JANAINA ZORZETTI

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* VIRULENTOS A *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

Londrina
2015

JANAINA ZORZETTI

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* VIRULENTOS A *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito à obtenção do título de Doutora em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
Coorientadora: Prof. Dra. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas

Londrina
2015

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Z88s Zorzetti, Janaina.
Seleção e caracterização morfológica e molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* virulentos a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) / Janaina Zorzetti. – Londrina, 2015.
93 f. : il.

Orientador: Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.
Coorientador: Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Boas.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Inseto – Controle biológico – Teses. 2. Bactérias entomopatogênicas – Teses. 3. Proteínas microbianas – Teses. 4. Bacillus thuringiensis – Teses. 5. Broca-do-café – Teses. I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro. II. Vilas-Boas, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.937

JANAINA ZORZETTI

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* VIRULENTOS A *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito à obtenção do título de Doutora em Agronomia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Pedro Moises Oliveira Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Patricia Helena Santoro
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

Prof. Dra. Viviane Sandra Alves
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Prof. Dr. Amarildo Pasini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Pesquisador Dr. Samuel Roggia
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Prof. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de maio de 2015.

“Aos meus queridos pais, Odair e Amelia, e minha irmã Luciane, exemplo de coragem e dedicação, que alimentaram meus sonhos e meu coração e foram a base de todas as conquitas”

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por toda sabedoria e fortaleza e pela oportunidade de vivenciar e obter tamanha experiência e conhecimento. Tão pequena sou diante de um Deus tão grande!

Aos meus pais, Odair e Amelia, por todo amor e amizade, por serem exemplo de trabalho e dedicação, e por me apoair em todas as decisões. Sem vocês nada disso seria possível!!

A minha família, tios, primos, minha irmã Luciane e meu cunhado Fernando, pelo constante respaldo e amizade, e por valorizar a importância de toda a dedicação aos estudos. E em especial ao meu sobrinho Pedro, por tanto amor que tenho e por alegrar meus dias.

Ao meu querido Tiago, por todo apoio, carinho e paciência. Por me passar tanta tranquilidade e me fazer acreditar que podemos ser tudo o que queremos. Obrigada por fazer minha vida mais feliz!

Ao meu orientador, Professor Dr. Pedro M. O. J. Neves, pelo aprendizado e amizade ao longo desses 12 anos de orientação! Obrigada pela confiança, paciência e pela oportunidade de adquirir conhecimento e experiência.

A minha coorientadora, Professora Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas e ao Professor Dr. Laurival Vilas-Bôas, por transmitirem conhecimento e me ajudar a entender algo que era tão distante para mim! Obrigada por acreditatem em minha capacidade de aprendizado e por não me deixarem desistir sem antes ter tentado!

A Pesquisadora Dra. Ana Maria Meneguim, por todo seu empenho no estudo e viabilização da dieta artificial para criação de *H. hampei*, o que permitiu a realização desse trabalho; pela orientação, sugestões, pela oportunidade de aprendizado e receptividade em seu laboratório, e em especial pela amizade e conselhos nessa longa caminhada.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, por todo o conhecimento transmitido. Em especial a Professora Dra Inês Cristina Batista Fonseca pela colaboração nas análises estatísticas e ao Professor Dr. Ayres Menezes por toda ajuda e amizade, e a secretária Weda Westin, por sua paciência e dedicação.

Aos membros da banca, Dra. Patricia Helena Santoro, Professor Dr. Amarildo Pasini, Professor Dr. Mauricio Ventura e Professora Dra. Viviane Alves, e pelos suplentes Dr. Samuel Roggia e Professora Dra. Inês Cristina Batista de Fonseca pela disponibilidade em contribuir e acrescentar sabedoria ao presente trabalho.

A todo pessoal do laboratório de Entomologia do IAPAR, as estagiárias Rosenilda e Bruna, especialmente as funcionárias e amigas Aline Pissinati e Edilene Sarcomam, sempre disponíveis a ajudar e transmitir experiências.

As minhas grandes amigas, Patricia e Kelly Constanski, por tantos anos de convivência, pela amizade e pela ajuda (física e emocional) na realização desse e de tantos outros trabalhos. Independente do tempo e distância, a amizade e carinho que tenho por vocês permanecerá, e a alegria de cada reencontro será sempre a mesma.

Aos amigos Ana Paula Ricietto e Ivan Rodrigo Wolf, pela paciência, ensinamentos e por toda a ajuda nas análises de dados e realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Genética, Fernanda Fazion, Ana Paula Ricietto, Josiane Scarpassa, Priscila Cardoso, Amanda Lunardeli, Carla, André Barbosa e Fernanda Henrique, e pelos amigos do laboratorio de Entomologia, Junio Amaro, Adriano Hoshino, Orcial Bortolotto, Mariana Sismeiro, Viviane Dutra e Davi Tramontina, por tanto tempo de convivência, boas histórias e trabalhos juntos. Amizade de pessoas assim é gratificante e fundamental em nossa vida.

ZORZETTI, Janaina. **Seleção e caracterização morfológica e molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* virulentos a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).** 2015. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A cultura do cafeeiro tem grande importância mundial, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de café. Entretanto, está sujeita a diversos problemas fitossanitários, como a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), que causa danos diretos pela destruição das sementes, e indiretos por afetar a qualidade da bebida do café. O controle químico é o método mais utilizado, o que pode levar à contaminação ambiental e humana. Uma alternativa ao uso de produtos químicos seria a utilização da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner, que é altamente específica ao inseto e inócua ao homem. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *B. thuringiensis* virulentos a *H. hampei*, caracterizá-los por métodos morfológicos e moleculares e identificar proteínas Cry com potencial controle dessa espécie para uma possível utilização na produção de plantas geneticamente modificadas. Para isso, 34 isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram toxicidade a insetos da ordem Coleoptera e Diptera foram avaliados em bioensaio seletivo, quanto à toxicidade a larvas de 1º ínstar de *H. hampei*. Entre os isolados testados, 11 além da linhagem padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, provocaram mortalidades acima de 90% e foram submetidos à estimativa da concentração letal média (CL_{50}) e caracterizados por métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares. A CL_{50} dos isolados selecionados variou de 0.037E+9 a 0.956E+9 esporos mL^{-1}. A menor concentração letal foi obtida com o isolado BR58, seguido pela linhagem padrão IPS82, e pelos isolados BR137, BR80, BR67 e BR81. A caracterização molecular identificou a presença dos genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11* e *cyt1* em dez isolados que apresentaram perfis gênicos semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. O isolado BR67 diferiu completamente dos demais, e amplificou apenas o gene *cry3*. O perfil proteico revelou proteínas de 28, 65, 70 e 130 kDa, e a análise morfológica identificou inclusões cristalinas esféricas em todos os isolados, semelhantes à linhagem padrão. Para o isolado BR58, que apresentou a menor CL_{50}, foi realizado o sequenciamento do genoma total, o que revelou a presença dos genes *cry30Aa1* e *cry60Aa2* e permitiu a obtenção de subclasses para os genes *cry4Aa1, cry4Ba1 cry10Aa3, cry11Aa1* e *cyt1Aa1* identificados por PCR. Os resultados obtidos revelam que os 11 isolados estudados, especialmente o isolado BR58, têm potencial para serem utilizados como fonte de genes para a produção de plantas de cafeeiro resistentes a *H. hampei*.

Palavras-chave: Controle microbiano. Proteínas Cry. Bactérias entomopatogênicas. Broca-do-café.

ZORZETTI, Janaina. **Selection and characterization morphological and molecular of the *Bacillus thuringiensis* strains virulent to *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).** 2015. 93 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The coffee crop has great importance worldwide, and Brazil is the largest producer and exporter of coffee. However, it is subject to various plant health problems, such as the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), which causes direct damage by the destruction of seeds, and indirect to by affecting the coffee beverage quality. Chemical control method is the most widely used, which can lead to environmental and human contamination. An alternative to chemical use would be the use of entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner, which is highly specific to insects and harmless to man. The objective of this work was to select *B. thuringiensis* strains virulent to *H. hampei*, characterize them by morphological and molecular methods and identify Cry proteins with potential control for this species for possible use in the production of genetically modified plants. For this, 34 *B. thuringiensis* strains that were toxic to Coleoptera and Diptera insects were evaluated in selective bioassay for coffee berry borer 1st instar larval toxicity. Among the strains tested, 11 beyond the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain, which caused over 90% mortality was subjected to estimation of the median lethal concentration (LC_{50}) and characterized by morphological, biochemical and molecular methods. The LC_{50} to selected strains ranged from 0.037E+9 to 0.956E+9 spores mL^{-1}. The lowest lethal concentration was obtained with the strain BR58, followed by the standard strain IPS82, and the strains BR137, BR80, BR67 and BR81. The molecular characterization identified the *cry4A*, *cry4B, cry10, cry11* and *cyt1* genes in ten isolates showing that it had genetic profiles similar to standard *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. The strains BR67 differed completely from the others strains, just presenting the *cry3* gene. The protein profile revealed proteins of 28, 65, 70 and 130 kDa, and morphological analysis reveles that all isolates produced round crystals, similar to the standard strain. The strain BR58, which had the lowest $LC_{50,}$ was sequncied and revealed the presence of *cry30Aa1* and *cry60Aa2* genes and afforded ranks for *cry4Aa1*, *cry4Ba1 cry10Aa3, cry11Aa1* and *cyt1Aa1* genes that had been identified by PCR. The results revealed that the strains, especially strain BR58, have the potential to be used as a source of genes for the production of coffee plants resistant to coffee berry borer.

Key words: Microbial control. Cry proteins. Entomopathogenic bacteria. Coffee berry borer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Eletromicrografia – Fêmea adulta de *Hyphotenemus hampei*. 19
Figura 2 – Fluxograma explicativo sobre a metodologia de sequenciamento do isolado BR58 50
Figura 3 – SDS-PAGE 10% da suspensão de esporos/cristais dos isolados de *B. thuringiensis*. M: marcador; 1 – BR58; 2 – BR81; 3 - BR80; 4 – BR67; 5 - BR135; 6 - BR146..... 56
Figura 4 – Fotomicrografia da mistura de esporos/cristais dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. 1 – BR58; 2 – BR80; e - cristal esférico; ep - esporo. 57
Figura 5 – Eletromicrografia da mistura de esporos/cristais dos isolados de *Bacillus thuringiensis.* 1 – BR58; 2 – BR80; e - cristal esférico; ep – esporo 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes, iniciadores gerais e específicos de *Bacillus thuringiensis*, tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR, sequência de nucleotídeos, condições de amplificação e fontes 47

Tabela 2 - Atividade patogênica (% de mortalidade) provocada por *Bacillus thuringiensis* a larvas de primeiro ínstar de *Hyphotenemus hampei* obtida em bioensaio seletivo cinco dias após a inoculação (Temperatura: 25 ± 2 ^{o}C; 60 ± 10% de UR; em ausência de luz) 52

Tabela 3 - Concentração letal média (CL_{50}) de isolados de *Bacillus thuringiensis* para para larvas de primeiro ínstar de *Hyphotenemus hampei* (n=60) cinco dias após exposição a dieta contendo suspensão de esporo/cristal dos isolados (Temperatura: 25 ± 2 ^{o}C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz) 54

Tabela 4 - Perfil genético e proteico de isolados de *Bacullus thuringiensis* 56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E ECONÔMICOS DA CULTURA DO CAFEEIRO 14
2.2 *HYPOTHENEMUS HAMPEI* 17
2.2.1 Aspectos Gerais 17
2.2.2 Biologia 17
2.2.3 Danos Ocasionados 19
2.2.4 Medidas de Controle 20
2.3 *BACILLUS THURINGIENSIS* 24
2.3.1 Breve Histórico 24
2.3.2 Características Gerais 25
2.3.3 Proteínas Cyt 27
2.3.4 Proteínas Cry 28
2.3.5 Modo de Ação das Proteínas Cry 32
2.4.1 Bioinseticidas 32
2.4.2 Plantas Geneticamente Modificadas 34
2.4.3 Controle de *H. hampei* 36
2.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA 38

3 OBJETIVOS…….. 42
3.1 OBJETIVOS GERAIS 42
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42

4 MATERIAL E MÉTÓDOS 43
4.1 CRIAÇÃO ESTOQUE DE *H. HAMPEI* EM DIETA ARTIFICIAL 43
4.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* 43
4.3 PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS/CRISTAIS 43
4.4 BIOENSAIO SELETIVO DE ISOLADOS DE *B. TURINGIENSIS* A *H. HAMPEI* 44

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL_{50}) DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*..... 45
4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DS ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* TÓXICOS A *H. HAMPEI*..... 45
4.7 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY POR MEIO DE SDS-PAGE 48
4.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*..... 48
4.9 SEQUENCIAMENTO DO ISOLADO BR58 DE *B. THURINGIENSIS* 49

5 RESULTADOS..... 51
5.1 BIOENSAIO SELETIVO DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* A *H. HAMPEI*..... 51
5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL_{50}) DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*..... 53
5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* TÓXICAS A *H. HAMPEI* 54
5.4 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY POR MEIO DE SDS-PAGE 55
5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*..... 57
5.6 SEQUENCIAMENTO DO ISOLADO BR58 DE *B. THURINGIENSIS* 58

6 DISCUSSÃO 59

7 CONCLUSÕES..... 74

REFERÊNCIAS 75

1 INTRODUÇÃO

O café é um produto de importância mundial, que gera renda e emprego para milhares de pessoas envolvidas desde o cultivo até o processamento e comercialização. Nos países em desenvolvimento, o cultivo do café é uma atividade de grande importância tanto para os setores da economia quanto da política. O Brasil é o maior produtor e exportador de café, bem como o segundo maior consumidor mundial. Seu cultivo está difundido nos estados brasileiros, concentrando-se atualmente em Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná (ICO, 2014).

A cafeicultura esta sujeita a diversos problemas fitossanitários que afetam a qualidade do produto e causam prejuízos econômicos. Entre as pragas, a mais importante é a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), que ataca os frutos em todos os estádios de maturação, causando danos diretos como a destruição total ou parcial das sementes e queda prematura de frutos. Indiretamente, a qualidade da bebida, é afetada pela presença de micro-organismos que penetram nos frutos através do orifício feito pelo inseto (REIS, 2002).

O método de controle mais utilizado é a aplicação de produtos químicos, que apesar de ser eficiente, pode causar problemas como a contaminação ambiental e humana. No Brasil existem apenas dois ingredientes ativos registrados para a praga - etofenproxi e clorpirifós - classificados como tóxico e extremamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente. O Endossulfam foi produto mais utilizado até recentemente, com elevada eficiência de controle. Entretanto, devido a restrições de países importadores, por ser considerado extremamente tóxico e persistente e responsável por selecionar populações de insetos resistentes foi banido do mercado brasileiro pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que em um processo de reavaliação do ingrediente ativo, determinou sua retirada do mercado brasileiro no prazo de quatro anos, contados a partir 31 de julho de 2010 (ANVISA, 2010).

Nos últimos anos, observou-se um aumento no número de consumidores de cafés especiais, ou seja, produtos diferenciados tanto pela qualidade da bebida, quanto pelo interesse em produtos livres de resíduos tóxicos, ambientalmente sustentáveis e socialmente justos. Assim, diversos métodos alternativos ao controle químico vêm sendo pesquisados contra a broca-do-café, como o controle biológico, cultural e comportamental (MOREIRA, 2008).

O melhoramento genético do cafeeiro, ao longo dos anos, vem desenvolvendo novas cultivares adaptadas a diferentes regiões e sistemas de cultivo, que expressem elevada produtividade, boa qualidade de bebida e tolerância e/ou resistência a doenças e pragas. Nesse contexto, alguns pesquisadores propuseram que plantas geneticamente modificadas através da inserção de genes codificadores de toxinas de *Bacillus thuringiensis*, poderiam apresentar bons resultados no controle de *H. hampei* (LOPEZ-PAZOS; CORTAZAR; CERON, 2009).

B. thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica que, durante o processo de esporulação, produz inclusões cristalinas compostas por protoxinas denominadas proteínas Cry. Essas protoxinas, ao serem ingeridas pelos insetos, se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino causando o rompimento das células e permitindo que o conteúdo intestinal extravase para a hemocele do inseto, causando infecção generalizada. Essas bactérias são altamente específicas na sua atividade, de modo que não causam danos a insetos não alvo, a vertebrados e ao meio ambiente (SOBERÓN et al., 2007; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

A hipótese é que isolados de *B. thuringiensis* patogênicos a *H. hampei,* podem ter um gene *cry* clonado e introduzido em plantas de café, e assim expressar a toxina inseticida de *B. thuringiensis* nos frutos e sementes, permitindo então o contato direto entre os insetos e a toxina, quando estiverem penetrando ou alojados nos frutos de café.

Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar e realizar a caracterização morfológica e molecular de isolados de *B. thuringiensis* virulentos a larvas de *H. hampei,* os quais poderão ser posteriormente, utilizados como fonte de genes para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes a essa praga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E ECONÔMICOS DA CULTURA DO CAFEEIRO

A cultura do cafeeiro é conhecida mundialmente, e desde sua origem, provavelmente nas florestas tropicais da Etiópia, Sudão e Quênia, difundiu-se para a Holanda, França, América Central e América do Sul. Foi introduzida no Brasil por Francisco de Mello Palheta em 1727, proveniente da Guiana Francesa e cultivada em Belém do Pará. Posteriormente foi levada ao Maranhão e se expandiu para os estados vizinhos chegando à Bahia em 1770. Em 1774 o cultivo do cafeeiro foi introduzido no Rio de Janeiro, seguindo para a Serra do Mar, e para os estados de São Paulo e Minas Gerais, onde encontrou condições climáticas favoráveis para o seu cultivo, chegando ao Norte Paranaense entre 1928 e 1930 (MATIELLO et al., 2002).

O gênero *Coffea L*. possui cerca de 100 espécies, sendo que apenas duas delas apresentam importância comercial e são cultivadas de maneira extensiva: *Coffea arabica* L., que representa 70% da produção mundial, e *Coffea canephora* Pierre, com 30% (MATIELLO et al., 2002). A espécie *C. arabica* é uma planta tropical de altitude, adaptada a climas úmidos com temperaturas amenas. A temperatura considerada ideal varia de 16 a 23 ºC e as regiões mais indicadas são aquelas com pluviosidade acima de 1200 mm/ano. É cultivada atualmente nas regiões tropicais com altitudes acima de 500 metros e temperaturas médias anuais de 19 a 22ºC (PEDINI, 2000).

A espécie *C. canephora*, conhecida também como café robusta, é originária das regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas da bacia do Congo, com altitudes inferiores a 850 metros, estando adaptada às condições de temperaturas mais elevadas, com média anual na faixa de 22 a 26 ºC (PEDINI, 2000). Esta variedade produz grãos com qualidade e preço inferiores aos da arábica, entretanto é mais produtiva e competitiva, sendo exportada por Brasil e Colômbia (CHI; TUAN; LAN, 2009).

O café apresenta é de grande relevância para a economia de países produtores, processadores, comerciantes e consumidores, e também exerce influência na economia e política de muitos países em desenvolvimento. É um dos produtos básicos mais valiosos, e representa mundialmente um mercado em valores que, em muitos anos, foi superado apenas pelo petróleo. O café é negociado nas principais bolsas de mercadorias e futuros do mundo, como as de Londres e Nova Iorque (USDA, 2014).

A partir dos anos 90, o mercado mundial de café apresentou expressivas modificações com crescimento de aproximadamente 30% na produção mundial entre 1990 e 2010. Na safra de 2013, a produção mundial foi de aproximadamente 145 milhões de sacas, sendo que o Brasil foi responsável por 35% desse total, seguido pelo Vietnã (15%), Indonésia (8,8%), Colômbia (7%), Etiópia (4,4%) e Índia (3,7%) (ICO, 2014). Além de ser o maior produtor mundial de *C. arabica*, o Brasil é também o maior exportador e o segundo maior consumidor, perdendo apenas para os Estados Unidos (ICO, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial há mais de 150 anos e o café teve grande influência na formação do país e de importantes cidades como São Paulo, Campinas, Ribeirão Preto, Londrina, dentre outras (COELHO, 2002). Atualmente, o agronegócio de café envolve direta e indiretamente, cerca de 10 milhões de pessoas desde a produção até o processamento (ICO, 2014).

A produção brasileira de café no ano de 2013 foi de 49,1 milhões de sacas de 60 quilos, sendo 38,3 mil de *C. arabica* e 10,9 mil de *C. canephora*. Esse valor foi 3,3% inferior ao volume de sacas colhidas na safra 2012/13, o que se deve principalmente, ao ciclo de baixa bienalidade, e às adversidades climáticas. A bienalidade é um fenômeno próprio da natureza fisiológica do cafeeiro no qual ocorre a alternância de grandes e pequenas produções ao longo do tempo. Essa alternância bienal de produção é comumente atribuída à diminuição das reservas das plantas em anos de safra com altas produtividades, o que faz com que a produção no ano seguinte seja baixa (DAMATTA et al., 2007).

Apesar dessa redução na produção, essa foi a maior safra produzida no país durante o ciclo de baixa bienalidade, revelando a menor diferença entre as safras de alta e baixa bienalidade. Este fato se deve a maior utilização da mecanização, que juntamente às inovações tecnológicas, exigências do mercado quanto à qualidade do produto e boa gestão da atividade, são fatores extremamente importantes e necessários para o avanço e modernização da cafeicultura (CONAB, 2014).

A área plantada com as espécies *C. arabica* e *C. canephora* no País totaliza aproximadamente 2,3 milhões de hectares, sendo que na safra de 2011, houve um crescimento de 3,02% na área total. A maior área de plantio está concentrada em Minas Gerais, com 1,2 milhões de hectares, predominando a espécie *C. arabica* com 98,9%. Esse estado é responsável por 51,9% da área cultivada com café no País, e consequentemente é o primeiro do ranking nacional. O Espírito Santo, que é o maior produtor de *C. canephora*, possui a segunda maior área plantada com café, totalizando 499 mil hectares, sendo 311 mil hectares com a espécie *C. canephora* (CONAB, 2014).

No estado do Paraná, a área total plantada com café foi estimada em 87 mil hectares, com redução de 2,2%, no ano de 2012. Essa queda se deve principalmente à dependência de mão de obra exigida pela cultura do cafeeiro e à concorrência com lavouras mecanizadas, como a cana-de-açúcar e a soja, que são facilmente manejadas pelos produtores (CONAB, 2014).

O Brasil sempre se posicionou no mercado de forma competitiva destacando-se mais pelo elevado volume de produção e preços baixos do que por sua qualidade, oferecendo café *commodity* de baixo valor agregado. Entretanto, tem-se notado que a produção de cafés especiais é uma alternativa vantajosa aos produtores devido à agregação de valor ao produto, o que tem despertado o interesse em investimentos nessa área (LEÃO; DE PAULA, 2010).

Existem consumidores que buscam produtos diferenciados visando não só a qualidade da bebida, como também o interesse em produtos que garantam a ausência de resíduos tóxicos e se preocupem com o meio ambiente, realizando o manejo racional da cultura. Com isto surgiram diferentes padrões internacionais de certificação para a cafeicultura convencional que, priorizam boas práticas agrícolas, como racionalidade no uso de insumos e agroquímicos, conservação da biodiversidade e respeito aos trabalhadores, contribuindo para o aumento da sustentabilidade na cafeicultura convencional nacional (MOREIRA, 2008).

Entretanto, a cafeicultura esta sujeita a diversos problemas fitossanitários que causam prejuízos econômicos e exigem atenção dos produtores, dificultando a redução no uso de agrotóxicos. Entre esses, destacam-se a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), considerada uma das pragas mais importantes, assim como o bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidotera: Lyonetiidae) e a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), que juntos são responsáveis pelos maiores danos à cultura (REIS, 2002). O variado número de pragas que atacam as diferentes partes da planta é responsável por danos diretos ao fruto, ou mesmo por danos indiretos às plantas, como a diminuição da área fotossintética e redução na produção.

2.2 *HYPOTHENEMUS HAMPEI*

2.2.1 Aspectos Gerais

H. hampei, conhecida como broca-do-café, está presente em quase todos os países produtores de café (LE PELLEY, 1968; MURPHY; MOORE, 1990), causando danos à cultura e grandes prejuízos econômicos. É considerada a praga mais devastadora e reincidente nos cafezais e atualmente encontra-se também estabelecida em países das Américas do Sul, Central e do Norte, África, Ásia e Oceania (CÁRDENAS, 2007).

A praga foi introduzida no Brasil em 1913 a partir de sementes importadas da África e Java, e as condições tropicais permitiram sua rápida dispersão para Honduras, Nicarágua, El Salvador, Guatemala e México (CASCO-GÓMEZ, 2012). Na última década, foram verificadas elevadas infestações, com a disseminação do inseto em grande parte das lavouras de países como Uganda (80%), Colômbia (60%), Jamaica (58-85%), Tanzânia (90%), Malásia (50-90%) e México (60%) (BURBANO et al., 2010).

A broca-do-café é uma espécie monófoga, pois apesar de ter sido encontrada alimentando-se de outras espécies, sua multiplicação ocorre apenas em espécies do gênero *Coffea* (BENASSI, 2000). Ela ataca *C. arabica* e *C. canephora*, entretanto, essa última é a espécie mais suscetível, provavelmente por apresentar uma floração irregular durante o ano todo, apresentando frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, e por seu plantio ser realizado em regiões quentes, características que favorecem maior número de gerações (FILHO; MAZZAFERA, 2003).

2.2.2 Biologia

A broca-do-café é um coleóptero pertencente à família Curculionidae, subfamília Scolytina. O inseto adulto apresenta corpo cilíndrico e ligeiramente recurvado para a região posterior e élitros revestidos de cerdas e escamas piriformes características (Figura 1) (GALLO, et al.; 2002). Desenvolve todo o ciclo evolutivo (ovo a adulto) e reprodutivo dentro do fruto de café, sendo a fase larval a que provoca os maiores danos (CASCO-GÓMEZ, 2012; FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007; PEREIRA et al., 2007). O período de desenvolvimento nos diferentes estágios do inseto, a 27 °C, é aproximadamente quatro dias para ovo, 14 dias para larva e sete dias para pupa, totalizando um tempo médio do ciclo de 28 a 34 dias (DAMON, 2000).

O inseto possui dimorfismo sexual, onde os machos são menores, medindo em media 1,24 milímetros e as fêmeas, aproximadamente 1,74 milímetros (CONSTANTINO et al., 2011). Além do tamanho, os machos podem ser diferenciados das fêmeas por apresentarem vestígios de asas membranosas, motivo pelo qual são incapazes de voar e abandonar o fruto onde emergiu (GALLO et al., 2002). A razão sexual é de um macho para 14 fêmeas sendo que a cópula ocorre no interior do próprio fruto onde os insetos se desenvolveram. Como os machos não abandonam o fruto podem fertilizar até 30 fêmeas, depois que essas atingem a maturidade sexual, o que leva em média cinco a seis dias após a emergência do adulto (DAMON, 2000). Após oito dias de sua fecundação, a fêmea sai à procura de novos frutos favoráveis ao desenvolvimento das larvas, e assim, inicia uma galeria circular, a partir da região da coroa em direção a uma das sementes, onde constrói uma câmara para a realização das posturas (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

A oviposição ocorre quando se inicia a maturação dos frutos (CURE et al., 1998), e durante todo o ciclo de vida, a fêmea pode ovipositar de 31 a 119 ovos, dependendo da estação climática e da idade da fêmea (BENAVIDES; GÓNGORA; BUSTILLO, 2012). A dimensão dos ovos é em media 0,59 milímetros e 0,31 milímetros nos eixos maior e menor respectivamente, apresentando forma elíptica ou levemente ovóide, e brilho leitoso. As larvas eclodem cerca de 4 a 10 dias após a oviposição (GALLO et al., 2002), e em condições de laboratório, foi verificada uma viabilidade média de ovos de 99,2 % (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

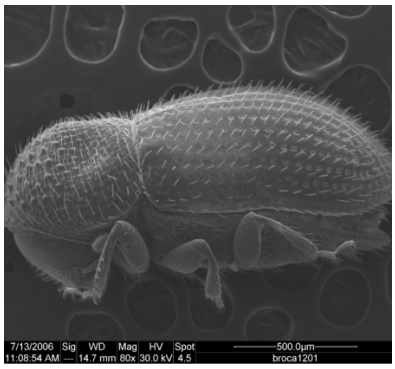
Após a eclosão, as larvas são capazes de destruir total ou parcialmente a semente (TAKEMATSU; JOCYS; POTENZA, 2004), e podem permanecer nessa fase por em media 19 dias, com temperatura variando de 10 a 28 ºC. Apresentam coloração esbranquiçada e são ligeiramente transparentes, medindo 0,75 mm de comprimento por 0,23 mm de largura logo após a eclosão, chegando a 2,0 mm de comprimento por 0,70 mm de largura quando completamente desenvolvidas. As larvas fêmeas passam por dois instares e as larvas machos por apenas um (PEREIRA et al., 2007; SILVA et al., 2012; VEGA et al., 2009).

A fase de pupa tem duração de 4 a 10 dias, são brancas nos primeiros dias, apresentando a cabeça complemente encoberta pelo pronoto, sendo as antenas e peças bucais livres e distintas. A fase adulta pode durar entre 100 e 150 dias para as fêmeas e 50 a 75 dias para os machos, e ambos os sexos, quando recém-emergidos, apresentam uma coloração marrom, tornando-se negros à medida que os insetos atingem a maturidade fisiológica (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

A população de broca-do-café varia com base na estação climática,

permanecendo semi-inativas nos grãos maduros na época das secas, saindo dos frutos após as primeiras chuvas, com temperaturas médias a 27 °C, para buscar novos frutos e reiniciar seu ciclo de vida. Com condições ambientais adequadas e produção constante nos cafezais, o inseto pode alcançar até oito gerações, mas usualmente chega a duas ou três no ano (CÁRDENAS et al., 2007; FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

Figura 1 - Eletromicrografia - Fêmea adulta de *Hyphotenemus hampei.*



Fonte: Patricia Helena Santoro

2.2.3 Danos Ocasionados

Os danos causados por *H. hampei* podem afetar a produção dos cafeeiros, pois ataca o fruto nos diversos estágios de maturação, destruindo frutos verdes, cereja, coco e café beneficiado (GALLO et al., 2002). As larvas alimentam-se dos tecidos da semente (DAMON, 2000), resultando na queda prematura de grãos e perda de peso e/ou qualidade do produto, o que reflete negativamente sobre seu valor comercial (GALLO et al., 2002; REIS, 2002). Essas perdas são impactantes principalmente no mercado externo, já que os países importadores de café não aceitam nenhum fruto brocado. A produção de sementes também fica inviável, pois os frutos broqueados são descartados. Dependendo do nível de infestação, os prejuízos devidos exclusivamente à perda de peso podem chegar a 21% (SOUZA; REIS, 1997).

O dano indireto é decorrente da presença de micro-organismos, como fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicilium*, que contaminam as sementes através do orifício feito pela praga no fruto, depreciando a qualidade da bebida do café (REIS, 2002). Além disso, existem micro-organismos que possuem associação direta com a broca-do-café, e podem produzir toxinas nos grãos, representando um perigo para saúde humana

(TANIWAKI, 2007).

2.2.4 Medida de Controle

Diversos métodos de controle vêm sendo pesquisados contra a broca-do-café, porém o fato de permanecer a maior parte do seu ciclo de vida dentro do fruto de café tem dificultado essa prática. São conhecidos métodos alternativos, como o controle biológico, cultural e comportamental, entretanto, o mais utilizado é o controle químico. A aplicação de inseticidas é realizada no período de trânsito da broca, em geral de novembro a janeiro, quando as fêmeas deixam os frutos remanescentes da safra anterior para atacar os frutos da nova safra e iniciar uma nova colonização. Assim, podem entrar em contato com o inseticida ao perfurar novos frutos e se alimentar da epiderme pulverizada com o produto (DAMON, 2000).

O controle químico das principais pragas é responsável por 12% do custo de produção do café, o qual pode chegar a 2,5 milhões de quilos de defensivos ao custo de bilhões de reais ao ano (EMBRAPA, 2013). Além dos custos elevados, outro problema relacionado ao controle químico da broca, é a falta de opção em ingredientes ativos registrados para o manejo desta praga, que atualmente são representados por etofenproxi e clorpirifós, com eficiência de 0 a 60% e 35 a 72% respectivamente, e classificados como tóxico e extremamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2015; REIS, 2007).

Os inseticidas clorados, altamente persistentes, como o DDT e BHC, foram muito utilizados, mas após a sua proibição foram substituídos pelo endossulfam (GUTIERREZ et al., 1998), com recomendações de até três pulverizações no período de trânsito ou mesmo quando a praga surgisse na lavoura (GALLO et al., 2002). Apesar de ser um produto eficaz, e até recentemente um dos mais utilizados para o controle a broca, devido a sua persistência e alta periculosidade à saúde humana e ao meio ambiente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou, em um processo de reavaliação do ingrediente ativo, sua retirada do mercado brasileiro no prazo de quatro anos, contados a partir 31 de julho de 2010 (ANVISA, 2010).

Recentemente foi lançado Cyantraniliprole® (CyazypyrTM), que ainda está em fase de registro no Brasil com o nome comercial de BeneviaTM. É um novo inseticida do grupo das diamidas antranílicas que atua pela ativação de receptores de rianodina através de um estímulo para a liberação das reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático de células

musculares (principalmente para insetos mastigadores), causando má regulação, paralisia e morte de espécies sensíveis (FETTING et al., 2011). Entretanto, sua importação está autorizada apenas em caráter emergencial e temporário para fins de controle da praga, somente no Estado de Minas Gerais enquanto existir a situação de emergência fitossanitária (BRASIL, 2014).

O método de controle químico, apesar de ser o mais eficiente, quando utilizado sem os cuidados necessários, pode causar problemas ambientais e intoxicação dos agricultores e consumidores (NEVES; HIROSE, 2005). Além disso, o uso intensivo do mesmo produto durante longo período de tempo, aliado à incorreta aplicação, pode selecionar insetos resistentes (TAKEMATSU; JOCYS; POTENZA, 2004).

Populações de broca-do-café resistentes ao principio ativo endossulfam foram identificadas na Nova Caledônia e Colômbia, onde se verificou populações de brocas com maior frequência do gene Rdl que codifica uma subunidade do receptor de ácido aminobutírico γ (neurotransmissor GABA), responsável por ativar o canal de cloro durante sinapses (BRUN et al., 1989; GINGERICH et al., 1996, NAVARRO; GONGORA; BENAVIDES, 2010).

Como métodos alternativos ao uso de inseticidas químicos, podem ser citados o controle biológico com a vespa de Uganda, *Prorops nasuta* (Waterston) (Hymenoptera: Bethylidae), e a vespa do Togo, *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) (Hymenoptera: Bethylidae), que foram introduzidas no Brasil em 1929 (HEMPEL, 1934), e em 1994 (BENASSI, 1998) respectivamente. O parasitoide *P. nasuta* ataca larvas de *H. hampei* e foi multiplicado e disseminado em lavouras no estado de São Paulo. Inicialmente foram observados bons resultados, mas as dificuldades e elevados custos para a criação e multiplicação em condições artificiais, aliadas a problemas de adaptação do parasitoide levaram ao abandono dessa prática. Posteriormente, passou-se a admitir que *P. nasuta* não havia se adaptado ao novo ambiente e até mesmo havia sido extinta (HEINRICH, 1965).

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Spicaria javanica* (Bally) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, são considerados importantes agentes de controle biológico da broca-do-café. Embora os resultados não sejam ainda adequados em condições de campo, trabalhos realizados em condições de laboratório com fungos *B. bassiana e M. anisopliae* apresentaram alta eficiência contra essa praga (BERNAL; BUSTILLO; POSADA, 1994). Os níveis de controle a campo podem variar de 20 a 75%, influenciados pela qualidade e concentração do fungo utilizado nas lavouras, condições climáticas e de manejo da cultura (BENAVIDES; GÓNGORA; BUSTILLO, 2012;

NEVES; HIROSE, 2005; OKUMURA et al., 2003). Para viabilizar a utilização desses agentes de controle, pesquisas têm se voltado para a transformação genética desses fungos com genes que podem aumentar sua virulência e ser mais eficiente em condições de campo para o controle da broca-do-café (PAVA-RIPOLL et al., 2008).

Algumas espécies de nematoides entomopatogênicos foram encontradas infectando naturalmente populações de *H. hampei* em plantações de café na Índia, México e Colômbia (CASTILLO et al., 2002; LÓPEZ et al., 2008; VARAPRASAD et al., 1994). As espécies *Steinernema colombiense* e *Heterorhabditis bacteriophora* foram citadas como capazes de encontrar e infectar grãos de café infestados por *H. hampei* (LARA; LÓPEZ; BUSTILLO, 2004).

O controle comportamental ganhou evidência com a constatação da atração aleloquímica da broca por voláteis do fruto, e fez com que a utilização de armadilhas contendo álcoois (etanol: metanol) para o manejo e controle da broca se tornasse alvo de muitos estudos (BARRERA et al., 2007). Foram realizadas pesquisas sobre os materiais utilizados para confecção das armadilhas, como cor, difusores, proporção dos atraentes na mistura, etc. (DUFOUR; FRÉROT, 2008). Entretanto, os resultados obtidos nesses trabalhos divergiram em alguns pontos, e não foram encontradas estratégias adequadas para estabelecer a forma e o momento correto na utilização das armadilhas de controle da broca (DUFOUR, 2004; MATHIEU et al., 1999). Dessa forma, o método de controle por armadilhas necessita de pesquisas mais detalhadas, e, além disso, deve ser vista como uma alternativa a ser associada a outras práticas que reduzam a população da praga (SILVA; VENTURA; MORALLES, 2006; UEMURA et al., 2010).

Outro método que pode contribuir para a redução dos danos causados pela broca-do-café é o controle cultural, que deve ser realizado por meio de uma colheita bem feita, iniciando-se pelos talhões mais atacados e prosseguindo com a realização do ‘repasse’, a fim de certificar-se que não restaram frutos nos pés de café (GALLO et al., 2002). Os cuidados com a catação dos frutos nas árvores e no chão e a eliminação de cafezais abandonados são as principais recomendações para o controle de *H. hampei*, visando diminuir a fonte de alimento, e consequentemente, a população residual da broca na safra seguinte. Entretanto, esses cuidados exigem a disponibilidade de mão de obra, e devido ao alto custo que isso representa, aliado à situação desfavorável da economia cafeeira, e preços muito baixos recebidos pelos produtos, tem ocorrido o abandono de práticas culturais.

O manejo da broca-do-café por meio de variedades resistentes vem sendo pesquisado. Entretanto, é relatada a falta de fontes de resistência genética dentro do gênero

Coffea e espécies afins. Algumas espécies são naturalmente menos suscetíveis ao ataque do inseto, em ordem crescente de atratividade pela broca, Le Pelley (1968) cita: *C. liberica* (praticamente imune), *C. excelsa*, *C. dybowskii*, *C. dewevrei*, *C. canephora* e *C. arábica.* Entretanto, Matiello et al. (2002), relataram não se conhecer cafeeiros em cultivo comercial que não sejam atacados pelo inseto, e destacam certa preferência da broca pela espécie *C. canephora*.

Devido às características de crescimento do cafeeiro, ou seja, planta semi-perene, de crescimento lento e produção após três anos de idade, os métodos de melhoramento tradicional, envolvendo seleção e cruzamento de indivíduos, podem demandar muito tempo. Assim, a utilização de técnicas de engenharia genética, envolvendo transformação de café é vista como uma abordagem promissora no controle de pragas como *H. hampei,* sendo testados entre outros genes, os de espécies distantes como de *Bacillus thuringiensis* e genes inibidores de α-amilases (OGITA et al., 2004).

A inserção de proteínas que atuam como inibidores de enzimas digestivas, como α- amilase, que catalisa a hidrolise do amido, podem ser utilizadas na transformação de plantas resistentes ao ataque de pragas (GATEHOUSE et al., 1992). A semente do fruto de café contém 10% de amido em sua composição. Portanto, com uma planta de café, modificada com inserção de inibidores de α- amilase, as larvas de *H. hampei* ao se alimentarem das sementes, ficariam impedidas de realizar a quebra desse amido e transformá-lo em açúcar para sua sobrevivência (SIVELTZ, 1977). Nesse contexto, alguns pesquisadores demonstraram, em experimentos *in vitro,* que o inibidor de α-amilase, isolado de sementes de feijão selvagem, *Phaseolus coccineus*, mostrou-se bastante eficiente na inibição das α-amilases da broca-do-café (PEREIRA et al., 2006).

As pesquisas com plantas geneticamente modificadas através da inserção de protoxinas de *B. thuringiensis* tem evoluído com bons resultados, sendo descobertas cepas patogênicas a *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e *H. hampei* (GUERREIRO et al., 1998; SUREKHA; ROYER; NAIDU, 2002). São grandes as perspectivas em relação a essa técnica, pois a toxina inseticida de *B. thuringiensis* produzida pela planta se expressará em tecidos de folhas e sementes, que são as fontes de alimentos dessas pragas, permitindo assim o contato direto entre os insetos e a toxina, mesmo que esses já tenham penetrado nas minas ou nos frutos de café (SUREKHA; ROYER; NAIDU, 2002).

2.3 *BACILLUS THURINGIENSIS*

2.3.1 Breve Histórico

A primeira descoberta de doenças em insetos causadas por *Bacillus thuringiensis* ocorreu em 1901, quando Ishiwata isolou uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade de populações do bicho-da-seda, *Bombyx mori* – Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Entretanto, foi descrita apenas em 1915 por Ernst Berliner na Alemanha, isolada a partir de larvas da traça da farinha, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; ROH et al., 2007). Berliner chamou-a de *Bacillus thuringiensis* e reportou a existência de cristais, porém a atividade destes ainda era desconhecida.

Em 1920, *B. thuringiensis* foi considerado como uma alternativa para o controle de insetos na agricultura e, em 1938, uma formulação à base dessa bactéria foi comercializada na França sob o nome de Sporeine (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; ROH et al., 2007). Na década de 60, foi isolada uma linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* com toxicidade até 200 vezes superior às linhagens já conhecidas para produtos comerciais. Com isso, aumentou o interesse na busca por novas toxinas ativas contra outras ordens de insetos (DULMAGE, 1970).

Até a década de 70 poucas linhagens haviam sido descobertas, e todas eram tóxicas para apenas algumas espécies de lepidópteros. Em 1977 foi identificada a primeira linhagem tóxica para dípteros (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). A partir disso, novos estudos comprovaram a eficiência de *B. thuringiensis* também para coleópteros (KRIEG et al., 1983), e para algumas espécies de nematoides, protozoários e ácaros (FEITELSON, 1994).

Com o avanço da biologia molecular e novas tecnologias aplicadas à transformação genética de plantas, os estudos se voltaram para a prospecção de genes que codificam proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* visando a sua inserção em plantas para o controle pragas. O primeiro registro de plantas transgênicas que expressavam toxinas de *B. thuringiensis* foi em 1987 com plantas de tabaco e tomate, e em 1995, nos Estados Unidos foi realizada a primeira plantação comercial de milho geneticamente modificado (USEPA, 1999).

A utilização de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas, tanto como bioinseticida ou em plantas geneticamente modificadas, é vista com grandes perspectivas em relação aos inúmeros benefícios proporcionados pela utilização dessa bactéria. Entre esses é possível citar a sua seletividade, efeito não poluente ao meio ambiente, inocuidade aos

mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas. Além disso, poderá ser vantajoso para os agricultores no aspecto econômico e contribuir como mais uma alternativa no programa de manejo de resistência de praga a inseticidas (PRAÇA, et al., 2010; WHITELEY; SCHNEPF, 1986).

2.3.2 Características Gerais

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) (Bacillales: Bacillaceae) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45º C. A sua dispersão ocorre naturalmente em diversos ambientes, como solos, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e em grãos armazenados (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004). Possui duas fases durante o ciclo de vida, uma de crescimento vegetativo, na qual se multiplica por bipartição, e outra de esporulação onde ocorre a diferenciação da bactéria em esporo. Suas células vegetativas apresentam de 1,0 a 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento (ANGELO;VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010), com um genoma variando entre 2,4 a 5,7 milhões de pares de bases.

No momento de sua esporulação, durante a fase estacionária de seu ciclo de crescimento, que ocorre devido à exaustão de nutrientes ou condições ambientais desfavoráveis, é produzido um esporângio que contém um endósporo e inclusões cristalinas proteicas (MENDONÇA, 2002). Os esporos sobrevivem durante anos devido à forma de resistência da bactéria, já os cristais, são dependentes das condições ambientais e possuem uma durabilidade variável, que geralmente é de apenas algumas horas (HÖFTE; WHITELEY, 1989).

Os esporos formados são elipsoidais, e no interior da célula mãe, localizam-se na região central ou paracentral. A formação de cristais paraesporais no início da fase de esporulação é uma característica marcante dessa espécie, e são eles os responsáveis por sua ação entomopatogênica (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

Essas inclusões proteicas cristalinas possuem diferentes formas e são compostas por proteínas denominadas proteínas Cry, que são tóxicas para uma grande variedade de pragas agrícolas e para vetores de doenças (BRAVO et al., 1998; MONNERAT; BRAVO, 2000). Por serem altamente específicas, são inócuas para uma série de organismos, incluindo o homem e insetos benéficos (SIEGEL, 2001).

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* pode produzir outras proteínas

com atividade inseticida tais como as enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases (ZHANG et al., 1993), proteases (LÖVEGREN et al., 1990), quitinases, δ-exotoxinas ou exotoxinas (SCHNEPF; WHITELEY, 1981), β-exotoxinas, (LEVINSON ET AL., 1990), proteínas VIP, que são secretadas na fase vegetativa e tem atividade contra lepidópteros e coleópteros (ESTRUCH et al., 1996) e proteínas Cyt (SCHNEPF et al., 1998). Adicionalmente, a ação sinérgica dos esporos produzidos pelas proteínas pode contribuir para a toxicidade apresentada pelos cristais (BRAVO et al., 1998; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

A β-exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por certas linhagens de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Ela é produzida em grande quantidade por linhagens do sorotipo H1 e atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP sendo muito tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematoides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (SEBESTA et al., 1981). Assim, a partir de 1970, os produtos comerciais de *B. thuringiensis* à base de linhagens do sorotipo H1 foram substituídos por outros a base de linhagens não produtoras de β-exotoxina (SEBESTA et al., 1981).

Diferentes genes *cry* podem fazer parte do genoma de uma determinada linhagem e serem responsáveis por sua toxicidade. Esses genes irão determinar a formação de proteínas Cry, que podem formar um ou mais cristais intracelulares (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Muitos desses genes ainda são desconhecidos, sendo necessário identificar o seu conteúdo e seu potencial a fim de utilizá-los como alternativa no controle de insetos (SUN et al., 2008).

A busca por novas linhagens de *B. thuringiensis* conta com tecnologias como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), é considerada como uma ferramenta adequada para identificação dos genes *cry* específicos em diferentes linhagens de *B. thuringiensis* (CÉRON et al., 1995). Essa técnica conta com mais de 80 iniciadores desenvolvidos para identificar grupos e genes *cry* individuais (SONG et al., 2003), e tem sido utilizada na caracterização de linhagens depositadas em bancos de bactérias entomopatogênicas em todo mundo. Assim, a identificação dos genes *cry* de isolados de *B. thuringiensis* é vista como um dos passos iniciais e mais importantes para a escolha de um isolado para ser empregado em programas de controle de insetos.

2.3.3 Proteínas Cyt

As proteínas Cyt são definidas como uma inclusão paraesporal de *B. thuringiensis,* sintetizadas na forma de protoxinas, com atividade hemolítica que compõe os cristais paraesporais. São formadas por apenas um domínio, composto por duas cadeias α-hélice externas e uma cadeia β-folha pregueada interna (SCHNEPF et al., 1998). As proteínas Cyt, de peso molecular 28 kDa, são citolisinas produzidas principalmente pela variedade *israelensis*, sendo acumulada no cristal, juntamente com as δ-endotoxinas típicas que compõe essa variedade. Essas toxinas não apresentam homologia com as demais proteínas Cry, e não são classificadas como δ-endotoxinas (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993).

O modo de ação das proteínas Cyt inicia-se quando as protoxinas são clivadas no interior do inseto liberando a toxina ativa pela quebra das porções C-terminal e N-terminal da proteína. É produzida uma toxina monomérica de 22-25 kDa que atua na membrana das células epiteliais do intestino médio. Sua ligação ocorre diretamente aos lipídios da membrana, não necessitando de receptores específicos da membrana celular como acontece com as proteínas Cry. Com isso, as proteínas Cyt induzem a formação de poros e desestruturam a bicamada lipídica das membranas (GILL; SINGH; HORNUNG, 1987).

O mecanismo de ação das toxinas Cyt ainda não está bem definido. Alguns autores sugerem que as duas alças de α- hélices externas distanciam-se das folhas β ao entrar em contato com a membrana, possibilitando assim, que as três últimas folhas β se insiram na membrana. Dessa forma, pode ocorrer a oligomerização com outros monômeros e a formação de um poro tipo β-barril, resultando em lise osmótica (COHEN et al., 2008). Outros autores propõem que a porção hidrofílica das hélices interage com resíduos de outros monômeros para formar um oligômero. Isto resulta em uma agregação não específica de toxinas Cyt na superfície da bicamada lipídica, o que leva a uma ação do tipo detergente e desestruturação da membrana (MANCEVA et al., 2005)

São conhecidas 38 proteínas Cyt classificadas em Cyt1A, Cyt1B, Cyt1C, Cyt1D, Cyt2A, Cyt2B, Cyt2C e Cyt3 (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; CRICKMORE et al., 2015). Sua atividade tóxica é geralmente menor do que as proteínas Cry, entretanto, as proteínas Cyt agem sinergicamente com as Cry, atuando como receptores para essas toxinas, e exercendo assim, um papel fundamental na atividade geral de algumas proteínas (CRICKMORE et al., 1995; PONCET et al., 1995).

2.3.4 Proteínas Cry

As proteínas Cry compõem as inclusões paraesporais de *B. thuringiensis* que exibem efeito tóxico a um organismo alvo. São utilizadas para a identificação da bactéria, e são codificadas por genes cry que se localizam, na maioria das vezes em plasmídeos conjugativos de alta massa molecular (> 40 kDa) e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano (KRONSTAD; SCHNEPF; WHITELEY, 1981; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). Esses plasmídeos podem apresentar uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou mesmo genes *cry* diferentes, e o número de cópias dos genes *cry* presente em uma determinada linhagem de *B. thuringiensis* pode influenciar de maneira significativa a quantidade final da proteína produzida pela bactéria (AGUIAR, 2007).

Atualmente já foram clonados e sequenciados 743 genes *cry,* classificados em 73 grupos de proteínas Cry com diferentes subdivisões (Cry1 a Cry73). A classificação de novas proteínas ocorre em função do grau de identidade dos aminoácidos. Devido à constante descoberta de proteínas, o número de genes *cry* aumenta a cada ano, e periodicamente, a classificação e a nomenclatura das proteínas Cry são atualizadas em um banco de dados online (CRICKMORE et al., 2015: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

Algumas linhagens de *B. thuringiensis* podem sintetizar mais de um tipo de cristal formados por diferentes proteínas Cry. Dependendo da composição, o cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou, ainda, sem forma definida. Estes cristais são responsáveis por 20-30% da proteína total da célula, sendo que a massa molecular das proteínas pode variar entre 14 e 142 kDa (SCHNEPF et al., 1998).

As diferentes formas apresentadas pelos cristais estão relacionadas às proteínas Cry que os compõe, e podem indicar a ação entomopatogênica sobre algumas ordens de insetos. Cristais bipiramidais são compostos por proteínas Cry1, as quais apresentam ação inseticida contra lepidópteros. Cristais cubóides frequentemente são compostos por proteínas Cry2, e apresentam ação contra lepidópteros e dípteros; cristais rombóides são associados às proteínas Cry3, que apresentam toxicidade frente a coleópteros, Cry4 para dípteros, Cry5 e Cry6 com ação inseticida para nematódeos (ROH et al., 2007).

Atualmente a classificação das proteínas Cry utiliza um recurso mnemônico (Cry ou Cyt) e quatro etapas hierárquicas que consistem em: números, letras maiúsculas, letras minúsculas e números (Exemplo: Cry25Aa1), de acordo com a posição da proteína na árvore filogenética. No primeiro nível de classificação, as proteínas recebem um número que

difere quando as sequências de aminoácidos possuem menos de 45% de identidade (Exemplo: Cry1, Cry2...Cry73). No segundo nível, esse número é seguido por uma letra maiúscula que diferencia as sequências com menos de 78% de homologia, separando as proteínas em diferentes classes (Cry1A, Cry1B, Cry1C....). Quando a homologia entre as sequências passa a ser maior que 95% elas são dividas em um terceiro estágio no qual recebem letras minúsculas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac...), sendo então, diferenciadas em subclasses. No quarto nível de classificação as sequências voltam a receber números que representam a ordem de deposição (publicação) das mesmas no banco de dados (Cry1Aa1, Cry1Aa2 ... Cry1Aa22) ou sequências que diferem sutilmente de outras já depositadas, devido a pequena mutação de algum aminoácido ou imprecisão no sequenciamento (CRICKMORE et al., 1998).

As toxinas foram separadas em famílias que vão desde Cry1 a Cry73. Cada família é específica para determinadas ordens de insetos, sendo Cry1 tóxicas para lepidópteros, Cry2 para lepidópteros e dípteros, Cry3 são ativas contra coleópteros, Cry4 tem ação específica sobre dípteros. Outras classes como Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21 tem suas toxinas ativas contra nematódeos (GUO et al., 2008; ROH et al., 2007).

As proteínas Cry mais comuns para coleópteros além da Cry3 são: Cry1B, Cry1I, Cry7, Cry9 e Cry8. As proteínas Cry18 Cry14 também estão relacionadas, porém apresentam baixa homologia entre elas e com as outras toxinas (VAN FRANKENHUYZEN, 2009). Algumas proteínas têm sido descritas com atividade tanto para lepidoptera como para coleoptera (Cry1B e Cry1I) (TAILOR et al., 1992). Outras toxinas que afetam essa ordem incluem Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 e Cry55 (CRICKMORE et al., 2015;. VAN FRANKENHUYZEN, 2009). De acordo com a análise filogenética dos domínios destas proteínas, tem sido proposto que Cry9 também pode ser ativo contra coleoptera (BRAVO, 1997).

A estrutura das proteínas Cry é formada por duas porções distintas: a amino-terminal que é uma região variável associada à toxicidade da proteína e a carboxi-terminal que é uma região conservada relacionada à formação das inclusões proteicas (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Com a utilização de difração por raios foi possível determinar a porção tóxica de algumas proteínas, as quais apresentam três domínios: o domínio I da porção amino-terminal é altamente conservado e consiste de seis α-helices anfipáticas que rodeiam uma α-helice hidrofóbica. Este domínio é responsável pela interação entre monômeros, inserção na membrana e formação do poro. O domínio II da porção amino-terminal é formado por três

folhas β-antiparalelas e duas α-helices curtas e estão envolvidos na ligação ao receptor, na membrana intestinal. O domínio III corresponde à região carboxi-terminal que consiste em duas folhas β-antiparalelas, formando um β-sanduíche que confere a especificidade de ligação aos receptores celulares e com o domínio II, e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; ROH et al., 2007). Esses três domínios que formam a toxina Cry ativa são necessários para que ocorra a lise celular e, consequentemente, a morte do inseto.

As proteínas Cry, além de serem semelhantes em sua estrutura, também apresentam regiões homólogas entre si, e o alinhamento das suas sequências de aminoácidos permitiu a observação de relações entre diferentes classes de proteínas. Elas apresentam cinco blocos de aminoácidos com sequências conservadas o que sugere que esses blocos são importantes para a estabilidade e função biológica dessas proteínas, principalmente por se localizarem nas regiões internas da proteína e na região de contato entre os domínios, o que evidencia que as proteínas Cry formam uma família com blocos similares e mecanismos de ação muito semelhantes (CAPALBO; VILLAS-BÔAS; ARANTES, 2004; DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; MONNERAT; BRAVO, 2000; PIGOTT; ELLAR, 2007).

2.3.5 Modo de Ação das Proteínas Cry

A ação tóxica de *B. thuringiensis* inicia quando o inseto susceptível à toxina ingere alimento contendo cristais e esporos formados pela bactéria e as proteínas Cry liberadas se ligam a receptores específicos encontrados nas microvilosidades do intestino médio dos insetos (SOBERÓN et al., 2007). A partir desse ponto, existem dois mecanismos de ação conhecidos, o de "formação de poros", descrito há mais tempo, é considerado o mais comum para a maioria das ordens dos insetos-alvos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera e o de "transdução de sinal", descrito somente em 2008 (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008).

No modelo de ação designado "formação de poros", após a ingestão da bactéria, os cristais são solubilizados no ambiente redutor e alcalino do intestino médio (pH 10), liberando as protoxinas que sofrem a ação de proteases específicas, e são clivadas nas porções N-terminal e C-terminal, resultando em proteínas ativas de 60-70 kDa (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; PIGOTT; ELLAR, 2007).

As proteínas Cry ativas são capazes de ultrapassar a membrana peritrófica e ligar-se especificamente e com alta afinidade aos receptores proteicos localizados nas

microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das lagartas de insetos susceptíveis. Essa união é de extrema importância, e uma etapa fundamental na especificidade das toxinas Cry (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; MONNERAT; BRAVO, 2000; ROH et al., 2007).

Entre as proteínas identificadas como receptores proteicos estão a N-aminopeptidase (APN) e a fosfatase alcalina (ALP), ambas ancoradas à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) e com capacidade de ligação às proteínas Cry. Além dessas, são citadas uma glicoproteína caderina (CADR) e uma proteína glicoconjugada (GCR) também com capacidade de ligação às proteínas Cry. Em adição, glicolipídeos de insetos também têm sido considerados como receptores em nematódeos (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; ROH et.al., 2007).

A união entre as toxinas Cry e os receptores localizados na membrana do intestino médio dos insetos é composta de uma etapa reversível e outra irreversível (VAN RIE et al., 1989). A primeira está relacionada à união reversível entre a toxina e seu sítio de união, que é um requisito básico, mas não suficiente para que ocorra a toxicidade (SCHNEPF et al., 1998). Já, a etapa irreversível, que parece estar mais ligada com a toxicidade, envolve a união a receptores específicos e a inserção na membrana (MONNERAT; BRAVO, 2000; VAN RIE et al., 1989). A interação inicial está relacionada à ligação entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto a irreversível está associada com uma interação proteína-proteína (LIANG; PATEL; DEAN, 1995).

A ligação da toxina com receptores específicos (caderina) leva a um novo processamento proteolítico, no qual é retirada a primeira α-hélice, deixando a região hidrofóbica exposta e, assim permitindo a oligomerização da toxina. A estrutura oligomérica resultante liga-se então a receptores secundários (ALP e APN) ocorrendo a inserção da toxina oligomérica na região apical da membrana da célula epitelial intestinal (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Dois modelos possíveis da inserção de toxinas Cry na membrana foram propostos com base em informações de outras toxinas bacterianas formadoras de poro (LI; CARROLL; ELLAR, 1991). O primeiro (modelo de abre cartas), sugere que as α-hélices 5 e 6 são inseridas na membrana como consequência de uma mudança conformacional causada pelo receptor, sem maior participação das hélices e domínios restantes. O segundo (modelo de guarda-chuva) sugere que após a união com o receptor, as regiões α4-α5 são inseridas, enquanto que o resto das hélices se arranjam sobre a superfície da bicamada lipídica expondo sua face hidrofóbica, ficando a molécula com forma parecida a um guarda-chuvas

(KNOWLES, 1994).

Após a inserção da toxina ocorre a formação de poros na região apical das microvilosidades ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, e com isso a perda da integridade da membrana do intestino dos insetos. O aumento da permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas maiores causa uma alteração na diferença de potencial da membrana o que leva a uma má distribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. Além disso, ocorre alcalinização do citoplasma, interferindo no metabolismo celular normal e, consequentemente, levando a morte celular e rompimento do epitélio (LIANG; PATEL; DEAN, 1995; VAN RIE et al., 1989).

Após a destruição das células colunares e caliciformes do inseto, os esporos de *B. thuringiensis* terão acesso à hemolinfa, iniciando sua germinação, e provocando a morte dos insetos por inanição e/ou septicemia (MONNERAT; BRAVO, 2000). Essa hipótese que defende a formação de poros tem sido estudada e confirmada em nematoides e em várias ordens de insetos (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O modelo conhecido como "transdução de sinal" foi proposto em estudos realizados somente em células de insetos e foi estudado em poucos insetos-alvo (ZHANG et al., 2006). O mecanismo retrata uma série de eventos associados à membrana celular, onde a ligação que ocorre entre a proteína Cry e os receptores específicos induziria reações intracelulares envolvendo a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A. Essa sequência de eventos provocaria um desequilíbrio da pressão interna, danificando a célula (BRAVO; SOBERÓN, 2008). Dessa forma, as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais por inativação do sistema de controle de gradiente de pH e citólise osmótica. Essas alterações que ocorrem na permeabilidade das microvilosidades levam a lise celular e a proliferação de bactérias na hemolinfa, ocasionando a morte por inanição ou septicemia (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

2.4 A UTILIZAÇÃO DE *B. THURINGIENSIS* NA AGRICULTURA

2.4.1 Bioinseticidas

Produtos à base de *B. thuringiensis* são utilizados como bioinseticidas na agricultura há mais de 70 anos. São considerados de grande importância em função de características como segurança ao meio ambiente, especificidade, inocuidade para mamíferos

e organismos não alvos e dificuldade de seleção de insetos resistentes. Os agrotóxicos formulados com proteínas de *B. thuringiensis* têm baixo custo de desenvolvimento e são facilmente produzidos em fermentadores por meios não poluentes, ao contrário dos inseticidas sintéticos, que são sintetizados quimicamente em processos caros e que podem poluir o ambiente (GLARE; O'CALLARGHAM, 2000; SCHNEPF et al., 1998; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

A comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis* foi em 1938 na França, com o nome de "Sporeine" (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004). Já na década de 60 foi isolada uma linhagem de *B. thutingiensis* subsp. *kurstaki*, denominada HD-1 (DULMAGE, 1970) que era, dependendo do hospedeiro, cerca de 2 a 200 vezes mais tóxica do que as linhagens normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Com essa descoberta, a busca por linhagens mais tóxicas foi estimulada, resultando na identificação da primeira linhagem eficaz contra dípteros, em 1977 (GOLDBERG; MARGALIT, 1977), e outra com ação frente a coleópteros em 1983 (KRIEG et al., 1983).

Os bioinseticidas formulados com *B. thuringiensis* são utilizados em todo o mundo com resultados promissores. Estima-se que os produtos à base dessa bactéria correspondam a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007), com a maior produção (50%) concentrada nos Estados Unidos e Canadá (LENG et al.; 2011; TAMEZ-GUERRA et al., 2001). Entre os produtos comerciais mais utilizados no mundo está o Dipel (*Bt kurstaki* HD-1), que possui atividade tóxica diferenciada contra 170 lepidópteros-praga, sendo inócuo para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; POLANCZYK, 2004).

A comercialização de bioinseticidas corresponde a cerca de 2% do mercado brasileiro de agrotóxicos, com expectativas de 10% em 2020. Em outubro de 2011, existiam 1352 agrotóxicos químicos registrados no Brasil e somente 26 produtos à base de agentes microbianos, dentre os quais, nove eram com *B. thuringiensis*. Em janeiro de 2015 o número de produtos biológicos registrados aumentou para 60, dentre os quais dez eram à base de *B. thuringiensis.* Esse crescimento estimado demonstra os esforços dos órgãos competentes (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ibama e Anvisa), pesquisadores, indústrias, agricultores e outros segmentos da sociedade em aumentar a disponibilidade de produtos biológicos para o manejo de pragas e doenças no Brasil (AGROFIT, 2015; BETTIOL; MORANDI; HECK, 2013; BETTIOL, 2011; BRAR et al., 2006).

Apesar de todos os benefícios conhecidos, esses produtos não são comercializados em volumes expressivos como os agroquímicos, e isso se deve a fatores

como instabilidade de suas formulações frente a fatores abióticos como a luz ultravioleta e temperatura elevada, que causam a desnaturação das proteínas Cry, ausência de translocação nas plantas, limitado espectro de ação, dificuldade e longos prazos para o registro dos produtos (BETTIOL, 2011).

Algumas ações são necessárias para difundir os bioinseticidas no Brasil, como a divulgação desses produtos e mudança cultural na agricultura praticada, implementação de produções regionais que pudessem reduzir o custo de produção e o estabelecimento de incentivos para implantação de programas de manejo integrado de insetos (ANGELO;VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

2.4.2 Plantas Geneticamente Modificadas

Até pouco tempo, características desejadas de plantas cultivadas como o maior teor nutricional, tolerância a condições ambientais adversas, resistência a doenças e pragas só eram possíveis por meio do melhoramento clássico, com o cruzamento de plantas de interesse. No entanto, diversas barreiras atreladas a esse método incentivaram a busca por alternativas biotecnológicas, a fim de reduzir o tempo para obtenção de novas variedades e também transmitir características entre espécies sexualmente incompatíveis.

As plantas Bt são um exemplo para as quais os avanços tecnológicos da engenharia genética e da moderna biotecnologia, permitiram o isolamento e manipulação de genes obtidos de *B. thuringiensis* para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, o que solucionou problemas relacionados às limitações na utilização de bioinseticidas à base dessa bactéria (WU et al., 2005).

As perspectivas em relação a plantas Bt surgiram em 1981 com a caracterização de um gene de *B. thuringiensis* codificador de uma proteína responsável pela atividade tóxica a insetos, o qual foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (SCHNEPF; WHITELEY,1981). Assim, houve a possibilidade de se introduzir os genes codificadores de proteínas Cry nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo apenas os insetos-praga que se alimentavam dos tecidos (DE MAAGD; BOSCH; STIEKEMA, 1999).

Em 1996 iniciou-se a comercialização de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos as quais eram eficientes no controle de pragas, e desde a sua primeira aplicação a transformação genética se tornou uma ferramenta indispensável na biologia molecular vegetal e na pesquisa de genômica funcional (USEPA, 1999).

A utilização de plantas GM resistentes a insetos proporciona inúmeros benefícios aos agricultores a ao ambiente. Na China, onde o algodão Bt é cultivado desde 1997, foi presenciada uma redução de 78 mil toneladas de inseticidas utilizados em 2001, com o número de aplicações passando de 20 para sete durante todo o ciclo de cultivo (WU et al., 2005). As vantagens atreladas a esse fato foram a redução em até 75% nos casos de produtores rurais intoxicados por inseticidas e a reversão no quadro de resistência de insetos a lambda-cialotrina (piretróide) e endosulfan (ciclodieno), o qual já se encontrava previamente instalado e documentado naquela região (HOSSAIN et al., 2004; PRAY et al., 2002; WU et al., 2005).

Diversas espécies de plantas cultivadas já sofreram transformação genética a fim de adiquirirem características importantes ao seu desenvolvimento, entre elas, está a cultura do cafeeiro, para a qual já foram pesquisados genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de etileno, para controlar o precesso de maturação dos grãos, gene para a resistência ao herbicida FinaleTM (*bar*), gene repórter para β-glucuronidase (Gus), resistência à canamicina (nptII), resistência à higromicina (hpt), resistência ao herbicida chlorosulphuran (csr1), e até mesmo, resistência à lepidópteros com a inserção do gene *cry1Ac* (ALPIZAR et al., 2006; HATANAKA et al., 1999; KUMAR et al., 2006; LEROY et al., 2000; PERTHUIS et al., 2005; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006).

Entre os métodos mais conhecidos para a tranformação genética do cafeeiro está a inserção de genes exóticos via *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* e o bombardeamento de micropartículas ou biobalística, para o qual foi publicado o primeiro protocolo relatando uma transformação estável para *C. canephora* (RIBAS et al., 2005).

A metodologia de bombardeamento de micropartículas foi utlizada para incoporar o gene codificador do inibidor de α-amilase α-AII de feijoeiro em *C. arabica* visando a transmissão de resistência à *H. hampei* (BARBOSA et al., 2009). Em outros estudos, esse mesmo gene foi introduzido em *C. canephora* via *A. tumefaciens*, e verificou-se um efeito inibidor sobre o crescimento e desenvolvimento do inseto (CRUZ; PAIXÃO; MACHADO, 2004).

A inserção do gene c*ry1Ac* em plantas de café foi realizada por transformação com *A. tumefaciens,* e foi o primeiro relato de planta de café transgênica com inserção de uma característica agronomicamente importante, resistência a *L. coffeella.* As plantas modificadas foram testadas por quatro anos a campo, apresentando resistência contra a praga de até 70%, sem mostrar interferência em outras características importantes para seu

desenvolvimento (LEROY et al., 2000). O método de biobalística sem marcadores de selecção ou genes repórter também foi utlizado com sucesso para a inserção do gene *cry1ac* em café arábica a fim de conferir resistência ao bicho-mineiro (DE GUGLIELMO-CRÓQUER, et al., 2010).

A utilização da transgenia na produção de plantas de café expressando genes de *B. thuringiensis* para resistência a *H. hampei* apresentaria inúmeras vantagens sobre os métodos tradicionais de controle. A possibilidade da produção constante da molécula inseticida em todos os tecidos da planta, como frutos e sementes, iria permitir o contato do inseto com a toxina logo no início do ataque, além disso as substâncias ativas ficariam protegidas contra a degradação por fatores abióticos como radiação UV e temperatura (WHETSTONE; HAMMOCK, 2007).

Diante das vantagens obtidas com o método da transgenia, plantas de café geneticamente modificadas foram produzidas por diferentes grupos de pesquisa do mundo, e apesar dos avanços significativos nos últimos 20 anos, ainda há muito a se desenvolver nessa área. Entre as linhas de pesquisa atuais, está a busca e identificação de novos genes envolvidos na virulência de *B. thuringiensis*, como genes *cry* e genes que levam a persistência e propagação da bactéria no hospedeiro. Dessa forma, esses genes poderão ser sequenciados e introduzidos no genoma de plantas (LEROY, et al., 2000; MISHRA et al., 2008; RIBAS et al., 2005; VILAS-BÔAS et al., 2012).

2.4.3 Controle de *H. hampei*

A realização de pesquisas para o desenvolvimento de plantas transgênicas envolve diversas etapas, como a prospecção, seleção e caracterização dos genes de interesse para expressar as características desejadas. Estudos vêm sendo conduzidos a fim de identificar genes *cry* ativos contra diversas ordens de insetos de importância econômica, como lepidópteros e coleópteros.

O primeiro isolado com ação tóxica contra coleópteros foi *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (isolado tenebrionis) que foi descoberto em 1983 na Alemanha. Subsequentemente foi relacionado que a toxicidade desse isolado era devido a proteína de 70kDa conhecida por Cry3 (KRIEG et al., 1983).

Pesquisas com as proteínas Cry1Ba e Cry1Ia, demonstraram que embora elas sejam ativas contra lepidópteros, existem relatos que mostram a sua bioatividade contra

coleópteros, inclusive para *H. hampei,* ainda que de forma moderada (LÓPEZ-PAZOS; CORTAZAR; CERÓN, 2009; TAILOR et al., 1992;VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

Estudos para investigar a atividade de *B. thuringiensis* contra *H. hampei* são de grande importância para os avanços no controle dessa praga, e vêm sendo realizados em países como Costa Rica e Colômbia, com resultados promissores obtidos por diversos pesquisadores. Hernández-Soto (2002) caracterizou uma coleção de 159 linhagens provenientes de cafezais infestados com *H. hampei,* as quais foram isoladas de cadáveres de insetos adultos e larvas. Entre essas, 46 apresentaram potencial para o controle da broca, e os genes que mais se repetiram foram *cry3, cry7, cry8* e *cry1B.* De forma semelhante, Arrieta; Hernandez; Espinoza, (2004) isolaram em áreas infestadas com brocas, linhagens contendo os genes *vip3, cry1, cry2, cry3* e *cry7*.

Muitas proteínas Cry efetivas contra coleópteros possuem baixa letalidade a broca-do-café. Isso pode ser devido a endogamia que ocorre durante o ciclo de vida desse inseto, o que confere determinadas características genéticas e biológicas, como o aumento na proporção de alelos de resistência a inseticidas por mecanismos de seleção e rápida adaptação (BENAVIDES, 2005; LÓPEZ-PAZOS, 2010).

Linhagens de *B. thuringiensis* foram avaliadas para controle de larvas de primeiro ínstar da broca-do-café, e as que se mostraram com maior toxicidade eram as específicas para dípteros. Foram selecionadas 37 linhagens que causaram mortalidades entre 90 a 100% a larvas de *H. hampei* com uma dose de 100 microgramas de esporo-cristal/cm^2 de dieta aplicados sobre a superfície de uma dieta artificial. Dentre essas, 18 linhagens foram identificadas como sorotipo *israelensis*. Os autores também realizaram bioensaios com linhagens de referência do Instituto Pasteur, e as linhagens dos sorotipos *israelensis* causaram mortalidade acima de 90% (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003).

A linhagem *B. thuringiensis* serovar *israelensis* IPS-82, contendo os genes *cry4, cry10, cry11* e *cyt* (SCHNEPF, et al., 1998), apesar de ser ativa contra dípteros, mostrou-se tóxica à broca-do-café (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003). Mais recentemente, linhagens com os genes *cry1Ba* e *cry3Aa* também foram identificadas pela atividade inseticida frente à *H. hampei*, mas com menor toxicidade do que IPS-82 (LÓPEZ-PAZOS; CORTAZAR; CERÓN, 2009).

Os resultados de diversos autores, ressaltam a importância de linhagens mosquitocidas no controle de *H. hampei,* e estimulam pesquisas sobre o efeito de genes ativos contra dípteros no controle de coleópteros. Para isso, além da seleção de proteínas Cry tóxicas ao inseto, é necessário caracterizá-las a fim de obter informações sobre seu conteúdo e

explicar seu modo de ação nos insetos, possibilitando sua utilização como fonte de genes na construção de plantas transgênicas, e assim lançar mão dos seus benefícios no controle da broca-do-café.

2.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento dos genomas de microrganismos, apoiado pelo progresso e investimentos em tecnologias moleculares, está avançando em um ritmo sempre crescente, e é visto como uma nova metodologia de estudo que possibilita a obtenção de informações relevantes contidas no genoma de um organismo de forma rápida e com menor custo (GALPERIN; KOONIN 2010).

O estudo do genoma é realizado por meio da obtenção da sequência completa de DNA de um organismo, da montagem, mapeamento e anotação de regiões codificantes, visando entender o funcionamento do metabolismo e processos biológicos no organismo estudado. As novas tecnologias de sequenciamento tem permitido a aquisição, em curto espaço de tempo, de significativas quantidades de dados de sequências gerados a partir de uma amostra de DNA, e isso tem aumentado a nossa compreensão do genoma de uma determinada espécie.

Os processos de sequenciamento de DNA genômico envolvem a fragmentação e sequenciamento de milhares de pequenos fragmentos de DNA que posteriormente deverão ser agrupados, o que acaba gerando uma quantidade muito grande de dados, e o principal desafio está em realizar sua montagem.

Em paralelo à essa expansão das pesquisas em genômica, e da quantidade crescente de informação biológica obtida, têm se exigido recursos computacionais cada vez mais sofisticados para a análise desses dados. Esse papel tem sido desempenhado pela bioinformática, ciência que utiliza abordagens computacionais para responder questões biológicas utilizando grandes e complexos conjuntos de dados gerados pelas técnicas de sequenciamento. Assim, pelas ferramentas em bioinformática, é possível fazer inferências a partir de dados biológicos e realizar conexões entre eles, obtendo informações funcionais (LESK, 2002).

Os estudos iniciais de genomas que utilizaram metodologias de sequenciamento foram realizados no meio da década de 1970 (PEIXOTO, 2013). O primeiro método de sequenciamento automático foi desenvolvido utilizando a metodologia de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), no entanto o processo era muito caro e

inviabilizava projetos maiores.

A partir de 2004 novos sequenciadores surgiram no mercado, reduzindo o custo e o tempo de geração de dados. Essa nova tecnologia ficou conhecida como sequenciamento de nova geração (next generation sequencing - NGS) e revolucionou a pesquisa em genética e genômica (QUAIL et al., 2012). Desde então, os genomas de milhares de espécies têm sido sequenciados e encontram-se depositados em bancos de dados públicos, onde ferramentas de pesquisa como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) permitem que sequências já existentes nesses bancos sejam utilizadas como fonte de busca e comparação entre genomas.

O primeiro NGS a ser introduzido no mercado foi a plataforma de sequenciamento 454 (Roche, Connecticut, Estados Unidos da América) no ano de 2004. Essa tecnologia utiliza o princípio do pirosequenciamento, no qual as reações enzimáticas são iniciadas pela liberação de um pirofosfato durante reação de incorporação de um nucleotídeo pela DNA polimerase na cadeia nascente e gera ao final do processo um sinal de luz que é capturado por uma câmera que faz parte do sequenciador. Dois anos após foi lançada a plataforma de sequenciamento Illumina (Illumina, San Diego, Estados Unidos da América), com a capacidade de gerar simultaneamente milhões de leituras curtas de DNA, o que permite o sequenciamento de um bilhão de bases nucleotídicas em uma única corrida (POP; SALZBERG, 2008).

Mesmo diante do surgimento de diferentes tecnologias, o sequenciamento de DNA por meio dos sequenciadores de nova geração era limitado pela complexidade das plataformas e pelo custo elevado das análises, visto que a maioria dos sequenciadores é dependente de sistemas caros de emissões de luz, impossibilitando a realização por pequenos e médios laboratórios (WHITELEY et al., 2012).

Recentemente, foi lançada a plataforma Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM) (Life Technologies, São Francisco, Estados Unidos da América) (ROTHBERG et al., 2011), que é a primeira plataforma de sequenciamento a realizar a detecção de bases sem a necessidade de emitir luz durante o processo de identificação de bases. O sequenciamento ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução na qual ocorre a reação de sequenciamento.

Esse novo método, sem a utilização de luz, é mais rápido e econômico, o que se deve a um chip de sílica semicondutor capaz de traduzir sinais químicos em informação digital. Para isso, um próton, proveniente da hidrólise do trifosfato, é liberado quando um nucleotídeo é incorporado pela DNA polimerase na nova cadeia de DNA, o que

resulta em uma alteração do pH da solução, que é detectada pelo sensor de íon localizado abaixo de cada micropoço e convertido em uma voltagem (WHITELEY et al., 2012). Os dados gerados no sequenciador são automaticamente transferidos para o Servidor Torrent e os sinais químicos são transformados em sequências de bases formando as leituras individuais.

O primeiro genoma sequenciado de um organismo não viral foi o da bactéria *Haemophilus influenzae*, em 1995 (FLEISCHMANN et al., 1995), com 1,8 milhões de pares de base (Mpb). Após esse passo inicial, várias bactérias tiveram seus genomas sequenciados e esse número aumenta a cada dia, podendo ser acessadas em bancos públicos de sequências como o *GenBank*, situado no Centro Nacional de Informação Biotecnológica ou *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

O conteúdo genômico de *B. thuringiensis* vem sendo estudado desde a década de 1970 por vários grupos de pesquisa que visam principalmente a busca por diferentes genes *cry*, e com isso, diversas proteínas Cry com funções distintas já foram descritas e os seus respectivos genes clonados (CRICKMORE, 2006; GONZÁLES et al., 1981; KRONSTAD; SCHNEPF; WHITELEY, 1981).

Alguns isolados de *B. thuringiensis* já tiveram seu genoma sequenciado, e o primeiro dado do início do sequenciamento completo do genoma dessa bactéria foi em 2004, com a linhagem *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* str. 97-27. Até o momento tem-se referência de 16 linhagens de *B. thuringiensis* que foram completamente sequenciadas, 15 estão em nível de cromossomo sequenciado, duas em Scaffold e 11 que apresentaram o sequenciamento apenas para Contig. Dentre as linhagens sequenciadas completamente, apenas a HD-789 *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis*, pertence a subespécie *isralensis* e dentre as que estão em Contig, duas são *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain 4Q7 e *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* ATCC 35646 com 6229 e 5213 genes respectivamente).

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/486).

A primeira linhagem completamente sequenciada a apresentar genes *cry* foi a *B. thringiensis* serovar *finitimus* YBT-020, na qual foram identificados os genes *cry26Aa* e *cry28Aa* (ZHU et al., 2011). Em seguida, *B. thuringiensis* subsp. *chinensis* CT-43, que mostrou-se altamente tóxica para dípteros e lepidópteros, também foi completamente sequenciada, e apresentou os genes *cry1Aa3, cry1Ba1, cry1Ia14, cry2Aa9, cry2Ab1* e *vip3Aa10* (HE et al., 2011). Para a linhagem *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* HD-789, que foi a única completamente sequenciada e citada como sendo da subespécie *isralensis,* os autores relataram a presença dos genes *cry4Aa3, cry4Ba5, cry10Aa3, cry11Aa3,*

cry60Ba3, cry60Aa3 e mais 3 genes *cyt* (DOGGETT et al., 2013). Peng et al., 2012 sequenciaram a linhagem *B. thuringiensis* serovar s*ichuansis* MC28, que é altamente tóxica para lepidópteros e dípteros e encontraram os genes: *cry4Cc1, cry30Fa1, cry53Ab1, cry54Aa1, cry54Ab1, cry68Aa1, cry69Aa1, cry69Aa2, cry70Ba1, cyt1Da1* e *cyt2Aa3*.

Essas linhagens que já foram sequenciadas são utilizadas como referência e modelo para o sequenciamento de novas linhagens e assim contribuem para estudos focados na estrutura dos genomas e nas funções de *B. thuringiensis.* Com o sequenciamento genômico, é possível obter de maneira ágil e com um menor custo, informações importantes sobre o conteúdo de genes tóxicos de *B. thuringiensis* e assim manipulá-los para o desenvolvimento de novas tecnologias como construção de plantas transgênicas resistentes a pragas.

O sequenciamento de linhagens nativas tóxicas a *H. hampei* permite analisar o conteúdo total de genes e identificar genes *cry* presentes no cromossomo e em plasmídios contidos na linhagem. Com isso será possível isolar e clonar os genes *cry* em uma bactéria acristalífera, para posteriormente serem testados separadamente a fim de verificar se a ação sobre o inseto é proveniente de um único gene ou da interação e sinergismo entre eles e entre outros fatores associados à bactéria.

Essa tecnologia de sequenciar o genoma completo do isolado selecionado em bioensaios contra *H. hampei* permitirá conhecer os genes pertencentes ao isolado tóxico a *H. hampei* que irá atuar como uma fonte de genes para a obtenção de plantas de café expressando a toxicidade das proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Selecionar e realizar a caracterização morfológica e molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* virulentos a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, que poderão ser utilizados como fonte de genes para a construção de plantas transgênicas.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Selecionar isolados de *B. thuringiensis* patogênicos a larvas de *H. hampei*;
- Determinar a concentração letal média (CL_{50}) de isolados de *B. turingiensis* contra *H. hampei*;
- Analisar o conteúdo de genes *cry* dos isolados virulentos a *H. hampei*;
- Analisar a morfologia e o perfil molecular dos cristais produzidos pelos isolados virulentos a *H. hampei*;

4 MATERIAL E MÉTÓDOS

4.1 CRIAÇÃO ESTOQUE DE *H. hampei* EM DIETA ARTIFICIAL

Os insetos utilizados nos bioensaios foram obtidos da criação de *H. hampei* mantida em dieta artificial descrita por Villacorta; Barrera (1993), em câmara climatizada (25 ± 2 ^{o}C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz) no Laboratório de Manejo Ecológico de Pragas do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR. A criação foi iniciada a partir de adultos provenientes de frutos brocados de café arábica, cultivar IPR59, coletados na Estação Experimental do IAPAR em Londrina. Inicialmente insetos adultos foram retirados dos frutos de café, desinfetados com hipoclorito de sódio (5%) e inoculados em dieta artificial (10 machos e 50 fêmeas/placa) em placas de Petri. Após 30 dias em câmara climatizada, as placas de Petri foram abertas para a coleta e transferência dos ovos para novas placas com dieta artificial onde permaneceram até a eclosão das larvas de primeiro ínstar utilizadas nos bioensaios.

4.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*

Foram avaliados 34 isolados de *B. thuringiensis*, pertencentes ao Banco de Bactérias do Laboratório de Genética e Taxonomia de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, identificados pela presença de proteínas Cry tóxicas às espécies das ordens Coleoptera e Diptera. A linhagem de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* IPS-82 foi utilizada como referência e controle positivo, pois apesar de ser ativa contra dípteros, mostrou-se tóxica a broca-do-café. Já a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, foi utilizada como controle negativo por não apresentar toxicidade a *H. hampei* (MÉNDEZ-LÓPEZ, BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003).

4.3 PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS/CRISTAIS

Isolados de *B. thuringiensis* estocados em papel de filtro contendo esporos e cristais foram recuperados após imersão dos papéis em 1 mL de água destilada esterilizada seguida de breve agitação. Dessa suspensão, foram retirados 20 µL e inoculados em placas de Petri contendo meio Nutriente Ágar (NA) que permaneceram em condições controladas (30 °C) por 96 h até completa esporulação. As culturas foram monitoradas quanto à presença de

cristais e possíveis contaminantes com a confecção de lâminas e posterior observação em microscópio óptico com aumento de 100x. Após a seleção das melhores placas, foram adicionados 1 mL de água Milli-Q esterilizada e as culturas de cada isolado foram raspadas dos meios de cultivo com auxílio de uma alça de Drygalski e transferidas para tubos de microcentrífuga. Essa mistura de esporos e cristais foi armazenada a -20 ºC até a realização dos bioensaios.

4.4 BIOENSAIO SELETIVO DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* A *H. HAMPEI*

Os bioensaios seletivos, visando determinar quais eram os isolados patogênicos a *H. hampei*, foram realizados com 34 isolados de *B. thuringiensis*. Para isso, 3 mL de dieta artificial (VILLACORTA; BARRERA, 1993) foram distribuídos em placas de polimetil-metacrilato (10 cm x 10 cm) compostas por 16 poços (1,8 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura). Após a solidificação da dieta, uma alíquota de 50 µL da mistura de esporos e cristais (item 4.3), foi homogeneizada, aplicada em cada poço e espalhada com pincel sobre a superfície da dieta. As placas permaneceram em câmara de fluxo laminar até a completa secagem da suspensão. Posteriormente, cinco larvas de primeiro ínstar foram depositadas em cada poço. Esse ínstar foi selecionado para os bioensaios devido ao seu maior consumo de dieta e assim, maior ingestão de *B. thuringiensis* (DE LA ROSA; FIGUEROA; IBARRA, 2005).

Após a inoculação das larvas, as placas foram vedadas com filme plástico para evitar a fuga dos insetos e manter a umidade da dieta. O bioensaio constou de 12 repetições com cinco larvas cada. Para o controle positivo foi utilizada a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 e para o controle negativo foram utilizados água e a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003). Os insetos foram mantidos em câmara climatizada (25 ± 2 ^{o}C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz), por cinco dias, quando então foi realizada a avaliação da mortalidade. As larvas eram consideradas mortas ao se constatar sua imobilidade e mudança na coloração e consistência do tegumento, que se tornavam mais escuros e flácidos do que nas larvas saudáveis. O bioensaio seletivo foi repetido duas vezes e os isolados que causaram mortalidade acima de 90% foram selecionados para os bioensaios de dose. Os dados de mortalidade foram submetidos ao teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL_{50}) DE ISOLADOS DE B. *THURINGIENSIS*

Os bioensaios de dose foram realizados com 11 isolados selecionados por provocarem mortalidade acima de 90% e com o padrão IPS82. Para determinar a concentração letal de cada isolado de *B. thuringiensis* indutor de 50% de mortalidade larval (CL_{50}) para *H. hampei,* foram preparadas sete concentrações de cada isolado a partir da suspensão inicial de esporos e cristais utilizada nos bioensaios seletivos. Entre essas, a mais concentrada foi utilizada pura, ou seja, 100% da suspensão inicial, e as demais foram diluídas em água esterelizada com Tween a 0,01% resultando em 30; 10; 3; 1; 0,3 e 0,1% da suspensão inicial. Essas suspensões foram posteriormente quantificadas em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de esporos por mL de água.

Para a inoculação das suspensões, a metodologia empregada foi a mesma utilizada nos bioensaios seletivos, aplicando-se 50µL da suspensão de cada concentração sobre a superfície da dieta já solidificada. Após a secagem da suspensão de esporos e cristais, cinco larvas de primeiro ínstar foram depositadas em cada poço. Foram realizadas 12 repetições para cada concentração testada. Para os controles positivo e negativo, utilizou-se a linhagem padrão IPS82 em sua maior concentração e água, respectivamente. Os insetos foram mantidos em câmara climatizada (25 ± 2 ^{o}C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz) por cinco dias, quando realizou-se a quantificação da mortalidade. Os dados foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971) para a determinação da concentração letal média. Os bioensaios foram repetidos duas vezes e as CL_{50} foram comparadas em relação aos intervalos de confiança.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* TÓXICOS A *H. HAMPEI*

Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen; Hendriksen (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h a 30 °C em placas contendo meio Luria-Bertani (LB). Com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para um microtubo contendo 200 µL de tampão TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA; pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em fervura por 10 minutos. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 × g por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e utilizado como amostra de DNA para as reações de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase). A

presença dos genes *cry*1, *cry*2, *cry*3, *cry*4A, *cry*4B, *cry*10, *cry*11 e *cyt*1 foi avaliada utilizando iniciadores e condições de amplificação específicas (Tabela 1). A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador Endurance TC-412. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de reação de 20 μL, contendo 1 U de *Taq* Dna polimerase (Invitrogen, Brasil), tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de KCl), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de dNTP, 0,5 μM de cada iniciador, 2 μL do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada. Essa mesma reação foi utilizada para todos os primers descritos. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) corados com Syber Safe (Invitrogen, Inglaterra) usando marcador de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Inglaterra). Após eletroforese, as imagens dos géis foram capturadas usando câmera digital Cyber-shot 8.1Sony.

Tabela 1 - Genes, iniciadores gerais e específicos de *Bacillus thuringiensis*, tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR, sequência de nucleotídeos, condições de amplificação e fontes.

Genes	Iniciadores	Produto (pb)	Sequência	Ciclos	Desnaturação	Pareamento	Extensão	Fonte
cry1	cry1gralD cry1gralR	558	5' CTGGATTTACAGGTGGGGATAT 5' TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT	30	60 s, 94°C	60 s, 52°C	60s, 72°C	[1]
cry2	cry2gralD cry2gralR	526	5' GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT 5' GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[2]
cry3	cjIII20-21D cjIII20-21R	652-733	5' TTAACCGTTTTCGCAGAGA 5' TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	30	60 s, 94ºC	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[3]
cry4A	cry4AspeD cry4BspeR	459	5' TCAAAGATCATTTTCAAAATTACA 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	30	45 s, 94°C	60 s, 50°c	60 s, 72°C	[4]
cry4B	cry4BspeD cry4BspeR	321	5' CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[4]
cry10	cry10speD cry10speR	348	5' TCAATGCTCCATCCAATG 5' CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	30	60 s, 94°C	60 s, 51°C	60 s, 72°C	[4]
cry11	cry11gralD cry11gralR	342-352	5' CGCTTACAGGATGGATAGG 5' GCTGAAACGGCACGAATATAAATA	30	45 s, 94°C	45 s, 50°C	60 s, 72°C	[4]
cyt1	cyt1gralD cyt1gralR	477-480	5'CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT 5'TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT	30	60 s, 94ºC	60 s, 50ºC	60s, 72ºC	[4]

Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação à 94 °C por 2 min e um passo final de extensão de 5 min à 72 °C. [1] Bravo et al. (1998). [2] Vidal-Quist; castañera; Gonzales-Cabrera (2009). [3] Céron et al. (1995). [4] Ibarra et al. (2003)

Fonte: o próprio autor

4.7 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY POR MEIO DE SDS-PAGE

As proteínas presentes nos cristais dos isolados foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) a fim de se caracterizar o perfil das proteínas produzidas. Cada isolado foi cultivado, em meio NB a 30 °C por 72 horas a 200 rpm, até completa esporulação. As proteínas Cry foram solubilizadas e os cristais foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Lecadet et al. (1992). Foram transferidos 1,5 mL das culturas bacterianas para tubos de microcentrifuga de 2 mL previamente autoclavados. Estes foram centrifugados a 12.000 × *g*, 20 minutos. Os sobrenadantes, resultantes da centrifugação, foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCI 0,5 M por 20 minutos. Após o descarte do NaCI 0,5M, as paredes do tubo de microcentrífuga foram secas com papel de filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF (fluoreto de fenilmetil sufonil) a 1mM e centrifugados a 12.000 x g por 20 min. Descartou-se o PMSF 1mM e os sedimentos foram ressuspendidos em 500 µL de PMSF 1 mM e armazenados a -20 °C.

As preparações de esporos-cristais dos isolados foram analisadas por SDS-PAGE, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados 15 µL das preparações de esporos-cristais solubilizados para a realização da eletroforese em tampão Tris-glicina, sob voltagem constante de 30 mA por 3 horas. A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82, a qual já tem o perfil proteico conhecido foi utilizada como referência. Um marcador de proteína, Precision Plus Kaleidoscope, 10-250kD (Bio-Rad) foi utilizado para a posterior análise dos resultados. As distâncias percorridas pelo marcador foram medidas e com os dados dos respectivos pesos moleculares foi realizada a regressão linear que resultou em um gráfico montado usado o programa Excel versão 2007 (Microsoft Office Package). Assim, foram calculados os pesos moleculares das proteínas produzidas pelas diversas linhagens do estudo.

4.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada por microscopia óptica, com a confecção de lâminas e posterior observação ao microscópio óptico com aumento de 100x e por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, o material liofilizado dos isolados utilizado nos bioensaios anteriores foi depositado diretamente sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, com corrente de 40 mA, sob vácuo (10-1

mbar), em um metalizador BAL-TEC modelo SCD – 050 Sputter Coater e analisada em microscópio eletrônico de varredura Philips QUANTA 200 (FEI) em alto vácuo sob tensão de 20 kV, com distância de trabalho de 10.2 mm.

4.9 SEQUENCIAMENTO DO ISOLADO BR58 DE *B. THURINGIENSIS*

O isolado BR58 foi selecionado para ser sequenciado pois apresentou a menor CL_{50} no controle de *H. hampei*. A extração do DNA genômico total, cujo produto foi encaminhado para o sequenciamento genético, realizou-se no Laboratório de Genética e Taxonomia de Microrganismos bioinseticida da Universidade Estadual de Londrina. Foi utilizado o *kit* comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante e a quantificação desta amostra de DNA foi realizada em NANODROP® ND1000.

O sequenciamento do genoma do isolado BR58 ocorreu no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo utilizando a plataforma Ion Torrent (Life Technologies) com um Ion Chip 316 (Life Technologies).

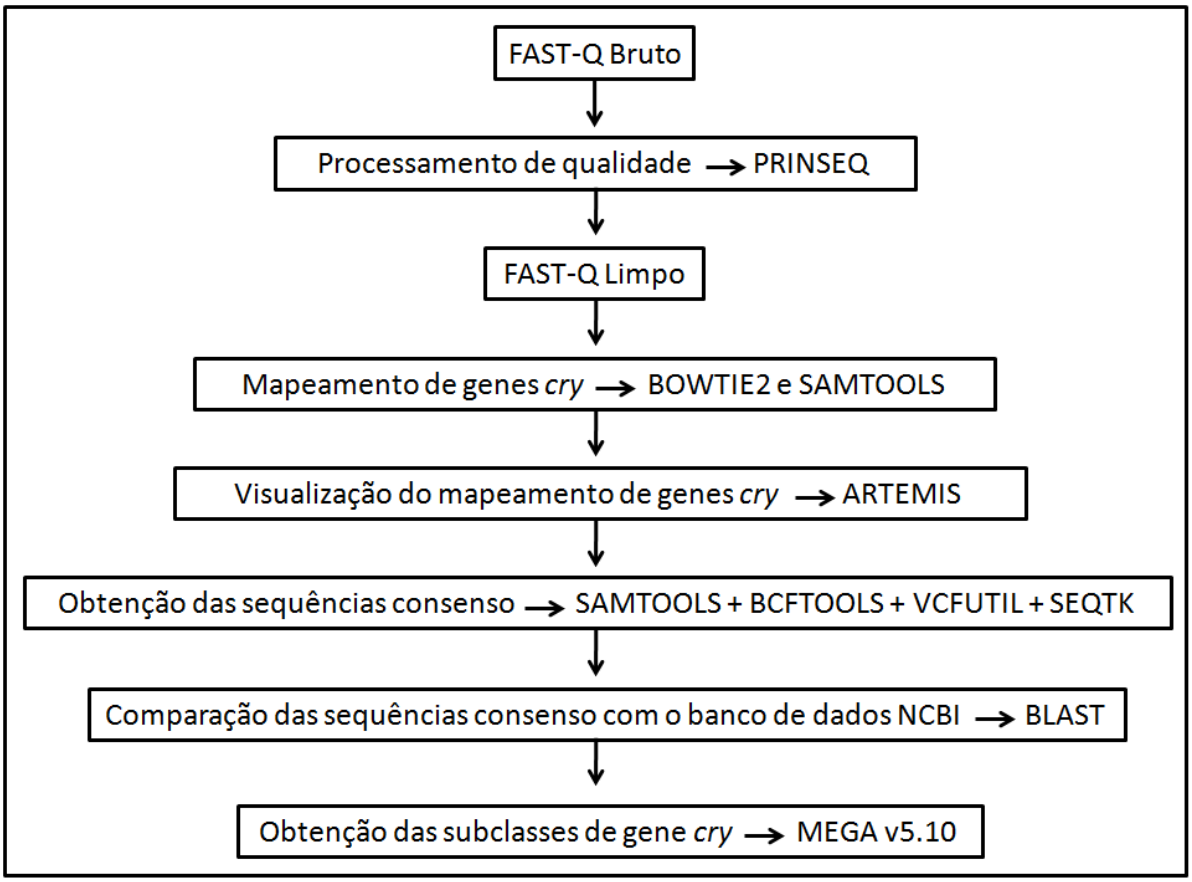
As sequências obtidas em formato FAST-Q foram analisadas no Laboratório de Bioinformática da Universidade Estadual de Londrina. Inicialmente foi realizado o processamento de qualidade do arquivo bruto, filtrando as leituras de baixa qualidade baseando-se no número de bases ambíguas. Esse processamento de qualidade ocorreu com o auxílio do programa PRINSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) (Figura 2).

Posteriormente, através das leituras (*reads)* obtidas no sequenciamento e sequências dos genes *cry* de referência depositadas no banco de dados GeneBank, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) realizou-se o mapeamento dos possíveis genes *cry* presentes nesse isolado com a utilização dos softwares BOWTIE 2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) e SAMTOOLS (LI et al., 2009). As sequências de genes *cry* utilizadas como referência foram selecionadas com base nos estágios de classificação (CRICKMORE et al., 2015) e alinhamento local destas sequências.

A visualização da cobertura do gene de referência com os *reads* mapeados a partir dos dados genômicos do isolado BR58 ocorreu pelo software ARTEMIS (RUTHERFORD et al., 2000). As sequências consenso foram obtidas para os genes *cry* que apresentaram cobertura completa, ou seja, com toda a extensão do gene de referência coberta pelos *reads*.

As sequências consensos foram comparadas às demais sequências através da ferramenta BLAST (BLASTn e BLASTp) disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Esse alinhamento global permitiu indicar e confirmá-las em relação aos genes *cry*. Posteriormente, as sequências consenso foram alinhadas por meio do software MEGA v. 5.10 (TAMURA et al., 2011) a fim de obter as subclasses para a identificação dos genes *cry* presentes no isolado.

Figura 2 - Fluxograma referente a metodologia de sequenciamento do isolado BR58.



Fonte: o próprio autor

5 RESULTADOS

5.1 BIOENSAIO SELETIVO DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* A *H. HAMPEI*

Dos 34 isolados de *B. thuringiensis* avaliados por meio de bioensaio seletivo, 11 (32,3%) causaram mortalidades de larvas de *H. hampei* acima de 96% e não diferiram significativamente entre si e entre a linhagem padrão IPS82, sendo esses submetidos aos bioensaios quantitativos para determinação da concentração letal média (CL_{50}). Os demais 23 isolados (67,6%) ocasionaram mortalidades abaixo de 21,2%, e entre esses, BR09 e BR187, assim como a linhagem padão não foram patogênicos a *H. hampei* (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade provocada por *Bacillus thuringiensis* a larvas de primeiro ínstar de *Hypothenemus hampei* em bioensaio seletivo cinco dias após a inoculação (Temperatura: 25 ± 2 °C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz).

Isolados	Mortalidade (%)[a]	
IPS82[b]	100,00	a
BR80	100,00	a
BR81	100,00	a
BR140	98,80	a
BR58	98,75	a
BR67	98,75	a
BR135	98,75	a
BR137	98,75	a
BR139	98,75	a
BR147	98,75	a
BR146	97,50	a
BR138	96,25	a
BR37	21,25	b
BR79	21,25	b
BR18	20,00	b
BR131	17,50	b
BR149	16,25	b
BR105	15,00	b
BR38	15,00	b
BR127	10,00	c
BR145	10,00	c
BR78	8,75	c
BR164	8,75	c
BR07	7,50	c
BR83	6,25	c
BR141	6,25	c
BR143	6,25	c
S1269	5,00	c
BR03	5,00	c
BR05	3,75	c
BR87	3,75	c
BR43	1,25	c
BR148	1,25	c
BR09	0,00	c
BR187	0,00	c
HD1[c]	0,00	c
Testemunha	1,25	c

[a]Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ($p<0,05$) por Scott-Knott.
[b]linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 – controle positivo
[c]linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 – controle negativo
Fonte: o próprio autor

5.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL_{50}) de Isolados de *B. Thuringiensis*

Os valores de Qui-quadrado (X^2) relacionados aos diferentes isolados para determinar a CL_{50} não foram significativos, indicando que os dados foram homogêneos e ajustaram-se ao modelo de probit (FINNEY,1971).

A CL_{50} dos isolados selecionados para larvas de *H. hampei* variou de 0.037E+9 a 0.956E+9 esporos mL^{-1}. A menor concentração letal foi proporcionada pelo isolado BR58, o qual não diferiu estatisticamente da linhagem padrão IPS82. Os resultados obtidos evidenciaram quatro grupos de toxicidade distintos estatisticamente. No primeiro grupo, não houve diferenças significativas entre os valores de CL_{50} dos isolados BR58, BR137, IPS82, BR80 e BR67, os quais apresentaram os melhores resultados e foram considerados os mais efetivos contra *H. hampei* (Tabela 3). No segundo grupo, formado por BR81, BR147, BR135 e BR146 todos diferiram da linhagem padrão IPS82 e dos isolados BR58 e BR137, que foram os mais tóxicos. A exceção é para o isolado BR81 que não diferiu estatisticamente da IPS82. O terceiro grupo foi composto pelos isolados BR138 e BR139, que obtiveram CL_{50} superior aos cinco isolados mais tóxicos. Por último, apresentando a menor toxicidade, o isolado BR140 diferiu de todos os demais, e apresentou a maior CL_{50}.

O isolado BR81, pertencente ao segundo grupo obteve CL_{50} cerca de três vezes maior que os isolados BR58 e BR137, mas esse valor não diferiu dos valores apresentados pelos isolados BR80 e BR67 e pela linhagem padrão IPS82. O isolado BR58 foi aproximadamente 25 vezes mais tóxico do que BR140, o qual apresentou a maior CL_{50} e diferiu de todos os outros isolados (Tabela 3).

A comparação entre o isolado com a maior CL_{50} pertencente ao segundo grupo (BR146) e o isolado BR58, demonstra que o BR146 foi 5,3 vezes menos tóxico que BR58. Da mesma forma, o terceiro grupo de isolados apresentou menor toxicidade a larvas de *H. hampei* com valores de CL_{50} significativamente maiores que o valor apresentado por BR58. Nesse último grupo, composto pelos isolados BR138 e BR139, o valor de CL_{50} obtido para BR139 (0.297E+9), foi cerca de oito vezes maior do que para BR58, o qual foi considerado o isolado mais efetivo sobre *H. hampei* nas mesmas condições avaliadas.

Tabela 3 - Concentração letal média (CL_{50}) de isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de primeiro ínstar de *Hypothenemus hampei* (n=60) cinco dias após exposição a dieta contendo suspensão de esporo/cristal dos isolados (Temperatura: 25 ± 2 °C, 60 ± 10% de UR, em ausência de luz).

ns: não-significativo pelo teste do qui-quadrado (p<0.05).

Isolado	CL_{50} (Esporos.ml-1)		$IC_{0.05}$ Inferior	$IC_{0.05}$ Superior	X^2	Equação de regressão
BR58	.037E+9	a*	.017E+9	.070E+9	10.330 ns	y=-5.667+1.410*logX
BR137	.039E+9	a	.023E+9	.067E+9	7.223 ns	y=-4.333+1.227*logX
IPS82	.040E+9	ab	.017E+9	.080E+9	7.033 ns	y=-6.552+1.519*logX
BR80	.049E+9	abc	.024E+9	.089E+9	10.168 ns	y=-5.776+1.402*logX
BR67	.113E+9	abc	.050E+9	.104E+9	10.166 ns	y=-7.428+1.543*logX
BR81	.114E+9	bcd	.074E+9	.169E+9	3.665 ns	y=-3.045+.998*logX
BR147	.148E+9	cde	.089E+9	.243E+9	8.089 ns	y=-5.559+1.292*logX
BR135	.164E+9	de	.122E+9	.217E+9	3.935 ns	y=-6.748+1.430*logX
BR146	.196E+9	de	.134E+9	.273E+9	2.172 ns	y=-5.216+1.232*logX
BR138	.251E+9	e	.180E+9	.344E+9	1.558 ns	y=-6.327+1.348*logX
BR139	.297E+9	e	.203E+9	.424E+9	3.923 ns	y=-4.820+1.159*logX
BR140	.956E+9	f	.624E+9	1.60E+9	3.798 ns	y=-4.420+1.049*logX

*Letras diferentes após os valores de CL_{50} para cada isolado são significantemente diferentes com base no intervalo de confiança (IC) (*P*=0.05).

Fonte: o próprio autor

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS* TÓXICOS A *H. HAMPEI*

Por meio da técnica de PCR, utilizando DNA total dos isolados mais tóxicos e iniciadores específicos para a detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* foi possível amplificar fragmentos de tamanhos esperados (BRAVO et al., 1998; CÉRON et al., 1995, IBARRA et al., 2003; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009), e assim, identificar a presença de diferentes grupos de genes *cry* de *B. thuringiensis* nos isolados.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que a combinação *cry4A, cry4B, cry10, cry11* e *cyt1* foi observada em dez isolados, os quais apresentaram produto de amplificação semelhante ao esperado para *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*cry4Aa, cry4Ba, cry10Aa, cry11Aa*, *cyt1Aa, cyt1Ca* e *cyt2Ba,* localizados em um único plasmídeo de 72MDa) (GUERCHICOFF; UGALDE; RUBINSTEIN, 1997; IBARRA et al., 2003; BERRY et al., 2002). Somente o isolado BR67 não apresentou produto de amplificação para os genes supracitados, e amplificou apenas para o gene *cry3* que possui atividade descrita para coleópteros (SCHNEPF et al., 1998).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY POR MEIO DE SDS-PAGE

A análise do perfil proteico, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) das misturas de esporos e cristais dos isolados selecionados pela maior toxicidade a *H. hampei*, revelou bandas de 28, 65, 70 e 130 kDa (Tabela 4). A linhagem utilizada como padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* apresentou perfil proteico semelhante ao relatado anteriormente de 27, 65, 128 e 135 kDa (BECKER; MARGALIT, 1993). Todos os perfis analisados, exceto BR67, apresentaram massa molecular de 130 kDa, a qual está frequentemente relacionada às proteínas-cristal das classes Cry4A e Cry4B, cujas massas moleculares variam de 128 a 135 kDa (LERECLUS, et al., 1989). O isolado BR58 apresentou peptídeos de 130 kDa, que podem estar relacionados às proteínas Cry4, e peptídeos de 70 kDa, que podem estar relacionados à proteína Cry10 (~78 kDa) (THORNE et al., 1986) e à proteína Cry11 (~72 kDa) (DELECLUSE; ROSSO; RAGNI, 1995). Massas moleculares de 65 ou 70 kDa foram reveladas em quase todos os isolados, confirmando a presença dos genes esperados (*cry10* e *cry11*). Entretanto essas bandas não foram reveladas nos isolados BR135, BR139 e BR146, os quais também continham os genes *cry10* e *cry11*, mas apresentaram apenas peptídeos de 130 kDa.

Os isolados BR81, BR80 e BR67, observados respectivamente nas canaletas 2, 3 e 4 do gel de poliacrilamida (Figura 3) revelaram perfis proteicos idênticos com exceção do isolado BR67, que não apresentou o polipeptídeo de 130 kDa. O isolado BR135 (canaleta 5), revelou uma única banda evidente de 130 kDa. O isolado BR146 (canaleta 6), revelou uma banda de ~130 kDa e o isolado BR58 (canaleta 1) apresentou uma banda de 130 kDa e de ~70 kDa.

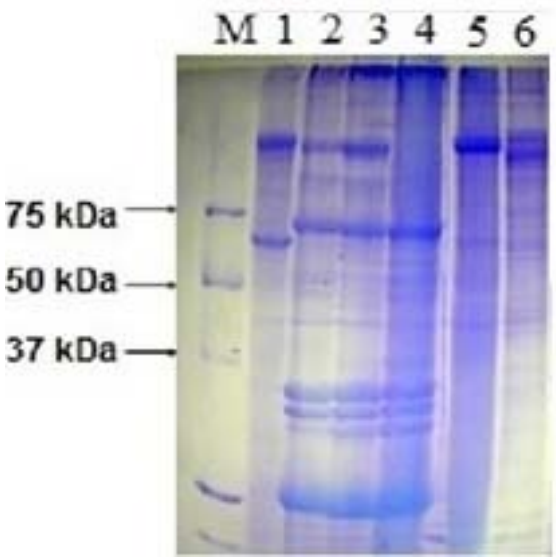
Tabela 4 - Perfil genético e proteico de isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolado	Perfil genético	Perfil proteico (kDa)
BR58	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/70
BR137	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/65
IPS82	*cry4A, cry4B,cry10, cry11, cyt1*	130/70/28
BR80	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/70
BR67	*cry3*	65/70
BR81	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/70
BR147	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/65
BR135	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130
BR146	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130
BR138	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/65
BR139	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130
BR140	*cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1*	130/65

Fonte: o próprio autor

.

Figura 3 - SDS-PAGE 10% da suspensão de esporos/cristais dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. M: marcador; Isolados: 1 – BR58; 2 – BR81; 3 - BR80; 4 – BR67; 5 - BR135; 6 - BR146.

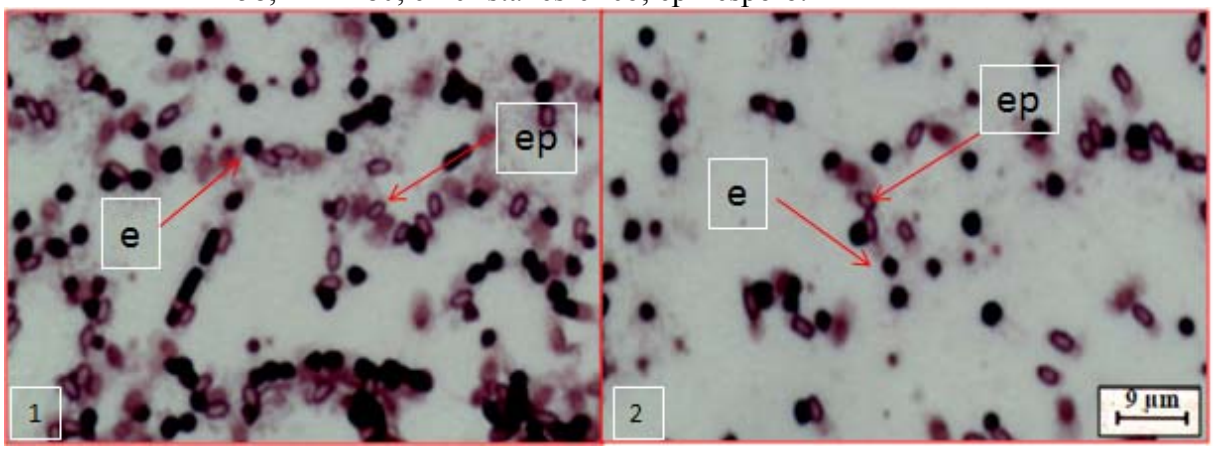


Fonte: o próprio autor

5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *B. THURINGIENSIS*

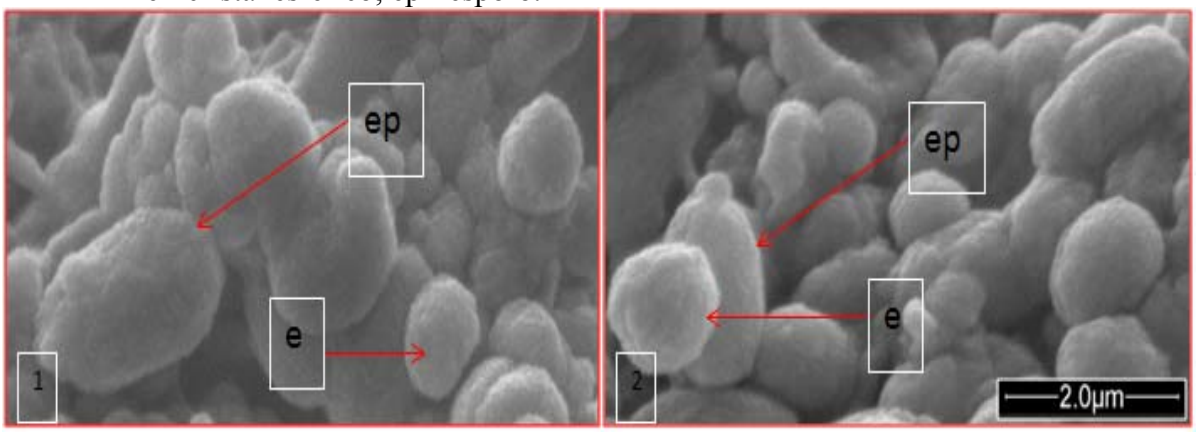
A análise morfológica, por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (Figuras 4 e 5), confirmou as características típicas de isolados pertencentes a espécie *B. thuringiensis*, como a presença de esporos, cristais e células vegetativas em forma de bastonete. As imagens revelaram que todos os isolados apresentaram cristais esféricos, muito semelhantes aos encontrados em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis.*

Figura 4 - Fotomicrografia de esporos/cristais de *Bacillus thuringiensis*. Isolados: 1 – BR58; 2 –BR80; e - cristal esférico; ep - esporo.



Fonte: o próprio autor

Figura 5 – Eletromicrografia de esporos/cristais de *Bacillus thuringiensis.* 1- BR58; 2- BR80. e - cristal esférico; ep - esporo.



Fonte: o próprio autor

5.6 SEQUENCIAMENTO DO ISOLADO BR58 DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

A análise do DNA total do isolado BR58, o qual apresentou maior toxicidade a *H. hampei*, foi realizada na plataforma Ion Torrent e gerou um arquivo bruto com 2.312.798 *reads* com tamanho médio de 308 pb por *read*. Após o processamento, com a retirada de sequências curtas e de baixa qualidade, foi obtido um arquivo com 2.239.376 *reads*. Com os *reads* gerados, foi possível cobrir em torno de 35 vezes o genoma total desta bactéria.

Observou-se após o mapeamento que os genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11, cry30, cry60* e *cyt1* foram cobertos por *reads* gerados, constituindo evidência da presença desses genes no genoma do isolado analisado. Para o gene *cry10* foram obtidos 1043 reads e para o *cry11* foram 847. Os genes *cry30* e *cry60* foram compostos por 1769 e 252 *reads,* respectivamente. Já o gene *cyt1* apresentou 310 *reads*. Para os genes *cry4A* e *cry4B* foram obtidos 2482 e 2625 *reads,* respectivamente.

O resultado do alinhamento por meio do BLASTn das sequências consenso com os genes depositados no banco de dados, mostraram que os genes *cry* identificados no isolado BR58 exibiram cobertura e identidade superiores à 80 e 99%, respectivamente, com as sequências de genes *cry* junto ao banco de dados NCBI, aumentando a confiabilidade da classificação. As sequências consensos alinhadas com as sequências para os genes *cry* esperado através do programa MEGA 5.1 confirmaram a presença dos genes *cry4Aa1, cry4Ba1 cry10Aa3, cry11Aa1, cyt1Aa1, cry30Aa1* e *cry60Aa2*.

6 DISCUSSÃO

Entre os 34 isolados testados no bioensaio seletivo para *H. hampei* 11 se destacaram como os mais tóxicos e apresentaram perfil morfológico (cristais esféricos), molecular (*cry4A, cry4B, cry10, cry11 e cyt1*) e proteico (130/70-65 kDa) semelhantes entre si e entre a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 (Tabelas 4 e 5). Esse perfil molecular apresentado pelos isolados é responsável por elevada toxicidade a dípteros, porém já foi citado no controle de coleópteros como *H. hampei* e *Anthonomus grandis* (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003; MONNERAT et al., 2012). Já os isolados que contém genes *cry1, cry2* e *cry3,* como o BR145 (RICIETO et al., 2013), que possui genes ativos contra a ordem coleóptera, apresentou baixa toxicidade a *H. hampei* causando apenas 10% de mortalidade (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram citados por Méndez- López; Basurto-Ríos; Ibarra (2003), que após avaliarem 170 isolados para o controle de *H. hampei*, observaram que apenas 32 causaram mortalidade entre 90 e 100%, sendo esses isolados díptero-específicos e semelhantes quanto à caracterização molecular, proteica, morfológica e atividade contra *Aedes aegypti*. Os autores também testaram contra *H. hampei* nove isolados do Instituto Pasteur com atividade mosquitocida, e observaram que as subespécies *israelensis* e *thompsoni* obtiveram 100% de mortalidade e as subespécies *morrisoni* (PG14) e *malaysiensis* apresentaram mortalidade acima de 80% não diferindo estatisticamente das mais tóxicas.

Os principais componentes do cristal paraesporal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, localizados em um único plasmídio de 72 MDa (WARD; ELLAR, 1986), são as proteínas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa (CRICKMORE et al., 1995), enquanto pequenas quantidades de Cry10Aa (GARDUNO et al., 1988) e Cyt2Ba (GUERCHICOFF; UGALDE; RUBINSTEIN, 1997) também estão presentes. A produção de proteínas do gene *cyt1Ca* ainda não foi detectada nos cristais, entretanto há indícios de sua transcrição (STEIN et al., 2006).

A combinação dos genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11 e cyt1,* amplificados nos 10 principais isolados estudados, não é comumente encontrada nas coleções caracterizadas por outros autores. Ibarra et al. (2003), por meio de PCR, utilizaram 27 iniciadores para detectar 17 diferentes genes *cry* e *cyt* em um banco com 6.531 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de países da América Latina. Os autores observaram diferentes combinações entre os genes diptero-específicos *cry4*, *cry10*, *cry11* e *cyt*. A combinação *cry4A, cry4B, cry11, cyt1* e *cyt2* foi encontrada em três isolados, onde a presença do *cry10* foi ausente, e o conjunto contendo *cry4A,*

cry4B, cry10, cry11 e cyt1, foi observado em apenas um isolado, diferindo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* por não apresentar o gene *cyt2*.

A dificuldade em se obter isolados com o perfil genético semelhante a *B. thuringiensis* var. *israelensis* enfatiza a importância do presente trabalho, no qual foi identificado a mesma combinação de genes *cry* (*cry4A, cry4B, cry10, cry11* e *cyt1)* em 27% dos isolados estudados, sendo que todos apresentaram elevada toxicidade a *H. hampei.*

Os autores Ibarra et al. (2003) demonstraram a alta eficiência dos isolados díptero-específicos contendo os genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11 e cyt1* contra larvas de *A. aegypti*, e é possível supor que entre esse complexo gênico inclua o(s) gene(s) responsável pela elevada virulência a *H. hampei,* ainda que os insetos pertençam a ordens diferentes.

Os isolados BR58, BR137, BR80, pertencentes ao primeiro grupo de toxicidade, com os menores valores de CL_{50}, amplificaram os genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11 e cyt1,* e revelaram bandas de 130kDa e 65-70kDa que podem estar relacionadas aos genes *cry4A, cry4B* e aos genes *cry10* e *cry11* respectivamente (MONNERAT et al., 2012). Os isolados BR135, BR146 e BR139, pertencentes ao segundo e terceiro grupo respectivamente, apresentaram o mesmo conjunto gênico que os isolados do primeiro grupo, porém revelaram apenas uma banda de 130kDa e não apresentaram bandas de 65-72kDa, 78kDa ou de ~28kDa, que poderiam ser referentes aos genes *cry11, cry10* e *cyt1* respectivamente. Esses isolados foram responsáveis pelos maiores valores de CL_{50}, o que sugere que a menor toxicidade apresentada pode ser devido à baixa ou a não expressão dos genes *cry10, cry11* e *cyt1*.

A técnica de PCR proporciona uma rápida e superficial caracterização molecular baseada nos iniciadores utilizados, porém não é capaz de identificar todos os genes presentes em um isolado, e também não revela se os genes são expressos ou não. Dessa forma, os genes amplificados, como por exemplo, *cry10, cry11* e *cyt1,* podem estar presentes em níveis muito baixos, ou estarem interrompidos, mutados ou sobre o controle de um promotor defectivo, não contribuindo assim para um bom efeito letal contra a praga, ou não se expressando para a formação de níveis de proteínas detectáveis por meio de caracterização proteica.

Os genes *cry4* e *cyt1,* encontrados em praticamente todos os isolados estudados no presente trabalho, foram responsáveis por elevada mortalidade a *A. grandis* (MONNERAT et al., 2012). Esses genes também foram identificados nos isolados *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e subsp. *morrisoni* (PG14) (CHOI et al., 2004; WAALWIJK et al., 1985), os quais foram considerados tóxicos *H. hampei* (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003), indicando o importante papel dessas toxinas na atividade contra coleópteros.

Isso leva a acreditar que um dos motivos para o efeito tóxico dos isolados estudados contra *H. hampei* seja, entre outras hipóteses, a ação das proteínas Cry4 e Cyt1. As proteínas Cyt1, apesar de apresentarem toxicidade *in vitro* apenas para dípteros (HÖFTE: WHITELEY, 1989), já demonstraram seu potencial contra coleópteros como *H. hampei*, *A. grandis* e *Chrysomela scripta* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae), quando testada individualmente contra esses insetos (FEDERICI; BAUER, 1998).

Além de sua atividade inseticida, as proteínas Cyt1 também apresentaram capacidade de suprimir elevados níveis de seleção de populações de *C. scripta* resistentes à proteína Cry3A (FEDERICI; BAUER, 1998). Essa ação pode ser devido à estrutura e modo de ação diferenciados das proteínas Cyt, que as tornam eficientes aliadas no manejo de resistência cruzada de pragas tanto na composição de inseticidas biológicos quanto para a construção de plantas geneticamente modificadas.

Delécluse et al. (1991) revelaram que a proteína Cyt1A não foi essencial para a atividade entomopatogênica de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a larvas de *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*, pois a interrupção do gene *cyt1A* resultou em um isolado com atividade entomopatogênica similar ao isolado selvagem. No entanto, a presença frequente da proteína Cyt1A em cristais sugere que ela pode ser um componente importante para a característica entomopatogênica de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, como por exemplo, ação sinérgica com outras proteínas ou com outros fatores de virulência capazes de aumentar a toxicidade da linhagem.

Diversos autores citam que as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* var. *israelensis* agem sinergisticamente, ou seja, quando são testadas isoladas têm menor efeito do que quando estão em conjunto com outras proteínas ou na linhagem selvagem (BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007; CRICKMORE et al., 1995). Essa ação sinérgica pôde ser demonstrada pela capacidade da proteína Cyt1Aa atuar no aumento da toxicidade de Cry11Aa ao facilitar a formação de uma estrutura oligomérica de pré-poro que auxilia na formação do poro (PEREZ et al., 2007).

Adicionalmente, Perez et al. (2007) demonstraram que a proteína Cyt1Aa induz a formação da estrutura oligomérica de Cry11Aa da mesma forma que o receptor de membrana caderina induz a oligomerização da proteína Cry1A em lepidópteros (GÓMEZ et al., 2002). Foi observado também que a proteína Cyt1Aa quando localizada na membrana do epitélio intestinal dos insetos aumenta a eficiência de ligação de Cry11Aa a BBMVs (brush border membrane vesicles ou vesículas de membrana das microvilosidades apicais) de larvas *A. aegypti* (COHEN et al., 2008).

A proteína Cyt1Aa pode apresentar a capacidade de suprimir a resistência de insetos a Cry11Aa ao proporcionar um sitio de ligação diferente para essa proteína e atuar como um receptor primário tipo caderina, o que irá resultar em uma eficiente formação do pré-poro, inserção na membrana e formação do poro (PEREZ et al., 2007).

Diante das funções apresentadas pela proteína Cyt1 é possível considerá-la como importante integrante do conjunto proteico apresentado pelos isolados tóxicos a *H. hampei*, e futuramente deve ser testada separadamente e em conjunto com as demais proteínas. Dessa forma, será possível avaliar não apenas sua toxicidade isolada à praga, mas também relações de sinergismo com outras proteínas e supressão ou atraso em casos de resistência dos insetos às demais proteínas de *B. thuringiensis* inseridas em plantas transgênicas.

Essa observação poderá auxiliar a decidir se será mais conveniente a inserção de um ou mais genes *cry* e *cyt* nas plantas de café visando incorporar resistência a *H. hampei*, visto que, além do sinergismo existente entre as proteínas Cry e Cyt, alguns autores já demonstraram que expressões múltiplas das toxinas de *B. thuringiensis* podem reduzir casos de seleção de populações de insetos resistentes as proteínas Cry (LI et al., 2014; MOAR et al., 1990).

O sinergismo entre toxinas produzidas por *B. thuringiensis* var. *israelensis* também foi verificado entre as proteínas Cry4 e Cyt1. O resultado foi analisado pela estimativa da CL_{50} das proteínas Cry4 e Cyt1 para larvas de *A. aegypti*, a qual foi dez vezes menor quando essas proteínas foram testadas em conjunto do que quando cada uma delas foi utilizada separadamente (TABASHNIK, 1992).

Beltrão; Silva-Filha (2007), ao realizarem ensaios de competição entre as proteínas, mostraram que Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, unem-se especificamente à BBMFs de *A. aegypti*, com alta afinidade aos sítios de união, e sugerem que o aumento dessa afinidade pode ser devido à interação sinergistica com a toxina Cyt1Aa.

Monnerat et al. (2012), observaram que a virulência a larvas de *A. grandis* causada por uma linhagem recombinante de *B. thuringiensis* expressando apenas o gene *cry4A* ou o gene *cry4B* foi maior do que a que continha apenas gene *cry11*, demonstrando que cada gene que compõe uma linhagem tem potencial diferente no controle de pragas. Entretanto, quando o conjunto de genes (*cry4A, cry4B, cry11A* e *cyt1A*) foi reunido em uma única linhagem recombinante, ainda assim, ela apresentou menor toxicidade do que a linhagem selvagem *B. thuringiensis* subsp. *israelenses*.

Esses resultados sugerem que outros fatores de virulência ou genes da linhagem selvagem, que não foram incluídos na linhagem recombinante possam ser responsáveis por sua ação frente a coleópteros, como por exemplo, os genes *cry10Aa, cyt2Ba* e *cyt1Ca* que também estão presentes no plasmídio pBtoxis da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *israelenses* (BERRY et al., 2002). Esses genes codificam para a formação de proteínas cristais menores do que as proteínas *cry4A, cry4B, cry11A* e *cyt1Aa*, mas também podem ser responsáveis pela toxicidade da linhagem padrão ou atuar em sinergismo com outras toxinas (BERRY et al., 2002; GUERCHICOFF; UGALDE; RUBINSTEIN, 1997; MONNERAT et al., 2012; STEIN et al., 2006; THORNE et al., 1986).

De forma semelhante, Huges et al. (2005), após avaliarem a ação de *B. thuringiensis* subsp. *israelenses* sobre *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae), constataram que a toxicidade do cristal selvagem era maior do que as contribuições isoladas de cada proteína e das combinações envolvendo todas as toxinas pertencentes a linhagem, com exceção da Cry10A. Os mesmos autores também verificaram a presença de sinergismo entre as toxinas Cry4A e Cyt1A, e em contraste a outros trabalhos com dípteros, observaram um leve antagonismo entre Cry11A/Cry4B e Cry11A/Cyt1A.

Os isolados mais tóxicos a *H. hampei*, selecionados neste estudo, com excessão do BR67, amplificaram os genes *cry4A* e *cry4B*, os quais, como verificado anteriormente em outros trabalhos, apresentaram toxicidade não só a dípteros, mas também a coleópteros. Esse fato é relevante considerando que as proteínas Cry4A e Cry4B possuem elevada importância biológica, pois, além da toxicidade individual, têm sido reportadas agindo sinergisticamente em larvas de mosquitos (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007).

Em bioensaios com *A. aegypti*, constatou-se que a proteína Cry4Ba foi mais tóxica as larvas, seguida pela Cry11Aa e Cry4Aa (PONCET et al., 1995). Entretanto, Crickmore et al. (1995) observaram em estudos semelhantes, que a toxina Cry11Aa apresentou a menor CL_{50} para larvas de *A. aegypti*, seguida pela Cry4Ba e Cry4Aa, e apesar da toxicidade apresentada pelas proteínas individualmente, a linhagem selvagem é sempre mais tóxica do que as frações individuais ou combinações de toxinas (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992; WU; CHANG, 1985). Isso ressalta a necessidade em se conhecer e estudar todas as proteínas Cry presentes em um isolado, tanto em conjunto quanto separadas, visto que há uma comprovada variação na eficiência de cada uma.

As proteínas Cry4Aa e Cry4Ba apresentam alta taxa de identidade de sequência de aminoácidos. Mas apesar desta similaridade, elas exibem diferentes níveis de

toxicidade contra várias espécies de dípteros. Enquanto a proteína Cry4Ba é altamente tóxica para larvas de *Aedes* e *Anopheles,* ela apresenta baixa atividade contra larvas de *Culex*. Já a proteína Cry4Aa exibe um alto nível de toxicidade contra larvas de *Culex* e *Aedes*, porém um pouco menos tóxica para *Anopheles* (PONCET et al., 1995).

Diante dessa diferença de toxicidade, ambas as proteínas (Cry4A e Cry4B), ao serem testadas individualmente e em conjunto contra *H. hampei,* possivelmente irão apresentar respostas diferentes em níveis de mortalidade, ou até mesmo não causarem toxicidade a praga. López-Pazos, Cortazar; Cerón (2009) relataram que proteínas Cry4 obtiveram menos de 7% de mortalidade a *H. hampei*, e não observaram ligação em suas BBMVs.

Em contraste aos resultados apresentados por Méndez-López; Basurto-Ríos; Ibarra (2003) e confirmados no presente trabalho, López-Pazos, Cortazar; Cerón (2009) não observaram mortalidade de *H. hampei* causada por *B. thuringiensis* subsp. *israelenses* IPS-82. Os autores explicaram que provavelmente isso se deva a diferenças existentes entre a linhagem IPS-82 causadas por alterações nas colônias de *B. thuringiensis* resultantes de diferentes condições de cultivos, como nutrição e temperatura de incubação, levando a perda de atributos multicelulares ou então devido a alguma mutação ocorrida nos promotores de genes essenciais para a toxicidade da bactéria.

Outras divergências metodológicas também podem ter influenciado nos resultados, como por exemplo, os bioensaios realizados por López-Pazos, Cortazar; Cerón (2009) foram realizados apenas com proteínas Cry recombinantes, já Méndez-López; Basurto-Ríos; Ibarra (2003) e no presente trabalho, cujo objetivo inicial foi analisar o conteúdo total dos isolados, foram utilizadas misturas de esporos e cristais, e dessa forma, a toxicidade ao inseto poderia estar relacionada não apenas as proteínas Cry, mas também a demais fatores de virulência, como proteases, quitinases, proteínas na fase vegetativa e proteínas Cyt. Outra diferença pode ser encontrada no protocolo de purificação das amostras, onde o conteúdo de toxina pode variar entre 20 e 90% em preparações não purificadas, e a metodologia de purificação pode influenciar os resultados em casos de comparação de toxicidade para uma mesma linhagem.

O gene *cry11*, apesar de ser o gene mais ativo contra *A. aegypti* (CRICKMORE et al., 1995), quando foi testado isoladamente contra *A. grandis*, demonstrou baixa toxicidade (MONNERAT et al., 2012). Em estudos realizados por Méndez-López; Basurto-Ríos; Ibarra (2003) foi obervado que *B. thuringiensis* subsp *fukuokaensis* (isolado T03C–001), *jegathesan* (isolado T28A–001) e *medellin* (isolado T30–001), os quais contém

proteínas Cry11 (CRICKMORE et al., 1998) também não foram tóxicos a *H. hampei*.

Apesar da toxicidade comprovada da proteína Cry11Aa sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), quando essa espécie foi exposta unicamente à proteína Cry11Aa, houve seleção de insetos resistentes após 16-20 gerações. Essa rápida seleção sugere que prováveis alterações no gene do receptor de membrana do inseto (caderina) podem ter conduzido a resistência à proteína Cry11Aa. Entretanto, a evolução dessa resistência foi menor quando a proteína Cry11Aa foi utilizada concomitantemente com as proteínas Cry4A e Cry4B, representando maior fonte de genes para atuar no controle da praga (GEORGHIOU; WIRTH, 1997).

A relação entre essas duas proteínas é de grande importância para as linhagens selecionadas, pois a maioria apresentou tanto o gene *cry4* quanto *cry11,* e assim, será interessante a realização de bioensaios com as proteínas individuais contra as larvas de *H. hampei* a fim de avaliar possíveis casos de resistência a proteína Cry11, e em casos positivos, se a utilização conjunta com a proteína Cry4 poderia atrasar ou eliminar o surgimento de insetos resistentes. Dessa forma, será possível prever se esses genes, após comprovada toxicidade, devem ser inseridos isoladamente na planta transgênica, ou em conjunto a fim de evitar casos futuros de seleção de insetos resistentes.

Segundo Wirth et al. (1998), linhagens que carregam os genes *cry4* e *cry11* podem apresentar competição pelo local onde as proteínas se ligam no receptor da membrana do intestino de alguns insetos, como ocorre em *Culex*. Entretanto, as protoxinas podem se ligar em diferentes locais do receptor caderina, levando a um baixo nível de competição entre as proteínas Cry, e a eficiência de ambas, aumentando a toxicidade do isolado, como ocorreu com *A. aegypti* em pesquisa realizada por Chen et al. (2009).

A obtenção e utilização isolada da proteína Cry impede a sua interação com outras proteínas Cry contidas em linhagens de *B. thuringiensis*, e assim, anula o efeito de competição entre essas no momento da sua ligação com receptores do intestino do inseto suscetível. Entretanto, apenas um gene inserido na planta para o controle de insetos, aumentaria as chances de seleção de insetos resistentes à toxina expressa por esse gene (AGUIAR et al., 2006).

Diversos grupos de pesquisa têm voltado seus estudos para a busca de isolados de *B. thuringiensis* altamente tóxicos e contendo múltiplas proteínas Cry a fim de se obter especificidade a diferentes insetos-praga e mais opções para o manejo de insetos resistentes a determinados genes (BOBROWSKI et al., 2003). Dessa forma, a descoberta de isolados de *B. thuringiensis* tóxicos a *H. hampei*, que expressem um conteúdo gênico diversificado, no qual

mais de um gene possa ser tóxico a praga, é de grande importância para o manejo de resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas.

Essa diversidade de genes, como foi observada na maioria dos isolados mais tóxicos estudados, poderá permitir o uso de genes combinados, com a expressão de mais de um gene na mesma planta e, cuja ligação ocorre em diferentes receptores (VAN RIE, 1999), dessa forma, reduzirá a probabilidade de um inseto ser simultaneamente resistente a mais de uma toxina (DEGRANDE; FERNANDES, 2006).

Mais de 47 toxinas Cry já foram testadas contra diferentes espécies da ordem coleóptera. As famílias mais testadas foram Chrysomelidae (62,6%), Scarabeidae (17,1%), Tenebrionidae (8,6%), Curculionidae (5,3%) e Cerambicidae (3,2%) (VAN FRANKENHUYZEN, 2009). Dessa forma, várias toxinas foram descritas como tóxicas a coleópteros como Cry1Ba para *Leptinotarsa decemlineata, Crysomela scripta* e *A. grandis* (FEDERICI; BAUER, 1998; MARTINS et al., 2008; NAIMOV, et al., 2001; ZHONG et al., 2000). Cry1Ia para *L.decemlineata* e *A. grandis* (MARTINS et al., 2008, NAIMOV, et al., 2001; RUIZ DE ESCUDERO et al., 2006), Cry3A para *C.scripta* e *H. hampei* (JAMES; CROFT; STRAUSS, 1999; LÓPEZ-PAZOS; CORTAZAR; CERÓN, 2009) Cry14Aa para *Diabrotica* (PAYNE; NARVA, 1994); Cry22Aa para *A. grandis* (ISAAC et al., 2001) Cry22Ab para *L.decemlineata* e *Diabrotica* (METTUS; BAUM, 2000), Cry55aa para Phyllotreta spp (GUO et al., 2008) e Cyt2 para *Diaprepes abbreviattus* (WEATHERSBEE; LAPOINT; SHATTERS, 2006).

A proteína Cry3, que é conhecida por sua atividade biológica contra Coleopteros (VAN FRANKENHUYZEN, 2009), também já foi relatada como tóxica a *H.* hampei (LÓPEZ-PAZOS; CORTAZAR; CERÓN, 2009), e identificada em linhagens de *B. thuringiensis* isoladas em plantações de café na Costa Rica (ARRIETA; HERNÁNDEZ; ESPINOZA, 2004). O isolado BR67 foi o único que obteve produto de amplificação apenas para o gene *cry3*, porém não se diferenciou estatisticamente quanto aos valores de CL_{50} da linhagem padrão IPS-82 e dos demais isolados pertencentes ao grupo de maior toxicidade. Além disso, apresentou em seu perfil proteico uma única banda entre 65/70 kDa, que corresponde ao gene *cry3*.

Algumas proteínas tóxicas a coleópteros, quando testadas em laboratório, são ativas somente após a prévia solubilização *in vitro*. Possivelmente isso ocorre devido ao pH intestinal dos coleópteros, que varia de neutro a fracamente ácido, e é incapaz de solubilizar as protoxinas (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). Esse fato também poderia ocorrer com *H. hampei*, cujo pH é entre 4.5 e 5.2 (VALENCIA et al., 2000), porém López-Pazos;

Cortazar; Cerón (2009) não observaram essa diferença, sendo que tanto as protoxinas quanto as toxinas Cry3Aa e Cry1Ba foram tóxicas as larvas de *H. hampei*, já os cristais solubilizados, não causaram mortalidade.

Essa diferença em relação a outros coleópteros se deve a características fisiológicas específicas encontradas no intestino médio das larvas de *H. hampei,* como por exemplo, proteases digestivas e o comportamento reprodutivo incomum apresentado pelo inseto, como endogamia, haplodiploidia funcional e baixa variabilidade genética, o que proporciona a ele características biológicas particulares como o aumento na proporção de alelos de resistência a inseticidas, e possivelmente suscetibilidade a proteína Cry3 sem a previa solubilização dos cristais (BENAVIDES, 2005).

O gene *cry10* teve sua atividade primeiramente descrita para dípteros (THORNE et al., 1986). Subsequentemente, a proteína Cry10 foi relatada no controle de lepidópteros (VASSAL et al., 1993), e de coleópteros como *H. hampei* (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003) e *A. grandis* (AGUIAR, 2007). O gene *cry10Aa* é um operon pois inclui duas ORFs (ORF1 e ORF2, respectivamente), separadas por uma sequência não traduzida de 48 pb. A ORF1 contém a sequência completa da δ-endotoxina. A ORF2 apresenta alta identidade à sequência da metade C-terminal das proteínas do tipo Cry4, com capacidade para codificar uma proteína de 56 kDa. Assim, acredita-se que um possível gene ancestral a *cry10Aa,* seria similar em tamanho aos genes tipo *cry4*. Entretanto, uma pequena sequência pode ter sido inserida no gene, ou mutações produziram códons de terminação nesta região (HERNÁNDEZ-SOTO et al., 2009).

Através de análises microscópicas, a morfologia dos cristais de um isolado pode fornecer informações sobre sua atividade inseticida (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993; SAADOUN et al., 2001; TAILOR et al., 1992). Todos os isolados selecionados para *H. hampei* apresentaram a mesma morfologia, com cristais esféricos, que normalmente identificam isolados tóxicos a dípteros (ROH et al., 2007).

Dos isolados mais tóxicos estudados no presente trabalho, quatro não diferiram estatisticamente do Padrão IPS82 quanto a CL_{50}. Entre esses, os isolados BR58 e BR137 possuem alto potencial para o controle de *H. hampei*, pois apesar de não diferir estatisticamente, obtiveram valores de CL_{50} menores que o da linhagem padrão.

Resultados semelhantes foram observados por Ibarra et al. (2003), que identificaram novos isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica a *A. aegypti*, sendo que dentre eles, quatro foram superiores ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, mesmo apresentando perfil proteico similar. Exceção foi verificada para um isolado que também

apresentou toxicidade maior que a linhagem padrão, entretanto, os autores citaram a presença de quatro proteínas diferentes (Cry11, Cyt1, Cyt2 e Cry30), as quais também possuem atividade tóxica para dípteros.

Esse fato revela a necessidade de bioensaiar os isolados contra os insetos, pois mesmo apresentando o mesmo conteúdo gênico, eles podem causar níveis de toxicidade diferentes, ou ainda o isolado pode conter genes que não haviam sido identificados por PCR e que seriam o fator determinante para a toxicidade a praga.

Além dos genes *cry* e *cyt*, existem outros fatores de virulência presentes em isolados de *B. thuringiensis* que podem contribuir com a toxicidade da bactéria (VILAS-BÔAS et al., 2012). Adicionalmente, podem ocorrer interações sinergísticas entre as toxinas *cry*, ou mesmo, entre essas e os esporos, e devido à variação na toxicidade de cada proteína, é difícil estabelecer uma contribuição individual para o efeito tóxico do isolado (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; VISSER et al., 1990). Essas interações também podem ser a explicação aos diferentes níveis de toxicidade obtidos pelos isolados testados, que mesmo apresentando conjunto gênico semelhante, apresentaram diferentes CL_{50} para *H. hampei.*

O presente estudo obteve importantes resultados e confirmou a toxicidade de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a *H. hampei*, que já havia sido reportada anteriormente (MÉNDEZ-LÓPEZ; BASURTO-RÍOS; IBARRA, 2003). Adicionalmente foram selecionados 10 isolados nativos de *B. thuringiensis* tóxicos a praga, e com o conteúdo gênico semelhante ao da linhagem padrão IPS82. Entre esses, o isolado BR58 que obteve o menor valor de CL_{50} para *H. hampei,* teve o seu genoma totalmente sequenciado, permitindo a busca de todos os genes *cry* existentes tanto em cromossomos como em plasmídios, o que não seria possível com outras técnicas, como PCR.

A técnica de PCR, por ser simples e acessível, é um dos métodos mais utilizados para identificação de genes *cry* (PALMA et al., 2014), porém é uma técnica limitada e não permite identificar todo o conteúdo gênico pertencente ao isolado. Recentemente, com a utilização de sequenciadores de nova geração, existe a possibilidade de sequenciar totalmente o genoma dos microrganismos e identificar todos os genes *cry* contidos no genoma de *B. thuringiensis* sem a dependência de iniciadores específicos. Essa tecnologia gera um grande volume de dados a baixo custo por base, pois, em um só ciclo de sequenciamento estas plataformas são capazes de produzir bilhões de nucleotídeos, resultando na diminuição do custo de sequenciamento ao longo dos anos e segurança na obtenção dos dados (METZKER, 2010).

A análise e sequenciamento total do genoma dos isolados como ocorreu com o isolado BR58, diferentemente da técnica de PCR, permite ao pesquisador identificar todo o conteúdo de genes *cry* que possivelmente são responsáveis pela toxicidade à praga, inclusive genes *cry* que até então não haviam sido descritos. Essa técnica de sequenciamento completo do genoma proporciona o conhecimento aprofundado sobre o isolado selecionado, e assim permite a manipulação dos genes de interesse por meio da clonagem de cada um isoladamente ou da construção de linhagens recombinantes. Dessa forma, é possível avaliar a atuação individual e conjunta dos genes, sinergismo, antagonismo e demais fatores de virulência contidos em cada isolado por meio de novos bioensaios.

O sequenciamento completo do BR58, que ocorreu em um sequenciador de nova geração, permitiu conhecer com total segurança todos os genes *cry* pertencentes a esse isolado de forma mais rápida e econômica em relação às técnicas de sequenciamento mais antigas e a técnica de PCR. Isso se deve a tecnologia dos sequenciadores de nova geração que permite localizar os genes *cry* pertencentes a um isolado em menor tempo, principalmente quando se trata de genes desconhecidos que não possuem iniciadores específicos para a amplificação por PCR.

Com isso, foi confirmada a presença dos genes já identificados por PCR e ainda foram localizados mais dois genes desconhecidos para esse isolado, *cry30* e *cry60*. Além disso, após a comparação pelo software MEGA 5.1 da sequência consenso com as sequências dos genes *cry* depositadas no banco de dados, foi possível obter as subclasses de todos os genes localizados no isolado.

O sequenciamento do DNA total do isolado BR58, que foi realizado na plataforma Ion Torrent gerou um arquivo bruto que, após o processamento de qualidade com a retirada de sequências curtas e de baixa qualidade, resultou em 2.239.376 *reads,* ou seja, um número ainda elevado, com apenas 73.422 *reads* a menos que o arquivo bruto, indicando que o sequenciamento obteve alta qualidade.

A cobertura total do genoma da bactéria foi em média de 35 vezes, número que também mostrou confiança nos resultados obtidos, visto que outros autores, ao realizarem o sequenciamento total do genoma de *B. thuringiensis*, encontraram resultados semelhantes. He et al. (2010), ao sequenciar a linhagem de *B. thuringiensis* BMB-171, obteve 448.963 *reads* provendo 32 vezes a cobertura do genoma. Doggett et al. (2013), ao sequenciar a linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-789*,* obteve 49.827.921 que forneceu a cobertura em 26,9 vezes do genoma total da linhagem.

A análise do alinhamento em BLAST-n das sequências consenso com os

genes depositados no banco de dados, revelou que os genes *cry* identificados no isolado BR58 (*cry4Aa1, cry4Ba1 cry10Aa3, cry11Aa1, cry30Aa1, cry60Aa2* e *cyt1Aa,*) exibiram alta cobertura e identidade (acima de 80 e 99%, respectivamente) com as sequências de genes *cry* junto ao banco de dados NCBI, e todos obtiveram e-value igual a zero, o que indica que o alinhamento é real, pois quanto menor o e-value, menores são as chances do alinhamento ter sido obtido ao acaso (AMARAL; REIS; SILVA, 2007).

A sequência do gene *cry4Aa1,* já citada por Ward; Ellar (1986) (número de acesso CAA68485) apresentou 99% de cobertura e identidade com 11 sequências depositadas no GenBank sob números de acessos diferentes (números de acesso: CP003766.1, JQ228565.1, AL731825.1, D00248.1, Y00423.1, EF208904.1, EF424470.1, EF424468.1, EF424472.1, EF424469.1, EF424471.1). O maior alinhamento foi com as sequências do gene *cry4Aa3* do plasmídio pBTHD789-3 da linhagem de *B. thuringiensis* HD-789 (número de acesso CP003766.1) descrita por Doggett et al. (2013) e *cry4Aa* do plasmídio pBtoxis de *B. thuringiensis* subsp.*israelensis* (número de acesso AL731825.1) descrita por Berry et al. (2002), os quais demonstraram, comparando entre todas as sequências, o maior total score (11497), ou seja, a pontuação máxima do alinhamento local de uma sequência.

O plasmídio pBTHD789-3 da linhagem de *B. thuringiensis* HD-789 contém os genes *cry4Aa3*, dois genes *cry4Ba5*, *cry10Aa3, cry11Aa3, cry60Ba3* e *cry60Aa3*. Já o plasmídio pBtoxis de *B. thuringiensis* subsp.*israelensis* apresenta os genes *cry4Aa, cry4Ba, cry10Aa, cry11Aa, cyt1Aa,* e *cyt2Ba*. Dessa forma, observou-se que o isolado BR58 é semelhante a essas linhagens, pois possuem um conjunto gênio em comum, além do gene *cry4Aa1*.

O mapeamento para o gene *cry4Aa1* obteve o total de 2482 *reads* os quais apresentaram uma inversão das bases T e C na posição 3102 que foi confirmada pelo programa Artemis. Essa ferramenta permitiu a leitura dos pares de bases para o gene *cry4Aa1* mostrando que 50% dos *reads* apresentavam timina nessa posição e 50% dos *reads* continham citosina. Com isso, foi verificado que assim como o plasmídio pBTHD789-3 que possui dois genes *cry4Ba5*, o isolado BR58 também possui dois genes *cry4Aa1* (DOGGETT et al., 2013).

A sequência do gene *cry4Ba1* obteve 99% de cobertura e identidade com 14 sequências diferentes depositadas no GenBank (números de acesso CP003766.1, AY847707.1, AL731825.1, X07423.1, X07082.1, D00247.1, EF468625.1, AY729887.1, EF468626.1, EF468627.1, EF468628.1, EF468630.1, EF468629.1, M20242.1), e dentre essas, sete citações se referiram as linhagens como sendo da subespécie *israelensis* e tóxicas para dípteros.

Entre essas sequências com 99% de cobertura e identidade, os dois maiores valores de total score foram com as mesmas sequências já citadas para o gene *cry4Aa1,* ou seja, a do plasmídio pBTHD789-3 da linhagem de *B. thuringiensis* HD789, e a do plasmídio pBtoxis de *B. thuringiensis* subsp.*israelensis*.

Após o alinhamento no programa MEGA 5.1 da sequência consenso obtida para o gene *cry4Ba* e as demais sequências depositadas no NCBI para *cry4Ba* (*cry4Ba1, cry4Ba2, cry4Ba3, cry4Ba4, cry4Ba5*), não foi possível classificar o gene *cry4Ba* do isolado BR58 em um quarto nível, pois não houve diferença entre os aminoácidos das sequências depositadas no NCBI e a sequência consenso. O mesmo ocorreu para os genes *cry11Aa* e *cyt1Aa,* os quais permaneceram com a primeira classificação encontrada para cada gene, ou seja, *cry11Aa1* e *cyt1Aa1* respectivamente.

Para o gene *cry10Aa3*, já citado por Berry et al. (2002) (número de acesso CAD30098), o alinhamento em Blast-n apresentou 99% de cobertura e 100% de identidade apenas com a sequência do gene *cry10Aa3* dos plasmídios pBTHD789-3 da linhagem HD789 e pBtoxis. Já com 99% de cobertura e identidade foram apresentadas mais oito sequências diferentes (JQ228566.1, M12662.1, EU124367.1, EU124366.1, EU124369.1, EU124368.1, EU124370.1, EU124371.1).

A sequência do gene *cry11Aa1* apresentou 99% de cobertura e 100% de identidade com as sequências do gene *cry11Aa* do plasmídio pBTHD789-3, do plasmídio pBtoxis, da linhagem HD-567 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (número de acesso M31737.1) (DONOVAN; JESSOR; COSTA, 1988) e da linhagem BRC-LLP29 de *B.* thuringiensis subsp. *israelensis* (número de acesso JQ228567.1). Adicionalmente, quatro sequências obtiveram 99% de cobertura e 99% de identidade (EU124372.1, EU124373.1, EU124374.1, EU124375.1).

A sequência do gene *cry30Aa1*, já citada por Delecluse et al. (2000) (número de acesso CACA80986) (PEREZ et al., 2003) apresentou 80% de cobertura e 100% de identidade com a sequências do plasmídio pBtoxis e 80% de cobertura e 99% de identidade com a do plasmídio pBTHD789-3 da linhagem HD789. A sequência de gene *cry60Aa2* apresentou 99% de cobertura e 100% de identidade com a do plasmídio pBTHD789-3 da linhagem HD789, e diferente de todos os demais genes, apresentou 99% de cobertura e 99% de identidade com a sequência da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* 367 Cry (número de acesso GQ3985000.1) descrita por Sun et al. (2013), e que contém os genes *Cry11Ba, Cry19Aa, Cry24Aa, Cry25Aa, Cyt2Bb, Cry30Ca, Cry60Aa* e *Cry60Ba*.

O alinhamento global da sequência completa do gene *cry60A* do BR58 com sequências de outros genes *cry60Aa* depositadas no NCBI revelou uma mutação entre a sequência do gene *cry60Aa1 e cry60Aa* na posição 154, onde ocorreu uma transversão de A para C. Isso nos revela que o gene *cry60Aa* do isolado BR58 não pode ser classificado como *cry60Aa1,* mas pode ser tanto *cry60Aa2, cry60Aa3* quanto *cry60Aa4,* os quais não demonstraram diferenças entre suas sequências de aminoácidos.

O gene *cry30* codifica um polipeptídio de 77kDa, e já foi citado no controle de *Plutella xylostella* e *A. aegypti* (TAN et al., 2009). Esses autores também revelaram a possibilidade da proteína Cry30Fa1 ser ativa para o controle de uma vasta gama de insetos-praga, visto que foi comprovada sua toxicidade a duas ordens diferentes de insetos. Diante disso, podemos supor que o gene *cry30Aa1* também possa ser ativo contra coleópteros, e deve ser testado contra espécies dessa ordem.

A proteína Cry30 foi identificada por Sun et al. (2013) na linhagem *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* 367, a qual também apresentou a proteína Cry60. Esses genes, que ainda não haviam sido relatados nessa linhagem, foram identificados pelos autores por uma metodologia inédita (bloco de gel de poliacrilamida acoplado a cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem). De forma semelhante, no presente trabalho, foi utilizada uma metodologia não usual (sequenciamento do genoma completo da bactéria em busca de genes *cry*), que foi capaz de revelar a existência de genes (*cry30* e *cry60*) não identificados por PCR.

Assim, como as demais proteínas existentes no isolado BR58, as proteínas Cry30 e Cry60, também podem ser responsáveis pela toxicidade a *H. hampei*, e devem ser bioensaiadas isoladamente e em conjunto. Os resultados dos ensaios realizados por Sun et al. (2013) mostraram que as toxinas Cry30 e Cry60 contidas na linhagem *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*, que é altamente tóxica a *C. quinquefasciatus,* quando foram testadas isoladamente contra essa espécie, obtiveram apenas toxicidade moderada e nula, respectivamente. Os autores sugeriram que provavelmente outras toxinas como Cry11Ba, devem coexistir no corpo parasporal e serem responsáveis ou interagir para a alta toxicidade da linhagem contra *C. quinquefasciatus*.

Adicionalmente, em trabalho realizado por Ito et al. (2006), a proteína Cry30 não apresentou toxicidade para *Culex pipiens pallens*, *Anopheles stephensi* e *A.aegypti,* mas os autores sugeriram, que assim como ocorre sinergismo entre as proteínas Cry29Aa e Cry11Bb, a proteína Cry30 também pode atuar em sinergia com outras proteínas, aumentando a virulência do isolado.

O sequenciamento e descoberta de todos os genes *cry* presentes no isolado nos possibilitará a individualização de cada um desses genes para avaliá-los contra *H. hampei*. Outro fator que deve ser considerado na seleção de genes ativos contra *H. hampei* é a possibilidade de sinergismo e antagonismo que existe entre as proteínas Cry e interação com os demais fatores de virulência. Também deve ser objetivo de estudos os receptores proteicos no intestino dos insetos e o modo de ação de cada proteína, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência.

A possibilidade de inserir um ou mais genes na planta de café deve ser considerada e estudada futuramente a fim de complementar o presente trabalho. Com os resultados obtidos até o momento, ou seja, a análise completa do genoma do isolado mais tóxico a *H. hampei*, e a verificação de todos os genes *cry* e *cyt* presentes no isolado, é possível, futuramente, investigar a ação de cada gene, e as relações entre esses, atuando de forma a incrementar a toxicidade, ou até mesmo evitar casos de seleção de insetos resistentes. Além disso, os estudos de seleção de genes cry podem ser ampliados para outras importantes pragas do cafeeiro, como *L. coffeella*.

Os resultados positivos obtidos na prospecção de genes que codificam proteínas altamente tóxicas para o controle da broca do cafeeiro revelaram grandes perspectivas para pesquisas com os genes encontrados no isolado BR58. O estudo torna-se ainda mais promissor por BR58 ser um isolado pertencente ao banco de bactérias entomopatogênicas da UEL, que poderá ser manipulado e utilizado como fonte de genes para serem inseridos em plantas de café geneticamente modificadas para o controle de *H. hampei,* e até mesmo serem testados para o controle de outros insetos-praga que atacam a cultura.

7 CONCLUSÕES

Os genes *cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt1* e *cry3* de *B. thuringiensis* apresentam potencial de controle para *Hypothenemus hampei*, pois foram amplificados nos isolados mais virulentos.

O isolado BR58, que obteve menor $CL_{50,}$ apresenta, além dos genes amplificados por PCR, os gene *cry30* e *cry60,* que foram identificados por sequenciamento do DNA total do isolado. Além disso, foram identificadas as subclasses para os genes *cry4Aa1, cry4Ba1, cry10Aa3, cry11Aa1, cry30Aa1, cry60Aa2* e *cyt1Aa1*.

O isolado BR58 apresenta potencial para ser utilizado como fonte de genes no desenvolvimento de plantas de café geneticamente modificadas com expressão de proteínas tóxicas para o controle de *H. hampei*.

REFERÊNCIAS

AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em fev. 2015.

AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, E. S.; VALICENTE, F.H.; CARNEIRO, N. P.; BATISTA, A. C.; MELATTI, V. M., MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. A recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to Lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Current Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 287–293, 2006.

AGUIAR, R. W. S. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinants de *Bacillus thuringiensis,* utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto.** 2007. 130 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 9, p. 959-967, 2006.

AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. O programa *BLAST:* Guia prático de utilização. 24p. **Documentos**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, n. 224, 2007.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, v. 73, n. 1-2, p. 63–68, 1992.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). **Anvisa**, Brasília, 2010. 22p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%c3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: jan. 2014.

ARRIETA, G.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOZA, A. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista de Biología Tropical**, v. 52, n. 3, p.757-764, set. 2004.

BARBOSA, A. E. A. D. **Transformação Genética de *Coffea arábica* para a resistência a broca-do-café**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasilia, Brasília – DF, 2009.

BARRERA, J.; VILLACORTA, J. H.; HEBER, G.; CRUZ, L. Aplicación de trampas para el monitoreo de la broca del café. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, 2007, Londrina. **Proceedings**... Londrina: IAPAR, 2007.p. 95- 112.

BECKER, V.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis,* an environmental biopesticide: theory and** practice. Londres: John Wiley & Sons Ltd., 1993. p. 147-169.

BELTRÃO, H. B. M; SILVA-FILHA, M. H. N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. i*sraelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 163-169, 2007.

BENASSI, V. L. R. M. Investigations on the coffee berry borer in Espírito Santo, Brazil. In: BARRERA, J. F.; GUERRA, A. A.; MENN, J. J.; BAKER, P. S. **Intercontinental Conf. Coffee Berry Borer**. 2ed. Tapachulas, México, 1998. 58 p.

BENASSI, V. L. R. M. Aspectos biológicos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (F.1867) (Coleoptera: Scolytidae), em frutos de açaí, *Euterpe oleraceae*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de caldas, MG. **Resumos expandidos...** Brasília: Embrapa Café:MINASPLAN, 2000. v. 2, p. 1178-1180.

BENAVIDES, P. Aspectos genéticos de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. In: XXXII Congreso de La Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen), 2005, Ibague- Colombia. **Memorias...** Ibague- Colombia: SOCOLEM, 2005, p. 23–26.

BENAVIDES, P; GÓNGORA, C; BUSTILLO, A. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of Beauveria bassiana, to overcome insecticide resistance in Colombia. In: PERVEEN, F . 2012. **Insecticides – Advances in Integrated Pest Management.** 1º ed. Rijeka, Croacia: InTech, 2012. p. 511-540.

BERNAL, M. G., A. E. BUSTILLO, Y F. J. POSADA. Virulencia de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y su eficacia en campo sobre *Hypothenemus hampei*. **Revista Colombiana de Entomología,** v. 20, n.1, p. 225-228, 1994.

BERRY C.; O'NEIL S.; BEN-DOV, E.; JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M.A.; HOLDEN, M.T.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied Environmental Microbiology** v. 68, n. 10, p.5082– 5095, 2002.

BETTIOL W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Hemel Hempstead, v.22, n.6, p.280-283, 2011.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; HECK, D. W. **Controle Biológico no Brasil: situação, desafios e oportunidades. Embrapa meio ambiente** – Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). 2013. Disponível em: HTTP://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/983252 Acesso em: mai. 2014.

BOBROWSKI V.L.; FIUZA, L. M. ; PASQUALI, G. ; ZANETTINI, M. H. B.. Genes de *Bacillus thuringiensis:* uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural,** v. 33, n. 5, p. 1-9 , 2003.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BRASIL. Portaria nº711, de 17 de Julho de 2014. **Diário oficial da União**, n°136, Brasília – DF, 18 de Julho de 2014. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/07/2014&jornal=1&pagina=6&totalArquivos=124> Acesso em 24 Jan. 2014.

BRAVO, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. **Journal of Bacteriology,** v. 179, n.9, p. 2793–2801, 1997.

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.

BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F. J., PEÑA, G., NUÑEZ-VALDEZ, M. E., SOBERÓN, M., QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n.12, p.4965 – 4972, 1998.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins?. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n.10, p.573 – 579, 2008.

BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING, D. M. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**, v. 82, n. 5, p. 1311-1316, 1989.

BURBANO, E; WRIGHT, M; BRIGHTt, D.E.; VEGA, F.E. New record for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Hawaii. **Journal of Insect Science**, v.11. n.117, p. 1-3, 2010.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. **Biotecnologia e meio ambiente.** Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

CÁRDENAS, S. I. **Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (Coffea arabica L. del CATIE)**. 2007. 117p. Tesis (Mestrado em Agricultura Ecológica) – CATIE, Turrialba, Costa Rica, CATIE. Disponível em: http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A1655E/A1655E.PDF. Acesso em 11 jun. 2014

CASCO-GÓMEZ, K. V. **Potencial de pérdidas económicas debido a *Hypothenemus hampei,* en Pahala Hawaii y costo/beneficio de usar *Beauveria bassiana* en café.** 2012. Tese (Licenciatura Administração e Agronegocios) - Escuela Agrícola Panamericana ,Francisco Morazán, Honduras,2012.

CASTILLO, A.; INFANTE, F.; BARRERA, J. F.; CARTA, L.; VEGA, F. E. First field report of a nematode (Tylenchida: Sphaerularioidea) attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n.3, p. 199–202, 2002.

CÉRON, J., ORTÍZ, A., QUINTERO, R., GÜERECA, L. and BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cry*1 and *cry3* genes within a *Bacillus thuringiensis* strains collection. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 11, p.3826 – 3831, 1995.

CHEN, C.D.; H.L. LEE; W.A. NAZNI; B. SELEENA; K.W. LAU; A.R. DALIZA; S.E. SYAFINAS & A.M. SOFIAN. 2009. Field effectiveness of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) in ornamental ceramic containers with common aquatic plants. **Tropical Biomedicine**, v. 26, n. 1, p. 100-105.

CHI, T.Q; TUAN, N.D.A; LAN, N.N. **Coffee yearbook in 2008 & Outlook for 2009**. Ministry of Agriculture and Rural Development. Institute of Policy and Strategy for Agriculture and Rural Development, Vietnam. 2009, 20 p.

CHOI, Y. J.; KIM, E. J.; PIAO, Z.; YUN, Y. C.; SHIN, Y. C. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. p. 4522–4531, 2004.

COELHO, M. J. H. **Café do Brasil: o sabor amargo da crise**. Florianópolis: Osfam, 2002. 58 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira café**. Safra 2014. Primeiro levantamento, Janeiro, 2014. v. 1, n. 1 (2014) Brasília: Conab, 2014. 18p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_52_41_boletim_cafe_2a_estimativa_ safra_2012.pdf>. Acesso em: jan. 2015.

CONSTANTINO, L. M.; NAVARRO, L.; BERRIO, A.; ACEVEDO, F. E.; RUBIO, D.; BENAVIDES, P. Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 37, n. 2, p. 173-182, 2011.

COHEN, S.; DYM, O.; ALBECK, S.; BEN-DOV, E.; CAHAN, R.; FIRER, M.; ZARITSKY, A.; High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 380, n. 4, p. 820-827, 2008.

CRICKMORE, N. Beyond the spore: past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide**. Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 616-619, 2006.

CRICKMORE, N.; EILEEN, J. B.; JULIET, A. W.; DAVID, J.E. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. **FEMS Microbiology Letters,** v. 131, n. 3, p. 249–254, 1995.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M; ZEIGLER, D. R. ***Bacilus thuringiensis* toxin nomenclature.** 2015. Disponível em: < http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 02 Jan. 2015.

CRUZ, A. R. R.; PAIXÃO, A. L. D. MACHADO, F. R. Obtenção de plantas transformadas de Coffea canephora por co-cultivo de calos embriogênicos com A. tumefaciens, vol. 73 of **Boletim de pesquisa e Desenvolvimento,** Embrapa, Brasília, Brasil, 2004.

CURE, J. R.; SANTOS, R. H. S.; MORAES, J. C.; VILELA, E. F.; GUTIERREZ, A. P. Fenologia e dinâmica populacional da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) relacionadas às fases de desenvolvimento do fruto. **Anais da Sociedade Entomológica do**

Brasil, v. 27, n. 3, p. 325- 335, 1998.

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.4, p.485-510, 2007. DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 6, p. 453-465, 2000.

DEGRANDE, P. E; FERNANDES, M. G. O Brasil com Bt. In: **Cultivar Grandes Culturas120,** Pelotas, RS: Cultivar, v. 8, n. 87, p. 16-21, 2006.

DÉLÉCLUSE, A.; CHARLES, J.F.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Deletion by i*n vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp.i*sraelensis* is not essential for mosquitocidal activity. **Journal of Microbiology,**,v. 173, n.1, p. 3374-3381, 1991.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied and Environmental Microbiology,**. v. 61, n.12, p. 4230-4235, 1995.

DE GUGLIELMO-CRÓQUER, Z.; ALTOSAAR, I.; ZAIDI, M.; MENÉDEZ-YUFFÁ, A. Transformation of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) with the *cry1ac* gene by biolistic, without the use of markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 387-393, 2010.

DE LA ROSA, W.; FIGUEROA, M.; IBARRA, J. E. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Vedalia,** v. 12, n.1, p. 3-9, 2005.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences,** v. 4, n. 1, p.9-13, 1999.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n.4, p. 193-199, 2001.

DOGGETT, N.A.; STUBBEN, C.J.; CHERTKOV, O.; BRUCE, D.C.; DETTER, C.; JOHNSON, S.L.; HANB, C.S. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Serovar Israelensis Strain HD-789. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, p. 102-103, 2013.

DONOVAN, J.E.; JESSOR, R.; COSTA, F. M. Syndrome of problem behavior in adolescence: A replication. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 56, n.3, p. 762–765, 1988.

DUFOUR, B. P. Condiciones de uso de las trampas en El control de la broca del café. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE O MANEJO DA BROCA-DO CAFÉ. 2004, Londrina. **Resumos**.... Londrina: UEL, 2004.

DUFOUR, B.P.; FRÉROT, B. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col., Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. **Journal of Applied Entomology,** v. 132, n. 7, p. 591-600, 2008.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 2, p. 232-239, 1970.

EMBRAPA. **Cultivo do café Robusta em Rondônia**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CultivodoCafeRobustaRO/index.htm> Acesso em: 4 jun. 2013.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.; MULLINS, M.; NYE, G.; CRAIG, J.; KOZIEL, M. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite States of America**, v. 93, n.11, p. 5389-5394, 1996.

FEDERICI, B.; BAUER, L. S. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 11, p. 4368–4371, 1998.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In **Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**. Montpellier, France, 1994. 184p.

FERNÁNDEZ, S.; CORDERO, J. Biologia de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) em condiciones de laboratório. **Bioagro**, v. 19, n. 1, p. 35-40, 2007.

FETTING, C. J.;HAYES, C. J.; MCKELVEY, S. R.; MORI, S. R. Laboratory assays of select candidate insecticides for control of *Dendroctonus ponderosae*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 548-555, 2011.

FILHO, O. G.; MAZZAFERA, P. Caffeine and Resistance of Coffee to the Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Agriculture Food Chemistry.** v. 51, n. 4 p. 6987-6991, nov. 2003.

FINNEY, D. J. **Probit analysis.** 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FLEISHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science,** n. 269, n. 5223, p. 496-512, 1995.

GALLO, D.; KANANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GALPERIN, M. Y., KOONIN, E. V. From complete genome sequence to 'complete' understanding? **Trends Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 398–406, 2010. GARDUNO, F.; THORNE, L.; WALFIEL, A. M.; POLLOCK, T. J. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology** v.54, n.1, p. 277–279, 1988.

GATEHOUSE, A. M. R., HILDER, V. A.; POWELL, K. S.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J. A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: MENKEN, S. B. J.; VISSER, J. H.; HARREWIJIN, P. **Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships.** v.49. Dordrecht: Amsterdam Kluwer Academic, 1992. p. 221-233.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistence in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1095-1101, 1997.

GILL, S. S.; SINGH, G. J.; HORNUNG, J. M. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* cytolytic toxins. **Infection Immunity**, v. 55, n. 5:1300–1308, 1987.

GINGERICH, D. P.; BORSA, P.; SUCKLING, D. M.; BRUN, L. O. Inbreeding in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) estimated from endosulfan resistance phenotype frequences. **Bulltetin of Entomological Research,** v. 86, n. 6, p. 667-674, dez. 1996.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 368p.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens.* **Mosquito News**. v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

GÓMEZ, I.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**. v. 513, n.2, p. 242–246, 2002.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C.P. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 63, n. 7, p. 2716–2721, 1997.

GUERREIRO, O., DENOLF, P., PEFEROEN, M., DECAZY, B., ESKES, A.; FRUTOS, R. Susceptibility of the Coffee Leaf Miner (*Perileucoptera* spp) to *B. thuringiensis* δ-endotoxins: a model for transgenic perennial crops resistant to endocarpic insects. **Current Microbiology,** v. 36, n. 3, p. 175-179, 1998.

GUO, S.; LIU, M.; PENG, D.; JI, S.; WANG, P.; YU, Z.; SUN, M. New strategy for isolating novel nematicidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT – 1518. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 6997 – 7001, 2008

GUTIERREZ, A. P.; VILLACORTA, A.; CURE, J. R.; ELLIS, C.K. Tritrophic analysis of the coffee (*Coffea arabica*) – Coffee berry borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] – Parasitoid system. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil,** v. 27, n. 3, p. 357-385, 1998.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysys. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n.1, p. 185 – 189, 2001.

HATANAKA, T.; CHOI, YE.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 106-110, 1999.

HE, J.; SHAO, X.; ZHENG, H.; LI, M.; WANG, J.; ZHANG, Q.; LI, L. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Mutant Strain BMB171. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 15, p. 4074–4075, 2010.

HE, J.; WANG, J.; YIN, W.; SHAO, X.;ZHENG, H.; LI, M.; ZHAO, Y.; SUN, M.;

WANG, S.; YU, Z. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* Strain CT43. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3407–3408, 2011.

HEINRICH, W. O. Aspectos do combate biológico à broca do café. **O Biológico**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 57-62, 1965.

HEMPEL, A. A *Prorops nasuta* Waterson no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 5, n.2, p.197-212, 1934.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NAVARRO-CERRILLO, G.; CACCIA, S.; MAAGD, R. A.; MOAR, W. J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S.; Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS ONE,** v. 5, n. 9, 2010.

HERNÁNDEZ-SOTO, A. **Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari).** 2002. 69p. Tesis (Bach. Ing. Biotecnología). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2002.

HERNÁNDEZ-SOTO, A.; DEL- RINCÓN-CASTRO, M.C.; ESPINOZA, A.M.; IBARRA, J.E. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. **Applied Environmental Microbiology**. v. 75,n.14, p. 4661–4667, 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 53, n. 2, p. 242 – 255, 1989.

HOSSAIN, F.; PRAY, C. E.; LU, Y.; HUANG, J.; FAN, C.; HU, R. Genetically modified cotton and farmer's health in China. International Journal of Occupational and Environmental Health, v. 10, n.3, p. 293-303, 2004.

IBARRA, J. E.; RINCÓN, M. C. D.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, l.; OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 9, p. 5269 – 5274, set. 2003.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics> . Acesso em: 10 mai. 2014.

ISAAC, B.C.; KRIEGER, E.K.; METTUS, L.A.; SIVASUPRAMANIAM, S. FARHAD, M. Polypeptide Compositions Toxic to *Anthonomus* Insects, and Methods of Use. WIPO **Patent WO 0187940**, 2001.

ITO, T.; IKEYA, T.; SAHARA, K.; BANDO, H.; ASANO, S. Cloning and expression of two crystal protein genes, cry30Ba1 and cry44Aa1, obtained from a highly mosquitocidal strain,

Bacillus thuringiensis subsp. *entomocidus* INA288. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n.8, p. 5673–5676, 2006.

JAMES, R.R.; CROFT, B.A.; STRAUSS, S.H. Susceptibility of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Crysomelidae) to Different Strains and Transgenic Toxins of *Bacillus thuringiensis* . **Environment Entomology**, v. 28, n.1, p.108-115, 1999.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ-endotoxins. **Advances in Insect Physiology.** V. 24, p. 275-308, 1994.

KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thutingiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**: 96, n. 1-5, p. 500-508, jan.-dez. 1983.

KRONSTAD, J. W.; SCHNEPF H. E.; WHITELEY, H. R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n.1, p. 419-428, 1981.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, K.; SARALA, S.; INDU, E.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy root phenotype. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 214-222, 2006.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapes-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** v. 227, n. 5259, p. 680 – 685, ago.1970.

LARA, J. C.; LÓPEZ, J. C.; BUSTILLO, A. E. Efecto de entomonematodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 30, n. 2, p. 179-185, 2004.

LE PELLEY, R. H. **Pests of coffee**. London: Longmans Green and Company Ltd, 1968, 590p.

LEÃO, E. A.; DE PAULA, N. M. A produção de cafés especiais no Brasil e a emergência de novos padrões de competitividade. In: ENCONTRO REGIONAL DE ECONOMIA, 13, 2010, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: ANPEC, 2010. p. 1-18.

LECADET, M. M.; CHAUFAUX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 58, n.3, p. 840-849, 1992.

LENG, P.; ZHIMING, Z.; GUANGTANG, P.; MAOJUN, Z. Applications and development trends in biopesticides. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19864-19873, 2011.

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.J.; CHIU, S.S.; CURRIER, S.; GONZALESZ JR, J.M. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid-chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, 1990.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BEILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis,* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice.** West Sussex, England: John Wioley & Sons Ltda., 1993. p.37 – 69.

LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADET. M.M., KLIER, A., RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal dendotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: ISSAR SMITH, R., SLEPECKY, A., SETLOW, P. **Regulation of prokaryotic development.** Washington: American Society for Microbiology, 1989. p. 71-88.

LEROY, T.; HENRY, A.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R.; PHILLIPE, R. Genetically modified coffee plants expressing the *B. thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 4, p. 382-389, 2000.

LESK, A. M. **Introduction to Bioinformatics.** New York, USA: Oxford University Press, 2002, 255p.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24719-24724, 1995.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. **Bioinformatics**, 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5A resolution. **Nature**, v. 353, n. 63447, p. 815-821, 1991.

LI, L.; ZHU, Y.; JIN, S.; ZHANG, X. Pyramiding *Bt* genes for increasing resistance of cotton to two major *lepidopteran* pests: *Spodoptera litura* and *Heliothis armigera.* **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 36, n. 10, p. 2717-2727, 2014.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24719-24724, 1995.

LÓPEZ, J. C.; GÓNGORA, C. E.; PLICHTA, K.; STOCK, P. PLICHTA K. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) from Colombia. **Holanda Nematology**, v. 10, n. 4, p. 561-574, 2008.

LÓPEZ-PAZOS, S. A.; ARIAS, A. C. R.; OSPINA, S. A.; CERON, J. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein agaist lepidopteran and coleopteran pest. **Microbiology Letters,** v. 302, n. 2, p. 93-98, 2010.

LÓPEZ-PAZOS, S. A.; CORTAZAR, J. E.; CERON, J.A. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 3, p. 242–245, 2009.

LÖVEGREN A.; ZHANG M. Y.; ENGSTRÖM A.; DALHAMMAR G.; LANDÉN R. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v.4, n.12, p. 2137-2146, 1990.

MSNCEVS, S. D.; PUSZTAI-CAREY, M.; RUSSO, P. S.; BUTKO, P. A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biochemistry**, v. 44, n. 2, 589–597, 2005.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCA, R.; GOMES, A.C.M.M RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant *Cry1Ia* protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1363–1371, 2008.

MATHIEU, F.; BRUN, L. O.; FRÉROT, B.; SUCKLING, D. M.; FRAMPTON, C. Progression in field infestation is linked with trapping of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Col., Scotytidae). **Journal of Applied Entomology**, v.123, n.9, p.535-540, 1999.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura de café no Brasil novo manual de recomendações.** Rio de Janeiro e Varginha: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p

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

MENDONÇA, P. C. **Caracterização e sequenciamento dos plasmídeos pMC1 e pMC2 de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* isolado T01 328**. 2002. 53p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2002.

METTUS, A.L.; BAUM, J.A. Polypeptide Compositions Toxic to (Diabrotica) Insects obtained from *Bacillus thuringiensis*; CryET70, and Methods to Use. **WIPO Patent WO 026378**, 2000.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, n.1, p.31-46, 2010.

MISHRA, P. K. S.; MISHRA, G.; SELVAKUMAR, S. C.; BISHT, S.; KUNDU, J. K.; BISHT, a.; GUPTA, H. S. Characterization of a psychrotrophic plant growth promoting Pseudomonas PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1-8, 2008.

MOAR, W.J.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; TRUMBLE, J.T. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12.**Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.8, p.2480-2483, 1990.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo I. S.; Azevedo J. L. **Controle Biológico**, v. 3. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000. p.163-200.

MONNERAT, R. G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; BERRY, C. 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.

MOREIRA, C. F. Café Orgânico: Certificação, panorama da produção e mercado. In: SIMPÓSIO DE CERTIFICAÇÃO DE CAFÉS SUSTENTÁVEIS, 1., 2008, Poços de Caldas. **Palestras....** Campinas: IAC, 2008.

MURPHY, S. T.; MOORE, D. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), previous programmer and possibilities for the future**. Biocontrol News and Information** v. 11, n. 2, p. 107-117, 1990.

NAIMOV, S.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; DUKIANDJIEV, S.; De MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Applied Environmental Microbiology** v.67, n. 11, p.5328–5330, 2001.

NAVARRO, L.; GONGORA, C. E.; BENAVIDES, P. Single nucleotide polymorphism detection at the *Hypothenemus hampei* Rdl gene by allele-specific PCR amplification with Tm-shift primers. **Pesticide Biochemstry and Physiology**. v. 97, n. 3, p. 204-208, 2010.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology** v. 34, n. 1, p. 77-82, 2005.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; MORIMOTO, M.; SANO, H. Application of RNAi to verify theobromine as the foremost intermediate for coffee biosynthesis in caffeine factories with certainly likely for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology,** v. 54, n. 6, p. 931-941, 2004.

OKUMURA, A. S.; NEVES, P. M. O. J.; PASSAGNOLO, A. F.; CHOCOROSQUI, V. R. C.; H . Controle de *Hypothenemus hampei* (FERRARI) em Terreiros de Secagem de Café. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n.2, p. 277-282, 2003.

PAYNE, J.; NARVA, K. Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079, 1994.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. Draft Genome Sequences of Two *Bacillus thuringiensis* Strains and Characterization of a Putative 41.9-kDa Insecticidal Toxin. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1490-1504, 2014.

PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; MOMEN, B.; WANG, C.; St. LEGER, R. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 99, n.2, p. 220-226, 2008.

PEDINI, S. A. A produção de café orgânico. In: WORKSHOP SISTEMAS AGROFLORESTAIS PARA O CULTIVO DO CAFÉ, 1., 2000, Machado. **Anais…** Machado: EMBRAPA Café, 2000. p. 11-12.

PEIXOTO, B. M. **Classificação de sequências e análise de diversidade em metagenômica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PENG, G.; PENG, A.; XIAOJUAN, D.; JING, Z.; LIZHI, X.; JUN, Z.; QIAO, L.; QIMING D.; SHUANGCHENG, L.; SHIQUAN, W.; HUANNIAN, L.; LINGXIA, W.; PING, L.;

AIPING, Z. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Serovar Sichuansis Strain MC28. **Jounal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6975, 2012.

PEREIRA, R. A. An α-amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry,** v. 67, n. 18, p. 2009–2016, 2006.

PEREIRA, R. A.; VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; MAGALHAES, C.P.; PRATES, M. V.; MELO, J. A.T.; LIMA, L. M.; SALES, L. P.; NAKASU, E. Y. T.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Effect of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* gut proteinases *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10714-10719, 2007.

PEREZ, C.; MUNOZ-GARAY, C.; PORTUGAL, L. C.; SANCHEZ, J.; GILL, S. S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2931-2937, 2007.

PEREZ, J. V.; PORCAR, M.; ORDUZ, S.; DELÉCLUSE, A. Cry29A and Cry30A: Two Novel δ-endotoxins Isolated from *Bacillus thuringiensis* serovar *Medellin.* **Systematic and applied microbiology,** v. 26, n.4, p. 502-504, 2003.

PERTHUIS, B., PRADON, J., MONTAGNON, C., DUFOUR, M.; LEROY, T. Stable resistance against the leaf miner *Leucoptera coffeella* expressed by genetically transformed *Coffea canephora* in a pluriannual field experiment in French Guiana. **Euphytica,** v. 144, n. 3, p, 321-329, 2005.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular biology**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith**). 2004. 144 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2004.POP, M.; SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. **Trends in Genetics**. v. 24, n. 3, p. 142-149, 2008.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interaction among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components *of B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 66, n. 2, p. 131-135, 1995.

PRAÇA, L. B.; RAMOS, F. R.; RAMOS, F. R.; WAGNER, F. O.; SOARES, C. M. S.; SUJII, E.; MONNERAT, R. G. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. **Universitas**. Ciências da Saúde (UNICEUB. Impresso), Brasília, v. 8, n.1, p. 17-31, 2010.

PRAY, C.; HUANG, J.; HU, R.; ROZELLE, S. Five years of Bt cotton in China - the benefits continue. **The Plant Journal**, v. 31, n. 4, p. 423-30, 2002.

QUAIL, M. A.; SMITH, M.; COUPLAND, P.; OTTO, T. D.; HARRIS, S. R.; CONNOR, T. R.; BERTONI, A.; SWERDLOW, H. P.; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC genomics**, v. 13, n. 241, p. 1-13, 2012.

REIS, P. R. Broca-do-café: conheça os métodos para eliminar a ameaça. **Cultivar**, Pelotas, v.38,n. 1, p.10-13, 2002.

REIS, P. R. Controle químico no manejo integrado da broca-do-café. In: HOMANN, C. L. (Org.). Manejo da broca-do-café. Londrina: IAPAR, 2007. p. 151-175

RIBAS, A.; PEREIRA, L.; VIEIRA, L. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 83-94, 2006.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of Coffea canephora by particle bombardment. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 493–497, 2005.

RICIETO, A. P.S.; FAZION, F. A. P.; CARVALHO-FILHO, C. D.; VILAS-BOAS L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. 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.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; JE, Y. H. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe and Effective Tool for Insect Pest Control. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 547 – 559, 2007.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**. v. 475, n. 7356, p. 348-352, 2011.

RUIZ DE ESCUDERO, I.;ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; ORGUIZA, J.A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Cry1I* protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4796–4804, 2006.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL,l J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. **Bioinformatics**,v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAADOUN, I.; AL-MOMANI, F.; OBEIDAT, M.; MEQDAM, M.; ELBETIEHA, A. Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). **Journal of Applied Microbiology** v. 90, n. 5, p. 866–872, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews,** v. 62, n.3, p. 775-806, 1998.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, n. 5, p.2893-2897, 1981.

SEBESTA, K.; FARKAS, J.; HORSKÁ, K.; VANKOVA, J. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 249-281. In: BURGES, H. D. **Microbial control of pest and plant diseases**. London, England: Academic Press, 1981. p.1970-1980.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

SILVA, F. C.; VENTURA, M. U.; MORALLES, L. O papel das armadilhas com semioquímicos no manejo da broca-docafé, *Hypothenemus hampei*. **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 27, n. 3, p. 399-406, 2006.

SILVA, W. D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; SIMÕES--BENTO, J.M. Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of Insect Behavior**. v. 25, n. 4, p. 408-417, 2012.
SIVELTZ, M. Coffee and Tea Technology. In: NORMAN, W. **Elements of Food Technology.** Desroesier Avi Publishing Co. Westport connetrant, v. 19, 1977, p. 601–613.

SOBERÓN, M.; FERNANDEZ, L. E.; PEREZ, C.; GILL, S. S.;BRAVO, A. Mode of Action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p 597-600, abr. 2007.

SONG, F.; ZHANG, J.; GU, A.; WU, Y.; HAN, L. H. E, K.; CHEN, Z.; YAO, J.; HU, Y.; LI, G.; HUANG, D. Identification of *cry*1I-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry*1I-type gene. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, n. 9, p. 5207 – 5211, 2003.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. 2.ed. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1997. 40p. (**Boletim Técnico, 50**).

STEIN, C.; JONES, G. W.; CHALMERS, T.; BERRY, C. Transcriptional analysis of the toxin-coding plasmid pBtoxis from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1771- 1776, 2006.

SUN, Y.; FU, Z.; DING, X.; XIA, L. Evaluating the insecticidal genes and their expressed products in *Bacillus thuringiensis* strains by combining PCR with Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 21, p. 6811 – 6813, 2008.

SUN, Y.; ZHAO, Q.; XIA, L.; DING, X.; HU, Q.; FEDERICI, B.A.; PARK, H.W. Identification and Characterization of Three Previously Undescribed Crystal Proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan.* **Applied and Environmental Microbiology.** v. 79, n. 11, p. 3364-3370, 2013.

SUREKHA, K.; ROYER, M.; NAIDU, R. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* toxins against two major coffee pests, i.e. coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) ans coffee white stem

borer (*Xylotrechus quadripes*). In: SIP, Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2002, Foz de Iguaçu, Brasil. **Program and Abstracts**, Foz de Iguaçu, PR, Brasil p.85

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 58, n. 10, p. 3342-3346, 1992.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211 – 1217, 1992.

TARUMA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2732-2739, 2011.

TAKEMATSU, A. P.; JOCYS, T.; POTENZA, M. R. Manejo da Resistência da Broca a Inseticidas. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2004, Mococa. **Anais...** p.85-88

TAN, G.; ZHENG, A.; ZHU, J.; WANG, L.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, S.; LI, P.; TANG, X. Rapid cloning, identification, and application of one novel crystal protein gene c*ry30Fa1* from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters,** v. 302, n. 1, p. 46–51, 2010.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J.; MEDRADO-ROLDÁN, H.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GÓMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México, **Ciência UANL**, v. 4, n. 2. p. 143-152, 2001.

TANIWAKI, M.H. Danos causados pela broca-do-café: Entrada para fungos e toxinas. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, 2007, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR, 2007. p. 77-82.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M. WILD, M.; WALFIELD, A.M.; POLLOCK, T.J. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". **Journal of Bacteriology**, v. 166, n.3, p. 801-811, 1986.

UEMURA, D. L.; VENTURA, M. U.; MIKAMI, A. Y.; SILVA, F.; MORALES, L. Responses of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), to Vertical Distribution of Methanol: Ethanol Traps. **Neotropical Entomology**, v. 39, n.6, p. 930-933, 2010.

USDA - United States Department of Agriculture - **Agricultural Projections to 2017**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/publications/oce081>. Acesso em: mai. 2014.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency and US Department of Agriculture. 1999. **Report of EPA/USDA workshop on Bt Crop Resistance Management in Cootton**. Memphis, Tennessee. August 26, 1999. Esther Day, ed. 80p. American Farmland Trust, Center of Agriculture in the Environment. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. Acesso em: jan. 2015.

VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. E.; OSSA, G. E.; CHRISPEELS, M. J. Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors**. Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 207–213, 2000.

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

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry,** v. 186, n. 1-2, p. 239-247, 1989.

VAN RIE, J. Insects Control with Transgenic Plants: Resistance Proof? **Trends Biotechnology**, v. 9, n.2, p. 177-179, 1999.

VARAPRASAD, K. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; DINAKAR, B. J.; RAO, R. C. V. R. 1994. First report of an entomogenous nematode, *Panagrolaimus* sp., from coffee-berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) from Karnataka, India. **Plant Protection Bulletin Faridabad**, v. 46, n. 2-3, p. 34-44, 1994.

VASSAL, J. M.; DE BARJAC, H.; FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A.Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from diseased filed-collected larvae of the saturniid moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana**. FEMS Microbiology Letters** 107, n. 2-3, p. 199-204, 1993.

VEGA, F.E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Anthropod Reviews**. v. 2, n. 2, p. 129-147, 2009.

VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, n. 19, v.8, p. 749 – 759, 2009.

VILLACORTA, A.; BARRERA, J. F. Nova dieta merídica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 22 n. 2, p. 405-409, 1993.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 605 – 613, 2004.

VILAS-BÔAS, G. T.; ALVAREZ, R.C.; SANTOS, C.A.; VILAS-BOAS, L.A. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus, Bacillus anthracis and Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 673 – 687, 2007.

VISSER, B.; MUNSTERMAN, E.; STOKER, A.; DIRKSE, W.G. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. **Jounal of Bacteriology** v. 172, n. 12, p. 6783-6788, 1990.

WAALWIJK, C.; DULLEMANS, A. M.; VAN WORKUM, M.; VISSER, B. Molecular cloning and nucleotide sequence of the M 28 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. Nucleic Acids Reserch** 13, n.22, p.8207–8217, 1985.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 8-endotoxin. Nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli.* **Journal of Molecular Biology** v. 191, n. 1, p.1-11, 1986.

WEATHERSBEE III, A.A.; LAPOINT, S.L.; SHATTERS, Jr. R.G.; Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Diaprepes bbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomology,** v. 98, n.4, p. 441-448, 2006.

WHETSTONE, P. A.; HAMMOCK, B. D. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. **Toxicon**. v. 49, n. 4, p. 576–596, mar. 2007.

WIRTH, M. C.; DELÉCLUSE, A.; FEDERICI, B. A.; WALTON. W. E. Variable cross-resistence to Cry 11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae) Resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 64, n. 11, p. 4174-4179, 1998.

WHITELEY, A. S.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLAN, B.; ALLCOCK, R.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) platform. **Journal of Microbiological Methods**. v. 91, n. 1, p. 80-88, 2012.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation in *B. thuringiensis.* **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 549 – 576, 1986.

WU, D.; CHANG, F.N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Letters**, v. 190, n. 3, p. 232–236, 1985.

WU, K.; MU, W.; LIANG, G.; GUO, Y. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. **Pest Management Science**, v. 61, n. 5, p. 491–498, 2005.

ZHANG, M. Y.; LOVGREN, A.; LOW, M. G.; LANDEN, R. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* - reduced expression of flagellin and phospholipases. **Infection and immunity**, v. 61, n. 11, 4947–4954, nov. 1993.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAUSSIN, R.; BULLA, L.A. Jr. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders**. Journal Invertebrate Pathology**, v. 76, n. 2, p. 131-139, 2000.

ZHU, Y.; SHANG, H.; ZHU, Q.; JI, F.; WANG, P.; FU, J.; DENG, Y.; XU, C.; YE, W.; ZHENG, J.; ZHU, L.; RUAN, L.; PENG, D.; SUN, M.. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *finitimus* strain YBT-020. **Journal of Bacteriology,** v. 193, n. 9, p. 2379–2380. 2011.