

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS DOIS VIZINHOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

RODRIGO MENDES ANTUNES MACIEL

**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* PARA *Alphitobius diaperinus*  
PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM CONDIÇÕES DE  
LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2019

RODRIGO MENDES ANTUNES MACIEL

**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* PARA *Alphitobius diaperinus*  
PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM CONDIÇÕES DE  
LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Gouvea

Co-orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi  
Lozano

DOIS VIZINHOS

2019

M152p Maciel, Rodrigo Mendes Antunes.

Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) em condições de laboratório e semi-campo. / Rodrigo Mendes Antunes Maciel – Dois Vizinhos, 2019.  
49f.: il.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Alfredo de Gouvea.

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos, 2019.

Bibliografia p.42-49.

1. Pragas - Controle biológico. 2. Entomologia. 3. Aviários.  
I. Gouvea, Alfredo, orient. II. Silva, Everton Ricardi Lozano da, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV. Título

CDD:632.7



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Dois Vizinhos  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



## TERMO DE APROVAÇÃO

### Título da Dissertação nº 111

**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* PARA *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797  
(Coleoptera: Tenebrionidae) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO**

**Rodrigo Mendes Antunes Maciel**

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia vinte e um de fevereiro de dois mil e dezanove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

---

**Dr. Alfredo de Gouvêa**  
UTFPR - DV

---

**Dra. Michele Potrich**  
UTFPR - DV

---

**Dr. Pedro Manoel de Oliveira Janeiro**  
Neves  
UEL - Londrina

---

**Coordenador do PPGZO**  
Assinatura e carimbo

\*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por todo esforço provendo financeiramente a minha trajetória acadêmica, pelo incentivo e paciência, além de todos os ensinamentos passados durante toda minha vida, a vocês meus agradecimentos, tenho certeza que não conseguiria sem vocês.

A minha namorada Fernanda Colombo, por todo carinho, amor, companheirismo e principalmente paciência, sei que não foi fácil, e sei também que muito provavelmente não conseguiria sem a sua ajuda, por tudo isso atribuo grande parte disso a você.

Ao meu orientador Prof. Alfredo de Gouvêa, por proporcionar o desenvolvimento de todo projeto, e pela disposição em atender as demandas que surgiram durante o período de execução do projeto.

Ao meu coorientador Prof. Everton Ricardi Lozano, agradeço por te me exigido ao máximo para que o resultado fosse o melhor possível, todos os ensinamentos desde a graduação foram e continuam sendo absorvidos, e é com muito orgulho que digo que você é um exemplo de pessoa que eu me espelho

Aos colegas do Laboratório que ajudaram na realização dos experimentos, com toda certeza sem a ajuda de vocês o trabalho não seria realizado.

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Dois Vizinhos, e todos seus funcionários, sem estes que proporcionam o perfeito funcionamento da instituição não seria possível a realização do trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa, provendo assim a dedicação exclusiva para com o programa de pós-graduação.

## RESUMO

MACIEL, Rodrigo Mendes Antunes Maciel. **Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) em condições de laboratório e semi-campo.** 2019. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

*Alphitobius diaperinus* é a principal praga de aviários de corte em todo o mundo e o seu controle é realizado, predominantemente com inseticidas químicos sintéticos, os quais são prejudiciais às aves e ao ambiente, além da baixa eficiência de controle sendo, entretanto, a única disponível. O controle biológico com *Bacillus thuringiensis* pode ser uma alternativa viável, toxicológica e ecotoxicologicamente mais segura para o controle de *A. diaperinus*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a patogenicidade de linhagens de *B. thuringiensis* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, em condições de laboratório e semi-campo e determinar o perfil genético destas. Na avaliação *in vitro* foram utilizadas as linhagens Br 12, Br 58, Br 67, Br 80, Br 137 e Br 138 à  $3 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> (tratamentos), em dois bioensaios (larvas e adultos). Para tal, foram misturados 10 mL de cada tratamento em 20g de ração de frango e particionados em oito placas (repetições) de 12 poços, sendo que cada poço recebeu uma larva de quarto ínstar. No bioensaio com adultos as repetições constaram de placas de Petri com 12 insetos cada, totalizando 96 insetos por tratamento em cada bioensaio. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada e o número de insetos mortos quantificado ao longo de 10 dias. Para o bioensaio de semi-campo foram utilizadas as mesmas linhagens, exceto a Br 80 e Br 138. Para tal, foi preparada uma mistura de cama de aviário e ração de frango em caixas plásticas - unidades experimentais (UE), que recebeu 40 insetos (20 larvas de quarto instar e 20 adultos) cada e, então pulverizados 3 mL de cada tratamento sobre a cama. As UE foram alocadas em ambiente climatizado e a avaliação ocorreu ao 7° e 10° dias, quantificando-se os insetos mortos. As linhagens foram submetidas a PCR e posterior corrida de Eletroforese em gel de agarose para determinar o perfil genético. Nos testes *in vitro* as linhagens Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137 causaram mortalidade acumulada para larvas de *A. diaperinus*, respectivamente de 65,6%, 66,6%, 66,6%, e 69,7%, diferindo significativamente da testemunha (26,0%). Na avaliação ao longo do tempo a mortalidade causada pelas linhagens foi significativa somente no período de 96-144 horas, Br 67 (32,2%) e Br 80 (30,2%), e no período de 168-216 horas a linhagem Br 137 (31,2%). No bioensaio com adultos de *A. diaperinus*, somente a linhagem Br 58 causou mortalidade acumulada significativa (35,4%), o que não foi verificado nas avaliações ao longo do tempo em nenhum dos tratamentos. No bioensaio de semi-campo nenhuma das linhagens testadas causou mortalidade significativa para larvas ou adultos de *A. diaperinus*. Com relação ao perfil genético foram encontrados genes codificadores para as toxinas Cry4 e Cry10, caracterizando as linhagens como subespécie *israelensis*. As linhagens de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* são patogênicas para larvas de *A. diaperinus* em condições de laboratório. Para a utilização de *B. thuringiensis* em campo, são necessários estudos visando desenvolver estratégias de inserção no manejo das populações desta espécie.

**Palavras-chave:** Cascudinho de aviário; Controle Biológico; Bactéria Entomopatogênica.

## ABSTRACT

MACIEL, Rodrigo Mendes Antunes Maciel. **Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* for *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) in conditions laboratory and semi-field.** 2019. 49 p. Dissertation (MSc in Zootecnia). Federal University Technology – Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

*Alphitobius diaperinus* is the main pest of cut aviaries worldwide and its control is carried out, predominantly with synthetic chemical insecticides, which are harmful to birds and the environment, in addition to the low control efficiency, being the only available one. Biological control with *Bacillus thuringiensis* may be a viable, toxicological and ecotoxicologically safer alternative for the control of *A. diaperinus*. Thus, the objective of this work was to evaluate the pathogenicity of *B. thuringiensis* strains on larvae and adults of *A. diaperinus* under laboratory and semi-field conditions and to determine the genetic profile of *B. thuringiensis* strains. In the in vitro evaluation, the strains Br 12, Br 58, Br 67, Br 80, Br 137 and Br 138 were used at  $3 \times 10^8$  UFC / mL<sup>-1</sup> (treatments), in two bioassays (larvae and adults). To do this, 10 mL of each treatment were mixed in 20g of chicken feed and partitioned into eight 12-well plates (replicates), with each well receiving a fourth-instar larvae. In the adult bioassay the replicates consisted of Petri dishes with 12 insects each, totaling 96 insects per treatment in each bioassay. The plates were conditioned in an air-conditioned room and the number of dead insects quantified over 10 days. For the semi-field bioassay, the same strains were used, except Br 80 and Br 138. A mixture of poultry litter and chicken ration was prepared in plastic boxes - experimental units (UE), which received 40 insects (20 instar larvae and 20 adults) each and then sprayed 3 ml of each treatment on the bed. The EU was allocated in an air-conditioned environment and the evaluation took place on the 7th and 10th days, quantifying the dead insects. The strains were submitted to PCR and subsequent run of Electrophoresis in agarose gel to determine the genetic profile. In the in vitro tests the Br 12, Br 58, Br 67 and Br 137 lines caused accumulated mortality for *A. diaperinus* larvae, 65.6%, 66.6%, 66.6% and 69.7%, respectively, differing significantly from the control (26.0%). In the evaluation over time the mortality caused by the strains was significant only in the period of 96-144 hours, Br 67 (32.2%) and Br 80 (30.2%), and in the period of 168-216 hours the lineage Br 137 (31.2%). In the adult bioassay of *A. diaperinus*, only the Br 58 strain caused significant accumulated mortality (35, 4%), which was not verified in the evaluations over time in any of the treatments. In the semi-field bioassay none of the tested strains caused significant mortality for larvae or adults of *A. diaperinus*. Regarding the genetic profile, coding genes for the Cry4 and Cry10 toxins were found, characterizing the strains as subspecies *israelensis*. The strains of *B. thuringiensis* subspecies *israelensis* are pathogenic to larvae of *A. diaperinus* under laboratory conditions. For the use of *B. thuringiensis* in the field, studies are needed to develop strategies of insertion in the management of the populations of this species.

Keywords: Lesser Mealworm; Biological Control; Entomopathogenic Bacteria

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	8
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1 AVICULTURA.....	9
2.2 <i>Alphitobius diaperinus</i> PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).....	10
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA.....	13
2.3.1 Bactérias no controle biológico de insetos-praga.....	15
2.3.2 Histórico de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	16
2.3.3 Caracterização de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
2.3.4 Modo de ação de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	19
2.3.5 Utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle biológico de insetos.....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 OBTENÇÃO DE <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	21
3.2 OBTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
3.3 PATOGENICIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE LARVAS E ADULTOS DE <i>A. diaperinus</i> EM LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO.....	24
3.3.1 Bioensaio 1 – Avaliação das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> sobre larvas de quarto ínstar de <i>A. diaperinus</i> , em condições de laboratório.....	24
3.3.2 Bioensaio 2: Avaliação das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> sobre adultos de <i>A. diaperinus</i> , em condições de laboratório.....	25
3.3.3 Bioensaio 3: Avaliação das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> sobre larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i> em condições de semi-campo.....	26
3.4 PERFIL GENÉTICO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> .....	28
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
4.1 BIOENSAIO 1 – AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE LARVAS DE QUARTO INSTAR DE <i>A. diaperinus</i> , EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	31
4.2 BIOENSAIO 2: AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE ADULTOS DE <i>A. diaperinus</i> , EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	32
4.3 BIOENSAIO 3: AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE LARVAS E ADULTOS DE <i>A. diaperinus</i> EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO.....	33
4.4 PERFIL GENÉTICO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i> SUBESPÉCIE <i>israelensis</i> .....	33
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil atualmente destaca-se no ramo da avicultura de corte, como terceiro maior produtor e maior exportador de carne de frango (ABPA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2017). O marco inicial da avicultura comercial brasileira ocorreu em 1970, com o sistema de integração, o qual gerou avanços de âmbito, genético, estrutural, sanitário e logístico, estas melhorias resultaram em aumento produtivo (CIELO; JUNIOR; RIBEIRO, 2017).

Em contrapartida, a evolução constante e a pressão para o aumento produtivo resultaram em alguns efeitos indesejáveis, como a alta incidência de insetos-praga, que acometem a avicultura. O principal inseto que preocupa a atividade é *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae), pois causa danos sanitários, estruturais e nutricionais (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). Inicialmente descrito como praga secundária de grãos armazenados, este inseto é cosmopolita e acredita-se que foi disseminado na avicultura comercial por meio da ração fornecida aos animais.

Nos aviários, *A. diaperinus* encontrou ambiente favorável para reprodução e aumento populacional, como umidade, temperatura e abundância de alimento, o que se torna um entrave para o seu controle. O inseto possui ciclo holometabólico com duração média de 45 dias, podendo se estender até 400 dias, em condições adversas para o seu desenvolvimento (SILVA; HOFF; DOYLE, 2005).

O controle químico sintético é majoritariamente utilizado na avicultura, todavia este não tem sido eficiente no controle de *A. diaperinus*, a ineficiência faz com que seja aumentado o uso dos produtos, resultando em populações resistentes (ALVES et al., 2017). Outra problemática desse método de controle são os impactos ambientais e a toxicidade às aves e humanos devido ao potencial residual e ecotoxicidade referente aos produtos, além da impossibilidade de utilizá-los durante o período de alojamento das aves. Nesse contexto, afirma-se a necessidade de desenvolver estratégias de controle, mais efetivas e sustentáveis, como a utilização do controle biológico com *Bacillus thuringiensis*.

As bactérias entomopatogênicas são uma potencial alternativa para utilização na avicultura comercial, devido ao seu modo de ação, rápido e específico (CASTAGNOLA; STOCK, 2014). O potencial inseticida de *B. thuringiensis* é oriundo, principalmente, de cristais que contêm proteínas tóxicas Cry, a principal forma de identificação de subespécies de *B. thuringiensis* quanto a sua especificidade e

toxicidade as ordens de insetos. As subespécies mais conhecidas *kurstaki* (Lepidoptera), *israelensis* (Diptera) e *tenebrionis* (Coleoptera) (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992), as quais são ingredientes ativos de diversos produtos utilizados para o controle de diversos insetos-praga..

Apesar da especificidade definida pelas toxinas Cry de *B. thuringiensis* já citada anteriormente, algumas linhagens são capazes de sintetizar mais de um tipo de toxina Cry além de toxinas Cyt, conferindo-lhes maior espectro de ação ou eficiência. Alguns trabalhos tem evidenciado efeitos de toxinas Cry da subespécie *israelensis* (tóxica para dípteros) contra coleópteros (MARTINS et al., 2007; MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003; MONNERAT et al., 2012; ZORZETTI et al., 2018).

A capacidade de linhagens de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* para controlar insetos de mais de uma ordem, combinada à patogenicidade, proporciona uma eficaz ferramenta de controle de insetos. Além disso, os pré-requisitos para o modo de ação da bactéria, como alcalinidade do trato digestório do organismo alvo, conferem seguridade para mamíferos e outros organismos não-alvos, os quais não possuem trato digestório alcalino. Estas características tornam *B. thuringiensis* uma alternativa viável para a utilização dentro de aviários para o controle de *A. diaperinus*, principalmente pelo fato das medidas de controle aplicadas atualmente nos aviários não atingirem o objetivo almejado de reduzir a população do inseto em questão. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a patogenicidade de linhagens de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* e determinar o perfil genético destas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 AVICULTURA**

A domesticação de quatro raças de aves do sul da Ásia Oriental há mais de 2000 anos é considerada o marco inicial da avicultura, atividade voltada para produção de produtos e subprodutos alimentícios advindos das aves. No ano de 1807 é implementada a avicultura industrial com o propósito de produção e comercialização de carne e ovos em cadeia, aplicando-se então, padrões nas áreas de nutrição, sanidade e tecnologia (WOOD-GUSH, 1959).

A avicultura no Brasil é concomitante com a descoberta do país pelos portugueses, todavia a avicultura industrial de corte foi implantada no país somente por volta de 1930, utilizando aves puras ou caipiras, que eram comercializadas vivas. Somente em 1970 ocorreu a implantação do sistema de integração, visando adotar estratégias para melhorar e padronizar a produção de carne de frango nos aspectos genético, sanitário e de manejo (MACARI et al., 2014).

A implantação do sistema de integração marca a importação de linhagens híbridas com características para produção de carne, assim como a padronização na nutrição ofertada às aves, protocolos sanitários que garantem qualidade no produto final e logística para atender a demanda do mercado interno e externo. O sistema de integração implantado em 1970 vigora, até os dias atuais, em evolução constante em todos os aspectos citados anteriormente, garantindo sucesso na cadeia produtiva (MACARI et al., 2014; CIELO; JUNIOR; RIBEIRO, 2017). A utilização das estratégias adotadas no sistema de integração consagrou o Brasil como segundo maior produtor de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos, e como o principal mercado exportador, atendendo os mais variados mercados consumidores (ABPA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2017).

Apesar dos números e informações técnicas citadas anteriormente que consagram a atividade avícola de corte no âmbito nacional, a pressão por produtividade aumenta a densidade de animais no mesmo local e diminui o intervalo entre lotes, o que, conseqüentemente, resulta em efeitos adversos, como o aumento de insetos-praga dentro do aviário. O principal inseto-praga que acomete a atividade avícola de corte é *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae), o qual causa inúmeros danos de âmbito sanitário, estrutural e nutricional (JAPP; BICHO; SILVA, 2010).

## 2.2 *Alphitobius diaperinus* PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

*Alphitobius diaperinus*, vulgarmente conhecido como cascudinho de aviário, é um besouro que possui ciclo holometabólico, com duração do período ovo - adulto de 30 a 80 dias (RUMBOS et al., 2018). Três dias após a cópula inicia-se a oviposição, com a eclosão ocorrendo a partir do quinto dia após a oviposição.

Os ovos possuem coloração branca brilhante, com comprimento médio de 1,8 mm. As larvas são elateriformes, de coloração leitosa até terceiro ínstar e

posteriormente marrom, possuem aparelho bucal mastigador, corpo alongado, afilado, com comprimento de 10,33 mm podendo chegar a 13,83 mm (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001). O período larval é dividido comumente em oito instares podendo estender-se até 11, com duração variável de um até sete meses (FRANCISCO; PRADO, 2001). Previamente ao empupamento, as larvas adentram o solo ou se mobilizam para ranhuras presentes na estrutura do aviário, onde empupam e, por volta do quinto dia ocorre a emergência dos adultos. A fase adulta pode durar aproximadamente um ano e, nesse período as fêmeas ovipositam até 1800 ovos.

Já os adultos possuem corpo em forma oval e apresentam coloração marrom escuro brilhante, com tamanho variando de 6 mm a 6,83 mm (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001). Da mesma forma como nas larvas, seu aparelho bucal é do tipo mastigador, constituído por mandíbulas robustas, assimétricas e com dois dentes apicais que causam danos físicos as instalações (GALLO et al., 2002).

O ciclo apresentado ocorre em condições ideais com temperaturas oscilando de 15 a 38°C, porém, em condições adversas o ciclo pode durar até 400 dias (RUMBOS et al., 2018; SILVA; HOFF; DOYLE, 2005). Considerado praga de distribuição cosmopolita, *A. diaperinus* é originário de regiões temperadas da África ocidental e inserido mundialmente em sistemas de produção pecuária, principalmente na avicultura comercial, através de grãos armazenados ou migrando de culturas vizinhas (JAPP; BICHO; SILVA, 2010; SALIN et al., 2000). O desenvolvimento da avicultura comercial gerou local propício para a proliferação deliberada de *A. diaperinus*, oferecendo local com temperatura, umidade e luminosidade adequada para o desenvolvimento do inseto, o que resultou em prejuízos para a avicultura comercial (DA SILVA SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2018; ZORZETTI et al., 2015).

Os danos causados por *A. diaperinus* podem ser divididos em sanitários, nutricionais e estruturais. Sanitários, pela capacidade do inseto em ser vetor de patógenos para as aves e humanos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários, nutricionais, danos nutricionais considerando a preferência das aves pelo consumo do inseto em relação à ração balanceada, gerando déficit no crescimento do animal. Já os danos estruturais ocorrem, pois, no último instar larval, este procura fendas para empupar, causando danos na sustentação e nos equipamentos dos aviários (ARENA et al., 2018; CHERNAKI; ALMEIDA, 2001; DA SILVA SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2018; PARK et al., 2014; SINGH; JOHNSON, 2015).

Os danos supracitados evidenciam a necessidade de planejar estratégias de controle que atuem de forma eficiente para a regulação da população de *A. diaperinus*. A estratégia de controle predominante atualmente baseia-se na utilização de inseticidas sintéticos, com variados princípios ativos, destacando-se piretróides, carbamatos e organofosforados (ALVES et al., 2017; GARG et al., 2004; ZORZETTI et al., 2015), todos neurotóxicos e que são aplicados no intervalo entre lotes, durante o amontoamento da cama para que ocorra a fermentação da mesma (WOLF et al., 2015).

A utilização deste método de controle não tem sido eficiente e tem resultado em populações de *A. diaperinus* resistentes aos princípios ativos utilizados na atividade avícola. Além de não poder ser utilizado durante período de alojamento das aves por ser danoso a saúde dos animais e deixar resíduos na carne a ser comercializada (LAMBKIN; FURLONG, 2014; TOMBERLIN; RICHMAN; MYERS, 2008). Dessa forma é necessária, a utilização e/ou associação com outros métodos de controle tais como cultural, físico, alternativo e biológico.

O controle cultural de pragas na avicultura é a adoção de um conjunto de medidas estruturais e sanitárias. Inicia-se com detalhes pertinentes à construção do aviário e com a utilização constante de medidas profiláticas, com enfoque na eliminação de resíduos que possam colaborar para a proliferação de *A. diaperinus* (AVILA et al., 2007). Por sua vez, o manejo de temperatura e umidade, principalmente no substrato utilizado nos pisos dos aviários comerciais, é definido como forma de controle físico, utilizando-se temperaturas e níveis de umidade desfavoráveis para o completo desenvolvimento de *A. diaperinus* (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001; GAZONI et al., 2012; WOLF et al., 2015).

A utilização de métodos de controle alternativos aos existentes no mercado, como extratos ou óleos de plantas com potencial inseticida é uma estratégia que pode contribuir para a eficiência de controle de *A. diaperinus* (MARCOMINI et al., 2009). Outros métodos alternativos são os condicionadores de ambiente como terra diatomácea, cal virgem ou hidratada, gesso agrícola entres outros, que agem diretamente na epicutícula do inseto, rompendo a membrana lipídica que o recobre o, causando a morte do mesmo por desidratação (JAPP; BICHO; SILVA, 2010; WOLF et al., 2014).

Um outro método de controle que tem ganhado cada vez mais destaque e que pode contribuir ambientalmente de forma menos agressiva para o controle de *A.*

*diaperinus* é o controle biológico (CB). Com a utilização de fungos (ALVES et al., 2015), nematoides (DEL VALLE et al., 2016) e bactérias entomopatogênicas (HUA; PARK; ADANG, 2014; PARK et al., 2014).

### 2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA

Em geral todo inseto em seu ambiente natural possui inimigos naturais, de forma que em um ecossistema equilibrado, quando ocorre aumento da população de inseto presa, concomitantemente aumenta a população do inimigo natural (ALTIERI, 1999). O CB em definição é a utilização e ou aplicação deste fenômeno natural para o controle de um inseto considerado praga, contribuindo para a supressão da população da praga a níveis que não ocasionem danos no ambiente ou cultura onde se encontra (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008).

Didaticamente o CB é dividido em quatro classes: natural, conservativo, clássico e aplicado. O CB natural consiste no fenômeno natural de ocorrência de inimigos naturais que ocorrem no ambiente, sem que haja nenhuma interferência humana, ao passo que o CB conservativo baseia-se na tomada de medidas para a conservação dos inimigos naturais presentes no ambiente e regulação das populações de pragas (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008; VAN LENTEREN et al., 2018). Já o CB clássico é definido como utilização de agentes biológicos exóticos (importação dos ambientes de origem) para o controle de eventuais pragas exóticas (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008; VAN LENTEREN, 2012). Por sua vez o CB aplicado é uma estratégia que consiste na produção massal de agentes de controle e sua utilização e aplicação diferindo das outras estratégias de CB, principalmente pelo modo de aplicação, que neste caso, assemelha-se às aplicações convencionais de produtos sintéticos para o controle da praga. Os agentes de controle biológico são os entomófagos (predadores e parasitoides) ou entomopatógenos (vírus, fungos, nematoides e bactérias), (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008; BRAR et al., 2006; VAN LENTEREN et al., 2018).

Os registros do emprego do controle biológico são datados no século III, na China, com a utilização de formigas para controlar pragas de pomares de citrus. Contudo, o marco da utilização do controle biológico clássico se deu em 1888 na Califórnia, com a utilização de besouros *Rodolia cardinalis*, 1850 (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) para controlar a cochonilha *Icerya purchasi* Maskell, 1878

(Hemiptera: Monophlebidae), tornando assim a Califórnia o berço do controle biológico (PARRA, 2014). Um século após o marco inicial do controle biológico na Califórnia, ocorre o programa considerado o mais bem-sucedido do mundo, na África, utilizando o parasitoide *Apoanagyrus lopezi* De Santis 1964 (Hymenoptera: Encyrtidae) para controlar *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae) que acometia as plantações de mandioca. Em 1981 foi realizada a soltura dos parasitoides na Nigéria e rapidamente espalhou-se pelos países vizinhos realizando o controle do inseto-praga (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008; VAN LENTEREN; BUENO, 2003). O sucesso do CB em todo mundo foi continuado em diversos programas. No mesmo período do início da utilização do CB na Califórnia, na Rússia era utilizado *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle de besouros que acometiam diversos cultivos de importância econômica (VAN LENTEREN et al., 2018).

A utilização do CB foi continuada até o surgimento de inseticidas sintéticos, principalmente Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), em meados da década de 1940, período considerado a era dos inseticidas sintéticos que durou até metade da década de 1960. Nesta década foram evidenciados os problemas acarretados pelo uso do DDT, como eliminação de inimigos naturais, resultando no ressurgimento de pragas primárias e pragas secundárias tornaram-se primárias. Além da seleção de populações resistentes e, principalmente, os danos ambientais (KOGAN, 1998). Após este período o CB ressurgiu como uma das principais alternativas para o controle de insetos-praga.

A utilização do CB passou por aumento significativo a partir da década de 1970, passando de fabricação caseira para fabricação industrial, a padronização de protocolos e investindo em tecnologia, resultando em incremento no número de agentes de controle utilizados no mundo (BRAR et al., 2006; VAN LENTEREN; BUENO, 2003). O avanço na utilização do CB ocorreu até o final da década de 1990, quando ocorreu uma estagnação no seu desenvolvimento, resultante da burocracia para a criação ou formulação de novos produtos. Tal fenômeno redirecionou as pesquisas, principalmente para as espécies nativas, assim diminuindo a necessidade de tramites legais, bem como estimulou-se os estudos e formulações de produtos à base de entomopatógenos (HATT et al., 2018; VAN LENTEREN et al., 2018).

A utilização de entomopatógenos no CB no Brasil é mais discreta, porém apresenta casos de sucesso, tais como a utilização do fungo entomopatogênico *M.*

*anisopliae* para o controle de *Mahanarva fimbriolata* Stal 1854 (Hemiptera: Cercopidae) no cultivo de cana-de-açúcar e também a utilização de vírus da poliedrose nuclear para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em plantações de soja (HATT et al., 2018; PARRA, 2014). Apesar dos poucos programas de CB com a utilização de entomopatógenos, atualmente são produzidos e comercializados, produtos à base fungos entomopatogênicos, vírus, nematoides e bactérias, para controlar insetos-pragas de diversas ordens, colocando os entomopatógenos como alternativas para o mercado agrícola moderno (BRAR et al., 2006; VAN LENTEREN et al., 2018; VAN LENTEREN; BUENO, 2003). O principal entomopatógeno utilizado para formulações de inseticidas comerciais é a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915, devido ao seu potencial de controlar insetos-praga com eficácia semelhante aos inseticidas químicos sintéticos (PARRA, 2014).

A utilização de entomopatógenos tem mais de um século, conhece-se a viabilidade no uso de fungos, vírus, bactérias, nematoides e protozoários para o controle de diversos insetos-praga (LACEY et al., 2015; PARNELL et al., 2016). Os avanços na utilização de entomopatógenos e desenvolvimento de técnicas de produção e aplicação ampliaram a utilização dos mesmos (GLARE et al., 2012), resultando em mais de 1 bilhão de dólares em produtos comercializados, com expectativa de 7 bilhões até 2019 (PARNELL et al., 2016). É importante destacar também que a otimização dos sistemas de produção que proporcionam aumento na eficiência de entomopatógenos, que também está relacionado com a conscientização ambiental pela redução de inseticidas químicos sintéticos (HATT et al., 2018).

### 2.3.1 Bactérias no controle biológico de insetos-praga

As bactérias pertencentes as famílias Bacilaceae, Clostridiaceae, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae possuem espécies que produzem metabólitos entomopatogênicos capazes de ser utilizados no CB (CASTAGNOLA; STOCK, 2014). No entanto, as bactérias da família Bacilaceae possuem ampla utilização quando comparada às demais, com destaque para a *B. thuringiensis*, sendo esta a matéria prima para o maior número de produtos utilizados no CB atualmente (VAN LENTEREN et al., 2018).

### 2.3.2 Histórico de *Bacillus thuringiensis*

O primeiro isolamento de *B. thuringiensis* foi em 1901 no Japão, a partir de lagartas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) doentes e foi descrita como doença de Sototo que acometia *B. mori* (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Já em 1915 na Alemanha, em Thuringia, a bactéria isolada de traças da farinha *Anagasta kuehniella* Zeller 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) foi nomeada *Bacillus thuringiensis*. Tal isolado foi perdido anos após sua descoberta e re-isolado em 1927, quando o mesmo foi distribuído para vários laboratórios e, em 1930, na França foi elaborado o primeiro produto comercial a base de *B. thuringiensis*, denominado “Sporeine” (BRAR et al., 2006).

As pesquisas com *B. thuringiensis* foram continuadas em diversas partes do mundo a fim de formular um produto que fosse concorrente aos químicos sintéticos utilizados na época. Em 1950 nos Estados Unidos, Steinhaus utilizou *B. thuringiensis* com êxito para controle de *Colias eurytheme* Boisduval 1852 (Lepidoptera: Pieridae), praga que acomete plantações de alfafa (STEINHAUS, 1956). O sucesso do controle fez com que o pesquisador em parceria com empresa privada idealizasse e produzisse um produto a base de *B. thuringiensis* chamado Thuricide® (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992), sendo este produzido até os dias atuais (VAN LENTEREN et al., 2018).

Entre os anos de 1938 (Produção de “Sporeine”) e 1950 (idealização do produto Thuricide®), apesar dos vastos estudos e utilizações experimentais de agentes de controle a base de *B. thuringiensis*, a morfologia da bactéria não era completamente compreendida pelos pesquisadores (STEINHAUS, 1956). Em 1953 Hannay (1953) descreveu outra estrutura além do esporo, já conhecido em bactérias da família Bacillaceae, estrutura está descrita como cristal, principal responsável pelo poder inseticida.

Em 1962 foi descoberta a subespécie *kurstaki*, sendo até 200 vezes mais eficiente que a subespécie *thuringiensis*, que era base dos produtos comercializados de *B. thuringiensis* até então (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Os estudos sobre a subespécie descoberta se estenderam até 1970 quando foi produzido o primeiro produto (Dipel®) com grande aceitação para o controle de diversas pragas da ordem Lepidoptera, que eram de difícil controle quando utilizado produtos à base da

subespécie *thuringiensis* (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Atualmente o produto Dipel é o mais comercializado em todo mundo (VAN LENTEREN et al., 2018).

Desde o início do século XX, a descoberta, a descrição e as formulações de produtos comerciais com a utilização de *B. thuringiensis* tiveram enfoque completo para o controle de insetos pertencentes a ordem Lepidoptera. Porém, em 1976 foi descoberta uma nova subespécie com atividade larvicida para insetos da ordem Diptera, a subespécie *israelensis*, a qual foi descrita com ação aguda a larvas de mosquito, causando a morte do inseto depois de 30 minutos da ingestão (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992).

A última subespécie descrita foi *tenebrionis*, em 1983, isolada de *Tenebrio molitor* L. 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae), que apresenta atividade inseticida para larvas de coleópteros (KRIEG; HUGER; SCHNETTER, 1983). Posteriormente, em 1986 foi descrito outra subespécie específica para coleópteros, a *San Diego*, todavia, quando confrontadas as características desta com a subespécie *tenebrionis*, verificou-se tratar da mesma, permanecendo assim a primeira subespécie descrita (*tenebrionis*), a aceita (CIDARIA et al., 1991).

Na atualidade existem produtos à base de *B. thuringiensis* das subespécies *kurstaki*, *israelensis* e *tenebrionis*, bem como inúmeros isolados que originam os produtos comerciais (FIUZA et al., 2017; VAN LENTEREN et al., 2018). A diversidade de linhagens gerando produtos comerciais, além da especificidade das subespécies para controlar as principais ordens de insetos-praga conferem a bactéria *B. thuringiensis* o inseticida biológico mais produzido e comercializado mundialmente (VAN LENTEREN et al., 2018). Até o ano de 2015 foi levantado que 98% do mercado de inseticidas biológicos era composto por produtos à base *B. thuringiensis* (LACEY et al., 2015).

### 2.3.3 Caracterização de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria pertencente à família Bacillaceae, isoladas em sua maioria do solo, podendo também o isolamento ser feito de insetos, plantas e ambientes aquáticos, sendo que o local de isolamento está diretamente ligado com a definição da subespécie e especificidade da bactéria (HÖFTE; WHITELEY, 1989; RABINOVITCH et al., 2017). Em definição são bactérias aeróbias, facultativamente anaeróbias (ANDRADE ANGELO; TRINDADE VILAS-BÔAS;

JORGE HERNAN CASTRO-GÓMEZ, 2010), positivas a coloração de Gram, apresentado formato de bastonetes com dimensões de 1,0 a 1,2 µm de comprimento e 3,0 a 3,5 µm de largura e estruturalmente caracterizadas por possuírem flagelos que auxiliam na locomoção e adesão na parede intestinal do hospedeiro e formarem esporos (ANDRADE ANGELO; TRINDADE VILAS-BÔAS; JORGE HERNAN CASTRO-GÓMEZ, 2010; BRAVO et al., 2011).

Durante a formação de esporos ocorre a formação de cristais proteicos que possuem diversas formas, conforme o isolado a qual pertencem, podendo ser: bipiramidais, piramidais cuboides, romboides, esféricos e retangulares, e serem formados por uma ou mais toxinas Cry (FIUZA et al., 2017). Esta estrutura é a principal responsável pela atividade inseticida, bem como principal fator de distinção de *B. thuringiensis* e as demais bactérias formadoras de esporos (ANGUS, 1956; HANNAY, 1953; PARK et al., 2014). Ao final da esporulação o cristal com as toxinas, correspondem a até 25% do peso da célula (ANDRADE ANGELO; TRINDADE VILAS-BÔAS; JORGE HERNAN CASTRO-GÓMEZ, 2010; ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002; FIUZA et al., 2017).

A fase de esporulação pode produzir as toxinas, Cry, Cyt e Vip, sendo que as toxinas Cry são as mais conhecidas e estudadas devido ao poder inseticida atribuído a estas. A classificação das toxinas Cry, são conforme a quantidade e qualidade das mesmas e estes parâmetros estão ligados ao isolado e subespécie de *B. thuringiensis* (FIUZA et al., 2017). Atualmente já há descritos 1176 genes que codificam as proteínas Cry com atividade específica a determinada ordem de inseto-praga (CRICKMORE et al., 2019). O banco de dados de genes que codificam proteínas Cry é atualizado conforme ocorre a descobertas de novos genes codificadores podendo ser acessado a qualquer momento por meio do endereço [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

Já as proteínas Cyt são caracterizadas pela atividade citolítica, com capacidade de afetar células do intestino médio dos insetos, podendo potencializar a ação de algumas proteínas Cry (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013). As últimas toxinas estudadas são as Vip, que são divididas em quatro famílias de acordo com a identificação sequencial de aminoácidos, sendo a ação destas toxinas definida como binária, podendo ser tóxicas para coleópteros e hemípteros (CHAKROUN; BEL; ESCRICHE, 2016). Independente das proteínas tóxicas contidas na linhagem, o modo

de ação tende a ser o mesmo, devido ao compartilhamento de uma estrutura particular na toxina Cry.

#### 2.3.4 Modo de ação de *Bacillus thuringiensis*

A ação entomopatogênica de *B. thuringiensis* é definida, principalmente pelas toxinas produzidas presentes nos cristais. Estas compartilham uma estrutura terciária, constituída pela porção C-terminal, responsável pela produção do cristal, e porção N-terminal, subdividida em três domínios, o domínio I, que é responsável pela inserção na membrana e os domínios II e III pela especificidade da bactéria (SANAHUJA et al., 2011). Dessa forma, o modo de ação inicia-se com a ingestão dos esporos e cristais da bactéria pelo inseto. Ao chegar no intestino ocorre a solubilização do cristal, devido a alcalinidade do trato digestório da fase larval dos insetos e, conseqüentemente, a liberação das pró-toxinas inativas (KNOWLES, 1994). As enzimas digestivas são responsáveis pela clivagem e ativação das pró-toxinas, fragmentando-as em peptídeos tóxicos (FIUZA, 2009).

Na seqüência, as toxinas se ligam a receptores específicos localizados na membrana, sendo os inúmeros receptores e a afinidade das proteínas Cry com os receptores o que confere o espectro de ação da linhagem. A aderência das toxinas ocorre primariamente com a ligação a peptídeos caderinas, que induz o processo de oligomerização, permitindo a ligação com receptores mais específicos situados nas microvilosidades do mesêntero dos insetos. Essa ligação forma poros, causando disfunção osmótica e lise celular que inativa as funções da membrana e conseqüentemente resulta no rompimento do intestino médio. Com isto ocorre o contato dos esporos da bactéria com fezes e hemolinfa, um “meio de cultura” adequado para a germinação dos esporos de *B. thuringiensis*, causando quadro de septicemia e levando o inseto a óbito (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012).

#### 2.3.5 Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de insetos

A utilização de inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* é mundialmente difundida para controlar insetos-praga de diversas ordens. A principal utilização de *B. thuringiensis* ou proteínas isoladas é realizada para insetos da ordem

Lepidoptera, sendo que a subespécie utilizada de forma predominante para controlar insetos-praga da referida ordem é a *kurstaki* (GLARE et al., 2012; LACEY et al., 2015).

O potencial inseticida sobre lepidópteros é afirmado sobre lagartas que ocorrem em grandes monoculturas produtoras de commodities, tais como *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002), *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) (ZHANG et al., 2013), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae) (ZORZETTI et al., 2017) e também sobre complexo de lepidópteros que acometem cultivos de chá (DASHORA et al., 2017). Diversas subespécies são a base para formulações de produtos referidos ao controle de insetos-praga da ordem Lepidoptera (BRAR et al., 2006; FIÚZA, 2010; VAN LENTEREN et al., 2018).

A utilização de *B. thuringiensis* não é restrita ao meio agrícola, a subespécie *israelensis* tem aplicação para controlar insetos da ordem Diptera em diversos ambientes (LACEY, 2007), sendo que alguns destes insetos são vetores de doenças que acometem a população humana, gerando efeitos deletérios no âmbito de saúde pública (FILLINGER; KNOLS; BECKER, 2003; RITCHIE; RAPLEY; BENJAMIN, 2010).

A utilização de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* como estratégia para controlar dípteros vetores de malária tem eficácia na redução da disseminação de casos da doença (FILLINGER; KNOLS; BECKER, 2003). Outro díptero capaz de disseminar diversas doenças e considerado caso de saúde pública é o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae). A aplicação de *B. thuringiensis* para o controle deste inseto resultou em redução populacional do inseto-praga e conseqüentemente reduziu o número de pessoas infectadas pela doença transmitida pelo inseto, a dengue (RITCHIE; RAPLEY; BENJAMIN, 2010).

A utilização de *B. thuringiensis* sobre insetos da ordem Coleoptera foi consolidada com a descoberta da subespécie *tenebrionis*, sendo que esta apresenta maior ação inseticida sobre coleópteros do que as demais subespécies descritas quando da sua descoberta (KRIEG; HUGER; SCHNETTER, 1983). A descoberta desta subespécie impulsionou estudos afim da caracterização morfológica e genética da variedade (MCPHERSON et al., 1988) e em 1991 foi patenteado o isolado de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de *A. diaperinus* (HICKLE; BRADFISCH; SICK, 1991). No mesmo ano foi isolado *B. thuringiensis* de *T. molitor*, específico para

controle de *Leptinotarsa decemlineata* Say 1824 (Coleoptera: Crysomelidae) (CIDARIA et al., 1991).

A utilização de *B. thuringiensis* é tida como alternativa para controle de coleópteros de diversas famílias que acometem inúmeras culturas. O uso de *B. thuringiensis* para o controle de *Lasioderma serricorne* Fabricius 1792 (Coleoptera: Anobiidae), praga que acomete o cultivo de fumo, apresentou resultados satisfatórios (KAELIN et al., 1999; TSUCHIYA et al., 2002). Outro inseto passível de controle por *B. thuringiensis* é a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1876 (Coleoptera: Curculionidae) (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003; ZORZETTI et al., 2018), assim como o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) (MARTINS et al., 2007; PÉREZ et al., 2017).

É importante destacar que a toxicidade de *B. thuringiensis* sobre insetos da ordem Coleoptera tem sido confirmada com trabalhos no decorrer do tempo (CIDARIA et al., 1991; KAELIN et al., 1999; MARTINS et al., 2007; MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003; PÉREZ et al., 2017; TSUCHIYA et al., 2002; ZORZETTI et al., 2018). Visto à eficácia de isolados ou produtos à base de *B. thuringiensis* de diferentes subespécies sobre insetos pertencentes à ordem Coleoptera, estudos destas sobre *A. diaperinus* se fazem necessários

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Controle Biológico I e II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos.

#### 3.1 OBTENÇÃO DE *Alphitobius diaperinus*

Os insetos em fase larval e adulta foram obtidos de aviário comercial (Figura 1A; B), com cama de aviário livre de inseticidas sintéticos e mantidos na sala de criação de insetos do Laboratório de Controle Biológico I à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, com substrato (cama de aviário) e ração para frangos (Figura 1C), por no mínimo sete dias, para ambientação (WOLF et al., 2014) e realização dos experimentos.

Figura 1 - A: Vista parcial do aviário comercial de frangos de corte; B: Recipiente plástico com cama de aviário; C: Recipientes plásticos com cama de aviário e insetos, mantidos em sala de criação ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas).



Fonte: Autor, 2019

### 3.2 OBTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis*

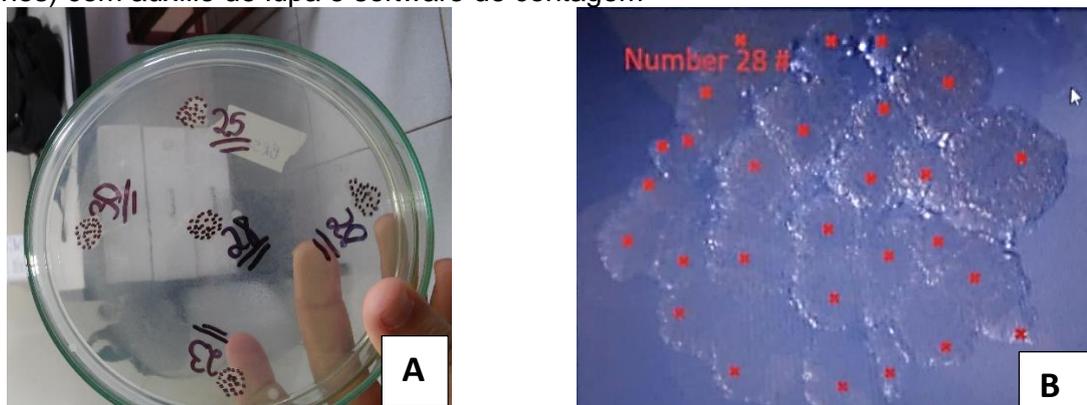
As linhagens de *B. thuringiensis* liofilizadas foram obtidas junto a coleção de entomopatógenos do Laboratório de Genética e Taxonomia de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina – UEL. Foram utilizadas seis linhagens de *B. thuringiensis* (Br 12, Br 58, Br 67, Br 80, Br 137 e Br 138), já identificadas pela presença de proteínas Cry tóxicas às espécies das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera.

Foram preparados 2,4 L de meio de cultura caldo nutritivo (3 g de extrato de carne e 5 g de peptona em 1000 mL de água destilada esterilizada), esterilizado e distribuído em alíquotas de 100 mL em frascos Erlenmeyer (250 mL). Paralelamente, com o auxílio de uma alça de platina foi retirada uma alíquota de cada linhagem bacteriana e ressuspensa em 10 mL de água destilada esterilizada em tubos de fundo chato (10 cm de altura x 2,5 cm Ø). Em seguida 200 µL de cada amostra das linhagens originais isoladas e ainda não quantificadas foram inoculadas ao meio de

cultura nos frascos Erlenmeyer para multiplicação, sendo utilizados quatro frascos para cada linhagem. Os frascos foram alocados em agitador horizontal Cienlab CE-725/R à temperatura de  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm durante 96 horas, conforme Alves, 1998. Posteriormente, as suspensões foram particionadas em alíquotas de 10 mL e alocadas em tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas 10 tubos por vez, em centrífuga (SPLabor-802B-15mL-Daiki) por 15 minutos, à velocidade de 12.000 g. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e ressuspendido em água destilada até completar o volume 10 mL e centrifugado novamente a 14.000 g por cinco minutos, sendo os pellets obtidos após as centrifugações acondicionados em tubos Falcon de 50 mL e mantidos em freezer a temperatura de  $-4^\circ\text{C}$  para posterior quantificação e montagem dos bioensaios.

Para a quantificação das diferentes linhagens de *B. thuringiensis*, amostras de 1 mL de cada linhagem foram adicionadas em tubos de vidro de fundo chato (10 cm de altura  $\times$  2,5 cm  $\varnothing$ ), contendo 9 mL de água destilada esterilizada. A partir dessa suspensão realizou-se diluição seriada até  $10^{-6}$ , sendo a cada diluição o material agitado em agitador tipo vórtex (Phoenix AP-56), durante 30 segundos. Após realizadas as diluições, previamente a inoculação, cada tubo nas diluições  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  foram agitadas e então alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram inoculadas em cinco pontos, em placas de Petri (15 cm de  $\varnothing \times$  2 cm de altura) contendo meio de cultura Agar Nutriente (1,0 g Extrato de Carne, 2,0 g Extrato de Levedura, 5,0 Peptona, 5,0 Cloreto de Sódio e 15,0 Agar), sendo utilizadas três placas para cada diluição, totalizando 15 pontos de 5  $\mu\text{L}$  por linhagem. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas) pelo período de 18 horas, quantificando-se, posteriormente as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) visualmente e com auxílio de estereomicroscópio binocular (Zeiss Stemi 305) no aplicativo ZEN blue edition, em cada ponto de inoculação (Figura 2 A;B). A partir da quantificação, determinou-se o número de UFC/mL, calibrando-se a suspensão para a concentração de  $3 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>, segundo metodologia adaptada de Lozano et al. (2017).

Figura 2 - A: Placa de Petri com pontos de unidade formadoras de colônias de *B. thuringiensis* e marcadas para contagem das mesmas. B: Contagem de UFC (pontos vermelhos) com auxílio de lupa e software de contagem



Fonte: Autor, 2019

### 3.3 PATOGENICIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE *B. thuringiensis* SOBRE LARVAS E ADULTOS DE *A. diaperinus* EM LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO.

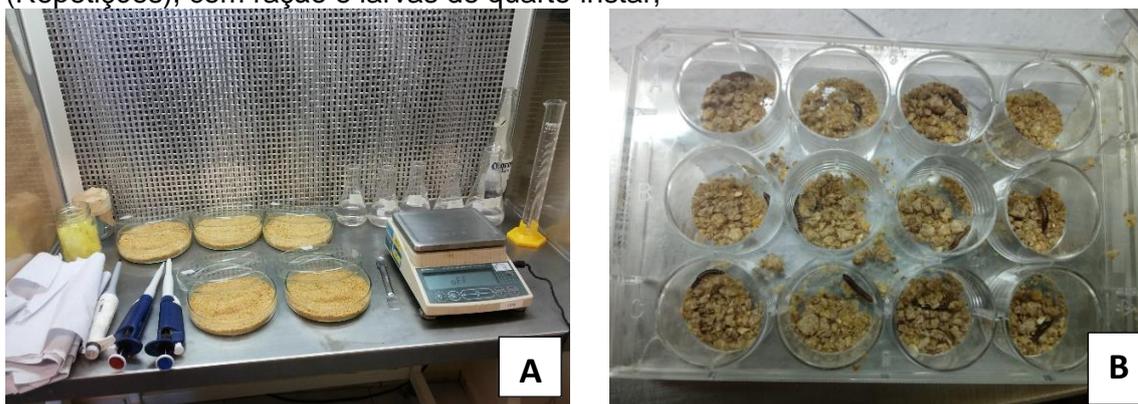
Foram realizados três bioensaios, cujos tratamentos foram: água destilada esterilizada, as linhagens Br12, Br58, Br67, Br80, Br137 e Br138 na concentração de  $3,0 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup> pré selecionadas pelo potencial inseticida a outros coleópteros (ZORZETTI et al., 2018), sendo excluídas as linhagens Br 80 e Br 138 no bioensaio 3, por não diferirem estatisticamente da testemunha no bioensaio 1.

#### 3.3.1 Bioensaio 1 – Avaliação das linhagens de *B. thuringiensis* sobre larvas de quarto ínstar de *A. diaperinus*, em condições de laboratório

Em placas de Petri 15 cm de Ø × 2 cm de altura foram pesados 20 g de ração comercial para frangos previamente esterilizada e acrescidos 10 mL de cada tratamento/linhagem na ração (Figura 3A), misturando-se de forma homogênea. As placas com a mistura foram levadas para a câmara de fluxo laminar horizontal durante 20 minutos para evaporação do excesso de água. Posteriormente a mistura foi subdividida em oito placas de acrílico (repetições), contendo 12 poços cada placa, sendo que cada poço recebeu 0,20 g de ração e uma larva de quarto ínstar determinada por tamanho médio e coloração (FRANCISCO; PRADO, 2001) de *A. diaperinus*, previamente selecionadas da criação (Figura 3B), totalizando 96 larvas por tratamento.

As placas de acrílico foram acondicionadas em câmara climatizada ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas). A avaliação ocorreu diariamente durante 10 dias, quantificando-se os mortos de cada tratamento e descartando-os.

Figura 3 - Etapas da montagem do bioensaio com larvas de *A. diaperinus*: **A**: Placas de Petri com ração de frango + tratamentos em câmara de fluxo laminar; **B**: Placas de poços (Repetições), com ração e larvas de quarto ínstar;

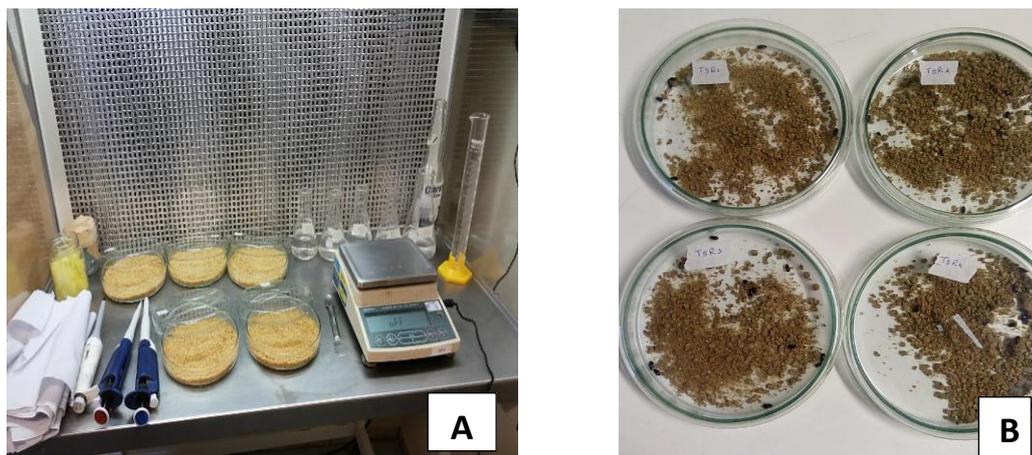


Fonte: Autor, 2019

### 3.3.2 Bioensaio 2: Avaliação das linhagens de *B. thuringiensis* sobre adultos de *A. diaperinus*, em condições de laboratório

A preparação dos tratamentos seguiu o procedimento descrito para o bioensaio 1. Após a evaporação do excesso de água (Figura 4A), o volume total de ração homogeneizada com tratamentos foi dividido em oito porções (2,5 g cada), distribuídas em placas de Petri (15 cm de  $\varnothing \times 2$  cm de altura) (repetições). Em cada placa com a mistura foram alocados 12 insetos adultos, totalizando 96 insetos por tratamento (Figura 4B). Os procedimentos de acondicionamento e avaliação foram os mesmos descritos no bioensaio 1, porém para comprovar a morte dos insetos durante as avaliações, estes foram colocados em placas de Petri vazias e deixados por dois minutos, se os mesmos não apresentassem reação natural era realizada interferência mecânica utilizando pinça, se não observado reação eram considerados mortos.

Figura 4. Etapas de montagem do bioensaio com adultos de *A. diaperinus*: **A**: Placas de Petri com ração de frango + tratamentos em câmara de fluxo laminar; **B**: Placas de Petri (Repetições), com ração e adultos;



Fonte: Autor, 2019

### 3.3.3 Bioensaio 3: Avaliação das linhagens de *B. thuringiensis* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* em condições de semi-campo

Para este bioensaio foram coletados 20 kg de cama-de-aviário de meia idade (4º lote), em aviário comercial, previamente à aplicação de controle químico (vazio sanitário). O material coletado foi alocado em sacos plásticos pretos com capacidade de 100 L, os quais foram mantidos fechados por sete dias em sala de criação ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas), no laboratório de Controle Biológico I para o expurgo de insetos através do acúmulo de amônia proveniente da cama de aviário. Posteriormente o material foi triado em superfície plástica branca para facilitar a retirada de insetos e resíduos ainda presentes no material (Figura 5A). O material livre de resíduos foi alocado em sacos de lixo de 100 L e acondicionado novamente em sala de criação, nas condições descritas para realização de novo expurgo, até o momento de montagem do bioensaio.

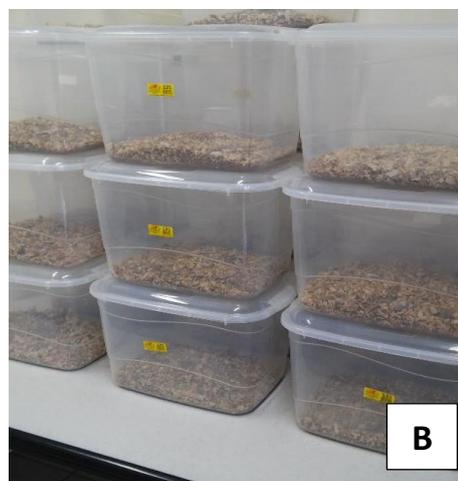
Para a realização deste bioensaio foram utilizadas caixas plásticas com capacidade volumétrica de 19 L (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 20 cm de altura), com tampa, consideradas Unidades Experimentais (UE). Em cada UE foi colocado 0,6 Kg de cama de aviário *in natura*, livre de inseticidas químicos sintéticos, volume correspondente ao utilizado em campo, considerando-se uma camada de 5 cm de espessura e larvas e adultos de *A. diaperinus*. Individualmente cada UE recebeu 10 g de ração de frango de corte (volume que atende às especificações de produção avícola, conforme Wolf et al. (2014)) distribuída sobre a cama e incorporada homogeneamente. Na sequência os insetos foram inseridos nas UE, sendo 20 larvas

de quarto instar e 20 adultos de 15 dias de idade e não sexados de *A. diaperinus* por UE (Figura 5B).

Os tratamentos avaliados foram as linhagens que causaram mortalidade significativa para os insetos no bioensaio 1, sendo, Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137, na concentração de  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> e água esterilizada como testemunha. Os tratamentos foram pulverizados nas UE prontas (cama de aviário, ração de frango de corte e larvas e adultos de *A. diaperinus*) no volume de 3 mL/UE (volume de calda semelhante ao utilizado para aplicação de controle químico), utilizando aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante (1,2 kgf/cm) (Tecnal® TE-058) (Figura 5C). Para cada tratamento foram utilizadas quatro UE, totalizando 80 larvas e 80 adultos por tratamento.

As UE foram alocadas em sala de criação em condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas) (Figura 5D). A avaliação ocorreu no sétimo e décimo dia após a aplicação dos tratamentos, realizando-se a triagem de todo o material presente em cada UE, em bandejas de fundo branco e quantificado o número de indivíduos mortos. Para comprovar a morte dos insetos durante as avaliações, estes foram colocados em placas de Petri vazias e deixados por dois minutos, se os mesmos não apresentassem reação natural, era realizada interferência mecânica utilizando pinça, se não observado reação eram considerados mortos.

Figura 5 - Etapas da montagem do bioensaio de semi campo com larvas e adultos de *A. diaperinus*: **A**: Triagem para retirada de resíduos da cama; **B**: UEs prontas (cama de aviário + ração + larvas e adultos de *A. diaperinus*); **C**: Pulverização dos tratamentos nas UE; **D**: Acondicionamento do bioensaio em sala de criação ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas).





Fonte: Autor, 2019

### 3.4 PERFIL GENÉTICO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *B. thuringiensis*

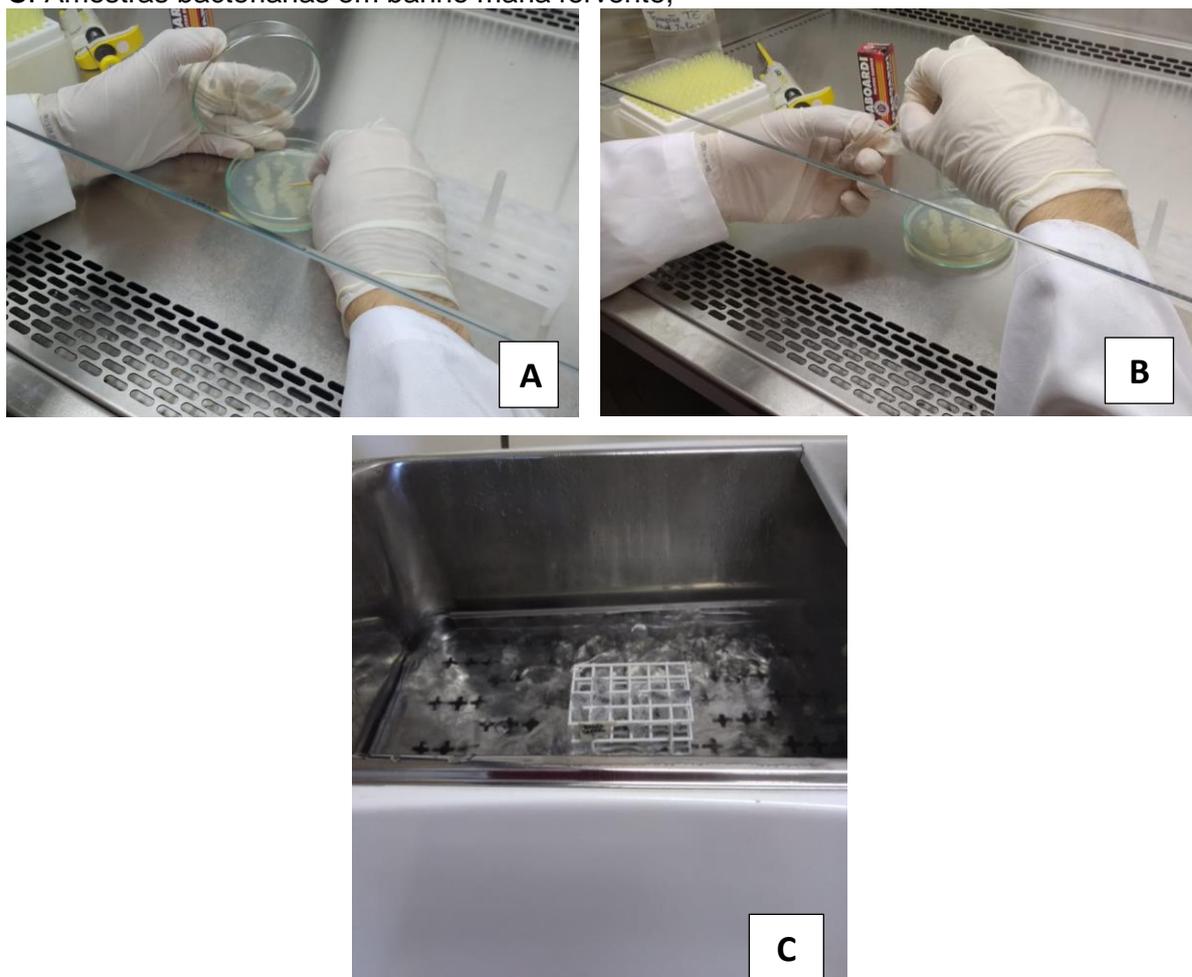
Os procedimentos para as análises moleculares foram realizados no Laboratório de Controle Biológico II, na sala de Biologia Molecular.. As linhagens de *B. thuringiensis* avaliadas nos bioensaios foram analisadas para verificar a presença dos genes *cry* e conseqüentemente traçar o perfil genético de cada uma. Para tal, utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), que amplifica os genes de interesse utilizando-se *primers* específicos e a leitura através de eletroforese em gel de agarose

A partir das suspensões bacterianas (estoque) preparadas conforme descrito por Ricieto et al. (2013), com o auxílio de uma alça de platina, uma alíquota de, aproximadamente 0,2 g de cada linhagem foi inoculada na superfície do meio de cultura e espalhada com o auxílio de uma alça de DriGaslky. Foi preparada uma placa para cada linhagem, sendo estas acondicionadas em câmara climatizada a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, por 18 horas.

Para a extração do DNA, com auxílio de um palito de madeira esterilizado, retirou-se uma amostra de aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro massa bacteriana de cada linhagem (Figura 6A) e alocadas em tubos plásticos tipo Eppendorf, com capacidade de 2,0 mL, com 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-EDTA) (pH 8,0) (Figura 6B). A extração foi realizada por meio do método de fervura em tampão TE a  $102^\circ\text{C}$ , em banho maria (Quimis – Q215M1), por 10 minutos para que ocorresse a lise celular (Figura 6C). Em seguida realizou-se a centrifugação dos tubos em centrífuga (SpinLab

SL-5F), por três minutos a 15.000 g. O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado com auxílio de micropipetador Kasvi e colocado em tubos Eppendorf de 1,5 mL e as amostras foram mantidas em freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  até a realização de PCR, mantendo-se a integridade do DNA (Hansen e Hendriksen, 2001).

Figura 6 - Etapas de preparação do material para realização de PCR: **A:** Retirada de amostra de *B. thuringiensis*; **B:** Inserção de amostra bacteriana em microtubo com tampão; **C:** Amostras bacterianas em banho maria fervente;



Fonte: Autor, 2019

Para a reação de PCR foi utilizada solução MasterMix (Ludwig®) (15  $\mu\text{L}$  de MasterMix, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer e 3  $\mu\text{L}$  de DNA). Essa solução foi utilizada para as seis linhagens de *B. thuringiensis* em tubos do tipo Eppendorf, que foram levados ao termociclador Agilent®, onde ocorreu protocolo com número de ciclos, temperatura e tempo específico para cada primer conforme Tabela 1. Foram utilizados seis pares de primers para amplificação dos genes, *cry1*, *cry2*, *cry 11* (BRAVO, 1998; IBARRA,

2003), *cry 3* (BENDOV, 1997), *cry 4* (BURKARI & SHAKOORI, 2014) e *cry 10* (IBARRA, 2003).

**Tabela 1.** Primer, sequência de nucleotídeos e condições de PCR utilizados para caracterização dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Primer (gene)	Sequência de nucleotídeos	Produto (pb)	Número de ciclos	Tempo (s), Temperatura (°C) Desnaturação	Tempo (s), Temperatura (°C) Anelamento	Tempo (s) e Temperatura (°C) Extensão
<i>cry1</i>	(f) CTGGATTTACAGGTGGGGATAT (r) TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT	558	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry2</i>	(f)GAGTTTAATCGACAAGTAGATA ATTT (r)GGAAAAGAGAATATAAAAATGG CCAG	526	30	60, 94	60, 50	60, 72
<i>cry3</i>	(f) CGTTATCGCAGAGATGACATTAC (r) CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT	652- 733	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry4</i>	(f) GCATATGATGTAGCGAAACAAGC (r) GCGTGACATACCCATTTCCAGGT CC	439	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry10</i>	(f) TCAATGCTCCATCCAATG (r) CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	348	30	45, 94	60, 51	60, 72
<i>cry11</i>	(f) CGCTTACAGGATGGATAGG (r) GCTGAAACGGCACGAATATAAAT A	342- 352	30	60, 94	45, 50	60, 72

Todas as reações contaram com uma etapa inicial de aquecimento à 94°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão à 72 °C por 5 minutos.

Posteriormente, para a visualização dos resultados obtidos pela PCR, foi realizado corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Para tal foram pipetados 8 µL de cada solução com DNA amplificados pela PCR e adicionados em 2µL de Loading Buffer e 1 µL de Gel Red e comparados com 100 marcadores de pares Ladder (Invitrogen, UK) e então as amostras foram alocadas em gel de agarose a 1,2 % e então realizada a corrida. Cada corrida ocorreu nas condições de 100 mA e 80 V, por 60 minutos, as imagens dos géis foram capturadas com fotodocumentador Loccus® e salvas no formato jpeg.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors e como não atenderam a normalidade dos resíduos (pressuposto para realização do teste de análise de variância ANOVA), foi realizado o teste de análise de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Dun a 5%, utilizando-se o programa Bioestat 5.3 (AYRES, 2007)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 BIOENSAIO 1 – AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *B. thuringiensis* SOBRE LARVAS DE QUARTO INSTAR DE *A. diaperinus*, EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

As linhagens de *B. thuringiensis* Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137 causaram mortalidade acumulada, até aos nove dias após a aplicação, para larvas de 4º instar de *A. diaperinus*, respectivamente de 65,6%, 66,6%, 66,6%, e 69,7%. Diferindo significativamente da testemunha (26,0%) (Tabela 2).

Ao observar a mortalidade de larvas de *A. diaperinus* causada pelas diferentes linhagens *B. thuringiensis* subespécie *israelelensis* no decorrer do tempo de avaliação, verifica-se que no período de 24-72 horas, os percentuais não diferiram em relação à testemunha. Já no tempo de 96-144 horas, somente as linhagens Br 67 (32,2%) e Br 80 (30,2%) causaram mortalidade de larvas de *A. diaperinus*, diferindo significativamente da testemunha (9,3%). Por sua vez, no período de 168-216 horas somente a linhagem Br 137 (31,2%) causou mortalidade larval, diferindo da testemunha (10,4%). Já o comparativo da mortalidade causada por cada linhagem bacteriana testada entre os tempos, verificou-se que todas as linhagens causaram maior mortalidade larval nos períodos de 96-144 horas e 168-216 horas diferindo significativamente do período 24-72 horas (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual médio ( $\pm$  EP) de mortalidade ao longo do tempo e acumulada de larvas de 4º instar de *Alphitobius diaperinus*, causada por linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Mortalidade (%)					
Trat	24-72h	96-144h	168-216h	p	Acumulada
Test	2,0 $\pm$ 2,42 <sup>ns</sup>	9,3 $\pm$ 2,63 b	10,4 $\pm$ 3,26 b	>0,05	26,0 $\pm$ 2,87 b

BR 12	10,4 ± 2,93 B	21,8 ± 3,64 abAB	30,2 ± 3,64 abA	<0,05	65,6 ± 4,48 a
BR 58	7,2 ± 2,63 B	27,0 ± 3,90 abA	27,0 ± 2,93 abA	<0,05	66,6 ± 3,30 a
BR 67	10,4 ± 3,26 B	32,2 ± 3,36 aA	21,8 ± 2,97 abAB	<0,05	66,6 ± 3,84 a
BR 80	8,3 ± 2,50 B	30,2 ± 3,64 aA	19,7 ± 2,49 abAB	<0,05	60,4 ± 3,11 ab
BR 137	9,3 ± 2,87 B	28,1 ± 3,74 abA	31,2 ± 3,82 aA	<0,05	69,7 ± 3,42 a
BR 138	3,1 ± 2,07 aB	25,0 ± 4,08 abA	23,9 ± 3,36 abA	<0,05	54,1 ± 3,65 ab
<i>p</i>	>0,05	<0,05	<0,05		<0,05

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Dun a 5%.

#### 4.2 BIOENSAIO 2: AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *B. thuringiensis* SOBRE ADULTOS DE *A. diaperinus*, EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

No bioensaio com adultos de *A. diaperinus*, considerando-se o acumulado de mortes, somente a linhagem Br 58 causou mortalidade aos insetos (35,4%), diferindo significativamente da testemunha (8,3%). Nas avaliações ao longo do tempo, em nenhum dos períodos avaliados as linhagens de *B. thuringiensis* causaram mortalidade significativa. A comparação de mortalidade causada pela mesma linhagem ao longo do tempo, verificou-se que Br 137 e Br 138, causara mortalidade larval nos períodos 96-144 horas e 168-216 horas diferindo do resultado encontrado no período de 24-72 horas (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentual médio (± EP) da mortalidade ao longo do tempo e acumulada de adultos de *Alphitobius diaperinus*, causada por linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Trat	Mortalidade				Acumulada
	24-72h	96-144h	168-216h	<i>p</i>	
Test	1,0 ± 1,66 <sup>NS</sup>	1,0 ± 1,66 <sup>NS</sup>	4,1 ± 2,04 <sup>NS</sup>	>0,05	8,3 ± 2,68 b
BR 12	0,0 ± 0,00 <sup>NS</sup>	2,0 ± 1,89	8,3 ± 2,88	>0,05	14,5 ± 3,93 ab
BR 58	4,1 ± 2,11 <sup>NS</sup>	9,3 ± 3,06	18,7 ± 3,72	>0,05	35,4 ± 4,13 a
BR 67	3,1 ± 2,49 <sup>NS</sup>	5,2 ± 2,49	11,4 ± 3,29	>0,05	22,9 ± 3,26 ab
BR 80	1,0 ± 1,71 <sup>NS</sup>	2,0 ± 1,96	10,4 ± 2,93	>0,05	15,6 ± 3,69 ab
BR 137	1,0 ± 1,71 B	3,1 ± 2,07 A	9,3 ± 2,63 A	>0,05	15,6 ± 2,87 ab
BR 138	1,0 ± 1,71 B	6,2 ± 2,42 AB	11,4 ± 2,97 A	<0,05	20,8 ± 3,54 ab
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05		<0,05

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Dun a 5%.

#### 4.3 BIOENSAIO 3: AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS DE *B. thuringiensis* SOBRE LARVAS E ADULTOS DE *A. diaperinus* EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO

A mortalidade de *A. diaperinus*, tanto para larvas quanto para adultos, causada pelas linhagens de *B. thuringiensis*, Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137 no acumulado das avaliações não diferiu significativamente das testemunhas. O mesmo foi observado na avaliação individual por tempo de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual médio ( $\pm$  EP) da mortalidade ao longo do tempo e acumulada de larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* causada por linhagens de *Bacillus thuringiensis*, em condições de semi-campo.

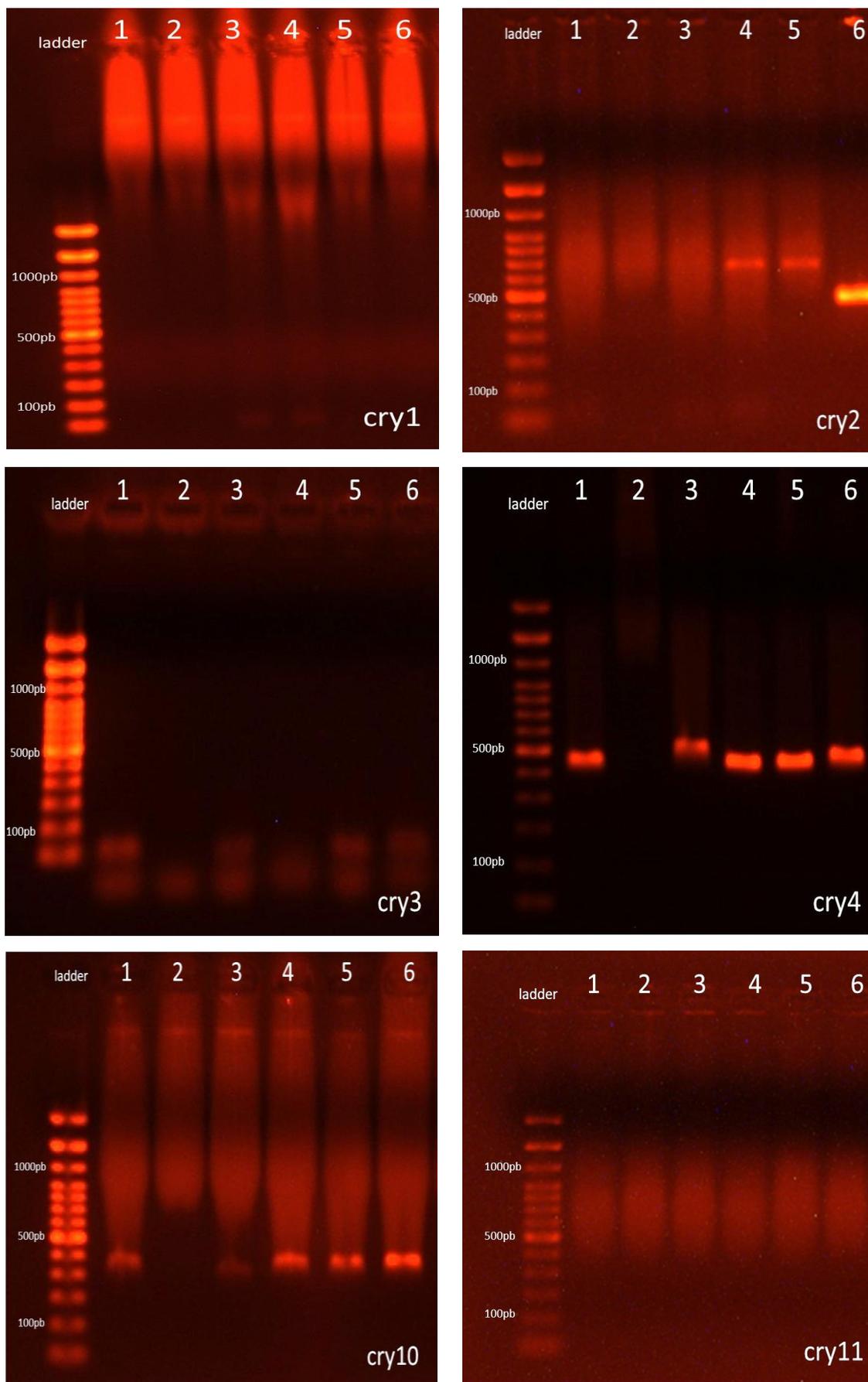
Trat	7° dia		10° dia		Mortalidade acumulada	
	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos
Test	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>ns</sup>	5,0 $\pm$ 3,16 <sup>ns</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>ns</sup>	1,2 $\pm$ 1,58 <sup>ns</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>ns</sup>	6,2 $\pm$ 3,53 <sup>ns</sup>
Br 12	6,2 $\pm$ 3,53	8,7 $\pm$ 3,21	0,0 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,00	6,2 $\pm$ 3,53	8,7 $\pm$ 3,21
Br 58	3,7 $\pm$ 2,73	3,7 $\pm$ 2,73	3,7 $\pm$ 2,73	1,2 $\pm$ 1,58	7,5 $\pm$ 2,94	5,0 $\pm$ 2,65
Br 67	1,2 $\pm$ 1,58	1,2 $\pm$ 1,58	2,5 $\pm$ 2,23	1,2 $\pm$ 1,58	3,7 $\pm$ 2,18	2,5 $\pm$ 1,69
Br 137	7,5 $\pm$ 3,87	7,5 $\pm$ 2,94	5,0 $\pm$ 2,65	2,5 $\pm$ 2,23	12,5 $\pm$ 3,63	10,0 $\pm$ 3,00
<b>p</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Médias ( $\pm$ EP) seguidas por Ns na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

#### 4.4 PERFIL GENÉTICO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *B. thuringiensis* SUBESPÉCIE *israelensis*

As linhagens de *B. thuringiensis* amplificadas por PCR não apresentaram genes *cry1*, *cry2* e *cry3* que expressam respectivamente as toxinas Cry 1, Cry 2 e Cry 3. Contudo, todas as linhagens, com exceção da linhagem Br 67, que não apresentou consistência de banda, apresentaram genes *cry4* e *cry10*, confirmando que as linhagens testadas são pertencentes a subespécie *israelensis* (Figura 7).

Figura 7 - Determinação de perfil genético com primers *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry10* e *cry11* em eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Legenda 1 – Br 80; 2 – Br 67; 3 – Br 137; 4 – Br 12; 5 – Br 58; 6 – Br 138.



Fonte: Autor, 2019

## 5 DISCUSSÃO

A utilização de *B. thuringiensis* ocorre principalmente para controlar insetos-praga pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, por meio de proteínas tóxicas Cry, codificadas pelos genes *cry*, as quais possuem particularidades que teoricamente atuam diretamente sobre ordens específicas (FIUZA et al., 2017; FRANKENHUYZEN, 2009). Os principais aspectos que diferem as linhagens de *B. thuringiensis* e aloca estas em subespécies são o formato do cristal proteico e as proteínas produzidas pelas mesmas. As subespécies mais utilizadas como base para os produtos comerciais são: a subespécie *kurstaki*, com cristais bipiramidais formados principalmente por proteínas Cry1 e Cry2 (FRANKENHUYZEN, 2009); a subespécie *israelensis* caracterizada por cristais em formatos arredondados, formados majoritariamente por proteínas Cry4 (SANAHUJA et al., 2011) e a subespécie *tenebrionis* com cristais de estruturas planas e quadradas, formados por proteínas Cry3 (KRIEG; HUGER; SCHNETTER, 1983).

As especificidades presentes em cada subespécie são utilizadas como modelo inicial para formulação de produtos. Entretanto, o desenvolvimento de resistência de insetos a toxinas Cry já utilizadas em diversas culturas (SIEGWART et al., 2015), torna necessário viabilizar a utilização de subespécies específicas sobre outras ordens de insetos, como a utilização de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* e subespécie *israelensis* para o controle de insetos-praga da ordem Coleoptera. A utilização de subespécies não específicas para o controle de coleópteros, além do viés de manejo de resistência, pode ser vantajosa economicamente, visto que a utilização de linhagens que acometam mais de uma ordem de insetos-praga tende a reduzir custos no manejo de pragas e potencialmente aumentar o rendimento da atividade em que se aplica a estratégia de controle.

No presente estudo, foram utilizadas as linhagens Br 12, Br 58, Br 67, Br 80, Br 137 e Br 138 pertencentes a subespécie *israelensis*, descrita como específica para ordem Diptera. Porém, os resultados de mortalidade obtidos para larvas do coleóptero *A. diaperinus* foram satisfatórios, visto que foram superiores a 60%, conferindo às linhagens potencial inseticida (patogenicidade), em condições de laboratório, para este inseto na fase larval. Méndez-López; Basurto-Ríos; Ibarra (2003) pioneiramente mostraram que isolados de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* são tóxicos para

larvas de *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1876 (Coleoptera: Curculionidae), ocasionando mortalidade larval de 100%. O potencial patogênico sobre coleóptero também foi evidenciado com linhagens de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* que apresentaram  $CL_{50}$  de 0,14 mg/mL, comparando a subespécie *tenebrionis* que apresentou  $CL_{50}$  de 0,32 mg/mL, para o controle de *A. grandis* (MARTINS et al., 2007). A patogenicidade da subespécie *israelensis* para o controle de larvas de *A. grandis* também foi evidenciada por Monnerat et al. (2012) que observaram que isolados de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* apresentaram  $CL_{50}$  de 0,30 mg/mL, semelhante à subespécie *tenebrionis* ( $CL_{50}$  de 0,32 mg/mL) para larvas de *A. grandis*.

Os resultados descritos acima, bem como os obtidos nesse trabalho, sugerem que a utilização de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* pode ser uma estratégia viável para o controle de insetos-praga pertencentes a ordem Coleoptera. As mesmas linhagens utilizadas no referido estudo, com exceção da Br 12, foram avaliadas quanto a toxicidade para larvas da broca do café *H. hampei*, causando mortalidade superior a 90% (ZORZETTI et al., 2018). Ainda, de acordo com os autores, as linhagens Br 58, Br 67, Br 80 e Br 137 foram mais tóxicas, com  $CL_{50}$  variando de  $0,037 \times 10^9$  esporos/mL a  $0,113 \times 10^9$  esporos/mL quando comparadas com a linhagem Br 138, com  $CL_{50}$  de  $0,251 \times 10^9$  esporos/mL. Os resultados do presente trabalho corroboram que as linhagens da subespécie *israelensis* são patogênicas para coleópteros, sendo que as linhagens que apresentam maior patogenicidade para *A. diaperinus* são Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137, causando mortalidade larval superior a 65%, diferindo significativamente da testemunha (26%).

O uso de *B. thuringiensis* para controlar diversos insetos-praga da ordem Coleoptera tem sido estudado em trabalhos de seleção de linhagens de subespécie *tenebrionis* (específica para coleópteros), bem como com as subespécies *kurstaki* e *israelensis*, que são específicas para outras ordens de insetos-praga. O intuito de tais estudos é ampliar a gama de subespécies de *B. thuringiensis* com patogenicidade confirmada para o controle de coleópteros, além de fornecer mais possibilidades de produtos para o mercado de inseticidas biológicos

O isolado de *B. thuringiensis* subespécie *tenebrionis*, na concentração de 300 ppm causou mortalidade de 100% em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Crysomelidae) (CIDARIA et al., 1991). Estudos com *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* para o controle de *A. diaperinus* evidenciaram que embora o isolado não tenha causado mortalidade significativa para *A. diaperinus*, o mesmo

causou efeito subletal, reduzindo o empupamento em mais de 80% (HASAN; REZA, 2002). Além disso, de acordo com os autores, foi necessário utilizar concentrações superiores (300 ppm) à recomendada para insetos da ordem Lepidoptera (200 ppm), ou seja, um mesmo isolado, em diferentes concentrações pode ser tóxico para espécies de insetos de diferentes ordens.

A avaliação de 2652 isolados de *B. thuringiensis* resultou na seleção de 28 isolados das subespécies *kurstaki*, *kinyae* e *darmstadienis* considerados tóxicos para *L. serricorne*, por reduzirem a taxa de emergência, causando mortalidade acima de 85% a adultos dos insetos. Já com relação a patogenicidade, somente dois isolados da subespécie *darmstadienis* causaram mortalidade larval superior a 40% (TSUCHIYA et al., 2002). A pré-seleção de 300 isolados de *B. thuringiensis* testados sobre insetos-praga pertencentes as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera identificou dois isolados (S234 e S997) com potencial inseticida para as três ordens, com respectivas  $CL_{50}$  de  $10,4 \times 10^{-3}$  e  $1,8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g.mL}$  para larvas de *A. grandis*. Importante destacar que estas  $CL_{50}$  foram até 300 vezes superiores a  $CL_{50}$  atribuída a subespécie *tenebrionis*  $537 \times 10^{-3}$  (PRAÇA et al., 2004).

*Bacillus thuringiensis* subespécie *kurstaki* apresentou patogenicidade para *A. grandis*. No entanto o fracionamento das toxinas oriundas da bactéria evidenciou que parte da toxicidade foi atribuída a  $\beta$ -exotoxinas e não somente as delta-endotoxinas. (PÉREZ et al., 2017). Os autores ainda salientam que as  $\beta$ -exotoxinas limitam a recomendação dos isolados para a formulação de produtos, devido principalmente aos efeitos teratogênicos a mamíferos.

Eski et al. (2017) utilizaram isolado de *B. thuringiensis* subespécie *tenebrionis* pré-selecionado, na condição de produto formulado e não formulado para controle de *Agelastica alni* Linnaeus 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae) e verificaram o potencial inseticida do agente, causando mortalidade com produtos formulados de 94% e 82%, para larvas e adultos de *A. alni*, respectivamente. Ainda, de acordo com os resultados encontrados pelos autores, o procedimento de produção comercial de *B. thuringiensis* aumentou a patogenicidade em comparação com o isolado fermentado.

A linhagem de *B. thuringiensis* HA foi testada em diferentes concentrações e ocasionou mortalidade larval de *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver 1790 (Coleoptera: Curculionidae) Os resultados encontrados mostram percentuais variando de 16% ( $3,48 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>) a 94% ( $2,18 \times 10^{11}$  UFC/mL<sup>-1</sup>) apresentando relação positiva

com a concentração utilizada da bactéria, ou seja conforme a concentração aumentou, a mortalidade larval também foi maior (PU et al., 2017).

A utilização de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* na concentração de  $4 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> causou mortalidade em 100% das larvas de quarto instar *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomeloidae). Além da mortalidade observou-se efeitos subletais como o aumento do ciclo de vida da praga e redução dos níveis de enzimas que atuam no trato digestório, aumentando assim a patogenicidade da bactéria (MALAIKOZHUNDAN; VINODHINI, 2018). Em observância aos resultados descritos nos trabalhos citados anteriormente, bem como aos dados obtidos no presente estudo, evidencia-se que *B. thuringiensis* subespécies *kurstaki* e *israelensis* são patogênicas a diferentes espécies de coleópteros, ampliando a gama de possíveis ingredientes ativos para produtos, bem como a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias de controle.

Diferentemente do observado nos bioensaios *in vitro*, com relação aos estudos de semi-campo, verificou-se que as linhagens de *B. thuringiensis* Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137 não causaram mortalidade para larvas e adultos de *A. diaperinus*. Tais resultados sugerem que a forma de contato do inseto com o patógeno utilizada no experimento não foi eficiente para causar mortalidade em larvas e adultos de *A. diaperinus*. Na mistura da bactéria com a cama de aviário e ração, a ingestão desta pode não ter ocorrido devido a ampla oferta de alimento disponível (detritos na cama). Os insetos podem detectar a presença de *B. thuringiensis* como agente estranho e ter dado preferência ao substrato sem a presença do patógeno ou ainda cessado a alimentação. De acordo com Silva; Hoff; Doyle (2005) *A. diaperinus* é capaz de manter-se no ambiente por longos períodos de tempo sem necessitar se alimentar.

Essa diferença de resultados observada entre estudos de laboratório e condições de campo verificados com *B. thuringiensis* também é evidenciada com outros agentes de controle tendo *A. diaperinus* como praga alvo, como a utilização de terra de diatomácea (ALVES; OLIVEIRA; NEVES, 2008), uso de feromônios (COSSÉ; ZILKOWSKI, 2015; SINGH; JOHNSON, 2012) e inseticidas químicos sintéticos (AXTELL; ARENDS, 1990; HICKMANN et al., 2018; LAMBKIN, 2005; LAMBKIN; FURLONG, 2011; LAMBKIN; RICE; FURLONG, 2010).

A distribuição de *A. diaperinus* no interior do aviário é outro fator preponderante para obtenção de êxito no controle. Os insetos concentram-se nas áreas de comedouros e bebedouros e em pilares de sustentação, dessa forma

considera-se que a infestação de *A. diaperinus* se restrinja a 5% da área total do aviário (LAMBKIN et al., 2008; SCHMITZ; WOHLGEMUTH, 1988). Apesar do conhecimento sobre distribuição espacial dos insetos dentro do aviário, a definição de locais de aplicação não é facilitada, de forma que o comportamento dos insetos em condições adversas é movimentar-se horizontalmente para locais propícios ao seu desenvolvimento.

Além da distribuição, o comportamento críptico torna-se outro fator que dificulta a ação do agente de controle, com os insetos alocando-se em extratos inferiores no substrato de criação (RUMBOS et al., 2018). Ainda conforme os autores *A. diaperinus* tem como hábito alimentar-se de aves mortas, fezes de aves e ração. Este comportamento implica diretamente para expressão da patogenicidade de *B. thuringiensis* à campo, sendo que os insetos podem não ingerir o entomopatógeno, pois este durante o período de alocação das aves, estaria presente no extrato superior do substrato de criação. Além dos fatores mencionados acima, diretamente impactantes na patogenicidade a campo, os mecanismos de resistência apresentados por *A. diaperinus*, tais como resistência a temperaturas muito altas ou baixas, regulação do consumo de O<sub>2</sub> e estado de hibernação cessando a alimentação (BJØRGE et al., 2018; RENAULT; HERVANT; VERNON, 2003) também podem reduzir o contato de *B. thuringiensis* e conseqüentemente diminuir a patogenicidade do agente de controle, pois os insetos não ingerem o mesmo.

Com relação ao perfil genético, verificou-se que os isolados testados que causaram mortalidade a *A. diaperinus* apresentaram os genes que codificam as proteínas *Cry4* e *Cry10*, descritas como toxinas oriundas de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, a qual possui atividade inseticida para insetos da ordem Diptera. Em trabalho semelhante, com as mesmas linhagens, foram identificadas as toxinas *Cry4*, *Cry10* e *Cry11*, bem como a atividade tóxica para o coleóptero *H. hampei* (ZORZETTI et al., 2018). A proteína *Cry4* é o principal fator que confere a subespécie *israelensis* o potencial inseticida para dípteros, porém a verificação da presença de mais de um gene *cry* nas linhagens testadas permite inferir que a ação conjunta dos genes *cry 4* e *cry 10* é o que confere a patogenicidade aos coleópteros *A. diaperinus* e *H. hampei*.

A toxina *Cry* com maior potencial inseticida para coleópteros é codificada pelo gene *cry3*, o qual caracteriza a subespécie *tenebrionis*, que apresentam ação específica para insetos da ordem Coleoptera (KRIEG; HUGER; SCHNETTER, 1983).

A proteína Cry3 apresentou toxicidade para larvas de quarto instar de *A. diaperinus*, sendo que a atividade tóxica relacionada ao receptor específico AdCad1, da família das caderinas (HUA; PARK; ADANG, 2014). Já Park et al. (2014) verificaram relação de peptídeos DvCad1-Cr8 e Cr10 com a atividade tóxica das proteínas Cry3 e Cry8, para larvas de *A. diaperinus*. A pesquisa ainda mostra que quando fornecida a toxina juntamente com o peptídeo receptor, o percentual de mortalidade aumenta. Além da proteína Cry3, outras toxinas podem apresentar efeito tóxico para coleópteros. Zhong et al. (2000) que identificaram que a linhagem de *B. thuringiensis* com predominância de gene *cry 1* causou 100% de mortalidade para larvas de *Chrysomela scripta* Fabricius 1801 (Coleoptera: Chrysomelidae).

Os trabalhos mencionados anteriormente evidenciam que as toxinas Cry1 e Cry3 possuem atividade inseticida para coleópteros. Já no presente trabalho a presença dos genes *cry4* e *cry10* possivelmente são os fatores responsáveis pela atividade tóxica das linhagens testadas para controlar larvas de quarto instar de *A. diaperinus*. Tal diversidade de genes e efeitos tóxicos resultantes, evidenciam a necessidade de se traçar o perfil genético do isolado estudado para melhor compreender seus possíveis efeitos sobre diferentes espécies.

Diante de todo o contexto, é importante destacar que estudos de laboratório para a identificação da patogenicidade, bem como o perfil genético dos isolados em estudo são fundamentais para a compreensão dos possíveis efeitos do patógeno. Vale ressaltar ainda que em estudos de laboratório os insetos são expostos a grandes quantidades do patógeno, enquanto em simulações de campo ou em campo a exposição é menor, conforme a estratégia de aplicação. Conforme destaca Rumbos et al. (2018), a utilização de *B. thuringiensis* para o controle de *A. diaperinus* em campo é uma estratégia inovadora, o que requer estudos sobre os diferentes fatores implicantes. Nesse atinente, além de estudos de laboratório que visam a seleção e identificação de isolados patogênicos, é necessário considerar todas as possibilidades supracitadas em futuros estudos visando lograr êxito na utilização de *B. thuringiensis* para o controle de *A. diaperinus* em condições de campo.

As vantagens advindas da utilização de *B. thuringiensis* na avicultura podem ser inúmeras, visando ser um método de controle que proporciona sustentabilidade devido ao seu baixo potencial residual e por não causar danos ambientais. Porém a maior vantagem concentra-se em um método de controle efetivo para *A. diaperinus*

que pode ser aplicado durante período de alojamento das aves, sem causar danos as mesmas, além de oferecer biossegurança aos profissionais que as manejam.

## 5 CONCLUSÃO

As linhagens de *B. thuringiensis* (Br 12, Br 58, Br 67 e Br 137) são patogênicas para larvas de *A. diaperinus* e somente a linhagem Br 58 é patogênica para adultos. Por outro lado, nas condições de semi campo nenhuma linhagem de *B. thuringiensis* foi patogênica a *A. diaperinus*.

Na determinação do perfil genético das linhagens todas apresentaram genes que expressam toxinas *Cry4* e *Cry10*, alocando estas como pertencentes a subespécie *israelensis*, com exceção da linhagem Br 67 que não apresentou consistência de banda, não sendo possível identificar a subespécie da mesma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatórios Anual**. Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2017\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2017_portugues_web_reduzido.pdf)>.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 74, p. 19–31, 1999.
- ALVES, L. F. A. et al. *Beauveria bassiana* Applied to Broiler Chicken Houses as Biocontrol of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), an Avian Pathogens Vector. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 4, p. 459–466, 2015.
- ALVES, L. F. A. et al. In vitro assay and morphological characterization of a new product based on diatomaceous earth for lesser mealworm control in poultry houses. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–6, 2017.
- ALVES, L. F. A.; OLIVEIRA, D. G. P.; NEVES, P. M. O. J. Fatores que afetam a eficiência da Terra de Diatomácea no controle de adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 716–722, 2008.
- ANDRADE ANGELO, E.; TRINDADE VILAS-BÔAS, G.; JORGE HERNAN CASTRO-GÓMEZ, R. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945–958, 2010.
- ANGUS, T. A. Association of toxicity with protein- crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. **Can. J. Microbiol.**, v. 2, n. 268, p. 122–131, 1956.
- ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 466–474, 2002.
- ARENA, J. S. et al. Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. December 2017, p. 190–194, 2018.
- AVILA, V. S. et al. Boas Práticas de Produção de Frangos de Corte. **Circular técnica**, v. 1, p. 1–4, 2007.
- AYRES, M. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, 2007.
- AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p. 101–126, 1990.

BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008.

BEEGLE, C.; YAMAMOTO, T. History of *Bacillus Thuringiensis* Berliner Research And Development. **The Canadian Entomologist**, v. 124, p. 588–616, 1992.

BJØRGE, J. D. et al. Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. **Journal of Insect Physiology**, v. 107, n. September 2017, p. 89–96, 2018.

BRAR, S. K. et al. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323–342, 2006.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

CASTAGNOLA, A.; STOCK, S. P. Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. **Insects**, v. 5, n. 1, p. 139–166, 2014.

CHAKROUN, M.; BEL, Y.; ESCRICHE, B. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins ( Vip ) from. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 80, n. 2, p. 329–350, 2016.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. DE. Exigências Térmicas, Período de Desenvolvimento e Sobrevivência de Imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 365–368, 2001.

CIDARIA, D. et al. A novel strain of *Bacillus thuringiensis* (NCIMB 40152) active against coleopteran insects. **FEMS Microbiology Letters**, v. 81, n. 2, p. 129–134, 1991.

CIELO, I. D.; JUNIOR, W. F. DA R.; RIBEIRO, M. C. P. O sistema de integração da avicultura de corte na mesorregião oeste paranaense: uma análise sob a ótica da nova economia institucional. **Revista Tecnologia Sociedade**, v. 13, n. 29, p. 177–191, 2017.

COSSÉ, A. A.; ZILKOWSKI, B. W. Behavioral Responses of Lesser Mealworm Beetles, *Alphitobius diaperinus*, (Coleoptera: Tenebrionidae) to Pheromone Components Using a Wind Tunnel Dual Choice Walking Bioassay. **Journal of Insect Behavior**, v. 28, n. 2, p. 202–210, 2015.

CRICKMORE, N. et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 62, n. 3, p.

807–813, 1998.

DA SILVA SOARES, C. E.; WEBER, A.; SCUSSEL, V. M. Stereo and scanning electron microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*) - a filamentous toxigenic fungi carrier. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 150–156, 2018.

DASHORA, K. et al. Pest management through *Bacillus thuringiensis* (Bt) in a tea-silkworm ecosystem: status and potential prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1795–1803, 2017.

DEL VALLE, E. E. et al. Biological control of *Alphitobius diaperinus* with *Steinernema rarum* CUL and *Heterorhabditis bacteriophora* SMC and feasibility of application in rice hull. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 1, p. 161–170, 2016.

ESKI, A. et al. A new biopesticide from a local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Xd3) against alder leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 1–9, 2017.

FILLINGER, U.; KNOLS, B. G. J.; BECKER, N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 1, p. 37–47, 2003.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de. **Biociência**, v. 38, p. 32–35, 2009.

FIUZA, L. M. et al. **Characterization and use in the field of biocontrol**. [s.l.: s.n.].

FIÚZA, L. M. Registro e comercialização. **Biociência**, v. 38, p. 58–60, 2010.

FRANCISCO, O.; PRADO, A. P. DO. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p. 125–131, 2001.

FRANKENHUYZEN, K. VAN. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 1–16, 2009.

GALLO D. et al., **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GARG, U. K. et al. Pathophysiological Effects of Chronic Toxicity with Synthetic Pyrethroid, Organophosphate and Chlorinated Pesticides on Bone Health of Broiler Chicks. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 3, p. 364–369, 2004.

GAZONI, F. L. et al. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 69–74, 2012.

GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30,

n. 5, p. 250–258, 2012.

HANNAY, C. L. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore-forming Bacteria. **Nature**, v. 172, p. 1004, 1953.

HASAN, M.; REZA, A. M. S. Response of *Alphitobius diaperinus* Panzer to *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. **Entomon**, v. 27, n. 4, 2002.

HATT, S. et al. Spatial diversification of agroecosystems to enhance biological control and other regulating services: An agroecological perspective. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 600–611, 2018.

HICKLE, L. A.; BRADFISCH, G. A.; SICK, A. J. **Use of *Bacillus thuringiensis* Microbe for Controlling Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus***, 1991.

HICKMANN, F. et al. Susceptibility of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), from Broiler Farms of Southern Brazil to Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 980–985, 2018.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–55, 1989.

HUA, G.; PARK, Y.; ADANG, M. J. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 11–17, 2014.

JAPP, A. K.; BICHO, C. DE L.; SILVA, A. V. F. DA. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1668–1673, 2010.

KAELIN, P. et al. Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates on *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 35, n. 2, p. 145–158, 1999.

KNOWLES, B. H. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -Endotoxins. **Advances in insect physiology**, v. 24, p. 275–308, 1994.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 243–270, 1998.

KRIEG, V. A.; HUGER, A. M.; SCHNETTER, W. gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. **Z. ang. Ent.**, v. 96, p. 500–508, 1983.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2 Suppl, p. 133–63, 2007.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LAMBKIN, T. A. Baseline responses of adult *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) to fenitrothion and susceptibility status of populations in Queensland and New South Wales, Australia. **J. Econ. Entomol.**, v. 98, n. 3, p. 938–942, 2005.

LAMBKIN, T. A. et al. Factors affecting localized abundance and distribution of lesser mealworm in earth-floor broiler houses in subtropical Australia. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 1, p. 61–67, 2008.

LAMBKIN, T. A.; FURLONG, M. J. Metabolic Mechanisms Only Partially Explain Resistance to Pyrethroids in Australian Broiler House Populations of Lesser Mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 629–635, 2011.

LAMBKIN, T. A.; FURLONG, M. J. Application of Spinosad Increases the Susceptibility of Insecticide-Resistant; *Alphitobius diaperinus*; (Coleoptera: Tenebrionidae) to Pyrethroids. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 4, p. 1590–1598, 2014.

LAMBKIN, T. A.; RICE, S. J.; FURLONG, M. Responses of Susceptible and Cyfluthrin-Resistant Broiler House Populations of Lesser Mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) to  $\gamma$ -Cyhalothrin. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 6, p. 2155–2163, 2010.

LOZANO, E. R. et al. Action of natural phytosanitary products on *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S-1905. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 2, p. 223–231, 2017.

MALAIKOZHUNDAN, B.; VINODHINI, J. Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. September 2017, p. 139–146, 2018.

MARCOMINI, A. M. et al. Atividade Inseticida De Extratos Vegetais E Do Óleo De Nim Sobre Adultos De *Alphitobius Diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 76, n. 3, p. 409–416, 2009.

MARTINS, É. S. et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 65–68, 2007.

MCPHERSON, S. A. et al. Characterization of the Coleoptera-Specific Protein Gene of *Bacillus thuringiensis* Var. *Tenebrionis*. **Nature biotechnology**, v. 6, p. 709–712, 1988.

MACARI M et al. **Produção de frangos de corte**. 2 ed. São Paulo: Facta, 2014.

MÉNDEZ-LÓPEZ, I.; BASURTO-RÍOS, R.; IBARRA, J. E. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n. 1, p. 73–77, 2003.

- MONNERAT, R. et al. Activity of a Brazilian Strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against the Cotton Boll Weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 1, p. 62–67, 2012.
- OLIVEIRA, D. G. P.; BONINI, A. K.; ALVES, L. F. A. Field Assessments to Control the Lesser Mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) Using Diatomaceous Earth in Poultry Houses. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 6, p. 2716–2723, 2017.
- PARK, Y. et al. A coleopteran cadherin fragment synergizes toxicity of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry3Aa, Cry3Bb, and Cry8Ca against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 123, p. 1–5, 2014.
- PARNELL, J. J. et al. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1110, p. 1–12, 2016.
- PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, n. October, p. 345–355, 2014.
- PÉREZ, M. P. et al. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 264–272, 2017.
- PRAÇA, L. B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesq. agropec. bras**, v. 39, n. 1, p. 11–16, 2004.
- PU, Y. C. et al. An entomopathogenic bacterium strain, *Bacillus thuringiensis*, as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Management Science**, v. 73, n. 7, p. 1494–1502, 2017.
- RABINOVITCH, L. et al. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. In: **Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol**. [s.l.: s.n.]. p. 1–18.
- RENAULT, D.; HERVANT, F.; VERNON, P. Effect of food shortage and temperature on oxygen consumption in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Physiological Entomology**, v. 28, n. 4, p. 261–267, 2003.
- RICIETO, A. P. S. et al. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. **Canadian journal of microbiology**, v. 59, n. 1, p. 28–33, 2013.
- RITCHIE, S. A.; RAPLEY, L. P.; BENJAMIN, S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1053–1059, 2010.

RUMBOS, C. I. et al. The lesser mealworm *Alphitobius diaperinus*: a noxious pest or a promising nutrient source? **Reviews in Aquaculture**, v. 2, p. 1–20, 2018.

SALIN, C. et al. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. **European Journal of Soil Biology**, v. 36, n. 2, p. 107–115, 2000.

SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 283–300, 2011.

SCHMITZ, V. M.; WOHLGEMUTH, R. Untersuchungen zum Massenaufreten und Verhalten von *Alphitobius diaperinus* Panz. (Coleoptera, Tenebrionidae) in Huhnermastbetrieben als Grundlage zur praxisgerechten Bekämpfung. **Anz Schadlingskde**, v. 61, p. 108–114, 1988.

SIEGWART, M. et al. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. June, p. 1–19, 2015.

SILVA, A. S.; HOFF, G.; DOYLE, R. L. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 177–181, 2005.

SINGH, N.; JOHNSON, D. Baseline Susceptibility and Cross-Resistance in Adult and Larval *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) Collected from Poultry Farms in Arkansas. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 4, p. 1994–1999, 2015.

SINGH, N.; JOHNSON, D. T. Attractiveness of an Aggregation Pheromone Lure and Chicken Droppings to Adults and Larvae of *Alphitobius diaperinus*; (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 6, p. 2196–2206, 2012.

SOBERÓN, M.; LÓPEZ-DÍAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, v. 41, p. 87–93, 2013.

STEINHAUS, E. A. Potentialities for microbial control of insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 676–680, 1956.

TOMBERLIN, J. K.; RICHMAN, D.; MYERS, H. M. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) from broiler facilities in Texas to four insecticides. **J. Econ. Entomol**, v. 101, n. 2, p. 480–483, 2008.

TSUCHIYA, S. et al. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 122–126, 2002.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 1, p. 1–12, 2012.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: Plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, n. 1, p. 1–20, 2012.

VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39–59, 2018.

VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v. 48, n. 2, p. 123–139, 2003.

WOLF, J. et al. Métodos físicos e cal hidratada para manejo do cascudinho dos aviários. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 161–166, 2014.

WOLF, J. et al. Combined physical and chemical methods to control lesser mealworm beetles under laboratory conditions. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1145–1149, 2015.

WOOD-GUSH, D. G. M. A History of the Domestic Chicken from Antiquity to the 19th Century. **Poultry Science**, v. 38, n. 2, p. 321–326, 1959.

ZHANG, Y. et al. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins Affect Lifespan and Reproductive Performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* Adults *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins Affect Lifespan and Reproductive Performance of Hel. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 614–621, 2013.

ZORZETTI, J. et al. Genome Sequence of the Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Strain BR58, a Biopesticide Product Effective against the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*). **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. 6–7, 2015.

ZORZETTI, J. et al. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains active against *Elasmopalpus lignosellus*; (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 417, 2017.

ZORZETTI, J. et al. Isolation, morphological and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 3, p. 198–204, 2018.