada com a participação de grupos de pequenos e médios avicultores. Os avicultores constroem os galpões e recebem dessas empresas os filhotes, a ração e a assistência técnica para a produção do frango de corte. Esse sistema é conhecido como produção integrada (Vital *et al.*, 2009).

Esta atividade em regime de confinamento, com intervalos pequenos entre os lotes, faz com que os integrados não removam a cama de frango, e com isso aumenta a proliferação de insetos nos galpões avícolas.

Neste sistema, as condições físicas e climáticas favorecem a proliferação de insetos, sendo o besouro *A. diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido como cascudinho da cama de frangos, encontrado em altas populações (Chernaki-Leffer *et al.*, 2001).

2. *Alphitobius diaperinus* (Cascudinho da cama de frangos)

2.1 Aspectos gerais

A. diaperinus foi descrito por Panzer em 1797 e pertence à família Tenebrionidae, subfamília Tenebrioninae, tribo Alphitobiini (Reitter, 1917), gênero *Alphitobius* Stephens, segundo definição de Doyen (1989). Originário do leste africano onde ocorre naturalmente em ninhos de pássaros e nas cavernas em guano de morcegos, se alimenta de fragmentos de detritos (McFarlane, 1971). Conhecido popularmente como cascudinho da cama de frangos é uma espécie cosmopolita, comumente encontrada infestando resíduos de produtos úmidos estocados, e que provavelmente migrou para os aviários através de rações ou de fazendas vizinhas que estocavam alimentos (Rezende *et al.*, 2009)

O cascudinho da cama de frangos é ingerido pelas aves, no lugar da ração balanceada, reduzindo a ingestão de nutrientes necessários e afetando o seu desenvolvimento (Uemura *et al.*, 2008). Insetos e larvas de *A. diaperinus* podem causar obstrução intestinal nas aves confinadas para o abate. Este fato pode causar lesões microscópicas ao longo da parede intestinal das aves, proliferando doenças e reduzindo a ingestão de alimento (Francisco e Prado, 2001).

Adultos e larvas perfuram a pele das aves, se alimentando do exsudato sanguíneo e também provocam ferimento no trato digestivo (papo e moela), podendo levar à morte filhotes recém-eclodidos ou confinados em pequenos espaços (Rezende *et al.*, 2009). Além disso, podem contaminar a carcaça durante o processamento no abatedouro, quando é feita a extração do papo e da moela. Este inseto é também um reservatório e potencial transmissor de protozoários, platelmintos, fungos, bactérias, vírus patogênicos às aves, incluindo corona vírus (Vittori *et al.*, 2007).

2.2 Biologia do inseto

O ciclo de vida deste inseto vai da fase ovo até o inseto adulto, passando por estádios larvais (em média oito), pela fase de pupa e adulto. A fig. 1 ilustra cada fase do ciclo de vida do *A. diaperinus*.

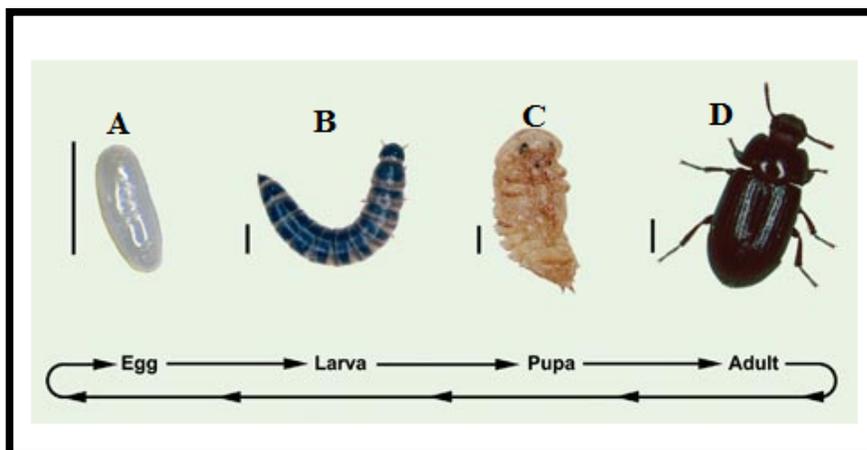


Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *A. diaperinus*. A: ovo; B: larva de 8º estágio; C: pupa; D: inseto adulto. (Fonte: Lambkin, 2006).

Ovos:

Inicialmente, apresentam formato esférico e em dois dias adquirem forma elíptica, cório translúcido e frágil; coloração branca leitosa brilhante, com substância adesiva por meio da qual se aderem entre si e/ou ao substrato. O comprimento varia de 1 a 1,17 mm e a largura de 0,5 a 0,7 mm. Cinco dias após a incubação em temperatura controlada de 28° C, as larvas eclodem (Chernaki, 2001; Silva *et al.*, 2005).

Larvas:

As larvas recém-eclodidas apresentam uma coloração leitosa do primeiro ao terceiro estágio, em seguida, passam a apresentar uma cor de tom marrom que vai escurecendo à medida que a larva se desenvolve. O tom de cor clara volta a cada ecdise realizada, porém no mesmo dia desta, retorna à cor anterior. A largura da cápsula cefálica, parâmetro utilizado para a determinação dos diferentes estádios larvais, pode chegar a medir de 0,20 mm (1º estágio) a 1,35 mm (8º estágio). As larvas apresentam oito estádios em temperatura de 28° C a 30° C e em temperaturas inferiores a 28° C podem apresentar 11 estádios (Silva *et al.*, 2005).

Pupas:

Logo que são formadas, as pupas apresentam coloração esbranquiçada e forma que lembra a do adulto com contornos dos olhos e asas. Posteriormente, algumas partes do corpo ficam marrom avermelhadas. As pupas fêmeas são geralmente maiores no comprimento (6,24mm a 7,5mm) e largura de 2,25mm a 2,5mm, as pupas macho são menores em relação às fêmeas, porém somente o tamanho não constitui um critério seguro na sexagem. Olhos com pigmentação mais visível podem ser observados ao final do desenvolvimento.

Antenas ficam protegidas no sulco prosternal. Região dorsal do protórax apresenta finas pontuações. Asas e élitros são rudimentares, e possuem inúmeras estrias. O abdome possui margens laterais denteadas. Na porção final com urogonfos larvais e acentuado dimorfismo sexual na região ventral: nas fêmeas apresentam projeções musculares esclerotinizadas, e os machos possuem pequenas papilas, sem nenhuma projeção definida. Na porção posterior do ventre das fêmeas há um marcado dimorfismo sexual (Figura 2), mostrando um apêndice genital nas fêmeas, ausente nos machos, que é um critério seguro para sexagem (Chernaki, 2001; Silva *et al.*, 2005; Esquivel *et al.*, 2012).

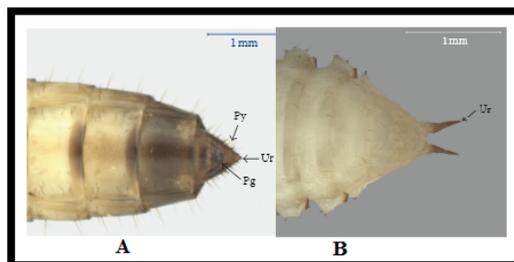


Figura 2: Dimorfismo sexual de pupas de *A. diaperinus*. A: pupa macho e B: pupa fêmea

Adultos:

Possuem cor marrom. Apresentam comprimento variando de 5,5 mm a 7 mm, largura de 2,5 mm a 3,2 mm, olhos ventrais.

Apresentam três pares de pernas com esporões localizados no ápice das tíbias. Nas pernas médias e posteriores os espinhos da tíbia são curvos nos machos e retos nas fêmeas. Possuem élitros truncados na base, com oito fileiras de estrias pontuadas, cada ponto com uma pequena cerda e epipleura estreita. Apresentam asas membranosas com venação pouco reduzida, com os três escleritos axilares definidos; abdome com cinco esternos visíveis em ambos os sexos. A genitália da fêmea é composta pelo oitavo e

nono segmentos abdominais; além desses segmentos, ocorre um apódema que sustenta toda a estrutura genital. A espermateca possui a forma de um C com tamanho equivalente a 1/3 da estrutura dos coxitos. A genitália do macho é formada pelos sétimo, oitavo e nono segmentos abdominais, além do espículo gastral; nono segmento invaginado e composto pelo pênis esclerotizado que abriga um saco interno de onde sai o dueto ejaculatório (Chernaki, 2001; Silva *et al.*, 2005).

O ciclo biológico de *A. diaperinus* está diretamente relacionado à temperatura e se completa em 55 dias quando mantido a temperatura de 27° C e 80% de U.R. Cinco dias após a postura, eclode de cada ovo uma larva esbranquiçada. A fase larval estende-se por trinta e oito dias, quando os imaturos atingem coloração marrom escura. As larvas passam por até 11 estádios de desenvolvimento. Após a fase larval, empupam e após cinco dias emergem os adultos que apresentam uma coloração branca. Após quatro dias os adultos adquirem coloração característica (marrom). Os adultos começam a se reproduzir em média vinte dias após a emergência (Silva *et al.*, 2005).

Em um galpão de aviário a população desses insetos no solo apresenta alta heterogeneidade. As larvas de últimos estádios de vida, pupas e adultos são localizadas no solo, em média a 10 cm de profundidade, preferencialmente debaixo dos comedouros, onde o substrato apresenta-se denso, compactado e com umidade baixa.

O contato direto do inseto com a cama das aves, assim como o hábito de se alimentar de aves moribundas e mortas, faz do *A. diaperinus* um veiculador de diversos patógenos (Chernaki, *et al.*, 2001).

Chernaki *et al.* (2002), ao isolarem enterobactérias de adultos de *A. diaperinus* e da cama de aviários em diferentes granjas do oeste do Estado do Paraná, encontraram as seguintes enterobactérias: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, *Citrobacter diversus* e *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que na cama foram encontradas *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli* e *Enterobacter agglomerans*. A enterobactéria *P. vulgaris* foi predominante nas camas das granjas (71,4%) e *E. coli* foi a segunda mais freqüente, isolada nos insetos em 42,8% das granjas.

Segabinazi *et al.* (2005) coletaram cascudinhos em empresas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Foram isoladas 14 espécies pertencentes a 10 gêneros diferentes de bactérias Enterobacteriaceae nas superfícies externa e interna dos insetos: *Citrobacter freundii* (6,89%), *Edwardsiella ictalurio* (6,89%), *Enterobacter aerogenes* (5,07%), *E. (Pantoea) agglomerans* (0,37%), *E.*

gergoviae (2,53%), *Escherichia coli* (36,96%), *Klebsiella oxytoca* (4,34%), *K. pneumoniae* (18,11%), *Proteus mirabilis* (8,34%), *P. vulgaris* (1,44%), *Serratia marcescens* (1,44%), *Yersinia enterocolitica* (0,37%), *Salmonella sp* (0,37%) e *Cedecea sp.* (6,89%). A maior frequência de isolados bacterianos e da diversidade de espécies foi observada na superfície externa (exoesqueleto) do inseto. Vittori *et al.* (2007) isolaram a bactéria *Clostridium perfringens*, causador de enterite necrótica de amostras de *A. diaperinus* provenientes de Sertãozinho (SP) e Descalvado (SP).

A. diaperinus não só causa doenças aos animais como também aos humanos como sintomas alérgicos, urticárias, angioedema, asma e conjuntivite (Japp, 2010).

Além da relação com os patógenos, os cascudinhos podem provocar danos nas instalações avícolas, por produzir túneis e orifícios nos equipamentos tornando-se um sério problema para a indústria avícola (Souza *et al.*, 2009).

2.3 Controle do *A. diaperinus*

O controle do *A. diaperinus* é considerado difícil, seus inimigos naturais são pouco conhecidos e até os dias de hoje não existe nenhum método eficiente e seguro. Os produtos químicos utilizados no controle acabam se tornando uma barreira comercial e de difícil aplicação devido aos ambientes habitados por esses insetos.

2.4 Controle químico

O controle dessa praga é realizado com os piretróides e organofosforados. Porém, estes apresentam algumas desvantagens como seleção de populações de insetos resistentes, contaminação do ambiente e das aves, tornando-se uma barreira comercial para exportação de carne, pois a União Européia não permite o uso de determinados produtos químicos para o controle de insetos. Além disso, sua eficácia é limitada pela presença constante das aves nos aviários e, pelo hábito dos insetos ficarem alojados abaixo da superfície. A limpeza freqüente do aviário, com remoção da cama após a retirada dos animais, é uma das formas de se reduzir o número de insetos, embora seja onerosa e trabalhosa (Rezende *et al.*, 2009).

Chernaki *et al.* (2006) avaliaram a suscetibilidade de utilizar reguladores de crescimento clorfluazurom, triflumurum, diflubenzurom, lufenurom e metoxifenozeide

em larvas de cascudinhos em condições de laboratório. A maior mortalidade foi de 76,7% com Clorfluazurom.

2.5 Controle biológico

Estudos estão sendo realizados voltados para o uso de agentes biológicos de ocorrência natural, como *Beauveria bassiana* (Bals.), principalmente em razão das condições de temperatura e umidade da cama-de-frango, que podem favorecer a ocorrência de epizootias (Santoro *et al.*, 2008).

Nematóides entomopatogênicos como *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* foram avaliados em larvas e adultos de cascudinhos, verificando-se que as larvas foram mais susceptíveis que os adultos e que o nematóide *S. carpocapsae* apresentou patogenicidade superior ao *S. glaseri*. Essa mortalidade, entretanto, não foi superior a 48%. Os produtos a base de nematóides e fungos entomopatogênicos não estão sendo produzidos em escala comercial, apenas laboratorial, necessitando de maiores estudos em relação ao seu modo de aplicação nos aviários (Alves *et al.*, 2005).

Rezende *et al.*, 2009 avaliaram a atividade dos fungos *B. bassiana*, *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. sobre adultos e larvas de *A. diaperinus*, inocularam suspensões de conídios na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹. Observaram que o isolado de *B. bassiana* causou mortalidade de insetos maior em comparação com os demais fungos, as larvas são mais sensíveis do que os adultos. A mortalidade confirmada pela ação de *B. bassiana* foi de 95% e 62,5% para as larvas e adultos.

Gazoni *et al.*, 2012 avaliaram um isolado de *Beauveria bassiana* para o controle de *A. diaperinus*, utilizando uma suspensão de conídios ($3,83 \times 10^8$ mL⁻¹) e relataram que não foi observada a mortalidade de larvas ou adultos dos insetos após os sete dias do experimento.

No Brasil, apesar de existirem diversos programas de controle biológico de pragas com destaque na aplicação de entomopatógenos, ainda são inexpressivos os estudos visando à exploração de nematóides, fungos e bactérias como bioinseticidas, não havendo muitos estudos que enfatizam a biodiversidade das espécies e da eficiência dos isolados. Tais fatores favorecem o desconhecimento sobre o tempo de permanência destes organismos em campo, quais seriam os períodos de reposição e quais fatores ambientais que afetam a sobrevivência (Rodrigueiro *et al.*, 2008).

Além destes fatores, quais seriam os impactos da aplicação dos organismos entomopatogênicos para outras espécies? Deve-se manter nas propriedades um programa integrado de controle de pragas, utilizando técnicas e conceitos já existentes, mas desenvolvendo um programa próprio para cada granja, já que cada modelo de criação apresenta particularidades que devem ser observadas no início da aplicação do manejo.

A integração de métodos também compreende a utilização de medidas de controle cultural pelo monitoramento da população e do conhecimento do comportamento de *A. diaperinus*.

O controle mecânico que envolve os detalhes da construção dos galpões, manejo dos resíduos e práticas sanitárias. O controle químico precisa ser analisado pelo conhecimento dos efeitos, quantidades e períodos de aplicação dos inseticidas, para evitar gastos desnecessários ao produtor bem como a explosão da densidade de pragas e danos ambientais.

3. *Bacillus thuringiensis*

3.1 Breve histórico

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* foi descoberta em 1902 por Ishiwata no Japão, que descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombyx mori* em uma criação massal. O pesquisador chamou essa nova bactéria de *Bacillus sotto*.

Em 1911, Ernst Berliner na cidade de Thüringe, na Alemanha isolou novamente o *Bacillus*, a partir da *Ephestia kuhniella*. Berliner nomeou esta nova bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915).

Entre os anos de 1920 e 1930 na Europa foram realizados os primeiros ensaios utilizando *B. thuringiensis* no controle de *Ostrinia nubilalis*, lepidóptero da família Pyralidae. Nos Estados Unidos e na Europa, entre os anos de 1930 e 1940, numerosos testes foram realizados contra outras espécies de lepidópteros e em 1938 a França iniciou a produção de uma formulação à base dessa bactéria, a Sporeína (Weiser, 1986).

Na década de 1950, aumentaram os estudos e descobertas a respeito da caracterização bioquímica, estrutura e modo de ação das inclusões cristalinas de origem protéica de *B. thuringiensis*. A partir desses estudos, diversos países como Alemanha,

Rússia e Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis*. Na década de 1960, foi isolada uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* que apresentou toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir dessa descoberta, aumentou-se a procura por estirpes que possuíssem novas toxinas ativas contra outras ordens de insetos (Monnerat *et al.*, 2003).

Entre as décadas de 1970 e 1980 as estirpes descritas eram tóxicas a lepidópteros e dípteros. Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi descrita como patogênica para coleópteros. Nos anos 1980, a utilização de *B. thuringiensis* cresceu ainda mais, com o surgimento de populações de insetos resistentes aos inseticidas sintéticos. Atualmente, *B. thuringiensis* é o microrganismo mais utilizado em nível mundial como agente de controle biológico (Medeiros *et al.*, 2005)

Dentro deste contexto, ressaltam-se a importância e a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* que poderá ser vantajoso para os produtores no aspecto econômico além de contribuir como mais uma alternativa no programa de manejo de resistência de praga a inseticidas (Praça, 2010).

3.2 Características gerais

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, esporulante, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, da família Bacillaceae, apresenta células na forma de bastonete e seu esporângio é pouco estendido (Bravo *et al.*, 1998).

Apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Durante a fase de esporulação, as bactérias produzem uma proteína corporal parasporal, conhecida como cristal (Figura 3) e com propriedades inseticidas (Martins *et al.*, 2008). As proteínas tóxicas que constituem o cristal são conhecidas como δ -endotoxinas, que são ativas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Orthoptera e Homoptera, e contra outros invertebrados como ácaros e nematóides (Maagd *et al.*, 2003). Essas bactérias são consideradas de ocorrência ubíqua por terem sido isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de vários substratos como solo, água,

superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Maagd *et al.*, 2001).

As espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* apresentam um grau de similaridade genética tão elevado, que muitas vezes dificulta diferenciá-las através de provas bioquímicas e bacteriológicas mais simples. Durante muito tempo, as duas primeiras espécies foram consideradas como sendo uma única. O principal critério utilizado para a distinção entre essas bactérias é a produção de corpos de inclusões paraesporais durante o processo de esporulação do *B. thuringiensis*.

No controle microbiano dos insetos, o entomopatógeno *B. thuringiensis* oferece as melhores alternativas como bioinseticida, mostrando-se também um bom candidato à obtenção de formulações comerciais, bem como à engenharia genética de plantas (Fiuza *et al.*, 2009/2010).

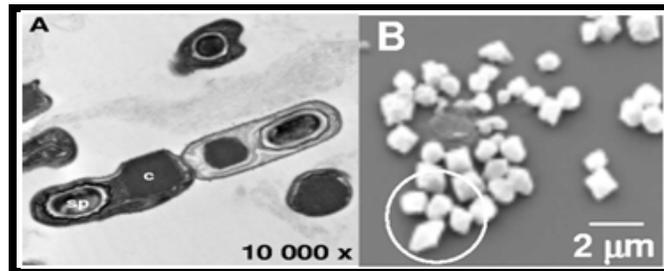


Figura 3. Morfologia da célula vegetativa de *B. thuringiensis*. A) Célula vegetativa de *B. thuringiensis* (sp. Esporo e c. Cristal); B) Cristais de *B. thuringiensis* (Foto de Swiecicka *et al.*, 2008).

Algumas das vantagens na utilização de *B. thuringiensis* são sua especificidade aos insetos susceptíveis, baixa periculosidade ambiental e o fato de ser de atóxico aos vertebrados. Mais de 590 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram seqüenciados. As δ -endotoxinas estão classificadas em 70 grupos de proteínas Cry, organizados em diferentes subgrupos, e três grupos de toxinas Cyt com 36 genes, agrupadas em função do grau de identidade de seus aminoácidos. A classificação das proteínas Cry, atualizada, encontra-se disponível no endereço eletrônico: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/ (Crickmore *et al.*, 1998).

3.3 Toxinas produzidas por *B. thuringiensis*

B. thuringiensis produz proteínas Cry e várias outras toxinas com atividade inseticida, como α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas, VIPs (do inglês “vegetative insecticidal protein”) que podem atuar aumentando o potencial tóxico das δ -endotoxinas.

Os esporos também contribuem com a patogenicidade das estirpes, através da ação sinérgica desempenhada junto com as proteínas Cry (Zhang *et al.*, 2013).

3.4 Proteínas Cry e seu mecanismo de ação

A utilização desta bactéria é uma alternativa de controle de insetos-praga na agricultura. As proteínas Cry apresentam cristais protéicos de formas variadas, podendo ser bipiramidais, esféricos, cubóides, romboidais, retangulares ou irregulares (Maagd *et al.*, 2003).

As estruturas das proteínas são definidas por padrões de difração de cristalografia de raios-X. As estruturas terciárias dessas proteínas revelaram três domínios bem distintos, envolvidos na atividade da proteína (Figura 4).

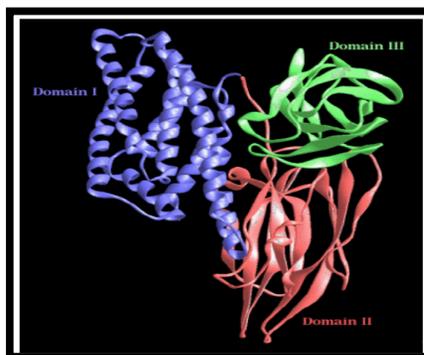


Figura 4. Estrutura terciária das proteínas Cry. Disponível no endereço eletrônico: www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/bttoxin.htm.

O domínio I é altamente conservado e consiste de sete α -hélices, sendo a quinta α -hélice rodeada pelas demais. Estudos inferem que este domínio é responsável pela interação entre monômeros e que as α -hélices se inserem na membrana celular formando poros (Bravo *et al.*, 2002; Boonserm *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2007; Soberón *et al.*, 2007).

O domínio II é formado por três folhas β antiparalelas e alguns “loops” que estão envolvidos na ligação ao receptor, na membrana intestinal (Bravo *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2005).

O domínio III apresenta uma estrutura em β sanduíche (Bravo *et al.*, 2005). Estudos inferem que este domínio seja importante na estabilidade da proteína e na ligação da toxina com a membrana do intestino do inseto (Bravo *et al.*, 2005). Para que ocorra a lise celular e conseqüentemente a morte do inseto é necessária à participação dos três domínios que formam a toxina Cry ativa.

Para esclarecer o mecanismo de ação destas toxinas, estudos têm sido realizados e os modelos propostos foram descritos em experimentos utilizando, na maioria, toxinas da família Cry1A. Inicialmente, ocorre à ingestão dos cristais que são protoxinas pelo inseto e no intestino médio do inseto que é alcalino ocorre à solubilização deste cristal. As protoxinas então ativadas por proteases intestinais, que clivam as porções N-terminal e C-terminal, liberando um monômero de aproximadamente 60-70 kDa (Figura 5) (Gómez *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2007; Pigott e Ellar, 2007; Soberon *et al.*, 2007).

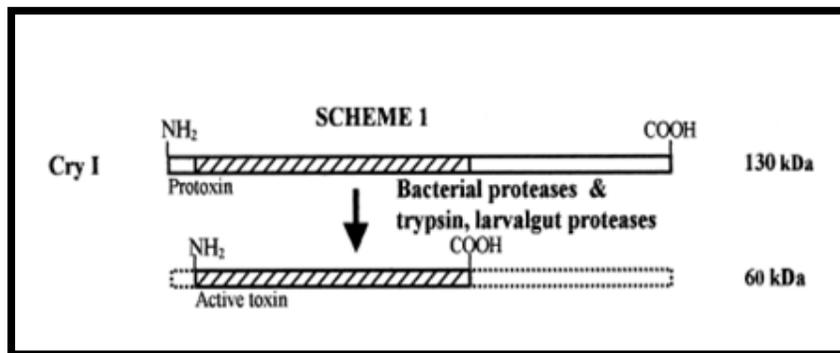


Figura 5. Esquema de processamento e ativação de toxina Cry1 de *Bacillus thuringiensis*. Protoxina (130 kDa) e toxina ativa (60 kDa).

Estudos realizados com lepidópteros, mostram que as principais enzimas digestivas envolvidas na clivagem das proteínas Cry são as proteases serínicas, como a tripsina e a quimiotripsina, e em coleópteros, as proteases cisteínicas e aspárticas (Maagd *et al.*, 2001). A partir deste ponto, dois modelos distintos foram propostos para a ação das toxinas: modelo de sinalização e o modelo de toxicidade.

No modelo de sinalização, estudos realizados em cultura de células de inseto sugerem que, após a ativação por proteases, estruturas monoméricas se ligam a

caderina, iniciando uma via de sinalização calcio-dependente, culminando na morte celular por apoptose (Zhang *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2006).

No modelo de toxicidade proposto por Bravo *et al.* (2007), a toxina interage com dois receptores diferentes. Na forma monomérica, a toxina liga-se a uma caderina (Bt-R1), ocorrendo um novo processamento proteolítico, no qual é retirada a primeira α hélice e, assim permitindo a oligomerização da toxina. A estrutura oligomérica resultante liga-se, então, ao segundo receptor, uma aminopeptidase N (APN) GPI-ancoradas, ocorrendo à inserção na região apical da membrana. Deste modo, ocorre à formação do poro, causando o descontrole osmótico, lise celular e morte do inseto por inanição (Bravo *et al.*, 2007; Soberon *et al.*, 2007).

Após a toxina ativa se ligar a uma caderina ocorrer sua primeira mudança conformacional, na qual a região N-terminal da proteína é clivada por proteases do intestino promovendo a oligomerização das toxinas Cry (na forma de um tetrâmero). O oligômero se liga a estes receptores e em seguida ocorre a inserção da toxina ativa na membrana de forma irreversível induzindo a abertura ou formação de poros que provocam uma quebra no balanço osmótico da célula e consequente lise celular (Pardo-López *et al.*, 2013). A figura 6 ilustra, de maneira geral o modelo de ação proposto por Pardo-López *et al.* (2013).

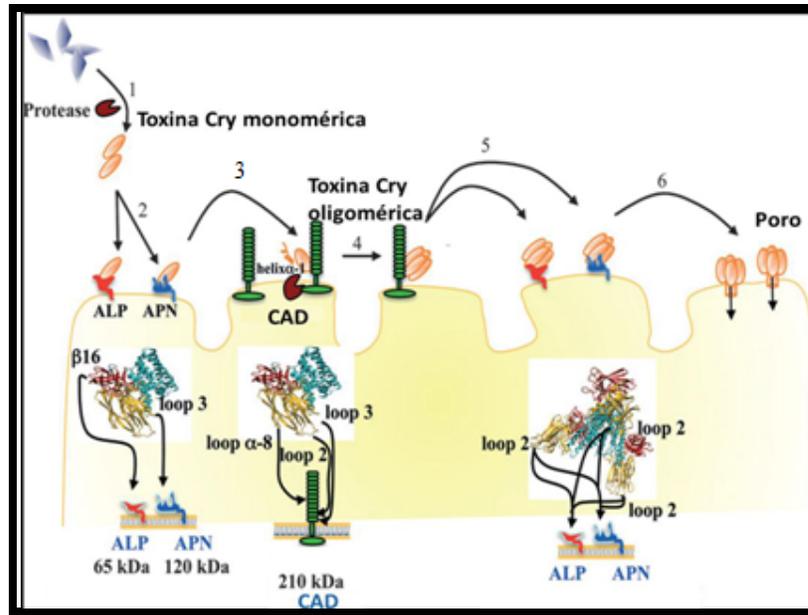


Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de ação das toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* em Lepidoptera. 1- A protoxina após ser ingerida pelo inseto é solubilizada no lúmen do intestino médio das larvas devido ao elevado pH e às condições de redução, posteriormente é ativada por proteases do intestino, gerando o fragmento de toxina. 2- A toxina Cry monomérica liga-se aos receptores ALP e APN, a toxina fica então localizada em estreita proximidade com a membrana. 3- A toxina Cry monomérica se liga ao receptor CAD numa interação de alta afinidade e esta interação induz a clivagem proteolítica da extremidade N-terminal da toxina, incluindo a hélice α -1 do domínio I. 4- A toxina Cry clivada torna-se capaz de formar um oligômero com as outras toxinas constituindo uma estrutura de pré-poro. 5- A estrutura oligomérica Cry liga-se com alta afinidade aos receptores ALP e APN. 6- O pré-poro insere-se na membrana promovendo a formação de poros (Pardo-López *et al.*, 2013).

4. HIPÓTESE

Existem estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a coleópteros, *A. diaperinus* é um coleóptero, assim, é possível selecionar uma estirpe de *B. thuringiensis* para controle do referido inseto.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao cascudinho da cama de frangos, *Alphitobius diaperinus*.

5.2 Objetivos específicos:

1. Estabelecer uma criação massal de *A. diaperinus*;
2. Selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *A. diaperinus*;
3. Desenvolver um protocolo de ensaio contra *A. diaperinus*;
4. Avaliar a toxicidade de proteínas de *B. turingiensis* contra o *A. diaperinus*;
5. Avaliar a interação das toxinas com os receptores de membrana intestinal do inseto-BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles”) de *A. diaperinus*
6. Determinar a variabilidade genética de *A. diaperinus*
7. Estabelecer um marcador para a identificação de *A. diaperinus*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, J. E e Filho, A.B. Microrganismos no controle de pragas. IN: Pinto, A.S; Nava, D.E; Rossi, M.M; Malerbo-Souza, D.T. Controle Biológico de Pragas- na prática. Piracicaba, 287p. 2006.

Alves, L.F.A; Buzarello, G.D; Oliveira, D.G.P. Alves S.B. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapse* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) Neotropical Entomology, v.34, n.1, p.139-141, 2005.

Alves, L.F.A; Buzarello, G.D; Oliveira, D.G.P. Alves S.B. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Arquivos do Instituto Biológico, v.73, n.1, p.115-118, 2006.

AVISITE. <http://www.avisite.com.br>. Consultado em 26/11/2011.

Belusso D, Hespagnol NA. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. Revista Percurso - Nemo Maringá, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

Boonserm, P; Davis, P.; Ellar, D. J. & LI, J. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. J. Mol. Biol., 348: 363–382, 2005.

Bravo A, Sánchez J, Kouskoura T, Crickmore N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J Biol Chem*. 2002.

Bravo A, Gill SS, Soberón M. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, *Bacillus thuringiensis*, Mechanisms and Use, pp. 175–206, 2005.

Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435, 2007.

Chernaki-LEffer AM, Lazzari FA, Lazzari SMN, Almeida LM. Controle do cascudinho. *Avicultura Industrial*, n.1094, p.22-25, 2001.

Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM, Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.3, p.243-247, 2002.

Chernaki-Leffer AM, Sosa-Gomez DR, Almeida LM. Suscetibilidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a reguladores de crescimento de insetos (RCI). Arquivos do Instituto Biológico, v.73, n.1, p.51-55, 2006.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* pp. 807–813, 1998.

Cromwell GL. Feed supplements: antibiotics: Encyclopedia of Animal Science (W. G. Pond and A. W. Bell, Eds.) Marcel Dekker, New York, NY. 2004.

Fiuza LM, Costa ELN, Lucho APR, Fritz LL. Biotecnologia. Edição especial: Ecotoxicologia de *B. thuringiensis*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Ano XI, n. 38, 2009/2010.

Francisco O, Prado AP. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. *Brazilian Journal Biology.* 6: 125-131, 2001.

Gazoni FL, Flores F, Bampi RA, Silveira F, Bouffleur R, Lovato M. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. *Arq Inst Biol, São Paulo*, v.79, n.1, p.69-74, jan./mar, 2012.

Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A. & Soberón M. Cadherinlike receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix K-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Febs Letters*, 513: 242-246, 2002.

Japp AK, Bicho CL, Silva AVF. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. *Ciência Rural*, v.40, n.7, jul, 2010.

Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genet.* 17:193–199, 2001.

Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann Rev Genet.* 37:409–433, 2003.

Martins ES, Aguiar RWS, Falcão R, Gomes ACMM, Melatti VM, Ribeiro BM, Monnerat RG. Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil *Anthonomus grandis*. Journal of Applied Microbiology, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

Medeiros PT, Ferreira MN, Martins E S, Gomes ACMM, Falcão R, Dias JMCS, Monnerat RG. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

Mcfarlane JA. 1971. The carnivorous beetles of Ithunda caves, Kenya. Stud. Speleol., 2:149 - 158.

Monnerat RG, Santos RC, Barros PC, Batista AC, Berry C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. Comunicado Técnico, n.98, 2003.

Pardo-López L, Soberon M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. Fems Microbiology Reviews, v. 37, n. 1, p. 3-22, Jan 2013.

Pigott CR & Ellar DJ. Role of Receptors In *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71 (2): 255-281, 2007.

Pinto, D.M; Ribeiro, P.B; Bernardi, E. Avaliação de métodos para monitorar populações de artrópodes em granja avícola, em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.74, n.2, p.95-99, abr./jun., 2007.

Praça LB, Ramos FR, Oliveira FW, Soares M, Sujii E, Monnerat RG. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v. 8, n. 1, p. 17-31, 2010.

Rezende SRF, Curvello FA, Fraga ME, Reis RCS, Castillo AMC, Agostino TSP. Control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with entomopathogenic fungi. Rev. Bras. Cienc. Avic. 11(2), 2009.

Rodrigueiro TSC, Ginarte CMA, Leite LG, Tavares FM, Goulart RM, Giometti, FHC. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no

controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.75, n.3, p.279-284, 2008.

Rutz F, Lima GJMM. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. 2001.

Salin C, Delettre YR, Cannavacciuolo M and Vernon P. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. *Eur. J. Soil Biol.* vol. 36, p. 107-115, 2000.

Santoro PH, Neves PMOJ, Alexandre TM, Sartori D, Alves LFA, Fungaro MHP. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 97, n. 2, p. 83-90, 2008.

Silva AS, Hoff G, Doyle RL, Santuario JM, Monteiro SG. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.2, p.177-181, 2005.

Segabinazi SDS, Flores ML, Barcelos AS, Jacobsen G, Eltz RD. Bactérias da família enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granja avícolas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.51-55, 2005.

Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science*, 318 (5856): 1640-1642, 2007.

Souza LM, Silva GS, Belo MAA, Soares VE, Costa AJ. Controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em instalações para frangos de corte. *Archives of Veterinary Science*, v.14, n.4, p.214-220, 2009.

Swiecicka I, Bideshi DK and Federici BA. Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* That Produces a Quasicuboidal Crystal of Cry1Ab21 Toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 923-930 Vol. 74, No. 4, 2008.

Vital T, Drouvot H, Sampaio Y. Avicultura integrada e estratégias de mercado de grandes empresas em Pernambuco. *Revista Contemporânea de Economia e Gestão - Contextus*, v. 7, n. 2, p.29-40, 2009.

Vittori J. Schocken-Iturrino RP, Trovo KP, Ribeiro CAM, Barbosa GG, Souza LM, Pigatto CP. *Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.3, p.894-896, 2007.

Weiser J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in Eastern Europe and in Ssovier Union. In: Krieg A. Huger, A.M. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlen Heft. 233*, 37- 50, Paul Parey, Berlin. 1986.

Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla LA. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death. Differ.* Vol. 12: p. 1407–1416, 2005.

Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci*, 2006.

Zhang L, Tang B, Huang E, Huang Z, Liu Z, Huang T, Gelbić I, Guan X, and Xu L. Different Toxicity of the Novel *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) Strain LLP29 Against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology* 106(3):1098-1102, 2013.

Capítulo II

**Criação de *Alphitobius diaperinus* Panzer, 1779
(Coleoptera: Tenebrionidae) em laboratório.**

1. INTRODUÇÃO

O cascudinho da cama de frangos, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1779) originário do continente Africano (Vaughan *et al.*, 1984), é uma espécie cosmopolita, comumente encontrada infestando resíduos de produtos úmidos estocados, e que provavelmente migrou para os aviários através de rações ou de fazendas vizinhas que estocavam alimentos (Wallace *et al.*, 1985). Quando associados a tal agroecossistema, esse inseto se alimenta de excrementos, ração e vísceras de aves mortas (Chernaki e Almeida, 2001).

Nas granjas avícolas, as larvas de últimos estágios de vida, pupas e adultos ficam localizados no solo, cerca de 10 cm de profundidade, preferencialmente debaixo dos comedouros, onde o substrato apresenta-se denso, compactado e com umidade baixa. Estes insetos em baixas temperaturas e/ou situações de estresse realizam diapausa, como os demais insetos, migrando em movimentos verticais para baixo em direção ao solo (Salin *et al.*, 2000).

A população de cascudinho em níveis elevados é um dos principais problemas da avicultura no país, pois pelo seu contato direto com a cama das aves é um veiculador de diversos patógenos, destacando-se enterobactérias (Chernaki *et al.*, 2002), protozoário *Eimeria* (Goodwin & Waltman, 1996) e fungos (De Las Casas *et al.*, 1968).

Os cascudinhos além de transmitirem doenças às aves também provocam danos às instalações avícolas, destruindo a proteção usada para isolamento térmico dos galpões em regiões de clima frio. Esses danos citados são em virtude da ação das larvas que escavam túneis no material isolante para empuparem (Silva *et al.*, 2010).

O controle dessa praga é considerado difícil e seus inimigos naturais são pouco conhecidos, e até os dias de hoje não existe nenhum método de controle eficiente e seguro (Japp *et al.*, 2010), embora vários estudos vem sendo realizados em busca de alternativas de controle para este inseto.

Chernaki e Almeida (2001) estudaram em laboratório, o efeito de quatro temperaturas constantes (22°C, 25°C, 28°C e 31°C) sobre as fases imaturas de *A. diaperinus* e observaram que houve desenvolvimento de imaturos nas quatro temperaturas, sendo que a 22°C observou-se maior duração do desenvolvimento e menor sobrevivência. A temperatura de 31°C foi a mais favorável para o desenvolvimento dos imaturos, com alta sobrevivência.

Silva (2005) e seus colaboradores avaliaram em laboratório o ciclo biológico do *A. diaperinus* em todas as etapas de desenvolvimento e puderam assim determinar em que fase ele é mais susceptível a um posterior controle químico ou biológico.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de criação massal de *A. diaperinus* em laboratório, visando o fornecimento desses para estudos futuros de prospecção de agentes de controle biológico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos insetos

Para que os insetos fossem coletados e mantidos em colônia, foi solicitada junto ao IBAMA a Autorização para atividades com finalidade científica, que foi concedida ao grupo de trabalho no dia 09 de setembro de 2010, sob número 25038-1.

Os insetos foram coletados juntamente com a cama e a ração de frangos provenientes de galpões da granja Pito Aceso, localizada no DF, (Figura 7) e transportados em sacos plásticos fechados hermeticamente para o laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. No laboratório, efetuou-se a triagem do material, separando insetos adultos de larvas e retirando todo o material da cama de frango proveniente da granja para evitar a contaminação da colônia de insetos. A seguir os insetos foram acondicionados em caixas plásticas transparentes, medindo 41x23x13,5 cm cobertos tecidos de voil medindo 30x18 cm nas tampas para a entrada de ar. As caixas foram deixadas em quarentena para eliminação de agentes contaminantes, antes do início da implementação da colônia.



Figura 7 – Vista parcial interna do galpão de criação de aves domésticas da Granja Pito Aceso, DF, onde foi coletada a população inicial de *Alphitobius diaperinus*

2.2 Criação de *A. diaperinus*

Após a quarentena, uma nova triagem foi realizada separando os insetos de acordo com as fases evolutivas. A seguir, os mesmos foram acondicionados em caixas plásticas conforme descrito no item 2.1, contendo ração de coelho triturada e serragem, na proporção de 1:1, ambas autoclavadas. Como fonte de alimento foi utilizada a ração comercial de coelhos por já estar descrita como uma dieta para criação deste inseto em laboratório (Silva *et al.*, 2005). A serragem foi adicionada sobre a ração para auxiliar na manutenção da umidade. Como as caixas não apresentavam nenhuma ondulação foi utilizado papelão corrugado, pois as ranhuras do papelão simulariam as fendas encontradas no piso e madeiras dos galpões de criação das aves (Figura 8).



Figura 8: A: Caixas plásticas transparentes, medindo 41 cm de comprimento x 23 cm de largura x 13,5 cm de altura, usadas como gaiolas para criação de *A. diaperinus*, a tampa com tecido de voil, medindo 30 cm de comprimento x 18 cm de largura para a ventilação das gaiolas; B: Caixa com dieta, serragem e papelão corrugado; C: Fêmea de *A. diaperinus* ovipositando sobre o papelão corrugado.

A criação foi mantida em sala climatizada com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e fotofase de 14:10h.

As caixas de criação foram observadas diariamente, umedecidas com água e as fases do ciclo biológico do inseto foram observadas. O papelão contido nas caixas de adultos foi coletado a cada 48 h. Cada papelão retirado foi individualizado e colocado em nova caixa para a eclosão das larvas. Quando os insetos empuparam foram transferidos para uma nova caixa até a emergência dos adultos. Esses foram novamente transferidos para novas caixas e passaram a ser alimentados com a ração de frangos. Nessas condições a colônia foi mantida durante todo o desenvolvimento experimental.

2.3 Avaliação do desenvolvimento de *A. diaperinus* em diferentes dietas

O desenvolvimento de *A. diaperinus* foi avaliado em dois diferentes tipos de dietas: dieta 1 [ração de coelhos comercial da Purina (composição: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de carne, calcário calcítico, sal, premix vitamínico e mineral, com os seguintes níveis: Proteína bruta: 16%, extrato etéreo: 3%, matéria fibrosa: 10%, material mineral: 8%, cálcio: 2,5%, fósforo: 0,5% e umidade de 12%) triturada em triturador elétrico da marca Arbel] e dieta 2 [ração de frangos produzida pela Asa Alimentos LTDA (composição: milho moído, soja, farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de carne, calcário calcítico, sal, premix vitamínico, probióticos e minerais, os níveis não são disponibilizados pela empresa), ambas autoclavadas.

Os insetos provenientes da colônia foram separados na fase de pupa da F1, e sexados com auxílio de uma lupa para observação da presença um apêndice genital nas fêmeas e ausentes nos machos, segundo metodologia de Barké e Davis (1967); Esquivel *et al.* (2012) (Figura 9).

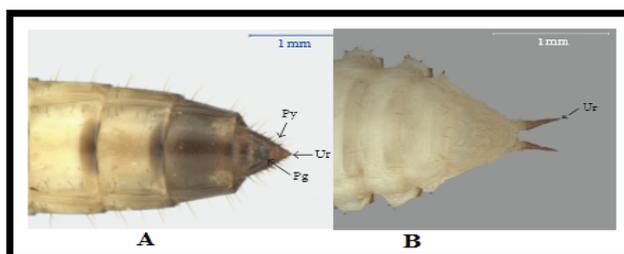


Figura 9: Dimorfismo sexual das pupas de *A. diaperinus*: A: Macho; B: Fêmea (Foto: Esquivel, *et al.* 2012).

Após a sexagem, cinco casais foram isolados em um recipiente plástico transparente com tampa com capacidade de 500 mL. Dentro de cada recipiente foram colocados 200 g de dieta, um pedaço de papel corrugado com 20 cm de diâmetro sobre a dieta e sobre o papelão foram colocados os casais de pupas. Na tampa de cada recipiente foi feito um orifício de 2 cm de diâmetro preenchido com algodão com água para manter a umidade.

Os recipientes foram mantidos em sala climatizada à temperatura de 28 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ de umidade e fotofase de 14/10 horas de acordo com Chernaki e Almeida (2001). As pupas foram observadas diariamente para verificação da emergência dos adultos. Foram realizadas 10 repetições para cada dieta testada.

Após a emergência dos adultos, os recipientes foram observados no início da manhã e no final da tarde, para verificar a presença de ovos. Quando os ovos foram observados, os papéis corrugados foram retirados dos recipientes para que a contagem dos ovos fosse efetuada. Esta avaliação foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Este procedimento foi repetido a cada 48 horas até o final da avaliação. Os papéis corrugados contendo os ovos foram colocados individualmente, em outros recipientes plásticos de 500 mL com 100 g de dieta e foram observados diariamente para a verificação da eclosão das larvas. Após a eclosão das larvas, estas foram contadas diariamente e selecionadas e separadas por estádios de acordo com a presença de ecdises. O número total de larvas e a duração de cada estágio larval foram então determinados. É importante salientar que foi observada a presença de ovos em mínima quantidade em outras partes dos recipientes, em torno de 10 %, mas para efeitos deste estudo, apenas os ovos encontrados no papel corrugado foram analisados.

Ao final da fase larval, foram colocados pedaços de papel corrugado para que as larvas pudessem buscar abrigo nas ranhuras dos mesmos para empuparem.

Duzentas pupas da F2 foram selecionadas ao acaso para avaliar o desenvolvimento do ciclo do inseto após a manipulação diária. A partir dessas larvas, 25 pupas fêmeas e 25 pupas macho foram acondicionados em recipientes plásticos de 500 mL com 200 g de dieta e um pedaço de papel corrugado, conforme já descrito. As pupas foram observadas duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde) para verificação da emergência dos adultos.

Todos os dados gerados foram avaliados estatisticamente, através de análise de variância, Kruskal-Wallis pelo programa Sigma Stat (Kuo *et al.*, 1992).

3. RESULTADOS

Todas as 100 pupas selecionadas e utilizadas no ensaio geraram adultos. Os insetos foram observados durante cinco dias (Figura 10). No terceiro dia de observação ocorreu a emergência dos primeiros insetos adultos nas duas dietas testadas. Sendo que, ocorreu a emergência de três mais fêmeas do que machos. No quarto dia, ocorreu a emergência da maioria dos insetos. No quinto dia foi observado somente emergência de insetos machos para as duas dietas. Houve diferença estatisticamente significativa na emergência de adultos nas duas dietas (Kruskal-Wallis ($H = 1,890$ com 1 grau de liberdade) ($P = 0,027$)).

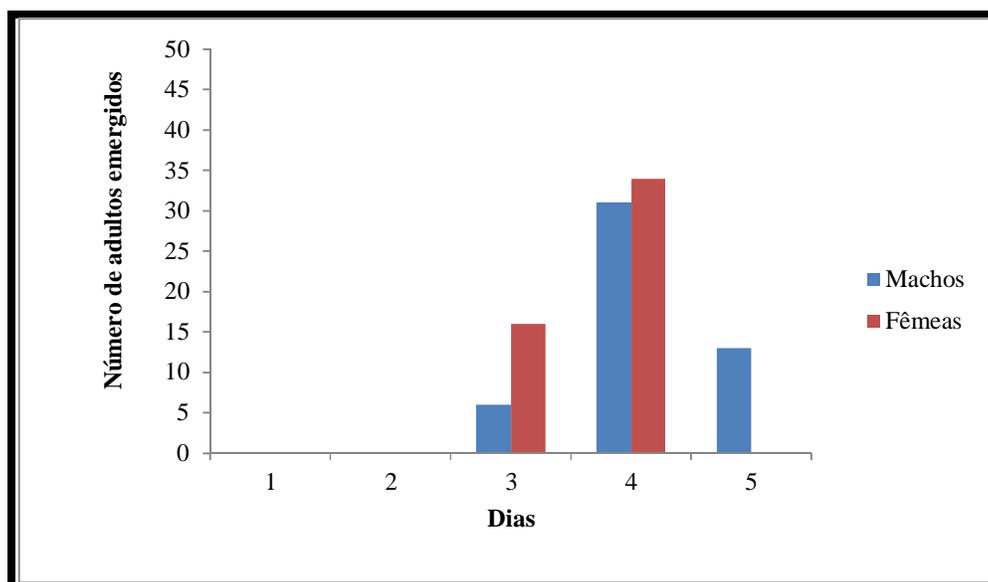


Figura 10: Emergência de adultos (machos e fêmeas) de *A. diaperinus* ao longo de 5 dias após a empupação provenientes de larvas criadas em dois tipos de dieta: dieta 1: ração de coelhos e dieta 2: ração de frangos.

O acasalamento começou a ocorrer quando os adultos, criados nas duas dietas tinham 14 dias e todos estavam acasalando no décimo quinto dia. Dois dias após o início do acasalamento, foram encontrados os primeiros ovos nas ranhuras do papel corrugado, os quais apresentavam inicialmente formato esférico, passando a forma elíptica em dois dias.

O número total médio de ovos coletados em cada tratamento foi de $160 \pm 55,5$ ovos para a ração de coelho e $165 \pm 60,1$ para a ração de frango (Figura 11). No

primeiro dia de coleta, que ocorreu 48 horas após o acasalamento (dia 2), foi observado um pico de oviposição nas duas dietas utilizadas. As coletas foram realizadas a cada 48 h, no dia 4, ocorreu um decréscimo na oviposição para ambas as dietas; no dia 6, na dieta 1, ocorreu um acréscimo na oviposição e na dieta 2 ocorreu um decréscimo bem acentuado; no dia 8, na dieta 1 ocorreu um decréscimo acentuado e na dieta 2 iniciou um crescimento gradativo da oviposição; no dia 10, as duas dietas mantiveram o crescimento da oviposição; no dia 12, a dieta 1 continuou em crescimento gradativo e na dieta 2 ocorreu um decréscimo na oviposição; no dia 14, as duas dietas apresentaram um mesmo crescimento na oviposição; no dia 16 ao dia 18, ambas dietas apresentaram um decréscimo, quando se estabilizaram numa baixa quantidade, até o final das coletas, que foram de 32 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de ovos obtidos nas duas dietas (Kruskal-Wallis ($H = 2,840$ com 1 grau de liberdade) ($P = 0,092$)).

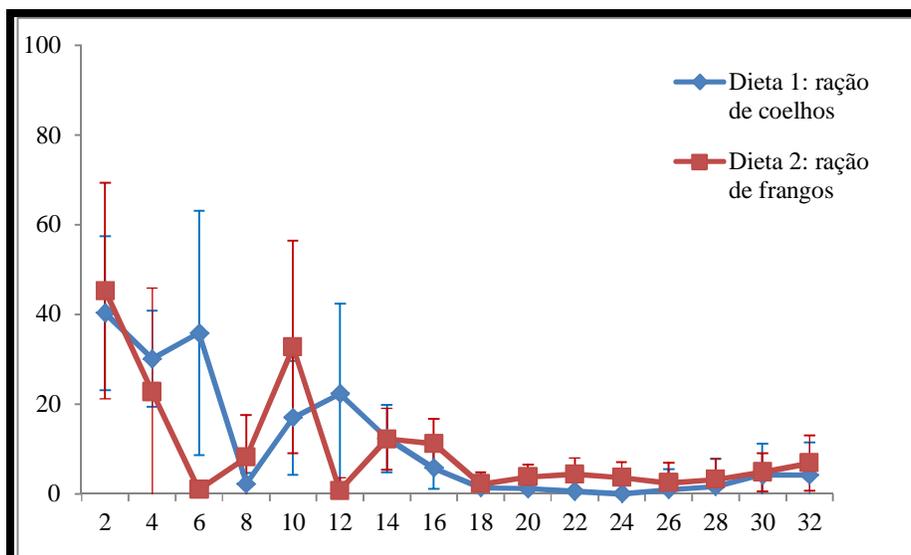


Figura 11: Número de ovos (média \pm desvio padrão) de *A. diaperinus* produzidos ao longo de 32 dias de período de oviposição. A oviposição iniciou-se 15 dias após a emergência dos adultos e 2 dias após o acasalamento. As larvas e adultos foram criados em dois tipos de dietas. Dieta 1: ração de coelhos e dieta 2: ração de frangos.

A emergência das larvas ocorreu em média dois dias após a oviposição nas duas dietas. Não houve uma diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis ($H = 2,840$ com 1 grau de liberdade) ($P = 0,009$)) na emergência das larvas entre as duas dietas. O número médio de larvas obtidas foi de $124,5 \pm 38,3$ larvas na ração de coelho e $112,1 \pm 37,5$ larvas na ração de frango, tendo-se obtido 56,3% e 61,6%

respectivamente de eclosão. As larvas apresentaram uma mortalidade mais acentuada do primeiro para o segundo estágio, a seguir começaram a estabilizarem, mantendo-se um percentual de sobrevivência semelhante nas duas dietas até o último estágio larval (Figura 12). Os estágios iniciais do primeiro ao quinto estágio duraram em média três dias e os últimos do sexto ao oitavo duraram de cinco a sete dias em ambas as dietas. Observou-se também, que o período larval foi de 35 ± 2 dias para as duas dietas. Foram observados oito estágios larvais. Não houve uma diferença estatisticamente significativa na emergência das larvas entre as duas dietas (Kruskal-Wallis ($H = 1,850$ com 1 grau de liberdade) ($P = 0,094$)).

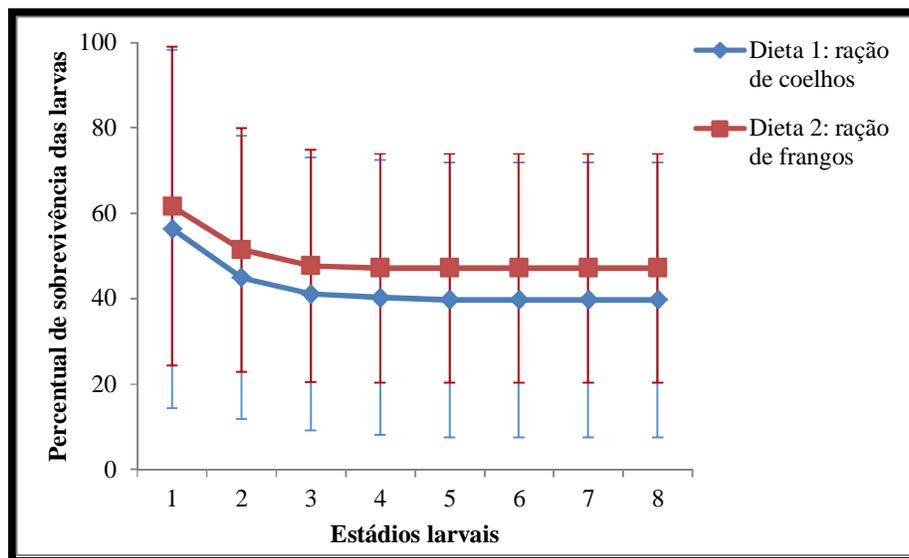


Figura 12: Percentual de larvas de *A. diaperinus* produzidas ao longo de 8 estágios larvais em duas dietas. As larvas emergiram 48h após o início da oviposição e o ciclo de desenvolvimento foi de 35 dias.

As larvas ao atingirem o seu último estágio, entraram nas ranhuras do papelão para empuparem, onde a luminosidade é baixa e o local é mais seguro, evitando a predação, tendo em vista que as pupas, ao contrário das larvas, não conseguem se locomover.

O período de pupa durou 4 ± 1 dia para as dieta 1 e para dieta 2. O número médio de pupas obtidas foi de $62,3 \pm 11,9$ na ração de coelho e $74,8 \pm 12,1$ na ração de frangos.

Foi observado uma pequena mortalidade dos insetos nesse estágio em ambas as dietas, 1,28 % das pupas para dieta 1 e 0,93 % das pupas para dieta 2. Não houve uma

diferença estatisticamente significativa para a emergência das pupas entre as duas dietas (Kruskal-Wallis-H = 10,593 com 14 graus de liberdade) (P = 0,718).

Os adultos emergiram com coloração branca e sem quitinização. O número médio de insetos adultos obtidos foi de $74,1 \pm 11,3$ na ração de coelho e $61,5 \pm 14,7$ na ração de frangos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas dietas (Kruskal-Wallis (H = 11,035, com 3 graus de liberdade) (P = 0,401). Somente após o 4.º dia o processo de quitinização foi observado.

O ciclo de desenvolvimento do *A. diaperinus* em laboratório, correspondente ao período de oviposição até o inseto adulto foi de 45 dias, mas o período total de desenvolvimento deste inseto foi de 61 dias (Tabela 1).

Tabela1: Ciclo de desenvolvimento do *A. diaperinus* criado em laboratório sob as condições de temperatura em torno de 28°C, umidade relativa 80% e fotofase de 14:10h.

Fases de desenvolvimento/ número de indivíduos observados	Duração de cada fase (média \pm desvio padrão)
Larval/ 200 indivíduos	35 \pm 2 dias
Pupal/ 200 indivíduos	4 \pm 1 dia
Adultos pós-emergência	4 \pm 1 dia
Maturidade sexual	12 \pm 3 dias
Pré-oviposição	4 \pm 2 dias
Oviposição	2 \pm 1 dia

As diferenças citadas acima podem decorrer do estresse devido à manipulação em todos os estádios. Os bioensaios não demonstraram haver diferenças significativas no desenvolvimento do cascudinho nas duas dietas testadas.

O cascudinho da cama de frangos adulto pode viver mais de um ano na cama das aves, neste trabalho observamos que os insetos adultos mantiveram sua capacidade reprodutiva até a oitava geração (F8), a partir dessa fase observou-se uma mortalidade mais elevada, de aproximadamente 40 % dos insetos adultos. Essa mortalidade pode ter

ocorrido em razão dos insetos terem sido criados em confinamento e durante esse período não foram inseridos novos insetos, com isso ocorre o aumento da similaridade entre os insetos. Para reduzir a similaridade dos insetos na colônia, novos indivíduos adultos (F1) foram inseridos, dando origem a uma nova colônia. Nessas condições a colônia foi mantida durante todo o desenvolvimento experimental e atualmente se encontra na geração F4.

4. DISCUSSÃO

Segundo dados da literatura, o tempo médio para o período pupal de *A. diaperinus* foi de cinco dias. Dass *et al.*, (1984), relatam que o período pupal a 28°C e 65 ± 5% UR, na cama de frangos foi de 5,3 dias e Silva *et al.*, (2005) relatam que o período pupal utilizando como dieta ração de coelhos e acondicionados em placas de Petri, foi de 5 dias, com uma taxa de sobrevivência de 100%, a temperatura de 27° C e 80% UR, mantidas em câmara climatizada com temperatura e umidade controlada. Esses dados embora com diferenças de temperatura e umidade se assemelham aos resultados encontrados neste trabalho.

A emergência dos adultos de *A. diaperinus* esta de acordo com relatos da literatura, sendo que neste trabalho foi observado que no quinto dia da emergência restavam apenas insetos machos em ambas as dietas, informação não encontrada na literatura. Chernaki e Almeida, 2001, em seus estudos observaram o tempo médio para início da emergência dos adultos foi de quatro a sete dias, sendo que não foi mencionada nenhuma diferença na emergência de machos e fêmeas.

Dass *et al.*,(1984) observaram durante o período larval que as larvas mostraram-se presentes em 33,2 dias com temperatura de 28°C, período superior, então, que o presente experimento, que foi de 28 dias. Quando houve avaliação deste estágio através da cápsula cefálica do coleóptero, obteve-se oito estádios larvais à temperatura de 28°C, esse dados corroboram com os estudos de Silva *et al.*, (2005).

Dass *et al.*, (1984), relatam que o período larval a 28°C e 65 ± 5% UR, foi de 68,8 dias, diferindo do trabalho de Silva *et al.*, (2005), que a 27° C e 80% UR , foi de 55 dias e neste trabalho a 28° C e 80% UR, foi de 46 dias , possivelmente ocorreram essas diferenças devido a temperatura e umidade. Neste trabalho, foi observado que as larvas necessitam altos teores de umidade (>80%) para se desenvolverem, esse dado corrobora com os relatos de Silva *et al.*, (2005).

Rodrigueiro *et al.*, (2008) em seus estudos, não obtiveram sucesso na tentativa de obter uma criação em laboratório, utilizaram recipientes plásticos de 3 litros contendo serragem e ração para frangos na proporção de 1:2. Este meio era umedecido 3 vezes por semana com água borrifada na sua superfície. Os potes de criação tinham tampas com abertura central, cobertas com organza que permitiam a aeração e eram mantidos em câmara climatizada, com temperatura ($26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60\pm 1\%$) e fotoperíodo (12C:12E) controlados. Houve a tentativa de se obter geração de adultos (F1) em laboratório, mas não foi possível por não atingir o número de adultos suficiente para realização dos bioensaios, devido à grande mortalidade ao longo do desenvolvimento e variação no tempo de emergência dos indivíduos. O insucesso de Rodrigueiro *et al.*, (2008) na obtenção de uma colônia, possivelmente se deve ao fato de utilizarem temperatura e umidade inferiores as necessárias para o desenvolvimento do ciclo dos insetos.

O ciclo reprodutivo, desde a incubação até inseto adulto, à temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 10\%$ foi de 41 dias, dado este que se assemelha com os de Dass *et al.*, (1984), onde o ciclo reprodutivo, desde a incubação até inseto adulto, à temperatura de 27°C , foi de 42,5 dias, mostrando que as diferenças podem decorrer da dieta alimentar e do meio ambiente. Segundo Dass *et al.*, (1984), o coleóptero adulto apresentou uma longevidade entre 14 e 16 meses, dados que se assemelham com os encontrados neste trabalho que foi de 15 meses. Porém, esta longevidade longa torna difícil o seu controle, pois produtos químicos eficientes, não são aconselhados por permanecerem na carne das aves, contrariando recomendações do Ministério da Saúde (Paiva, 2000).

Como o bioensaio com as duas dietas não apresentaram diferenças estatísticas significativas e este inseto se desenvolve na ração de frangos nos aviários, optou-se em realizar a criação massal na dieta de frangos. Atualmente, esta criação esta fornecendo insetos para a realização de estudos utilizando entomopatógenos e feromônios para seu controle.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo relata um método simples de criação de *A. diaperinus*, permitindo o estabelecimento de colônias do inseto para estudos de biologia e controle com padronização dos insetos com controle de idade para utilização em bioensaios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM, Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de Enterobacérias em *Alphitobius diaperinus* spp e na Cama de Aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Ciência Avícola, Campinas, v.4, p.243-247, 2002.

Chernaki-Leffer AM, Lazzari SMN, Almeida LM. Controle do cascudinho. Avic. Ind. 1094: 22-25, 2001.

Dass R, Paul AVN e Agarwal RA. Feeding potential and biology of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, preying on *Corcyra cephalonica* St. (Lep. Pyralidae) Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie. 98: 444-447, 1984.

De Las Casas E, Pomeroy BS, Harein PK. Infection and quantitative recovery of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia Coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry Science, v.47, n.6, p.1871-1875, 1968.

Esquivel JF, Crippen TL, Ward AL. Improved Visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)—Part I: Morphological Features for Sex Determination of Multiple Stadia. Hindawi Publishing Corporation, Psyche, 2012.

Geden CJ e Steinkraus DC. Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. Journal of Economic Entomology. 96: 1602-1607. 2003.

Goodwin MA, Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. Journal of Applied Poultry Research, v.5, p.51-55, 1996.

Japp AK, Bicho CL, Silva AVF. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. Ciência Rural, v.40, n.7, jul, 2010.

Kuo J, Fox E, MacDonald S. Sigmastat: statistical software for working scientists. Users manual. San Francisco: Jandel ScientiWc, 1992.

Mcallister JC, Steelman CD, Newberry LA, Skeeles JK. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry Science, v.74, n.1, p.45-49, 1995.

Paiva DP. Controle de moscas e cascudinhos. Desafios na Produção Agrícola. In: *I Simpósio sobre resíduos da produção avícola. Embrapa Suínos e aves* (Concórdia, Brasil). pp.21-26, 2000.

Rodrigueiro TSC, Ginarte CMA, Leite LG, Tavares FM, Goulart RM, Giometti FHC. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.75, n.3, p.279-284, 2008.

Salin C, Delettre YR, Cannavacciuolo M and Vernon P. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. *Eur. J. Soil Biol.* vol. 36, p. 107-115, 2000.

Silva AS, Hoff G, Doyle RL, Santurio JM, Monteiro SG. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. *Acta Scientiae Veterinariae.* 33(2): 177-181, 2005.

Silva PRQ, Martins ES, Sallet L, Monnerat RG. Análise da variabilidade genética de *Alphitobius diaperinus* utilizando marcadores moleculares de DNA. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 8, n. 2, p. 55-68, jul./dez. 2010.

Vaughan JA, Turner EC, Ruzsler PL. Infestation and damage of poultry house insulation by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry Science, v.63, p.1094-1100, 1984.

Wallace MMH, Winks RG. The use a beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) for the biological control of poultry dung in high-rise layer houses. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, v.51, n.3, p.214-219, 1985.

Capítulo III

Identificação de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

1. INTRODUÇÃO

Os atuais sistemas de manejo da avicultura brasileira favoreceram a proliferação do besouro *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em meio à cama de aviário, principalmente pelas condições geradas na manipulação do ambiente, como a temperatura no confinamento das aves. O cascudinho da cama de frango além de ser considerada uma das principais pragas que afetam a avicultura moderna, é uma praga secundária de grãos armazenados, farinhas e rações (Silva *et al.*, 2005).

A temperatura e umidade adequadas e o reaproveitamento da cama a cada troca de lote faz com que o cascudinho se desenvolva e forme continuamente novos focos de infestação, que ocorre de um lote para outro. Com isso, medidas de controle são empregadas, principalmente o uso de inseticidas químicos na cama, porém o uso indiscriminado desses produtos e a falta de tecnologia de aplicação tornam o controle insuficiente, fazendo com que ocorram novos focos de infestação, mesmo depois da aplicação de produto químico, o que favorece o desenvolvimento de populações resistentes (Gazoni *et al.*, 2012).

Em vista disso, a busca por métodos de controle alternativos aos métodos convencionais apresenta-se necessária e em especial aqueles métodos que não gerem danos à sanidade das aves e à saúde humana, levando em consideração também o ciclo biológico do inseto (Gazoni *et al.*, 2012).

Uma alternativa viável para o controle biológico do *A. diaperinus* é a utilização do *Bacillus thuringiensis*. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar novas proteínas produzidas por esta bactéria com atividade tóxica contra insetos-praga (Macedo *et al.*, 2012).

B. thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica que produz endotoxinas chamadas toxinas Cry que se formam durante a fase de esporulação como corpos parasporais, que apresentam atividade inseticida a várias ordens de insetos.

Estas proteínas têm sido usadas comercialmente há muitos anos para o controle de pragas de insetos na agricultura e na saúde humana, porque são altamente específicas para insetos, inócuos para vertebrados e plantas e biodegradáveis (Zavala *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação desta bactéria envolve vários passos, como solubilização do cristal, processamento das toxinas, interações específicas com receptores, união ao receptor e inserção de uma parte da toxina na membrana apical das células intestinais dos insetos (Bravo *et al.*, 2007).

Segundo Monnerat (2003), várias pesquisas já demonstraram que para a estirpe ser tóxica, a toxina por ela produzida, deve se ligar a um receptor específico. Esse processo é fundamental para que os efeitos deletérios das proteínas Cry sejam observados, entretanto, o fato da proteína se ligar ao receptor não quer dizer que, necessariamente, que a mesma apresente toxicidade.

O modo de ação das proteínas Cry tem sido extensivamente estudado e sabe-se que, após a ingestão, essas proteínas (protoxinas), são solubilizadas, devido ao pH alcalino intestinal e ativadas por proteases intestinais. Após serem ativadas, as proteínas reconhecem e se ligam aos receptores de membrana específicos, causando alterações na permeabilidade, levando a um choque osmótico e, conseqüentemente, a paralisia e morte do inseto por inanição e septicemia (Monnerat *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2010).

A busca por estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas de *A. diaperinus* é de grande importância para o manejo desta praga, mas estudos sobre este assunto ainda são limitados. O objetivo deste trabalho foi identificar estirpes de *B. thuringiensis* que apresentem atividade patogênica para *A. diaperinus*, que poderão ser utilizadas no controle deste inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Insetos

Os insetos foram coletados na colônia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde é feita a criação massal de *A. diaperinus*, conforme já descrito no capítulo I.

2.2 - Estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizadas 194 estirpes pertencentes à Coleção de Bactérias Patogênicas a Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Desse total, 187 estirpes nativas de *B. thuringiensis*, seis estirpes são de *B. thuringiensis* recombinante e uma de *E. coli* recombinante.

As estirpes nativas foram cultivadas em meio Embrapa (13 g. L⁻¹ de caldo nutriente, 0,5 g. L⁻¹ de extrato de levedura, 6,8 g. L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,3 g. L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,02 g. L⁻¹ de MnSO₄, 0,02g. L⁻¹ de Fe₂(SO₄)₃, 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, pH

7,2), conforme Monnerat *et al.*,(2007), em incubador rotativo a 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595), 28 °C, durante 72 h, até sua completa esporulação, o material cultivado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30min, a 4°C, congelado por 16 horas e liofilizado por 18h.

As estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes que expressam as toxinas Cry11, Cry1Ab, Cry4B, Cry1B, Cry10 e Cyt1A foram cultivadas em meio Embrapa. Para Cry11, Cry1Ab, Cry4B e Cyt1A foram adicionados ao meio de cultivo 10 µg/mL de eritromicina e para Cry1B e Cry10 foram adicionados 6 µg/mL de cloranfenicol, em incubador rotativo a 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595), 28 °C, durante 72 h, até sua completa esporulação, o material cultivado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30min, a 4°C, congelado por 16 horas e liofilizado por 18h.

A estirpe de *E. coli* recombinante, que expressa a toxina Cry3A foi crescida em meio LB (Luria Bertani) (peptona bacteriológica, 10 g. L⁻¹, extrato de levedura, 5 g. L⁻¹, cloreto de sódio, 10 g. L⁻¹, pH 7,2) em incubador rotativo a 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595), 37 °C, durante 16 h, até sua completa esporulação, o material crescido foi centrifugado a 10.000 rpm por 30min, a 4°C, congelado por 16 horas e liofilizado por 18h.

A caracterização bioquímica e molecular das estirpes utilizadas neste estudo foram realizadas por Martins *et al.*, 2009 .

2.3 Bioensaios

Para a realização dos bioensaios foram realizados experimentos prévios utilizando como dieta a ração de frangos e também a dieta artificial utilizada para ensaios com o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*. Dentre essas, selecionou-se para os bioensaios a dieta artificial de bicudo do algodoeiro, por apresentar uma melhor absorção do material e com isso utilizar uma menor quantidade de material.

A dieta artificial, que é composta de 43,5 g de ágar (Biobras), 60 g de levedo de cerveja, 60 g de germen de trigo, 40 g de pharmedia (Traders Protein Memphis, Tennessee, EUA), 100 g de proteína de soja, 60 g de sacarose, 10 g de sais minerais (21% CaCO₄, 0,039% CuSO₄, 9 % MgSO₄, 0,009% K₂SO₄, 12% KCl, 31% KH₂PO₄, 0,057 % NaF, 14,9 % (Ca₃PO₄)₂, 1,47 % FePO₄, 0,02 % MnSO₄, 0,009 % Al₂(SO₄)₃, 0,005 % KI, 10,5 % NaCl), 20 g de ácido ascórbico, 2,4 g de ácido sórbico, 2 g de

nipagim (Vetec, RJ, Brasil) e 10 mL de solução vitamínica (1,2 % de ácido ascórbico, 0,03 % pantotenato de cálcio, 0,015 % niacina, 0,008 % riboflavina, 0,004 % tiamina HCl, 0,004 % piridoxina HCl) em um volume de 1,5 l de água (Monnerat *et al.*, 2000). A dieta utilizada nos bioensaios foi preparada e acondicionada em placas de cultura de células com seis poços, cada poço com diâmetro de 9 cm. 19,2 mg das estirpes liofilizadas, foram diluídas em 200 µL de água destilada estéril, e 50 µL de cada suspensão bacteriana foi aplicada sobre 2 mL de dieta, em cada poço, obtendo-se a concentração final de 4000 µg/cm². Após a absorção do material sobre a dieta, foram colocadas 10 larvas de segundo estágio. Para cada tratamento foram realizadas três repetições e um controle negativo contendo dieta e água. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação, 28°C ± 2, umidade relativa 80 ± 10% e fotofase de 14:10 h. Após sete dias, as larvas de *A. diaperinus* foram contadas e o número de insetos vivos e mortos nas três repetições foram avaliados determinando-se a porcentagem de mortalidade (Figura 13). Após a avaliação dos bioensaios foram selecionadas as estirpes que causaram mortalidade. Os ensaios com as estirpes selecionadas foram repetidos três vezes em períodos diferentes.



Figura 13: Ilustração da montagem e avaliação do bioensaio: A1 e A2. Montagem do bioensaio, B. Avaliação do bioensaio (Foto: Lunalva Sallet).

3. Ensaio com proteínas Cry individuais e detecção de receptores

Para os bioensaios com proteínas Cry individuais foram realizados os cultivos das estirpes que expressaram as proteínas de interesse, a purificação e a solubilização. A seguir, para a detecção de receptores as proteínas solúveis foram ativadas e biotiniladas.

3.1 Purificação, solubilização e quantificação das proteínas

As estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes utilizadas foram: Cry11, Cry1Ab, Cry4B, Cry1B, Cry10 e Cyt1A. Estas foram cultivadas em meio cultura Embrapa, com antibiótico. Os cultivos bacterianos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 rpm a 4 °C, o sedimento foi lavado por três vezes a 10.000 rpm a 4 °C (Jouan BR4i) por 10 minutos, com tampão contendo 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA (pH 8,0), e em seguida por três vezes com tampão contendo PMSF a 1 mM. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado com tampão TTN (20 mM de tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de triton x-100, pH 7,2) este foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C (Jouan BR4i) por 10 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes. Após esta etapa o material foi sonificado a três pulsos de um minuto com intervalos iguais de um minuto a 15 W (VirSonic CelDisrutter 16-850).

A purificação das proteínas de *B. thuringiensis* recombinantes foi realizada por meio de gradiente de sacarose de acordo com protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983). Posteriormente, foram recuperados com adição de triton 1% (v/v) e PMSF 1 mM e solubilizados em tampão alcalino de carbonato de sódio a 50 mM e pH 10,5 com 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol por duas horas a 37 °C com agitação constante de 60 rpm. Depois desse processo, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm.

Para a purificação da proteína de *E. coli* recombinante, foi utilizado meio LB com 10mg/mL de ampicilina e incubado por 16 h a 37° C a 250 rpm. Em seguida, o inóculo foi transferido para erlemmayer com 500 mL de meio LB com antibiótico e incubado por 2 a 3 h até alcançar a OD_{600nm} de 0.5, a seguir foi adicionado 0,1 mM de IPTG e incubado por 16h a 37° C. Depois, o material foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm. O sedimento recuperado com tampão PBS 1X (10mM de fosfato de sódio e potássio e 150 mM de NaCl, pH 7,4) e a seguir com 10mL de tampão TES (25mM de tris, 10mM de EDTA e 15% de sacarose, pH8) e foi congelado a -70° C por 30 minutos. Após o material foi sonificado a cinco pulsos de um minuto com intervalos iguais de um minuto a 15 W (VirSonic CelDisrutter 16-850) e centrifugado a 14.000 rpm por 40 minutos, o sedimento foi lavado com solução tampão TTN (20 mM de tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de triton x-100, pH 7,2) e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, a seguir, foi centrifugado a 12.500 rpm por 40 minutos, essa etapa foi repetida por duas vezes. Após, o sedimento foi lavado com solução de PBS-acetona 5:1 v/v, depois com PBS 1X a 12.500 rpm por 40 minutos após, foi ressuscitado com

tampão alcalino (50mM de Na₂CO₃, 10mM de DTT, 5mM de EDTA, 1mM de PMSF, pH10) e incubado por 16 h a 37° C com 250 rpm. Posteriormente, o material foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm e sobrenadante foi coletado.

Em seguida, as proteínas solúveis foram quantificadas com Protein Assay (Bio Rad) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para observação da integridade e massa molecular das proteínas foi feito um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, de acordo com Laemmli (1970).

O gel foi corado e fixado com 20 mL de solução corante de Comassie blue (40% metanol, ácido acético 10% e Comassie blue 0,1%) por cerca de 16 horas sob leve agitação e descorado com 20 mL de água por 1-2 horas até visualização dos perfis proteicos das estirpes.

3.2 Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais

Para o bioensaio com as proteínas Cry individuais foram utilizadas as proteínas solúveis preparadas de acordo com o protocolo de solubilização descrito acima.

O bioensaio contra as larvas de *A. diaperinus* foi realizado em placas de cultura de células com seis poços, conforme descrito no item 2.3. As 2,4 µg das proteínas foram diluídas em 100µL de água destilada estéril, e 20 µL de cada proteína foram aplicados sobre a dieta, em cada poço, obtendo-se a concentração final de 250 ng/cm². Após a absorção do material sobre a dieta, foram colocadas 10 larvas de segundo estágio. Para cada tratamento foram realizadas três repetições e um controle negativo. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação, a temperatura de 28°C ± 2, e fotofase de 14:10 h (clara/escuro) e umidade relativa de 80 ± 10%. Após sete dias, foi realizada a avaliação do bioensaio, as larvas do *A. diaperinus* foram contadas e o número de insetos vivos e mortos nas três repetições foram avaliados determinando-se a porcentagem de mortalidade em cada repetição.

3.3 Ativação das proteínas com tripsina

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e em seguida incubadas com a enzima tripsina durante uma hora a 37 °C com leve agitação. A concentração da tripsina variou de acordo com a concentração das proteínas numa

proporção de 10:1 de proteína: enzima, respectivamente. Para inativação da enzima foi adicionado PMSF a 1 mM, e em seguida foi feita uma centrifugação para recuperar o sobrenadante. Para observação da integridade das proteínas e sua massa molecular foi feito um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.

3.4 Ativação das proteínas com suco gástrico

A extração das proteases foi feita de acordo com o protocolo de Silva-Werneck e Ellar (2008). As proteases foram extraídas a partir de 10 intestinos médios das larvas de *A. diaperinus* de quarto estágio. Os intestinos íntegros foram retirados com auxílios de pinças, lavados e incubados em 500 µL de tampão de dissecação para manutenção da integridade das paredes do intestino e do pH (sacarose 250 mM e tris-HCl 5 mM, pH 8,0). Após este passo, 1 mL de tampão de homogeneização gelado (DTT 10 mM e Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,5) foi adicionado. Os intestinos foram homogeneizados com quatro pulsos (Blender – polytron, Glass-Col® Terre Haut USA) com 1 mL de tampão de homogeneização gelado.

O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10000 rpm, por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi esterilizado por filtração (0,22 µm) para eliminar possíveis contaminantes e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, como descrito anteriormente, e alíquotadas em volumes de 250 µL. As alíquotas foram armazenadas a – 80 °C até sua utilização.

3.5 Biotinilação das proteínas

As proteínas ativas Cry1B, Cry11, Cry10, Cry1Ab, Cry4B, Cry3A e Cyt1A foram biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. Um miligrama das proteínas foi incubado com tampão bicarbonato (Amersham) e 40 µL de biotina durante uma hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. As proteínas conjugadas com biotina foram adicionadas à coluna. As proteínas foram eluídas da coluna pela adição de 10 mL de PBS 1X. A partir disso, dez frações contendo um mL de solução foram coletadas e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford em cada fração. As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%.

3.6 Extração de BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles” - Vesículas da Borda Escovada da Membrana Apical das Células do Intestino).

As BBMVs foram obtidas a partir de intestinos médios de *A. diaperinus* de quarto estágio de desenvolvimento, por precipitação diferencial usando $MgCl_2$ como reportado por Wolfesberg *et al.* (1987). Os intestinos foram retirados com auxílio de pinças e adicionados em solução tampão homogeneização contendo 300 mM de manitol, 17mM de Tris-HCl, 10mM de Hepes, 5mM de EGTA, 2mM de DTT, 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, pH 7.4. Um grama dos intestinos foram submetidos a cinco pulsos a 2250 rpm em um aparelho homogeneizador “blender-polytron” (Glass-Col® Terre Haunt USA) juntamente com 5 ml de tampão de homogeneização. Adicionou-se um ml de solução gelada de $MgCl_2$ a 24 mM e a mistura foi incubada em gelo por 10 min. A reação foi centrifugada a 10.000 rpm por 1h a 4°C.

O sedimento foi ressuscitado em 1ml de tampão estocagem MET (manitol 200mM, DTT 1mM e Hepes-Tris 1mM, pH 7.4). As BBMVs purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a -80°C.

3.7 Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV's)

A ligação foi realizada em 100 μ L de tampão de ligação [PBS (pH 7.6), 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20]. Dez microgramas de BBMVs de *A. diaperinus* foram incubados (separadamente) com as toxinas, Cry1B, Cry11, Cry10, Cry1Ab, Cry4B, Cry3A e Cyt1A biotinizadas (10 nmol.L⁻¹). As toxinas não ligadas foram removidas por centrifugação (10 minutos a 10.000 rpm). As BBMVs foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuscitadas em 15 μ L de PBS 1X e 5 μ L de tampão de amostra Laemmli 4X [0,125 mol.L⁻¹ Tris/HCl (pH 6.8), 4% (m/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0.01% (m/v) Azul de Bromofenol]. As amostras foram fervidas por 3 min e resolvidas em SDS-PAGE a 9%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL- nitrocellulose membrane – GE Helthcare), a transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema

submarino (Hoefer) por 40 min em tampão de transferência [25 mmol.L-1Tris, 192 mmol.L-1 Glicina e 20% metanol (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1X para que fosse renaturada. A ligação das toxinas marcadas com as BBMV's foi visualizada com streptavidina-peroxidase conjugada (1: 6000- GE Helthcare) por 1 h seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1 Bioensaios para *A. diaperinus*

Dentre as 187 estirpes nativas testadas, três (S907, S1122, S1806) apresentaram os melhores resultados de toxicidade às larvas de *A. diaperinus* (Tabela 2) e como controle negativo foi utilizado água.

Tabela 2: Resultado de bioensaio de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de *A. diaperinus* a partir de uma dose diagnostica.

Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem	Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem
S8	0,0	Espírito Santo (BR)	S853	10,0	Santa Catarina (BR)
S10	10,0	Mato Grosso do Sul (BR)	S854	13,0	Santa Catarina (BR)
S13	5,0	Mato Grosso do Sul (BR)	S855	12,4	Santa Catarina (BR)
S18	7,0	Mato Grosso do Sul (BR)	S859	16,2	Rio Grande do Sul (BR)
S29	13,0	Espírito Santo (BR)	S861	12,0	Bahia (BR)
S33	12,4	Espírito Santo (BR)	S874	10,0	Bahia (BR)
S34	16,2	Espírito Santo (BR)	S893	10,2	Mato Grosso (BR)
S38	12,0	Espírito Santo (BR)	S894	8,7	Mato Grosso (BR)
S39	11,1	Espírito Santo (BR)	S897	15,6	Mato Grosso (BR)
S41	18,3	Espírito Santo (BR)	S898	20,3	Santa Catarina (BR)

Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem	Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem
S62	10,0	Santa Catarina (BR)	S916	6,0	Paraná (BR)
S65	10,0	Santa Catarina (BR)	S919	7,3	Paraná (BR)
S66	10,0	Santa Catarina (BR)	S920	4,3	Minas Gerais (BR)
S69	8,7	Rio Grande do Sul (BR)	S939	2,3	Paraíba (BR)
S70	15,6	São Paulo (BR)	S946	21,3	São Paulo (BR)
S72	20,0	Paraná (BR)	S965	15,6	Mato Grosso do Sul (BR)
S73	16,0	Goiás (BR)	S997	13,5	Mato Grosso (BR)
S74	15,4	Goiás (BR)	S1016	11,0	Mato Grosso (BR)
S75	19,4	Goiás (BR)	S1018	10,0	Mato Grosso (BR)
S76	13,0	Goiás (BR)	S1020	7,6	Mato Grosso (BR)
S78	14,0	Goiás (BR)	S1021	0,0	Mato Grosso do Sul (BR)
S79	18,5	Goiás (BR)	S1026	10,0	Mato Grosso (BR)
S80	13,0	Goiás (BR)	S1044	5,0	Goiás (BR)
S81	6,0	Goiás (BR)	S1045	7,0	Mato Grosso (BR)
S82	7,3	Goiás (BR)	S1046	13,0	Goiás (BR)
S83	4,3	Goiás (BR)	S1047	12,4	Paraná (BR)
S84	14,6	Goiás (BR)	S1051	16,2	Amazonas (BR)
S86	2,3	Goiás (BR)	S1052	12,3	Rondônia (BR)
S88	7,5	Rondônia (BR)	S1055	11,1	Rondônia (BR)
S90	11,5	Minas Gerais (BR)	S1060	14,5	Amazonas (BR)
S92	1,5	Minas Gerais (BR)	S1063	18,5	Amazonas (BR)
S93	0,0	Minas Gerais (BR)	S1064	13,1	Amazonas (BR)

Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem	Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem
S95	1,2	Minas Gerais (BR)	S1066	10,0	Amazonas (BR)
S96	4,6	Minas Gerais (BR)	S1067	12,4	Rondônia (BR)
S97	7,0	Minas Gerais (BR)	S1077	17,4	Pará (BR)
S98	8,3	Mato Grosso (BR)	S1079	2,5	Rondônia (BR)
S99	4,5	Mato Grosso (BR)	S1080	3,5	Pará (BR)
S100	14,0	Mato Grosso (BR)	S1081	12,4	Pará (BR)
S101	12,3	Mato Grosso (BR)	S1082	7,3	Pará (BR)
S105	10,0	São Paulo (BR)	S1085	0,0	Pará (BR)
S106	10,3	São Paulo (BR)	S1086	10,0	Pará (BR)
S108	6,2	Mato Grosso do Sul (BR)	S1087	6,6	Pará (BR)
S148	5,1	Minas Gerais (BR)	S1092	16,2	Rondônia (BR)
S158	4,3	Goiás (BR)	S1093	12,1	Rondônia (BR)
S198	11,7	Pernambuco (BR)	S1094	10,3	Rondônia (BR)
S287	16,0	Bahia (BR)	S1099	10,0	Rondônia (BR)
S299	15,0	Bahia (BR)	S1101	8,7	Rondônia (BR)
S309	19,1	Pernambuco (BR)	S1102	15,6	Rondônia (BR)
S324	21,0	Rondônia (BR)	S1104	19,0	Rondônia (BR)
S325	16,5	Rondônia (BR)	S1105	16,0	Rondônia (BR)
S332	15,4	Rondônia (BR)	S1107	6,1	Rondônia (BR)
S335	17,5	Rondônia (BR)	S1108	4,3	Rondônia (BR)
S381	3,4	Goiás (BR)	S1111	11,0	Pará (BR)
S395	14,5	Paraná (BR)	S1113	16,0	Amazonas (BR)
S397	2,5	Paraná (BR)	S1114	15,0	Amazonas (BR)

Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem	Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem
S415	0,0	Goiás (BR)	S1117	21,0	Amazonas (BR)
S420	10,0	Goiás (BR)	S1119	11,0	Acre (BR)
S421	12,4	Goiás (BR)	S1120	16,0	Acre (BR)
S422	17,4	Goiás (BR)	S1121	15,3	Acre (BR)
S428	2,5	Goiás (BR)	S1122 ^a	50,0	Argentina
S466	3,5	São Paulo (BR)	S1123	3,4	Acre (BR)
S472	12,0	Mato Grosso (BR)	S1132	14,5	Acre (BR)
S473	16,3	Minas Gerais (BR)	S1133	2,5	Acre (BR)
S497	2,5	Pará (BR)	S1193	0,0	Amazonas (BR)
S518	0,0	Minas Gerais (BR)	S1194	0,0	Tocantins (BR)
S520	13,5	São Paulo (BR)	S1195	4,6	Tocantins (BR)
S570	16,4	Santa Catarina (BR)	S1196	7,0	Tocantins (BR)
S593	0,0	Rondônia (BR)	S1197	8,3	Tocantins (BR)
S907 ^a	30,0	Paraná (BR)	S1199	4,5	Tocantins (BR)
S615	16,0	Paraná (BR)	S1201	10,0	Bahia (BR)
S617	15,4	Paraná (BR)	S1211	10,2	Bahia (BR)
S640	17,5	São Paulo (BR)	S1213	6,2	Bahia (BR)
S646	3,4	Mato Grosso do Sul (BR)	S1264	6,5	São Paulo (BR)
S672	2,5	Mato Grosso do Sul (BR)	S1271	4,3	São Paulo (BR)
S690	0,0	Rondônia (BR)	S1329	11,0	Ceará (BR)
S699	0,0	Amazonas (BR)	S1342	16,0	Ceará (BR)
S710	10,0	Alagoas (BR)	S1350	15,2	Ceará (BR)
S711	1,2	Pernambuco (BR)	S1361	17,4	Maranhão (BR)

Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem	Estirpe	Mortalidade (%)	Estado de Origem
S765	7,3	Santa Catarina (BR)	S1450	3,5	Rio Grande do Sul (BR)
S780	8,3	Amazonas (BR)	S1451	12,4	Distrito Federal (BR)
S785	4,5	Minas Gerais (BR)	S1806 ^a	60,0	Minas Gerais (BR)
S813	9,3	Rio Grande do Sul (BR)	S1971	0,0	Distrito Federal (BR)
S820	10,4	Santa Catarina (BR)	S1472	10	Distrito Federal (BR)
S821	7,4	Paraná (BR)	S1473	7,4	Distrito Federal (BR)

^a. Estirpes escolhidas para bioensaios

É importante ressaltar que a estirpe S1806 que se destacou nesse estudo trata-se de uma estirpe de *B. thuringiensis israelensis* com atividade descrita para dípteros e coleópteros (Tabela 3). As estirpes que apresentaram uma maior toxicidade para *A. diaperinus* já haviam sido caracterizadas por Martins *et al.*, 2007.

Tabela 3: Resultados da mortalidade dos insetos na concentração de 4000 µg/cm² e a caracterização das proteínas.

Estirpes	Massa molecular (kDa)	Proteínas	Mortalidade
S907	130-65 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry1B (Martins <i>et al.</i> , 2007)	30%
S1122	122-55 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry3, Cry8 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	50%
S1806	129-65-29 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry4, Cry10, Cry11, Cyt1e Cyt2 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	60%

Tendo em vista que as três estirpes nativas que apresentaram toxicidade a *A. diaperinus* apresentam as proteínas Cry1B, Cry3, Cry8, Cry4, Cry10, Cry11, Cyt1 e Cyt2, uma segunda etapa de bioensaios foi realizada com as estirpes recombinantes que expressam uma só toxina, nesses bioensaios foi incluída a estirpe recombinante S2010 que apresenta o gene *cry1Ab* (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados da mortalidade dos insetos na concentração de 4000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a caracterização das proteínas.

Estirpes	Massa molecular (kDa)	Proteínas	Mortalidade
S2396	130 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry1B	30%
S2492	72 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry10	80%
S2037	128 (Martins <i>et al.</i> , 2007)	Cry4B	40%
ECE131	73-55	Cry3A	30%
S2038	70-32	Cry11	30%
S2035	30-23	Cyt1A	30%
S2010	130-65	Cry1Ab	30%

Nos bioensaios com as estirpes recombinantes S2396, S2037, ECE131, S2038, S2035 e S2010 apresentaram uma mortalidade entre 30 e 40%, mas a estirpe S2492 destacou-se entre as demais apresentando uma mortalidade de 80% dos insetos.

Em virtude dos resultados de toxicidade apresentados pelas estirpes recombinantes a *A. diaperinus*, fez-se necessário à avaliação da presença dos seus receptores e a atividade de cada proteína. Para isso, as proteínas foram purificadas, solubilizadas, ativadas e biotinizadas.

4.2 Purificação e solubilização das proteínas

A análise do perfil das proteínas solúveis Cry1B, Cry11, Cry10, Cry1Ab, Cry4B, Cry3A e Cyt1A, apresentaram protoxinas e toxinas de tamanho conforme descrito na tabela 5. O perfil dessas proteínas está de acordo com o relato de outros trabalhos (Martins *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2012; Macedo 2012, Gómez *et al.*, 2012 e Ibraim *et al.*, 2013).

Tabela 5: Peso molecular das proteínas recombinantes solúveis e ativadas

Proteína	Peso molecular das protoxinas (solúveis)	Peso molecular das toxinas (ativadas)
Cry 1Ab	130 kDa	65 kDa
Cry 1Ba	130 kDa	60 kDa
Cry 3Aa	73 kDa	55 kDa
Cry 4Ba	128 kDa	46 kDa
Cry 10Aa	72 kDa	62 kDa
Cry 11Aa	70 kDa	30 kDa
Cyt 1A	30 kDa	30 kDa

4.3 Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais

Além dos ensaios com as proteínas totais foram realizados bioensaios com as proteínas Cry individuais.

As seis estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* expressando as toxinas Cry4B, Cry10, Cry1B, Cry11, Cry1Ab e a Cry3A recombinante de *E. coli* apresentaram mortalidade. Mas dentre estas se destaca a proteína Cry10 que apresentou uma mortalidade superior a todas as demais proteínas, atingindo uma mortalidade de 100% das larvas de *A. diaperinus* (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultado de bioensaio contra *A. diaperinus* utilizando as proteínas puras Cry1Ab, Cry1B, Cry11, Cry3A, Cry4B, Cry10 e Cyt1A, na concentração de 250 ng/cm².

Toxinas puras	Mortalidade (a)
Cry1Ab (S2010)	50%
Cry1B (S2395)	30%
Cry11 (S2038)	30%
Cry3A (ECE131)	30%
Cry4B (S2037)	50%
Cyt1A (2035)	30%
Cry10 (S2492)	100%

4.3 Ativação das proteínas com tripsina e com proteases do intestino de *A. diaperinus*

A análise do perfil da ativação das proteínas Cry4B, Cry10, Cry1B, Cry11, Cry1Ab e a Cry3A com tripsina e com proteases do intestino dos insetos mostraram perfis de acordo com o esperado, tamanho conforme indicado na tabela 5 do item 4.2.

Todas as proteínas apresentaram massa molecular semelhante à ativada com tripsina, demonstrando a presença de proteases no suco gástrico dos insetos (Figura 14).

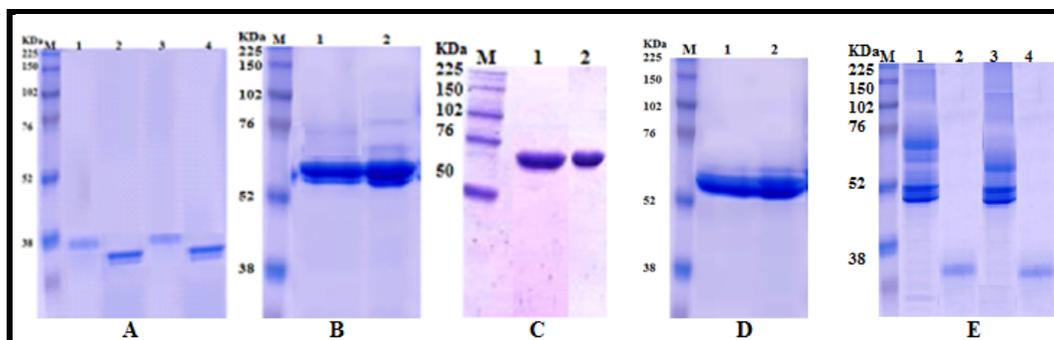


Figura 14: Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS de diferentes proteínas de *B. thuringiensis* ativadas com tripsina ou proteases do intestino de *A. diaperinus* **A:** Ativação das proteínas Cry4B e Cry3A. M: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 1: proteína Cry4B ativada com tripsina, 2: proteína Cry3A ativada com tripsina, 3: proteína Cry4B ativada com protease, 4: Cry3A ativada com protease. **B:** Ativação da proteína Cry1B. M: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 1: proteína Cry1B ativada com tripsina, 2: proteína Cry1B ativada com protease **C:** Ativação da proteína Cry10. M: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 1: proteína Cry10 ativada com tripsina, 2: proteína Cry10 ativada com protease. **D:** Ativação da proteína Cry1Ab. M: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 1: proteína Cry1Ab ativada com tripsina, 2: proteína Cry1Ab ativada com protease. **E:** Ativação das proteínas Cry11 e Cyt1A. M: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 1: proteína Cry11 ativada com tripsina, 2: proteína Cyt1A ativada com tripsina com protease, 3: proteína Cry11 ativada com protease, 4: Cyt1A ativada com protease (SDS-PAGE) 12%.

4.5 Biotinilação das proteínas

A análise do perfil proteico das proteínas ativadas e biotinizadas revelou a presença de perfis para as proteínas Cry1B, Cry11, Cyt1A, Cry10, Cry4B, Cry3A e Cry1Ab (Figura 15).

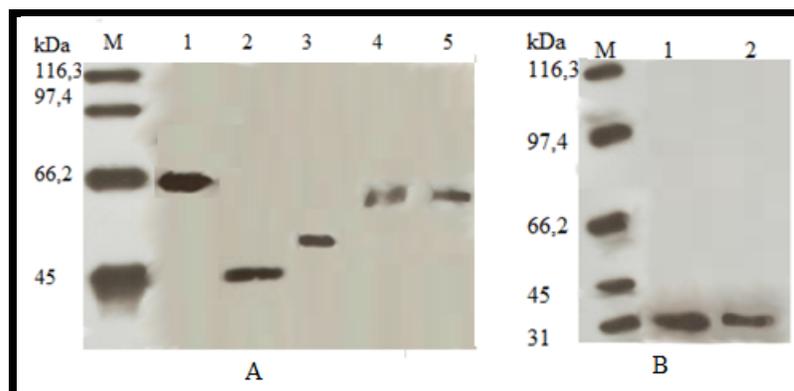


Figura 15 : Biotinilação das proteínas de *B. thuringiensis* : **A:** M. marcador;1. Cry10 (62 kDa), 2. Cry4B (48 kDa), 3. Cry3A (55 kDa), 4. Cry1B (60 kDa), 5. Cry1Ab (65 kDa). **B.** M. marcador;1. Cry11(30 kDa), 2. Cyt1A (30 kDa).

4.6 Ensaio de ligação

As membranas contendo as BBMV's de *A. diaperinus* apresentaram ligações quando submetidas à marcação com as proteínas biotiniladas Cry10, Cry1Ab e Cry4B (Figura 16). Estes resultados indicam que possivelmente o intestino médio das larvas desses insetos apresentam receptores para as proteínas Cry10, Cry1Ab e Cry4B e que estas toxinas são capazes de se ligarem a estes receptores, mas as proteínas Cry1B, Cry11, Cry3A e Cyt1A, não apresentaram ligações, indicando que no intestino das larvas de *A. diaperinus* não há receptores para essas toxinas.

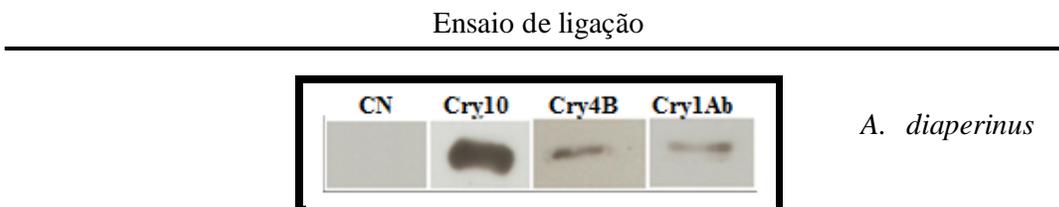


Figura 16: Ensaio de ligação das proteínas biotiniladas Cry10, Cry4B e Cry1Ab aos possíveis receptores intestinais de *A. diaperinus*.

5. DISCUSSÃO

É importante ressaltar que e a primeira vez que se utiliza *B. thuringiensis* visando o controle de *A. diaperinus*. Nossos resultados indicam a possibilidade de uso desta bactéria em programas de manejo desse inseto.

Neste trabalho foram avaliadas a toxicidade de 194 estirpes de *B. thuringiensis* depositadas no Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia contra *A. diaperinus* e a ligação das proteínas do intestino deste inseto.

Entre as estirpes nativas a S1806 apresentou um percentual de mortalidade mais elevada em relação às demais estirpes nativas, mostrando que mesmo sendo *B. thuringiensis israelensis*, apresentou resultados satisfatórios para o coleóptero *A.*

diaperinus. Possivelmente, esta mortalidade mais elevada esteja relacionada a presença dos genes *cry4* e *cry10*, genes específicos para dípteros e coleópteros, na estirpe S1806. Este relato corrobora com alguns trabalhos já realizados com outros coleópteros (Mendes-López *et al.*, 2003 e Martins *et al.*, 2009). A segunda estirpe nativa que também apresentou um percentual de mortalidade significativa foi a estirpe S1122, que provavelmente esteja relacionada com a presença dos genes *cry3* e *cry8*, que expressam proteínas já descritas como tóxicas a coleópteros (Pinto e Fiuza, 2003; Shu *et al.*, 2009).

A partir dessas informações os bioensaios com as estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* e *E. coli*, mostraram toxicidade variáveis quando testadas para larvas de *A. diaperinus*. Observou-se que a atividade tóxica da estirpe recombinante S2492 (Cry10) foi a mais alta para às larvas de segundo estágio de *A. diaperinus*, seguida pelas estirpes recombinantes Cry4B, Cry1B, Cry3A, Cry1Ab e Cyt1A. Esses resultados corroboram com os resultados de Aguiar *et al.*, 2012, que avaliaram a toxicidade da estirpe Cry10 para *Anthonomus grandis*, outro coleóptero de importância agrícola.

A estirpe de *B. thuringiensis* recombinante Cry10 foi a mais eficiente atingindo uma mortalidade de 80% dos insetos. A proteína Cry4B é descrita com atividade tóxica a Dípteros, mas também apresentou toxicidade para *A. diaperinus* como mostrado neste trabalho. Já a proteína Cry1B diferiu em relação a outros estudos e não apresentou uma mortalidade significativa para *A. diaperinus*. Martins *et al.*, 2010 ao avaliarem a toxicidade da proteína Cry1B sobre *Anthonomus grandis* observaram uma mortalidade de 50% dos insetos na concentração de 305,22 µg.mL⁻¹.

Gómez 2012, ao avaliaram a toxicidade da proteína Cry1B sobre *Asymmathetes vulcanorum* (Coleoptera: Curculionidae) verificaram que esta proteína na concentração de 8000 ng/cm causou uma mortalidade de 40% dos insetos.

Nos bioensaios realizados com as proteínas Cry individuais (Cry1B, Cry11, Cyt1A, Cry10, Cry4B, Cry3A e Cry1Ab), purificadas e ativadas, mais uma vez, a proteína Cry10 se destacou apresentando uma mortalidade de 100% dos indivíduos seguidas pelas demais proteínas testadas, isso é um indicativo de que há receptores para Cry10 nas proteínas das membranas do intestino de *A. diaperinus*.

A partir dos resultados dos bioensaios buscou-se avaliar a presença de receptores no intestino das larvas deste inseto. Esta etapa do mecanismo de ação é necessária para que a toxina ativada possa passar por complexos eventos de ligação com diferentes receptores do intestino que levam à sua inserção à membrana e à formação de poros. Portanto, foi utilizado tripsina para simular *in vitro* o que naturalmente ocorre no

intestino dos insetos de forma que as protoxinas Cry fossem ativadas. Para comparar com a tripsina foi utilizado proteases intestinais do inseto, mostrando não haver diferenças entre as duas formas de ativar as proteínas. Dados semelhantes foram relatados por Macedo e colaboradores (2012) com a proteína 1Ab e o suco gástrico de *Diatraea saccharalis*.

As proteínas se ligaram à biotina além do que se mantiveram íntegras após passarem pelo processo de biotilação e que o tamanho esperado das proteínas está de acordo com os encontrados em outros trabalhos (Martins *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2012; Macedo 2012).

Os resultados dos ensaios de ligação indicam que possivelmente o intestino médio das larvas deste inseto apresentam receptores para as proteínas Cry1Ab, Cry4B e Cry10 e que estas toxinas são capazes de se ligarem à estes receptores. Porém, as taxas de mortalidades encontradas para as proteínas Cry4B e Cry1Ab foram inferiores a 50%, enquanto que, para a proteína Cry10 chegou a 100 %. Esses resultados indicam que a proteína Cry10 ligou-se aos receptores específicos causando efeitos deletérios sobre as larvas de *A. diaperinus*. Para as proteínas Cry1B, Cry11, Cyt1A e Cry3A as proteínas do intestino de *A. diaperinus* não apresentaram receptores na concentração testada.

A proteína Cry3 já descrita como toxica a coleópteros, vários estudos corroboram com esta informação, mas neste trabalho e no trabalho de Contreras *et al.* (2013), onde avaliaram a toxicidade das toxinas Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Ca contra *Tribolium castaneum* que é um coleóptero da mesma família do *A. diaperinus*. Para avaliarem a susceptibilidade utilizaram uma única dose de 3 ug da mistura esporo-cristal, depois de sete dias de tratamento, as estirpes produtoras de Cry3Aa, Cry3Ca não foram significativamente ativas em comparação com larvas não tratadas, enquanto que mistura esporo-cristal de Cry3Ba apresentou uma mortalidade de 20% das larvas.

Entre os receptores estudados para espécies de lepidópteros e coleópteros a aminopeptidase e a caderina foram identificados como possíveis receptores para as toxinas Cry1Ab, Cry4A e Cry10 nos estudos de Piggot & Ellar, 2007, Bravo *et al.*, 2007.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estabelecido um protocolo com a finalidade de verificar o efeito tóxico do *B. thuringiensis* a *A. diaperinus*. Das 193 estirpes de *B. thuringiensis* testadas, 10 estirpes apresentaram toxicidade a *A. diaperinus*. Dentre essas, apenas duas estirpes se destacaram: a estirpe nativa S1806 que apresentou 60% de mortalidade e a estirpe de *B. thuringiensis* recombinante S2492 que apresentou uma mortalidade de 80% para *A. diaperinus*. Os resultados obtidos no ensaio de ligação com as membranas contendo as BBMV's das larvas de *A. diaperinus* demonstraram ligações quando submetidas à marcação com biotina das proteínas Cry10, Cry1Ab e Cry4B. Sendo a marcação mais forte com a proteína Cry10. Este resultado contribui para a confirmação da atividade tóxica desta proteína aos possíveis receptores presentes no intestino médio das larvas. Este trabalho contribui para a possível utilização de *B. thuringiensis* para o controle de *A. diaperinus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar RWS, Martins ES, Ribeiro BM, Monnerat RG. Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. *Bt Research*, Vol.3, N.4, 20-28, 2012.

Alves SB, Moraes SB. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: Alves SB. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 765-778, 1998.

Aranda E, Sanchez J, Peferoen M, Güereca L, Bravo. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invert Pathology*, v. 68, p. 203-212, Nov 1996.

Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435, 2007.

Contreras E, Rausell C, Real MD. Proteome Response of *Tribolium castaneum* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Toxin Producing Strains. *Plos One*, Volume 8, January 2013.

Gazoni FL, Flores F, Bampi RA, Silveira F, Bouffleur R, Lovato M. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.79, n.1, p.69-74, jan./mar., 2012.

Gómez JE, López-Pazos SJ, Cerón J. Determination of Cry toxin activity and identification of an aminopeptidase N receptor-like gene in *Asymmathetes vulcanorum* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 111, Issue 1, 15 September, Pages 94–98, 2012.

Ibrahim MA, Griko NB, Bulla LA. The Cry4B toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* kills Permethrin-resistant *Anopheles gambiae*, the principal vector of malaria. *Experimental Biology and Medicine*, 238: 350–359, 2013.

Kuo J, Fox E, MacDonald S. *Sigmastat: statistical software for working scientists*. Users manual. San Francisco: Jandel ScientiWc, 1992.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

Lee MK, Miles P, Chen JS. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 1043-1047, Jan 2006.

Macedo CL, Martins ES, Macedo LLP, Santos AC, Praça LB, Góis LAB, Monnerat RG. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pesq. agropec. bras*, Brasília, v.47, n.12, p.1759-1765, dez. 2012.

Martins ES, Praça LB, Dumas VF, Silva-Werneck J, Sone EH, Waga IC, Berry C, Monnerat, RG. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Biological Control*, v. 40, p. 65-68, 2007.

Martins ES, Monnerat RG, Queiroz PR, Dumas VF, Braz SV, de Souza Aguiar RW, Gomes AC, Sánchez J, Bravo A, Ribeiro BM. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*. Feb;40(2):138-45, 2010.

Méndez-López, IR, Basurto-Ríos & Ibarra. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 11131: 1-5, 2003.

Menezes RS, Dumas VF, Martins ES, Praça LB, Monnerat RG. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Agrotis ipsilon*. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 8, n. 2, p. 1-13, jul./dez. 2010.

Monnerat RG, Santos RC, Barros PC, Batista AC, Berry C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. *Comun Técn.*, n.98, 2003.

Monnerat RG, Silva SF, Silva-Werneck J. O catálogo do banco de germoplasma de bactéria entomopatogênica do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p. 2001.

Monnerat RG, Soares CM, Roberg RA, Dumas VF, Ramos FR, Praça L B, Martins E S, Queiroz PR, Sujii ER. Bt-horus, um biolarvicida a base da *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de *Aedes aegypti*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 220, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Set. 2008.

Monnerat RS, Bravo A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo IS, Azevedo JL (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, p.163-200, 2000.

Pigott CR & Ellar DJ. Role of Receptors In *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71 (2): 255-281, 2007.

Pinto LMN, Fiuza LM. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, v.33, p.699-702, 2003.

Shu C, Yan G, Wang R, Zhang J, Feng S, Huang D, Song F. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela*. Appl Microbiol Biotechnol 84(4):701–707, 2009.

Silva AS, Hoff G, Doyle RL, Santuario JM, Monteiro SG. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. Acta Scientiae Veterinariae, v.33, n.2, p.177-181, 2005.

Silva-Werneck JO and Ellar DJ. Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology. v. 98, p. 320-328, 2008.

Zavala LE, Pardo-López L, Cantón PE, Gómez I, Soberón M, Bravo A. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. The Journal of Biological Chemistry Vol. 287, N. 41, p. 34499, October 5, 2012.

Capítulo IV

Estabelecimento de um marcador
mitocondrial para identificação de
Alphitobius diaperinus.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é um dos setores agropecuários que mais tem crescido nas últimas décadas. O Brasil encontra-se como um dos maiores produtores e exportadores da carne de frango (AVISITE, 2012).

O País se tornou o terceiro produtor mundial e líder em exportação. Atualmente, a carne nacional chega a 142 países. A taxa de crescimento de produção da carne de frango, por exemplo, deve alcançar 4,22%, anualmente, nas exportações, com expansão prevista em 5,62% ao ano, o Brasil deverá continuar na liderança mundial (MAPA, 2012).

Um dos maiores problemas para a avicultura é o controle fitossanitário, pois os galpões de criação são vulneráveis ao aparecimento de insetos e doenças que podem acometer as aves em todas as fases de desenvolvimento (Japp *et al.*, 2010).

A. diaperinus é um inseto-praga que causa grandes problemas a avicultura mundial. É uma espécie cosmopolita que foi introduzida no Brasil através de rações e grãos armazenados e se adaptou as condições dos aviários. Até o momento, não há relatos de outra espécie de *A. diaperinus* no Brasil.

A. diaperinus desempenha um papel importante na transmissão de numerosos agentes patogênicos como vírus (Eidson *et al.*, 1966; Goodwin and Waltman, 1996; Watson *et al.*, 2000, fungos (De Las Casas *et al.*, 1972) e protozoários (Goodwin; Watman *et al.*, 1996). Além disso, o besouro pode servir como fonte de infecção para *Campylobacter* spp. (Bates *et al.*, 2004), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e várias outras bactérias (McAllister *et al.*, 1994; Chernaki-Leffer *et al.*, 2002; Segabinazi *et al.*, 2005; Vittori *et al.*, 2007; Chernaki-Leffer, *et al.*, 2011; *et al.*, Gazoni 2012).

O controle deste inseto-praga está vinculado ao uso de inseticidas, piretróides e organofosforados, e é crescente o número de relatos de populações resistentes a estes compostos (Tomberlin *et al.*, 2008), inclusive no Brasil (Chernaki-Leffer *et al.*, 2011; Gazoni *et al.*, 2012). Em virtude da ocorrência de populações resistentes e da contaminação da carne das aves, novas alternativas de controle têm sido desenvolvidas.

Para que se obtenha sucesso com as novas alternativas de controle é necessário conhecer todas as características fenotípicas e genotípicas deste inseto-praga.

O estabelecimento do perfil genético dos insetos e o desenvolvimento de marcadores que indiquem populações resistentes a inseticidas ou potencialmente transmissoras de doenças (Silva *et al.*, 2010).

A identificação morfológica de certos grupos de insetos é complexa e, por isso, a utilização de marcadores moleculares relacionados às seqüências de nucleotídeos cresceu consideravelmente nos estudos de sistemática durante as últimas décadas (Carreira *et al.*, 2008).

2. Marcadores moleculares

Os dados básicos para esses estudos são gerados pelos marcadores moleculares, que correspondem a sequências de DNA, por exemplo, que ocupam *loci* gênicos específicos e que apresentam polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Sendo assim, marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, (Borém e Caixeta, 2006).

A genética de populações recebeu contribuições importantes que foram fornecidas pelos marcadores moleculares. Essa revolução se deve ao fato de hoje ser possível estudar a genética de qualquer organismo existente. Essa mudança veio com a abundância de dados experimentais gerados pelo uso de métodos moleculares nos estudos dos polimorfismos genéticos.

Com a descoberta da reação em cadeia da polimerase, PCR (Mullis e Faloona, 1987), as análises das sequências de DNA têm sido utilizadas com sucesso para obtenção de dados informativos para a resolução das relações filogenéticas de diversas ordens de insetos, por exemplo, coleópteros *Tribolium molitor* e *Ceutorhynchus neglectus* (Simon *et al.*, 1994; Sagegami-Oba, *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2011).

A técnica de PCR promoveu também o surgimento de novos marcadores moleculares para estudos com insetos como, por exemplo, AFLP (Polimorfismo No Comprimento De Fragmentos Amplificados) (Vos *et al.*, 1995); PCR-RFLP (PCR - Polimorfismo No Comprimento De Fragmentos De Restrição) (Botstein *et al.* 1980); RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) (Williams *et al.*, 1990); Microssatélites; STS-*Sequence Tagged Sites* (sítios marcados por seqüências) (Litt & Luty, 1989); SCAR-*Sequence Characterized Amplified Regions* (regiões amplificadas

caracterizadas por seqüências) (Paran & Michelmore, 1993); SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismo de um único nucleotídeo) (Brumfield 2003) e DNA mitocondrial (mtDNA) (Avice, 2000).

Dentre vários marcadores moleculares utilizados no estudo com insetos, neste trabalho foi utilizado o DNA mitocondrial.

2.1 DNA mitocondrial e o gene citocromo oxidase subunidade I

O DNA mitocondrial é muito utilizado para estudos filogenéticos por ser uma molécula circular pequena que possui um genoma de 16 a 20 quilobases (Kb) nos animais. Desta forma, é relativamente fácil de ser amplificado e seqüenciado, e na grande maioria dos casos, apresenta seqüências com diferentes taxas de evolução, oferecendo informação para a elucidação de vários níveis taxonômicos (Simon *et al.*, 1994, Avice 2000). Ainda, é uma molécula de herança uniparental com baixa taxa de recombinação, com taxa de mutações relativamente altas se comparada ao DNA nuclear o que possibilita investigações da estrutura da população e relações filogenéticas (Li *et al.*, 2007).

Dentre outras características está o fato do DNAm_t ser haplóide, o que faz com que apenas uma seqüência possa ser detectada no organismo (Wells e Stevens, 2008). Possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 genes codificando moléculas de RNAt, três subunidades da enzima citocromo c oxidase (COI, COII e COIII), citocromo B (cytB), subunidades 6 e 8 de ATP F₀ sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L).

Para análises filogenéticas de insetos da ordem Coleoptera é usual a análise dos genes NADH₂ (Borghuis *et al.*, 2009), COI (Zhuang *et al.*, 2011) e COII (Elven *et al.*, 2010) possibilitando a obtenção de dados mais informativos (Arnoldi 2007).

Cerca de 70% dos estudos com marcadores de DNA fazem uso do DNA mitocondrial (DNAm_t) como ferramenta genética (Zhang Hewitt *et al.*, 2003).

O gene mitocondrial da enzima citocromo oxidase subunidade I (COI) vem sendo usado com bastante freqüência em estudos das relações filogenéticas por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (Sahls e Nyblom, 2000) e devido à disponibilidade de iniciadores para amplificar genes inteiros para diferentes grupos de insetos (Simon *et al.*, 1994, Zhuang

et al., 2011). Desta forma, seqüências de COI têm sido empregadas em muitos trabalhos de relações filogenéticas em insetos (Dobler e Muller, 2000; Arnoldi *et al.*, 2007).

2.2.1 PCR

A introdução da técnica de PCR na Biologia Molecular resultou em grande impacto tecnológico, permitindo a amplificação de uma seqüência de interesse contida em uma amostra de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma (Molina *et al.*, 2004).

Para a realização da PCR, utiliza-se uma enzima termoestável (*Taq*DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma seqüência específica de ácido nucléico, a partir de uma fita molde, teoricamente.

O princípio da PCR envolve três etapas básicas: a) Desnaturação da fita molde de DNA; b) Pareamento do iniciador na região a ser amplificada; c) Amplificação por meio da enzima *Taq*DNA polimerase, das novas fitas de DNA. Cada ciclo é repetido em torno de 30 a 35 vezes e promove a amplificação da região alvo em torno de bilhões de vezes (Eisenstein, 1990).

A técnica de PCR em análise molecular de insetos e/ou coleópteros é muito utilizada nos estudos de identificação de insetos.

Takano *et al.* (2012), utilizaram a técnica de PCR para o estudo de *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae). Nowaczyk *et al* (2009), utilizaram esta técnica para a identificação de *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae).

2.2.2 PCR-RFLP

A técnica de reação em cadeia da polimerase seguindo-se a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) é muito utilizada na identificação de insetos por apresentarem uma forma rápida, fácil, e baixo custo para fins de diagnóstico rotina.

Essa técnica utiliza fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de oligonucleotídios iniciadores específicos, seguindo-se a detecção de padrões de polimorfismo entre os indivíduos. O princípio da técnica baseia-se em diferenças no

tamanho dos fragmentos de restrição que são clivados com endonucleases de restrição. As principais vantagens são a co-dominância e a alta reprodutibilidade dos marcadores (Faleiro *et al.*, 2007; Takano *et al.* 2012).

Sukenari *et al* (2009), utilizaram a reação em cadeia da polimerase seguindo do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição para detectar diferenças de variação genética no DNA mitocondrial da região contendo o gene da citocromo-oxidase subunidade I (COI) a subunidade II (COII) em *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae).

No Brasil, não há relatos de estudos utilizando marcadores moleculares como instrumento de análises moleculares para *A. diaperinus*. Para estabelecer medidas fitossanitárias é necessário efetuar um estudo prévio a respeito do inseto.

O estabelecimento de ferramentas moleculares que possibilitem conhecer melhor as populações deste inseto são importantes para a implementação eficaz do manejo integrado/controlado biológico para *A. diaperinus* que é a principal praga da avicultura.

A combinação de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase e do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), tem sido muito útil para identificar espécies em diferentes estágios de vida. A vantagem desta técnica está ligada à rápida e fácil execução, além do baixo custo para uso em rotina (Thyssen *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um marcador molecular para a identificação de *A. diaperinus* e através do mesmo, analisar a variabilidade genética de diferentes populações deste inseto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos indivíduos de *A. diaperinus*

Indivíduos adultos de *A. diaperinus* foram coletados aleatoriamente de camas aviárias, em três propriedades localizadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nove propriedades localizadas nos estados de Goiás e Distrito Federal e da colônia estabelecida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 17). Após a coleta, os adultos foram mantidos em etanol 100% a -20 °C no laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



Figura 17: Mapa do Brasil mostrando os locais de coletas e manutenção. **A.** Distrito Federal: quatro locais de coletas, com as seguintes coordenadas: 1. S 15° 50' 18.41372" / W 47° 30' 56.52028"; 2. S 15° 44' 41.67536" / W 47° 23' 23.74814"; 3. S 15° 53' 36.55779" / W 47° 24' 09.78078"; 4. S 15° 53' 36,6" / W 47° 24' 09.8". **B.** Goiás: cinco locais de coletas distribuídos conforme as seguintes coordenadas: 1. S 15° 54' 09.23172" / W 47° 37' 18.83474"; 2. S 15° 37' 34.72414" / W 47° 32' 21.89731"; 3. S 15° 48' 09.79553" / W 47° 57' 16.78057"; 4. S 16° 07' 45.8" / W 48° 13' 06.2" ; 5. S 15° 35' 25.4" / W 48° 12' 38.9". **C.** Colônia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: uma colônia com a seguinte coordenada: S 15° 43' 24" / W 47° 54' 9". **D:** Paraná: um local de coletas com a seguinte coordenada: S 24° 24' 01.95", W 51° 69' 13.18". **E.** Santa Catarina: um local de coletas com a seguinte coordenada: S 31° 43' 1" / W 52° 18' 32". **F:** Rio Grande do Sul: um local de coleta com a seguinte coordenada: S 27° 4' 32" / W 48° 54' 24"

3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total foram utilizados dez indivíduos adultos de cada população. O protocolo para esse procedimento foi adaptado de Ayres *et al* (2002).

Indivíduos adultos de *A. diaperinus* foram macerados da seguinte maneira:

Em tubos plásticos de 1,5 mL previamente identificados foi adicionado um indivíduo e macerado com bastão de vidro. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de extração (0,4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8,0, 120 µg mL⁻¹,

proteínase K e 1,5% SDS) aos tubos com o macerado. Estes homogenatos foram incubados a 65 °C por 3 h e, após esse tempo, foram adicionados 420 µL de NaCl 5M. Os tubos foram invertidos várias vezes para homogeneização e centrifugados por 20 minutos a 12000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para novos tubos também previamente marcados e foram adicionados 500µL de isopropanol gelado, que foi misturado suavemente ao sobrenadante que estava no tubo e esse foi deixado em repouso por 16 h a -20 °C para precipitação do DNA. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante descartado, permanecendo o sedimento de DNA.

Foi realizada uma lavagem com 300 µL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, repetindo-se a centrifugação durante 5 minutos a 12000 rpm. A última lavagem foi feita com a adição de 500 µL de etanol 70% (v/v) durante 10 minutos a 12000 rpm. Os DNA's precipitados foram secos em temperatura ambiente. Cada DNA extraído foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE 0,1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 1% RNase (10 mg/mL)(Invitrogen). As amostras foram então armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

3.3 Quantificação dos DNAs das amostras

As amostras de DNAs foram quantificadas utilizando o kitQubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Para confirmação do grau de integridade dos DNA's extraídos foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 1X TBE (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM). A visualização das amostras de DNA foi feita por imersão em solução de brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/ml. O deslocamento eletroforético das amostras em gel de agarose foi realizado por 1 h e 20 minutos a uma voltagem de 80 V. Ao final, as amostras de DNA foram fotografadas em fotodocumentador (BIO RAD-GEL DOC 1000), utilizando-se o software QuantityOne^R (BIO RADTM, HERCULES, CA, USA).

A quantidade de DNA obtido para cada amostra foi estimada pela comparação com DNA de Fago Lambda (Invitrogen) com concentrações conhecidas de 100, 300 e 500 ng/µL. A concentração de DNA foi estimada por meio da comparação visual das intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo em fotodocumentador (BIO RAD-GEL DOC 1000), utilizando-se o software QuantityOne^R (BIO RADTM, HERCULES, CA, USA).

3.4 Reação de PCR para o gene DNA mitocondrial Citocromo Oxidase I

A amplificação da região COI do DNA mitocondrial foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos COI-F (Forward) 5' TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT 3' e COI-R (Reverse) 5' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A 3' (Invitrogen) de acordo com a metodologia de Simon *et al.* (1994) em termociclador PTC 100 (MJ Research, BIORAD).

A reação foi realizada em 20 µL de uma solução contendo 2,5 µL de tampão (Tris-HCl 6mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM,) na concentração 10X; 0,5 µL dNTP (10 mM); 0,5 µL de cada iniciador (10 µM); 0,25 µL *Taq* DNA Polymerase (2,5 U/µL) e 5 µL de DNA (5 ng).

A reação de PCR consistiu em um passo de desnaturação inicial de 94 °C por dois minutos, seguido-se 38 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 46 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. Em todas as reações realizadas, foram incluídos controles negativos contendo água para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR.

Uma alíquota de 5µL de cada produto de PCR foi visualizada em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados em um fotodocumentador (BIO RAD-GEL DOC 1000), utilizando-se o software Quantity One^R (BIO RADTM, HERCULES, CA, USA). O tamanho dos fragmentos foram estimados pela comparação com padrões de massa molecular 100 bp Ladder (GE Healthcare).

3.5 Sequenciamento

Foram selecionados para seqüenciamento 39 produtos de amplificação do gene COI provenientes das várias amostras de *A. diaperinus* coletadas nas várias localidades, sendo três amostras de cada população.

Os produtos de amplificação foram purificados do gel de agarose utilizando-se o *Kit* Illustra GFXTM PCR DNA ou Gel Band Purification Kit (GE) de acordo com as recomendações do fabricante. Após as purificações, as amostras de DNA de *A. diaperinus* foram quantificadas em gel de agarose 1,5%. O produto de amplificação do

gene COI de *A. diaperinus* foi então encaminhado para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As reações foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando-se o programa Base Caller KB. As sequências obtidas neste estudo foram analisadas e encaminhadas para depósito no GenBank.

3.6 Análise das sequências

As sequências consenso foram alinhadas através do ClustalW 1.8 (Thompson *et al.* 1997), implementado através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v.7.0.5.3 (Hall, 2001). Logo após, as sequências foram submetidas ao Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de modo a confirmar o posicionamento taxonômico das mesmas. A seguir, foi realizada a conversão da sequência de nucleotídeos para a sequência de aminoácidos. Posteriormente, os sítios de restrição com potencial de uso foram identificados através de ferramentas disponíveis no Sequence manipulation suite (www.bioinformatics.org/sms/).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências descritas no GenBank para outros insetos.

3.7 Digestão do DNA mitocondrial

A digestão de fragmentos de PCR foi baseada no protocolo da enzima. Alíquotas de 250 ng dos produtos amplificados foram digeridos com a enzima *HaeIII* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Cada reação continha a enzima na concentração final de 3 U/ μ L, tampão One-Phor-All (GE Healthcare) na concentração 1X (GE Healthcare) e água milli-Q para um volume final de 20 μ L e incubada a 37°C por 16 horas.

O tamanho dos fragmentos de restrição gerados pela digestão com a enzima de restrição foi revelado por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 80 V. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV em fotodocumentador (BIO RAD-GEL DOC 1000), utilizando-se o software Quantity One^R (BIO RADTM,

HERCULES, CA, USA) utilizando como referência padrões de massa molecular 100 pb Ladder (GE Healthcare).

3.8 Validação do marcador mitocondrial

Adultos das espécies *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Plutella xylostela* (Lepidoptera: Yponomeutidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) foram utilizados para validar a metodologia proposta. Para isso foi realizado PCR utilizando o oligonucleotídeo COI com o DNA de 3 grupos de 10 insetos de cada espécie e os produtos obtidos foram digeridos com a enzima *HaeIII*, de acordo com os protocolos anteriormente descritos.

4. RESULTADOS

A metodologia de extração de DNA que foi adaptada de Ayres *et al.* (2002) gerou DNA em quantidade e com qualidade suficiente para ser utilizado nas análises moleculares de *A. diaperinus*. A quantidade média de DNA obtido a partir da quantificação dos DNAs extraídos das várias amostras de *A. diaperinus* provenientes das várias localidades de coleta foi em média de 11,52 µg/mL ± 9,23.

Essa amplitude de concentração deveu-se ao tamanho do inseto, ao estágio de desenvolvimento e à integridade do mesmo no momento da coleta. Esse método de extração caracterizou-se pela rapidez, simplicidade, baixo custo operacional e por não usar solventes orgânicos tais como, o fenol.

Na literatura não há relatos de estudos com marcadores moleculares para *A. diaperinus*, em razão disso, buscou-se trabalhos com outros insetos da ordem Coleoptera para que fosse possível localizar alguns exemplos de marcadores moleculares para serem utilizados nos estudos com *A. diaperinus*. Nesse levantamento bibliográfico, foram encontrados alguns trabalhos com *Tribolium castaneum* utilizando marcadores moleculares a partir de DNA mitocondrial. Dessa forma, por essa espécie ser da mesma família do *A. diaperinus*, foram selecionados oligonucleotídios do DNA mitocondrial que haviam sido desenhados para *T. castaneum*, por Simon, em 1994.

Analisando os perfis eletroforéticos de *A. diaperinus* que apresentaram as ampliações do gene Citocromo oxidase I do DNA mitocondrial, observou-se um fragmento de 850 pb para todas as amostras analisadas (Figura 18). Para cada grupo de amostras testadas foi realizado um controle negativo com água cujo resultado foi ausência de amplificação nos géis.

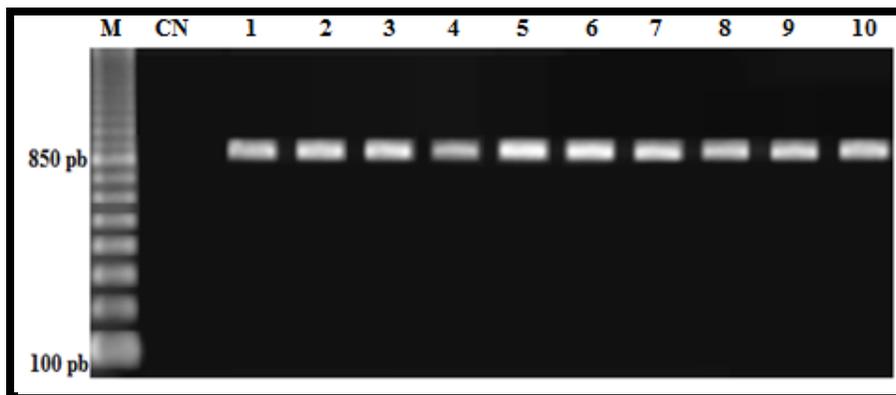


Figura 18: Amplificação do gene mitocondrial da citocromo oxidase I das várias populações de *A. diaperinus* coletadas em granjas das regiões Centro-Oeste e Sul, mostrando em M: o marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder; CN: controle negativo com água; 1. Amostra de *A. diaperinus* do PADF, 2. Amostra de *A. diaperinus* de Alexânia, 3. Amostra de *A. diaperinus* de Santo Antônio do Descoberto, 4. Amostra de *A. diaperinus* de Planaltina, 5. Amostra de *A. diaperinus* de Braslândia, 6. Amostra de *A. diaperinus* de Sobradinho, 7. Amostra de *A. diaperinus* do Paraná, 8. Amostra de *A. diaperinus* de Santa Catarina, 9. Amostra de *A. diaperinus* do Rio Grande do Sul, 10. Amostra de *A. diaperinus* da Colônia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Os dados obtidos no sequenciamento dos 39 produtos de amplificação foram analisados com o programa Bioedit, e as seqüências foram alinhadas e encaminhadas para depósito no genbank.

A partir da análise da seqüência gerada tanto pelo contig quanto pelo alinhamento observou-se que não houve diferença entre todas as seqüências analisadas, mostrando que não há variabilidade entre as populações em estudo quanto à seqüência correspondente à subunidade I do gene citocromo oxidase, pois não há diferenças entre as sequencias de *A. diaperinus*.

Após o alinhamento as seqüências de *A. diaperinus* foram comparadas com as seqüências de outros coleópteros já depositados no Genbank (Tabela 7). Essa análise indicou uma alta identidade entre as seqüências de outros coleópteros. A seqüência de *Gonocephalum* sp. apresentou uma identidade de 93%, *Litostylus* sp. apresentou uma identidade de 94%, *Anaspis thoracica* apresentou uma identidade de 94% e *Necrophila americana* apresentou 96% de identidade. Todas as seqüências acima ao serem comparadas com *A. diaperinus* apresentaram alinhamento em uma região correspondente a 117 nucleotídeos. Dentre esses nucleotídeos analisados, *A. diaperinus* apresenta várias transições, transversões e deleções em sua seqüência (Figura 19).

Tabela 7: Identidade da seqüência do gene citocromo oxidase I entre as várias espécies de Coleoptera quando comparadas com *A. diaperinus*.

Código do Genbank	Descrição da seqüência	Identidade (%)
GU176343.1	<i>Necrophila americana</i> mitochondrion, complete genome	96%
FJ904068.1	<i>Anaspis thoracica</i> voucher UPOL ZL0199 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	94%
GQ980907.1	<i>Atheta crassicornis</i> voucher ZMUN:10002640 cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; tRNA-Leu (trnL) gene, complete sequence; and cytochrome oxidase subunit 2 (CO2) gene, complete cds; mitochondrial	93%
HQ891471.1	<i>Litostylus</i> sp. 2 AMV2011b cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	93%
FN544407.1	<i>Gonocephalum</i> sp. GON2 mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, specimen voucher BMNH 829780	93%
DQ155999.1	<i>Oxypoda acuminata</i> voucher BMNH 676873 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	93%
FM876327.1	<i>Dailognatha quadricollis</i> mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase I, specimen voucher BMNH:723109	92%
FN544670.1	<i>Pedinus</i> sp. PED6 mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, specimen voucher BMNH 829471	92%
EU164694.1	<i>Metophthalmus haigi</i> isolate CO480 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	92%
GQ980908.1	<i>Atheta modesta</i> voucher ZMUN:10002621 cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; tRNA-Leu (trnL) gene, complete sequence; and cytochrome oxidase subunit 2 (CO2) gene, partial cds; mitochondrial	92%
FN548435.1	<i>Zyzyva</i> sp. SPN-001 mitochondrial partial COI gene for cytochrome c oxidase subunit I, specimen voucher BMNH:826602	92%
FJ749938.1	<i>Halorhadinus aequalis</i> voucher NIBR:CNUIC-KTOL-0014 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	92%
EU110971.1	<i>Ceutorhynchus contractus pallipes</i> isolate 467 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	92%
AB671259.1	<i>Curtos costipennis</i> mitochondrial COI, COII genes for cytochrome oxidase subunit 1, cytochrome oxidase subunit 2, partial cds, specimen_voucher: personal: Masahiko Muraji: K121_ISG	91%
AB606433.1	<i>Necrodes nigricornis</i> mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, isolate: 1801	91%
HQ382984.1	<i>Mada glymbus</i> sp. BI-2011 voucher BMNH798452 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	91%
HQ883628.1	<i>Cryptorhynchini</i> gen. sp. 2 BHJ-2011 voucher Crh_sp2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	91%
FR733476.1	<i>Platynectes</i> sp. MB2722 mitochondrial partial cox1 gene for cytochrome c oxidase 1, isolate MB2722	91%

* As seqüências de *T. castaneum* e *T. molitor* depositadas no GenBank não apresentaram identidade significativa com a seqüência de *A. diaperinus*.

Coleópteros da família tenebrionidae não apresentaram seqüências com identidade significativa.

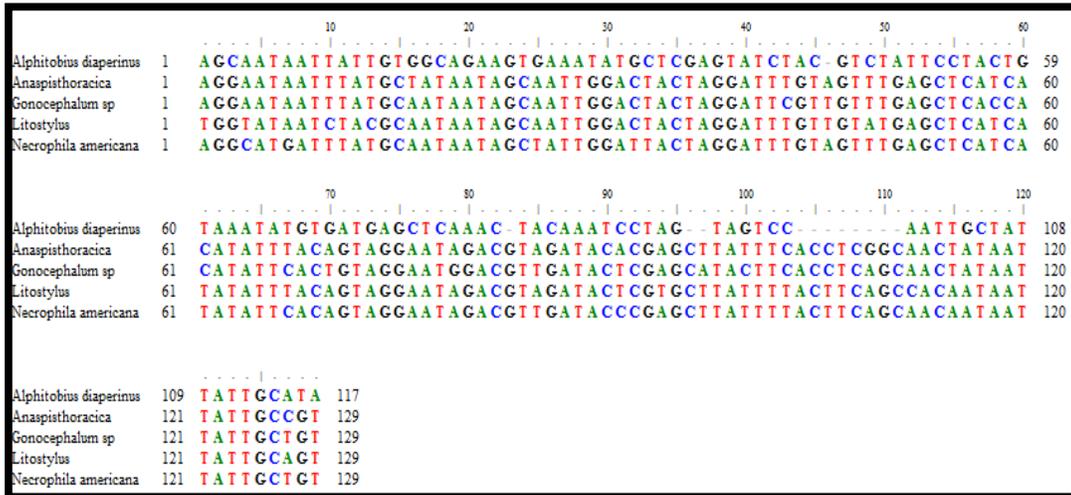


Figura 19: Alinhamento de uma seqüência de 117 nucleotídeos da subunidade I do gene da região citocromo oxidase de diferentes espécies de coleópteros que apresentaram identidade com *A. diaperinus*.

A análise de identidade mostrou que as seqüências são todas pertencentes a ordem Coleoptera, as seqüências de *A. diaperinus* foram analisadas no Sequence Manipulation Suite (SMS) (www.bioinformatics.org/sms/), para selecionar sítios de restrição candidatos para a metodologia do PCR-RFLP visando a obtenção de perfis de restrição (Figura 20).

Posição na seqüência de <i>A. diaperinus</i>	Alteração
3 e 84	Transversão = C ↔ G
11, 27, 28, 62, 65, 86 e 129	Transversão = A ↔ T
15, 24, 55, 58, 68, 88, e 114	Transição = T ↔ C
17, 20, 59, 67, 72, e 116	Transversão = G ↔ A
18, 33, 42, 45, 54, 77, 98 e 117	Transição = C ↔ T
29, 39, 62, 65, 86 e 129	Transição = T ↔ G
30, 44, 70 e 79	Transição = A ↔ G
36	Transversão = G ↔ T
46	Deleção = A ↔ T
83	Deleção = G
96	Deleção = C
97	Deleção = T e A
104 a 111	Deleção = A, C, T e G

Figura 20: Mutações encontradas na seqüência de DNA do *A. diaperinus* em relação às seqüências de *Anaspisthoracica*, *Gonocephalum sp.*, *Litostylus sp.*, *Necrophila americana*. Os números indicam os nucleotídeos da seqüência e como referência o primeiro nucleotídeo encontrado é o de *A. diaperinus*.

O alinhamento das sequências de aminoácidos mostrou que existem diferenças entre os insetos (Tabela 8).

Tabela 8: Aminoácidos encontrados na conversão da sequência de nucleotídeos do DNA de *A. diaperinus* em relação aos aminoácidos de *Anaspisthoracica*, *Gonocephalum sp.*, *Litostylus sp.*, *Necrophila americana*. Os números indicam os aminoácidos da sequência e como referencia o primeiro aminoácido encontrado é o de *A. diaperinus*.

Posição na sequência de <i>A. diaperinus</i>	Alteração em relação aos demais insetos
4	Tirosina por Lisina
7	Arginina por Asparagina
10	Deleção em <i>A. diaperinus</i> e Triptofano nos demais insetos
12	Deleção em <i>A. diaperinus</i> Treonina nos demais insetos
13	Ácido glutâmico por Arginina
22	Valina por Lisina
25 e 28	Tirosina por Arginina
26	Cisteína por Asparagina
30	Metionina por Tirosina
40	Tirosina por Asparagina
8	Sem alteração todos com Serina
14	Sem alteração todos com Isoleucina
18	Sem alteração todos com Serina
19	Sem alteração todos com Serina
41	Sem alteração todos com Tirosina
42	Sem alteração todos com Cisteína

A técnica de RFLP é um dos muitos tipos de marcadores moleculares que são capazes de detectar variações em sequências de DNA de 4 a 8 pares de base. Reconhecidas por enzimas de restrição, são capazes de clivar o DNA por reconhecimento de sequências.

Após a análise de identidade buscou-se selecionar sítios de restrição candidatos para a metodologia de PCR-RFLP (Tabela 8).

Thyssen *et al.*, 2005 e colaboradores avaliaram a diferenciação de estágios imaturos de duas moscas necrófagas utilizando o gene COI e a técnica de PCR-RFLP, o que permitiu diferenciação precisa entre adultos das duas espécies *Hemilucilia*, seja

por meio de uma análise independente (a digestão de uma região específica) ou a análise combinada (múltiplas digestões em ambas as regiões).

Na busca por sítios de restrição candidatos a metodologia do PCR-RFLP, foram encontrados vários sítios de restrição e enzimas candidatas (Tabela 9).

Tabela 9: Principais sítios de restrição obtidos a partir da análise da sequência do gene da citocromo oxidase I de *A. diaperinus*.

Enzima e sítio de restrição	Posição
<i>AccII</i> cg cg	90, 216
<i>AluI</i> ag ct	506, 662
<i>AvaI</i> c ycgrg	621
<i>BfaI</i> c tag	234, 678
<i>BstUI</i> cg cg	90, 216
<i>EcoRV</i> gat atc	14
<i>HaeIII</i> gg cc	309
<i>SspI</i> aat att	174
<i>SstI</i> gagct c	664
<i>TaqI</i> t cga	622
<i>HpaII</i> c cgg	464
<i>MspI</i> c cgg	464
<i>NlaIII</i> catg	426, 546
<i>NruI</i> tcg cga	90
<i>PhoI</i> gg cc	309
<i>PstI</i> ctgca g	28
<i>SacI</i> gagct c	664
<i>TliI</i> c tcgag	621
<i>XhoI</i> c tcgag	621

Dentre as enzimas encontradas para a sequência de *A. diaperinus* selecionou-se a enzima *HaeIII*, em virtude do tamanho dos fragmentos serem de 309 pb (Tabela 8). Com isso, os fragmentos de 850 pb seriam clivados pela enzima *HaeIII* próximo a metade do seu tamanho total.

O produto de amplificação correspondente a subunidade I do gene mitocondrial COI foi submetido à digestão com a enzima de restrição *HaeIII*.

A análise da identidade das sequências permitiu selecionar a enzima *HaeIII*, como sítio de restrição de *A. diaperinus*. O perfil de restrição obtido resultou em dois fragmentos de aproximadamente 340 e 510 pb (Figura 21).



Figura 21 – Digestão do produto de PCR do gene mitocondrial COI com a enzima de restrição *Hae*III das amostras de *A. diaperinus* coletadas a partir de granjas das regiões Centro-Oeste e Sul, mostrando em M, o marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder; 1. Amostra de *A. diaperinus* do PADF, 2. Amostra de *A. diaperinus* de Alexânia, 3. Amostra de *A. diaperinus* de Santo Antônio do Descoberto, 4. Amostra de *A. diaperinus* de Planaltina, 5. Amostra de *A. diaperinus* de Braslândia, 6. Amostra de *A. diaperinus* de Sobradinho, 7. Amostra de *A. diaperinus* do Paraná, 8. Amostra de *A. diaperinus* de Santa Catarina, 9. Amostra de *A. diaperinus* do Rio Grande do Sul, 10. Amostra de *A. diaperinus* da Colônia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os produtos de digestão do gene são de 340 pb e de 510 pb.

Uma vez estabelecido o perfil de digestão do gene COI para *A. diaperinus*, este protocolo foi testado para outros insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera para avaliar se o PCR-RFLP estabelecido adequa-se, especificamente, à identificação de *A. diaperinus*. A PCR realizada com o DNA obtido a partir de amostras de insetos das ordens Coleoptera (*Anthonomus grandis*, *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor*), Lepidoptera (*Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostela*, *Spodoptera frugiperda*), Diptera (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*) gerou um produto de 850 pb, semelhante ao obtido para *A. diaperinus* (Figura 22).

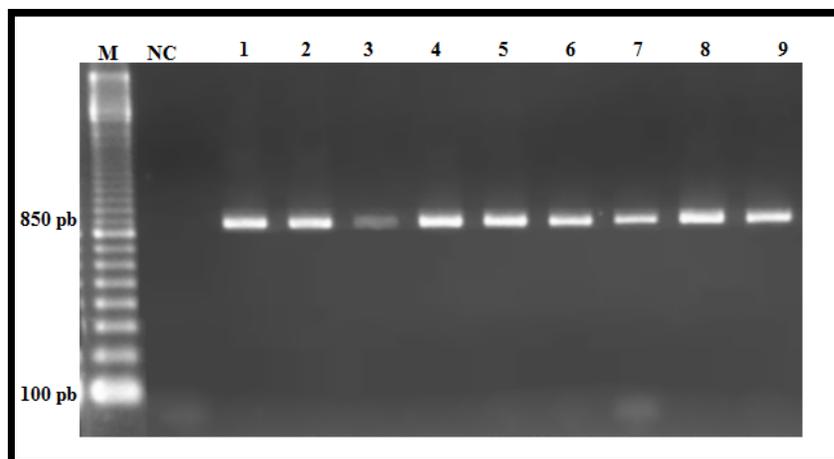


Figura 22: Produto de amplificação do gene mitocondrial COI em diferentes insetos. M: marcador 100 pb; CN: controle negativo com água, 1: *A. diaperinus*; 2: *A. grandis*; 3: *T. molitor*; 4: *T. castaneum*; 5: *P. xylostela*, 6: *A. gemmatalis*, 7: *S. frugiperda*, 8: *A. aegypti*, 9: *C. quinquefasciatus*.

Os fragmentos obtidos a partir dos produtos de PCR com DNA de outros insetos apresentaram diferentes tamanhos ou não foram digeridos pela enzima *HaeIII*, diferente dos produtos de PCR de *A. diaperinus* que geraram fragmentos de 340 pb e 510 pb. (Figura 23). Os produtos de PCR de *Anthonomus grandis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostela*, *Spodoptera frugiperda*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* não foram digeridos pela enzima *HaeIII*. O produto gerado com o *Tenebrio molitor*, apresentou fragmentos de 150 pb e 340 pb, *Tribolium castaneum* fragmentos de 150 pb, 300 pb, 310 pb e 420 pb.

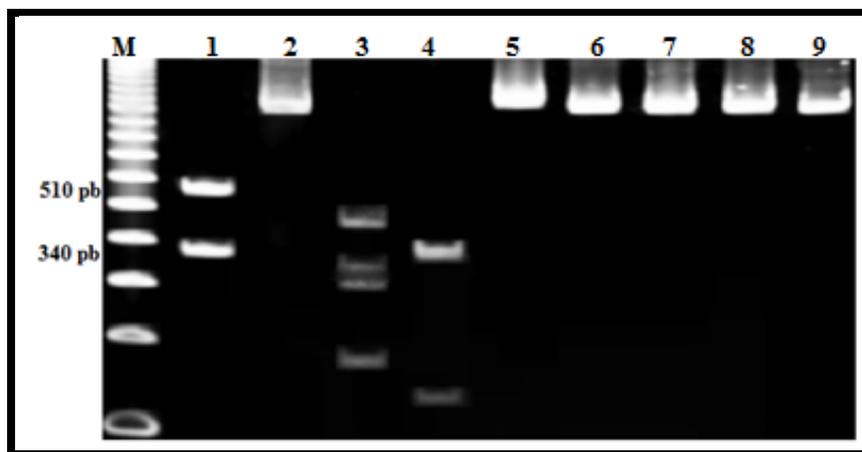


Figura 23: Perfil da digestão do gene COI com a enzima *HaeIII* de diferentes insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera. M: marcador 100 pb; 1: *A. diaperinus*; 2: *A. grandis*; 3: *T. molitor*; 4: *T. castaneum*; 5: *P. xylostela*, 6: *A. gemmatalis*, 7: *S. frugiperda*, 8: *A. aegypti*, 9: *C. quinquefasciatus*.

5. DISCUSSÃO

Na literatura não há relatos de estudos com marcadores moleculares para *A. diaperinus* e, em razão disso, buscou-se trabalhos com outros insetos da ordem Coleoptera para que fosse possível realizar estudos com *A. diaperinus*.

Os resultados obtidos após a PCR e a digestão enzimática permitiram verificar que não houve variabilidade entre os indivíduos de uma mesma localidade e entre indivíduos de localidades distintas. É importante salientar alguns desses locais apresentam distancias superiores a 1,000 quilômetros. Trabalhos de variabilidade genética realizados através de RAPD-PCR com *P. xylostella* mostraram que havia semelhanças entre populações muito afastadas geograficamente, sugerindo irradiação desta espécie (Monnerat *et al.*, 2004).

Simon (1994) em seus estudos com *Tribolium castaneum* verificou a presença de um fragmento de 869 pb correspondente ao gene da citocromo oxidase I quando utilizou os mesmos iniciadores anteriormente descritos.

Trabalhos realizados com *T. castaneum* possibilitaram a seleção de um marcador para esta espécie (Simon *et al.*, 1994 e Angelini e Jockusch, 2008). Por ser *A. diaperinus* da mesma família do *T. castaneum*, os mesmos oligonucleotídios de DNA mitocondrial foram utilizados neste estudo.

No presente trabalho, a semelhança foi detectada através do gene de DNA mitocondrial, que é mais conservado e muito utilizado no estudo de variabilidade genética entre populações e espécies e também para identificar e investigar as relações evolutivas e biogeográficas de algumas famílias de coleópteros e dípteros (Harvey *et al.*, 2003; Alessandrini *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 2011).

O gene COI provou ser particularmente adequado como um marcador molecular para estudos evolutivos e taxonômico em insetos. Com efeito, a análise de PCR-RFLP de COI providenciou marcadores de diagnóstico para a identificação de espécies em vários grupos diferentes (Simon *et al.*, 1994).

A técnica de PCR-RFLP utilizando gene COI gerou perfis diferentes quando aplicada em outros insetos como os coleópteros *Anthonomus grandis*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e os lepidópteros *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda*, possibilitando a diferenciação do *A. diaperinus*.

Esses resultados sugerem que o PCR-RFLP utilizando gene COI pode servir tanto para identificar a espécie quanto para realizar estudos de variabilidade genética e dispersão populacional de *A. diaperinus*.

6. CONCLUSÃO

O protocolo de extração que foi utilizado neste trabalho produziu DNA íntegro para as reações de amplificação, usando os oligonucleotídios de mtDNA.

Foi estabelecido um marcador para identificação de *A. diaperinus*.

As informações obtidas poderão contribuir para o melhor conhecimento da espécie *A. diaperinus*, podendo futuramente ser utilizada para traçar estratégias de controle deste inseto- praga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandrini F, Mazzabti M, Onofri V, Turchi C, Tagliabracci A. MtDNA analysis for genetic identification of forensically important insects. *Foren Scien Inter: Genetics Supplement Series 1* (1): 584-585, 2008.

Alves L, Voss-Rech D, Pozza J, Silva VS, Vaz CSL. Detecção por PCR de *Campylobacter* termófilos em materiais de frangos de corte obtidos em frigorífico. In: CONFERÊNCIA FACTA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011, Santos. Resumos, Santos: FACTA, 2011.

Angelini and Jockusch. Relationships among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Mol Phyl Evol* January; 46 (1): 127–141, 2008.

Arnoldi FGC, Ogoh K, Ohmiya Y, Viviani VR. Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence. *Gene* 405, 1-9, 2007.

Avice JC. Harvard University Press; Cambridge, MA: Phylogeography: the history and formation of species, 2000.

AVISITE. <http://www.avisite.com.br>. Consultado em 26/11/2011.

Ayres CFJ, Romão TPA, Melo-Santos MAV, Furtado AF. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Osw Cruz* 97: 871-875, 2002.

Bates C, Hiett KL, Stern, NJ. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Diseases*, v.48, p.138-147, 2004.

Borém A, Caixeta ET. Marcadores moleculares – Viçosa, MG, 374p, 2006.

Borghuis A, Groenendaal J, Madsen O and Ouborg J. Phylogenetic analyses of the leaf beetle genus *Galerucella*: Evidence for host switching at speciation? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 361–367, 2009.

Botstein D, White KL, Skolnick M and Davis RW: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331, 1980.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) as markers in phylogeography. *Trends Ecol Evol.* 18:249–256, 2003.

Carreira GA, Arantes LC, Lima LHC, Queiroz PR. Levantamento e caracterização da díptero fauna necrófaga em uma localidade de Brasília. *Universitas: Ciências da Saúde.*, Brasília, v. 6, n. 2, p. 87-102, jul./dez. 2008.

Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM, Almeida, LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no Oeste do Estado do Paraná, Brasil. *Rev Bras de Ciên Avícola*, v.4, n.3, p.243-247, 2002.

Chernaki-Leffer AM, Sosa-Gómez DR, Almeida LM, Lopes ION. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. *Rev Bras de Entom*, v.55, p.125-128, 2011.

De Las Casas E, Harein PK, Pomeroy BS. Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. *Environmental Entomology*; 1(1): 27-30, 1972.

Dobler S, Müller JK. Resolving Phylogeny at the Family Level by Mitochondrial Cytochrome Oxidase Sequences: Phylogeny of Carrion Beetles (Coleoptera, Silphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Volume 15, Issue 3, p. 390–402, 2000.

Eidson CS, Schmittle SC, Goode RB, Lal JB. Induction of leukosis tumors with the beetle *Alphitobius diaperinus*. *Amer Journ Veter Resea*; 27(119):1053-7, 1966.

Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 322, n. 3, p. 178-183, Jan. 18. 1990.

Elven H, Bachmann L, Gusarov VI. Phylogeny of the tribe Athetini (Coleoptera: Staphylinidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 84–100, 2010.

Faleiro FG. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p, 1998.

Gazoni FL, Flores F, Bampi RA, Silveira F, Boufleur R, Lovato M. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. Arq Inst Biol, São Paulo, v.79, n.1, p.69-74, jan./mar, 2012.

Goodwin MA, Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, Viruses, and bacteria to the chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. Jour of Appl Poul Res; 5: 51-55, 1996.

Harvey J A, Van Dam NM, Gols R. Interactions over four trophic levels: food plant quality affects development of a hyperparasitoid as mediated through a herbivore and its primary parasitoid. Jour of An Ecol, Oxford, GB, v. 72, p. 520-531, 2003.

Japp AK, Bicho CL, Silva AVF. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. Ciência Rural, v.40, n.7, jul, 2010.

Jenkins TM and Eaton TD. Population genetic baseline of the first plataspid stink bug symbiosis (Hemiptera: Heteroptera: Plataspidae) reported in North America. *Insects* 2: 264-272, 2011.

Litt SM, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetic, v. 44, p. 397-401, 1989.

Li X, Ogoh K, Ohba N, Liang X, Ohmiya Y. Mitochondrial genomes of two luminous beetles, *Rhagophthalmus lufengensis* and *R. ohbai* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). Gene 392(1-2):196-205, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura. <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso: [Acessado em 22 dezembro 2012.](#)

Mcallister JC, Steelman CD, Skeeles JK. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella Typhimurium* (Eubacteriales:

Enterobacteriaceae). Jour of Med Entom, v.31, p.369-372. Poultry Science 1995; 74: 45-9, 1994.

Molina AL, Tobo PR. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico, 2004. Disponível em: <http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>. Acessado em 10 de maio de 2011.

Monnerat RG, Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, Butt TM, Bordat D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por susceptibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. Hort Bras, v.2, n.3, p.441-443, jul-set, 2004.

Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-50, 1987.

Nowaczyk K, Obrepalska-Stepłowska A, Gawlak M, Throne JE, Olejarski P, Nawrot J. Molecular techniques for detection of *Tribolium confusum* infestations in stored products. J. Econ. Entomol. 102 (4): 1691–169, 2009.

Paran L and Michelmore RW. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce . Theor . Appl. Genet. 85: 985-993, 1993.

Sahls G, Nyblom K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. Mol. Phylogen. Evol., v. 15, p. 235-241, 2000.

Sagegami-Oba R, Oba Y, Ôhira H. Phylogenetic relationships of click beetles (Coleoptera: Elateridae) inferred from 28S ribosomal DNA: Insights into the evolution of bioluminescence in Elateridae. Mol. Phylogenet. Evol. 42(2), 410- 421, 2007.

Segabinazi SDS, Flores ML, Silva Barretos A, Jacobsen G, Eltz RD. Bactérias da família enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granja avícolas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Act Scien Vet, v.33, n.1, p.51-55, 2005.

Silva PRQ, Martins ES, Sallet L, Monnerat RG. Análise da variabilidade genética de *Alphitobius diaperinus* utilizando marcadores moleculares de DNA. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v. 8, n. 2, p. 55-68, jul./dez. 2010.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, and Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol Soc Am* 87:651–701, 1994.

Sukenari, S. Miyazaki, I.; Yamamoto, T.; Minoura, K. PCR-RFLP for a study of genetic variation of mitochondrial DNA in sweet potato weevil *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service*, Mar 2009.

Takano S, Takasu K, Fushimi T, Ichiki RT, Nakamura S. Life history traits and damage potential of an invasive pest *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae) on *Satakentia liukiuensis*. *Entomological Science*. [V. 15, Issue 2](#), p. 238–245, April 2012.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nuc Ac Res* 25 (24) pp. 4876–4882, 1997.

Thyssen JP, Lessinger AC, Azeredo-Espin ANL and Linhares AX. The Value of PCR-RFLP Molecular Markers for the Differentiation of Immature Stages of Two Necrophagous Flies (Diptera: Calliphoridae) of Potential Forensic Importance. *Neotropical Entomology* 34(5):777-783, 2005.

Tomberlin JK, Richman D, Myers HM. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) from Broiler Facilities in Texas to Four Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v.101 n.2, p.480-483, 2008

Vittori J, Schocken-Iturrino P, Trovó KP, Ribeiro CAM, Barbosa GG, Souza LM, Pigatto CP. *Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. *Ciêñ Rural*, v.37, n.3, p.894-896, 2007.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TV, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414, 1995.

Watson DW, Guy JS, Stringham SH. Limited transmission of turkey coronavirus in young turkeys by adult *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Medical Entomology* 37(3): 480-483, 2000.

Wells JD and Stevens JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 53:103-120, 2008.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535, 1990.

Zhang DX, Hewitt GM. Nuclear DNA analyses in genetic studies of population: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 563-568, 2003.

Zhuang Q, Cai J, Zhang M, Feng H, Guo H, Yadong, Lan L, Chen Y. Molecular identification of forensically significant beetles (Coleoptera) in China based on COI gene. *Rev Colom de Entom* 37 (1): 95-102, 2011.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar os possíveis receptores das proteínas de *B. thuringiensis* recombinante para *A. diaperinus*.
- Realizar ensaios de competição heteróloga com as proteínas ativadas com proteases de *A. diaperinus*.
- Determinar o grau de sinergismo das proteínas para *A. diaperinus* a partir de novos bioensaios.
- Entender o mecanismo de ação das proteínas Cry em insetos da ordem Coleoptera.