



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATOLOGIA E ALTERAÇÕES HISTOLÓ-
GICAS CAUSADAS POR
Bacillus thuringiensis var.
tenebrionis EM CINCO
COLEÓPTEROS PRAGAS DE CEREAIS
ARMAZENADOS.

ELAINE MENDELECK

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP) para a
obtenção do grau de mestre em Ciências
Biológicas (Parasitologia).

Orientador:

Prof. Dr. Mohamed E. M. Habib.

CAMPINAS
1993

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Elaine Mendeleck
e aprovada pela Comissão Julgadora 25
/ 11
/ 93



A meus pais, Guilherme
e Fernanda.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Mohamed Habib, que muito mais que um orientador, foi um amigo e irmão em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Andrade (Fe), pela leitura minuciosa dessa tese, por seus conselhos e sobretudo por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Benedito Ferreira do Amaral Filho por suas valiosas sugestões durante a correção desta.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pelas sugestões bastante úteis durante certas fases deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio material sem o qual dificilmente este trabalho poderia ter sido realizado.

Ao Dr. Francisco Alcantara pelas identificações das estruturas histológicas e por sua inestimável ajuda durante os estudos de histologia dessa tese.

A Luiz Fernando por toda a sua paciência e por sempre estar por perto quando eu precisei.

A direção e coordenação do Liceu Nossa Senhora Auxiliadora, na pessoa do Padre Sergio Baruffi por toda a compreensão com relação ao meu tempo disponível.

Ao Sr. Ricardo Fabiano pela inestimável ajuda e amizade.

A D. Abigail e D. Rosa por sua ajuda com os cortes histológicos.

Ana Rita e Dominique por tudo e muito mais.

Desi, pela sua grande amizade.

Aos amigos que estiveram presentes nas diferentes etapas de meu trabalho: Ana Tereza, Regina, Rubinho, Cris e Grandão, meu muito obrigada

E por ultimo, mas não menos importante: aos meus pais. Lamento ter apenas esta vida para agradecer-lhes por tudo o que sempre fizeram por mim.

Índice

1- Introdução.....	01
2- Revisão histórica.....	06
2.1 Classificação de variedades <u>E. thuringiensis</u>	09
2.2 Principais toxinas produzidas por <u>E. thuringiensis</u>	10
2.3 Modo de ação e sintomas externos.....	13
2.4 Sintomatologia externa.....	17
2.5 <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>Tenebrionis</u>	19
3-Material e métodos.....	22
3.1 Obtenção e manutenção de espécies de coleópteros avaliadas.....	22
3.2 Bioensaios de susceptibilidade para escolha da espécie a ser estudada.....	24
3.3 Histopatologia.....	27
4- Resultados e discussão.....	28
4.1 Ensaios de susceptibilidade.....	28
4.2 Diferenças de patogenicidade de <u>E. thuringiensis</u> var. <u>Tenebrionis</u> com relação às espécies testadas.....	33
4.3 Sintomatologia externa.....	34
4.4 Ensaios para estudo de histopatologia.....	42
4.5 Bioensaios com adultos submetidos diretamente à ação de <u>E. thuringiensis</u> var. <u>Tenebrionis</u>	45
4.6 Anatomia interna de <u>Tenebrio molitor</u>	47
4.7 Histopatologia do canal alimentar e tubulos de Malpighi de <u>T. molitor</u>	50
4.8 Exames anatómicos do aparelho reprodutor de fêmeas de <u>T. molitor</u>	62
5- Conclusões.....	63
6- Resumo.....	65

7- Summaries.....68
8- Bibliografia.....71

1 - Introdução

A ampliação dos conhecimentos científicos motivada pelas necessidades econômicas e sociais, é mais um fator que contribuiu para o desenvolvimento dos métodos de Controle Biológico. O desenvolvimento nas áreas de Entomologia e Ecologia, propicia uma conscientização cada vez maior da importância de parasitos, predadores e patógenos na regulação de populações de insetos e da possibilidade de seu uso prático em programas de controle de espécies prejudiciais.

A integração de medidas de controle em programas de manejo é uma das características da agricultura avançada. O Controle Biológico dentro de tais programas pode ser o elemento central. O crescente uso de inseticidas não pode ser refeito sem a opção de uma alternativa eficiente e segura. O Controle Biológico é uma das alternativas mais eficientes.

Uma das importantes áreas dentro do Controle Biológico envolve a utilização de patógenos. As falhas nas primeiras tentativas de utilização de patógenos ocorreram devido a falta de conhecimentos básicos (uso de patógenos impróprios ou aplicações feitas sob condições inadequadas). Estudos básicos de identificação do organismo e avaliação do seu efeito nos seus diferentes hospedeiros, podem poupar tempo, energia e material, evitando descrença em relação à Patologia de Insetos, base para

o Contrôlo Biológico (Habib, 1982).

Várias espécies de patógenos de insetos são hoje conhecidas e utilizadas para o controle de pragas. Entre as várias linhas desenvolvidas nas pesquisas de Patologia de Insetos, a Bacteriologia de Insetos é a que tem apresentado maiores resultados. Apesar das centenas de espécies de bactérias associadas à insetos conhecidas atualmente, as de maior importância concentram-se nas famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, pois possuem características que permitem seu uso no controle de insetos.

O crescente interesse na utilização de bactérias entomopatogênicas para controle, direcionou as pesquisas para a família Bacillaceae, envolvendo dois gêneros de alta importância: Bacillus e Clostridium.

Atualmente, com as várias informações obtidas através de inúmeras pesquisas, o Bacillus thuringiensis ocupa o primeiro lugar entre os patógenos mais produzidos e usados para o controle de insetos pragas. Essa bactéria foi isolada pela primeira vez em 1911 e é produzida na França desde 1938 (Habib, 1982).

Os produtos comerciais à base do sorotipo (H: 3a-3b) são específicos para larvas de lepidópteros e uma das grandes opções dentro do Manejo Integrado de Pragas (Berti FQ e

Gallo, 1977; Dulmage, 1989; Habib, 1982; Gravena e Pazini, 1987; Gallo et al., 1988).

A descoberta de B. thuringiensis var. Israelensis (H:14) tornou possível a idéia de controle microbiano de dípteros aquáticos (Habib et al., 1987; Andrade e Castello Branco, 1991 e Andrade e Modolo, 1991).

Na Alemanha, uma nova variedade de B. thuringiensis foi isolada de Tenebrio molitor (Coleoptera, Curculionidae) por Krieg e colaboradores (1983). Essa variedade produz dentro de cada esporângio um esporo e um cristal parasporal de formato retangular, diferentes do cristal bipiramidal das variedades que atuam contra lepidópteros e foi descrita como Patótipo C na classificação de linhagens. De acordo com testes bioquímicos realizados pelos descobridores, a nova variedade foi denominada Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis (Krieg et. al., 1983, 1984) . Essa variedade pertence ao sorotipo H:8a-8b, previamente descrito com o nome de B. thuringiensis var. morrisoni (Bonnetoi e de Barjac, 1963). De acordo com deBarjac e Frachon (1990), graças à particularidade de ser ativa contra coleópteros, é útil que seja mencionada como variedade Tenebrionis, para distingui-la do isolado original Morrisoni que é ativo contra pernilongos e borrachudos. E ainda uma vez que tais " variedades " ou "sorotipos" carecem de valor taxonomico segundo o código bacteriológico, será adotado no presente trabalho a terminologia B. thuringiensis var. Tenebrionis (baseando-se em Le Minor e

Popoff, 1987).

Em 1983 em San Diego (California, EUA), Herrstadt e colaboradores, também encontraram um isolado de E. thuringiensis com atividade tóxica contra coleópteros, mas não contra lepidópteros ou dípteros e que recebeu o nome de E. thuringiensis var san diego (Herrstadt et al., 1986); doravante mencionado como San Diego.

Tanto a variedade Tenebrionis quanto a variedade San Diego apresentam segundo Krieg (1983) e Herrns- tadt et al. (1986), o cristal tóxico em formato retangular e são ativos contra coleópteros. Infelizmente a falta de comparações entre as duas variedades pelos pesquisadores podem levar a crêr que na realidade, sejam uma só havendo necessidade de estudos de sorotipagem.

Nos últimos anos os sorotipos Kurstaki e Is- raelensis tem sido exaustivamente investigadas quanto ao modo de ação (Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1979; Habib, 1982 ; Gupta et al. 1985; Reisner et al., 1988, ; Mathavan et al., 1989), a sua bioquímica (Percy e Fast, 1983; Widner e Whiteley, 1989; Fang et al., 1990; Yan e Mc Carthy, 1990 e Sanders e Ellar, 1993) e características genéticas (Schnepf et al., 1985, Shibano et al., 1985; Mc Pherson et al., 1988) e histopatológicos (Nishi- itsutsuji- Uwo 1979; Endo e Nishitsutsuji- Uwo, 1980; Habib, 1982; Percy e Fast, 1983; de Lello et al., 1984; Oron et al.,

1985; Spies e Spence, 1985; Chiang *et al.*, 1986; Gill e Hornung, 1987; Mathavan *et al.*, 1989; Reisner *et al.*, 1989; Ryerse *et al.*, 1990 e Knowles *et al.*, 1992) entre outros. Com relação à variedade *Tenebrionis* são poucos os estudos realizados a nível mundial.

O objetivo deste trabalho é realizar estudos de histopatologia e modo de ação de *T. thuringiensis* var *Tenebrionis* em coleópteros de importância econômica, uma vez que tais investigações são fundamentais para o conhecimento da atuação do patógeno no inseto alvo, possibilitando dessa forma, uma utilização mais eficiente em programas de Manejo Integrado de Fragas (MIF).

2- Revisão Histórica

As doenças bacterianas em insetos benéficos começaram a ser descobertas antes daquelas causadas por insetos prejudiciais. As investigações que serviram como base para posteriores pesquisas de patologia e controle microbiano de insetos prejudiciais, tiveram início no final do século XIX, quando a apicultura e a sericicultura eram ameaçadas por tais doenças (Habib e Andrade, 1986). A primeira tentativa mais concreta para o desenvolvimento da Patologia de Insetos como parte da área de Controle Biológico, foi apresentada no "The International Live Stock Exposition" em 1927 (Habib, 1982).

Desde 1970, o progresso no uso de patógenos tem sido exponencial e programas de cooperação internacional tem sido organizados com a finalidade de aprimorar técnicas cada vez mais eficientes com um mínimo de custos (Burges, 1981).

É relativamente pequeno o número de espécies de bactérias com a capacidade de multiplicação na luz intestinal ou na hemolinfa, causando septicemia, bem como daquelas capazes da produção de toxinas, causando toxemia nos insetos afetados. Dentro do gênero Bacillus, B. thuringiensis Berliner, seguido por B. cereus Frankland e Frankland e B. popillae Dutky, ocupam lugar de destaque nas pesquisas de patologia e controle microbiano.

B. thuringiensis, gram positivo, facultativo e formador de esporos. Por apresentar um cristal proteico paraesporal de efeito tóxico, tem merecido há anos, maior atenção por parte dos pesquisadores em relação aos demais patógenos de insetos. Essa espécie foi isolada por Berliner (1911) de larvas de Anagasta kühniella Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) e descrita pelo mesmo autor em 1915 (Habib, 1982), muito embora, já em 1901, o mesmo bacilo tenha sido isolado por Ishiwata de larvas de bicho-da-seda. Atualmente, o material isolado por Berliner é considerado como B. thuringiensis var Turingiensis (sorotipo H:1), enquanto o material isolado por Ishiwata, é conhecido como variedade Sotto (sorotipo H:4a-4b), (Habib, 1982; Habib e Andrade, 1986).

A partir de 1950, tiveram início investigações mais acuradas com relação aos aspectos taxonômicos e patológicos de B. thuringiensis (Steinhaus, 1951, 1960). A presença de cristais em culturas esporuladas de B. thuringiensis foi detectada por Hannay (1953), que os denominou corpos paraesporais, e relacionou-os com a patogenicidade da bactéria. Ainda segundo Hannay, os corpos paraesporais deviam estar relacionados à formação de uma substância tóxica, capaz de auxiliar septicemia em insetos. Essa hipótese foi comprovada por Angus e Heimpel (1956). Posteriormente, toxinas semelhantes foram isoladas de outras variedades desse bacilo (Fitz James *et al.*, 1959; Heimpel e Angus, 1959). Os corpos paraesporais também foram notados por Berliner em 1915 e Mates em 1927 (Habib, 1982), contudo, esses

pesquisadores não os relacionaram com a patogenicidade da bactéria.

As semelhanças morfológicas e bioquímicas existentes entre as espécies E. thuringiensis e E. cereus, acabaram por criar divergências entre os pesquisadores, quanto à classificação dessas bactérias (Habib, 1982). Atualmente, para fins práticos, considera-se E. thuringiensis uma espécie independente de E. cereus.

2.1 Classificação das variedades de *E. thuringiensis*

A utilização de testes imuno-sorológicos para classificação dos diferentes isolados de *E. thuringiensis*, foi sugerida pela primeira vez por de Barjac em 1963 (Habib, 1982). Atualmente, *E. thuringiensis* apresenta mais de 30 variedades, classificados através da análise do antígeno-H (aglutinação-flagelar). Essas análises indicam que entre as diferentes linhagens e variedades desta bactéria existem diferenças bioquímicas e sorológicas que estão relacionadas à fenômenos de virulência e especificidade (de Barjac, 1981; Lavini, 1981; Habib e Andrade, 1986; Jaquet et al., 1987 e de Barjac e Frachon, 1990).

Krieg et al. (1983), por outro lado, citam que dentro de cada sorotipo, pode-se ainda classificar os isolados da bactéria em diferentes patótipos. Dessa forma, uma variedade patogênica para larvas de lepidópteros é classificada como Patótipo A; quando patogênicos e larvas de nematoceros pertencem ao Patótipo B e para as larvas de coleópteros ao Patótipo C. Também existem o Patótipo D, patogênico tanto para lepidópteros, como para dípteros; e o Patótipo E, para as variedades que mesmo produzindo δ - endotoxina, não são patogênicas para nenhuma das espécies avaliadas até o momento (Ellar et al. 1986 apud Carrol et al., 1989).

Assim, através dos critérios citados acima, pode-se dizer que a variedade Israelensis (H:14) pertence ao patótipo B e a variedade Kurstaki ao patótipo A. Devido à sua comprovada eficiência, ambos os sorotipos já vem sendo industrializados há muito tempo, apresentando excelentes resultados (Habib, 1982, 1983; Habib e Andrade, 1986; Habib *et al.*, 1986; Andrade, 1989 e Dulmage, 1989). Também é preciso registrar a descoberta de variedades de E. thuringiensis com atividade contra nematoides parasitas de animais e plantas (Edward *et al.*, 1991 e European Patent Office Application 0462721). Tal descoberta é a primeira demonstração de que algumas variedades de E. thuringiensis são ativas com outras formas de vida além de insetos.

2.2 Principais toxinas produzidas por Bacillus thuringiensis

As variedades de E. thuringiensis produzem algumas toxinas já caracterizadas, além de substâncias com ação tóxica pouco definida para muitos insetos. Dentre elas cita-se: a toxina do endósporo, α -exotoxina, β -exotoxina, δ -endotoxina, sendo que a última constitui o fator mais importante no quadro causado pelo bacilo (Bulla *et al.*, 1977).

A- Endósporo

Até o final da década de 50, a padronização dos produtos comerciais à base de B. thuringiensis era baseada na contagem e na quantidade de esporos por unidade de peso do produto formulado. Com a descoberta do cristal proteico (protoxina) e da δ - endotoxina, considerada atualmente como o principal fator na atividade patogênica desse bacilo, os pesquisadores chegaram a acreditar que os esporos não desempenhariam nenhum papel neste sentido. Contudo, pesquisas revelaram a presença de uma proteína na parede do endósporo, química e sorologicamente semelhante à proteína do cristal, e apesar de se apresentar em quantidade menor com relação ao cristal, também apresentou efeito tóxico para lagartas (Burges et al., 1976). Em insetos que sofreram toxemia, o efeito da proteína do esporo é mascarado pelo efeito daquela do cristal, pois tais insetos morrem antes que os esporos possam germinar e dessa forma liberar a toxina do exospório. Em insetos susceptíveis que morrem por septicemia, o papel do esporo é perceptível, pois misturas de cristais e esporos são muito mais patogênicas do que cristais sózinhos (Habib e Andrade, 1986).

B- α - exotoxina

Essa toxina foi descrita como Lecitinase-C por Taumanoff (1953). Também produzida por B. cereus, a Lecitinase-C é solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos, apre-

sentando uma melhor atuação em um intervalo de pH de 6.6 e 7.4 . Uma toxina semelhante a essa, porém tóxica para ratos e para larvas de Flutella xylostella foi revelada por Krieg (1971), que a denominou como "Toxina de ratos" ou "Toxina termosensível", e que difere quimicamente de Lecitinase-C

C- β - exotoxina

O nome β - exotoxina foi sugerido por Heimpel (1967), para uma substância termostável em água e altamente tóxica para muitos insetos e certos vertebrados (Habib e Andrade, 1986). Como esta toxina não sofre degradação no intestino dos bovinos, sua adição à dieta destes animais foi sugerida para o controle de moscas nas fezes. Contudo, efeitos tóxicos com lesões em tecidos e ação mutagênica em mamíferos, resultaram no impedimento do uso de linhagens produtoras dessa toxina durante algum tempo (Burges, 1975).

D- δ - endotoxina

Em 1967, Heimpel sugeriu o nome de δ - endotoxina para o cristal proteico, que representa o componente principal dos produtos à base de E. thuringiensis. O cristal em si, não tem ação tóxica, sendo considerado como protoxina. A δ - endotoxina é uma das moléculas que fazem parte da constituição do cristal, assim, sua ação tóxica depende da dissolução do cristal em meio alcalino (Habib, 1982 e Habib e Andrade, 1986).

apresentando um formato quadrangular, retangular ou romboidal. A ingestão do cristal parasporal e esporos pelas larvas, causa parada alimentar, paralisia intestinal, invasão da hemocele e septicemia que leva o inseto à morte. Adultos expostos à folhas contaminadas sofrem parada alimentar e na postura de ovos A β -exotoxina não participa deste processo, pois a variedade *Tenebrionis* não produz toxinas desta natureza (Krieg *et al.*, 1984). A ação deste bacilo sobre larvas de coleópteros fitófagos, segue o esquema já conhecido para o patótipo A: interrupção da alimentação e morte após poucos dias, dependendo da dose (Krieg *et al.*, 1984).

Em 1985, o *B. thuringiensis* var. San Diego, também patogênico para coleópteros, foi isolado nos EUA (Hernstadt *et al.*, 1986). De acordo com Krieg *et al.* (1987a) e Huger e Krieg (1989), a variedade San Diego é idêntica à variedade *Tenebrionis*, assim como o isolado EG- 2158, descrito por Donovan *et al.* (1988).

Nos últimos anos, pesquisas têm sido desenvolvidas na Europa e nos EUA, com a finalidade de determinar o potencial desta nova variedade de controle de coleópteros daninhos. A maioria das investigações estão voltadas à patogenicidade deste bacilo a uma praga inexistente no Brasil, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae), mas muito importante por atacar plantações de batata e tomate, mostrando-se muito susceptível ao bacilo (Krieg *et al.*, 1984; Ferro e Ge-

O cristal é formado fora do exósporo, dentro da célula bacteriana durante a esporulação, sendo que muitos polipeptídeos distintos, concorrem para a formação da δ -endotoxina. Muitas pesquisas tem sido realizadas com a finalidade de uma melhor caracterização da δ -endotoxina, incluindo investigações à nível bioquímico e genético, além de outras enfocando as proteínas do cristal de *B. thuringiensis* ativas contra nematódeos (Bulla *et al.*, 1977; Sharp e Baker, 1979; Yamamoto, 1983; English e Cantley, 1985, 1986; Himeno, 1987; Hoffman *et al.*, 1988a,b e c; Edwards *et al.*, 1990).

2.3 Modo de ação e sintomas internos

Existem muitos estudos sobre a ação das toxinas produzidas por *B. thuringiensis*. Quanto às interações do bacilo com seus insetos hospedeiros, a δ -endotoxina e Thurin-giensina, representariam os fatores mais importantes no quadro patológico causado por esta bactéria.

A- α - exotoxina (Thuringsiensina)

A gama de insetos susceptíveis a essa toxina, é bem maior do que aquela dos susceptíveis ao cristal (β - endotoxina), produzida pela mesma bactéria (Habib, 1982). Os estágios larvais são mais susceptíveis que os adultos, sendo que o

efeito é mais visível durante as fases críticas da metamorfose. As alterações provocadas por doses sub-letais, abrangem mal-formações das peças bucais, sistema reprodutor, asas e tamanho menor em adultos sobreviventes de larvas submetidas ao tratamento. Sintomas patológicos foram observados em hemócitos de larvas de Galleria mellonella, tratadas com α - exotoxina (Burges, 1981). Contudo, hemípteros não demonstraram susceptibilidade a Thuríngiensina (Habib e Andrade, 1986).

B- δ -endotoxina

Durante as últimas décadas, foram realizados muitos estudos sobre a ação da δ - endotoxina, derivada do cristal de *B. thuringiensis* em insetos (Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1979; Nishiitsutsuji-Uwo e Endo, 1980; Spies e Spence, 1985; Himeno et al., 1985; Gupta et al., 1985; Cheung e Hammock, 1985; English e Cantley, 1985, 1986; Knowles e Ellar, 1986; Singh et al., 1986; Aronson et al., 1986; Maddrel et al., 1988; Hoffman et al., 1988a,b; Lane et al., 1989 e Yan e McCarthy, 1990).

Muitos fatores tem sido propostos para explicar a especificidade da δ -endotoxina, tais como a ativação proteolítica do cristal no intestino do inseto e a presença de receptores específicos na membrana celular para diferentes δ - endotoxinas (Hoffman et al., 1988a,b e Yan e McCarthy, 1990). Com relação a este último, Ryerse et al. (1990) observaram que a δ - endotoxina de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* não se

liga à todos os tipos de células. Esse resultado sugeriu aos pesquisadores a presença de receptores para a variedade Kurstaki, largamente distribuídos na superfície apical das células epiteliais. Contudo, o termo receptor deve ser usado com cuidado, pois implica numa proteína, sendo também possível, que a toxina reconheça a conformação molecular geral ou interações por componentes associados à membranas (Ryerse *et al.*, 1990). De acordo com Maddrell *et al.* (1988), as toxinas diferem entre si. Elas fazem ligação com certos fosfolipídios espalhados nas membranas celulares, o que confere sua especificidade. Por outro lado, Knowles e Ellar (1987) acreditam na presença de poros não específicos na membrana celular.

Cientistas aceitam que a δ - endotoxina ataca primeiramente as membranas das células epiteliais do intestino médio (Travers *et al.*, 1976; Nishiitsutsuji-Uwo, 1979; Lacey e Federici, 1979; Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Percy e Fast, 1983; de Lello *et al.*, 1984). A δ - endotoxina geralmente altera a permeabilidade das células, epiteliais, impedindo a regulação dos íons potássio (K+) (Nishiitsutsuji-Uwo e Endo, 1979). As modificações nos níveis de K+, podem ser explicadas por interferências nas passagens de K+, com consequente alteração no pH celular (Sacchi *et al.*, 1986; Lane *et al.*, 1989). Tais mudanças no gradiente iônico, levam a alterações histopatológicas (Gupta *et al.*, 1985; Lane *et al.*, 1989). Nishiitsutsuji-Uwo e Endo (1980) relacionaram a paralisia geral ao aumento na taxa de potássio da hemolinfa.

As mudanças histopatológicas investigadas à nível de microscópio óptico e eletrônico, compreendem hipertrofia celular, inchaço da membrana plasmática, separação das células epiteliais da membrana basal, ruptura das microvilosidades, vacuolização do citoplasma (tais vacúolos são produzidos pelo Complexo de Golgi, sendo alguns deles citofágicos), vacuolização das cisternas do retículo endoplasmático com lisossomos acumulados, perda de ribossomos, deslocamento do núcleo para a região basal das células epiteliais e condensação anormal da cromatina. Ao microscópio eletrônico, o citoplasma de algumas células epiteliais assume aparência reticulada. As mitocôndrias apresentam mudanças na forma, mostrando-se condensadas. Os espaços entre as cristas mitocondriais apresentam-se vacuolizados e a matriz, muito condensada e extremamente eletrodensa. Investigações realizadas, revelaram que polipeptídeos tóxicos têm efeito estimulante na produção de oxigênio pelas mitocôndrias e efeito inibidor na produção de ATP, indicando a atuação da toxina na fosforilação oxidativa. Dependendo das condições envolvidas, da dosagem aplicada e do inseto tratado, a musculatura intestinal, principalmente a circular, sofre relachamento e dissociação, explicando com isso, a ocorrência de paralisia intestinal em larvas de vários lepidópteros. Em estágios mais avançados da doença, esses músculos podem sofrer desintegração total. Os mesmos sintomas estendem-se para a musculatura do corpo, nas larvas que sofrem paralisia geral. Nos estágios finais da infecção, a maioria das células apresentam-se totalmente rompidas, extravasando seu conteúdo

para o lúmen intestinal. (Angus e Heimpel, 1956; Sutter e Raun, 1967; Travers *et al.*, 1976; Ebersold *et al.*, 1977; Kissinger e McGaughey, 1979; Lacey e Federici, 1979; Nishitsutsuji-Uwo, *et al.*, 1979; Griego *et al.*, 1979a,b; Endo e Nishitsutsuji-Uwo, 1980, ; Habib, 1982; Lahkim-Tsrer, 1982; Percy e Fast, 1983; de Lello *et al.*, 1984; Habib e Andrade, 1986; Johnson e Davidson, 1984; Spies e Spence, 1985; Sacchi *et al.*, 1986; Chiang *et al.*, 1986; Jonhson, 1987; Maddrell *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1988a, b; Reisner *et al.*, 1989; Lane *et al.*, 1989; Ryerse *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1990; Yan e McCarthy, 1990). De acordo com Mathavan *et al.* (1989), a intoxicação é resultado de um aumento no estoque de glicogênio.

2.4 Sintomatologia externa

Em geral, nas larvas de lepidópteros, os sintomas externos causados pela infecção por *E. thuringiensis* seguem um mesmo padrão, sendo que, apenas pequenas variações na sequência dos sintomas, podem ser observadas devido ao modo de infecção, dosagem usada e nível de susceptibilidade do inseto, tratado (Habib, 1982).

Os primeiros sinais externos da doença, correspondem à falta de apetite, causada por certos distúrbios à nível do sistema digestivo, principalmente do epitélio do intestino médio. Em seguida, o inseto passa a apresentar movimentos

lentos, contudo, observações constataram movimentos peristálticos no intestino médio. Ao fim dessa fase, ocorrem diarreia e vômitos apresentando fragmentos de alimentos não digeridos. O tegumento das larvas infectadas torna-se fosco em função da penetração do patógeno na hemolinfa e os insetos doentes passam a apresentar movimentos, apenas quando estimulados mecânicamente. Em várias espécies foi constatada paralisia intestinal e acúmulo de alimentos em partes do intestino. Posteriormente, o intestino adquire coloração marrom, a larva passa a não corresponder à estimulação mecânica, tornando-se flácida. Alguns insetos sofrem paralisia geral. Após a morte, a larva adquire coloração preta e começa rapidamente a deterioração dos tecidos, sem ruptura do tegumento (Habib, 1968; Nishiitsutsuji-Uwo e Endo, 1980; Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Habib, 1982; Habib e Andrade, 1984; Habib e Andrade, 1986).

De acordo com o modo de ação e sintomatologia, Heimpel e Angus (1959) classificaram os insetos em três tipos:

Tipo I: Os insetos do Tipo I sofrem paralisia geral, causada pelo aumento do pH da hemolinfa. A morte ocorre por toxemia, provocada pela δ -endotoxina, antes da germinação e multiplicação do patógeno.

Tipo II: Não ocorre paralisia geral, há queda do pH do intestino. O patógeno invade a cavidade do corpo, havendo germinação e mul-

tiplicação do patógeno, causando septicemia e morte do inseto. O pH da hemolinfa não sofre alterações.

Tipo III: Os insetos são mortos pela ingestão de cristais e esporos, sofrendo de septicemia e toxemia crônicas e morte. Não há paralisia geral nem intestinal.

Tipo IV: Novo grupo caracterizado por Burgerjon e de Barjac (1960) e Martouret (1961), onde os insetos sofrem ação da Thuringiensina (Habib e Andrade, 1986).

2.5 Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis

Em 1982, foi isolada na Alemanha por Krieg et al., uma nova variedade de B. thuringiensis, denominada Tenebrionis. É caracterizada como patótipo C, do sorotipo H: 8a- 8b. Os cristais da nova variedade são solúveis tanto em meio alcalino, como em soluções salinas saturadas, fator que não ocorre com os cristais de outros patótipos deste mesmo sorotipo. Outra propriedade apresentada pela nova variedade é a recristalização de sua forma tóxica, depois de sofrer diálise, sem alteração da composição do cristal (Krieg et al., 1983; Bernhard, 1986; Krieg et al., 1987b; Li et al., 1988).

O cristal parasporal de B. thuringiensis var. Tenebrionis é diferente do das outras variedades, sendo plano,

lernter, 1989; Riethmuller e Langenbruch, 1989; Zehnder e Gelenter, 1989; Langenbruch e Riethmuller, 1990; Hough-Goldstein *et al.*, 1991; Ferro e Lyon, 1991). Também existe grande preocupação com a caracterização do gene da proteína tóxica (Hernstadt *et al.*, 1987; Hofte *et al.*, 1987; Jahn *et al.*, 1987; Donovan *et al.*, 1988; Sekar, 1988; Rhim *et al.*, 1990) e estudos com outros crisomelídeos (Bauer, 1990, 1992 e Bauer e Pankratz, 1992).

Apesar de não causar nenhum quadro patológico visível, *B. thuringiensis* var. *Tenebrionis* , pode reduzir a longevidade das abelhas, quando expostas à concentrações muito altas da bactéria (Vandenberg, 1990).

A descoberta de *B. thuringiensis* var. *Tenebrionis* vem aumentar o leque de opções dentro do Controle Biológico de Pragas, uma vez que investigações realizadas por vários pesquisadores, demonstraram ser esta bactéria um agente bastante promissor (Bowen, 1991). São várias as características que colocam *B. thuringiensis* em vantagem com relação aos inseticidas químicos. A principal delas está relacionada à alta especificidade deste patógeno, que não interfere com predadores e parasitos que naturalmente controlam o inseto alvo, garantindo um maior equilíbrio ecológico. A bactéria também oferece total segurança para vertebrados, insetos benéficos e plantas (no caso da variedade *Tenebrionis*, a segurança ainda é maior, pois esta não produz a β exotoxina).

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção e manutenção de espécies de coleópteros avaliados

As espécies de coleópteros coletadas e criadas para posterior escolha da mais adequada para a avaliação no presente trabalho foram Carpophilus spp. (Nitidulidae), Chriolestes ferrugineus (Cucujidae), Lasioderma serricornis (Anobiidae) , Tenebrio molitor e Iribolium sp (Tenebrionidae)

Os coleópteros acima citados foram obtidos a partir de material proveniente de moinhos da região de Campinas (SP), material esse que era submetido a triagem em laboratório.

Foram utilizados frascos de vidro de 3.0 litros para a manutenção da espécie T. molitor, sendo que as demais espécies foram mantidas em frascos de vidro de 0.5 litros. Todos os frascos foram fechados com tecido de algodão, gaze, nylon e elástico (Figura 1).

Todos os insetos foram mantidos em criação de laboratório sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$ UR) e fotoperíodo de 12 horas.



Fig. 1 - Frascos de vidro fechados com tecido de nylon utilizados para a criação dos coleópteros em laboratório.

As dietas oferecidas foram previamente autoclavadas a 1 atmosfera por 60 minutos com a finalidade de eliminar ácaros.

Para C. ferrugineus, L. serricornis, Carpophilus sp e Tribolium sp foi oferecido fubá e, para L. molitor, farelo de trigo, farinha de trigo integral e ração para coelhos moída na proporção de 1:1:1.

Os critérios básicos de manutenção de criações de estoques utilizados por pesquisadores como Habib (1980) e Amaral F2 (1986) também foram seguidos nesse trabalho.

3.2 Bioensaios de susceptibilidade para escolha da espécie a ser estudada

A escolha da espécie a ser estudada foi inicialmente realizada através de bioensaios feitos no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Zoologia, UNICAMP, com dois preparados experimentais à base de Bacillus thuringiensis var Tenebrionis (H: 8a - 8b): ABG - 6256, fornecido pela Abbott Laboratories LTD. (EUA) e outro cedido pela BASF S.A. (Alemanha), ambos em formulação pó- molhável.

O preparado ABG - 6256 foi utilizado para avaliação em todas as espécies citadas anteriormente, exceto Carpophilus sp. enquanto que para I. molitor, Tribolium sp e L. serricornis foi utilizado o preparado fornecido pela BASF.

Nas avaliações preliminares de susceptibilidade, foram utilizadas larvas de 3º estágio de Carpophilus sp e Lasioderma serricornis com exceção das avaliações com C. ferrugineus e Tribolium sp, nas quais foram utilizados só adultos da espécie. Nos ensaios com I. molitor foram utilizados adultos e larvas. Os ensaios foram realizados até que a mortalidade se estabilizasse.

Nos experimentos com larvas de L. serricornis foram utilizados dois tratamentos com duas repetições com 30 in-

divíduos por tratamento, além das testemunhas. As concentrações de bactéria aplicadas foram misturas de 1:10 e 1:100 em fubá. As leituras foram iniciadas 12 após a aplicação e efetuadas em intervalos de 6 horas.

Com relação a C. ferrugineus, foram realizados 2 tratamentos com 2 repetições e 50 adultos por repetição, além da testemunha. As concentrações da bactéria aplicadas foram de 1:10 e 1:100 em fubá, com leituras iniciadas 12 após a aplicação e efetuadas a cada 12 horas

Para adultos de Iribolium sp, foram realizados 4 tratamentos com duas repetições cada, com 50 indivíduos adultos por repetição, além da testemunha. As concentrações da bactéria aplicadas foram de 1:10 e 1:100 em fubá, com leituras iniciadas 12 horas após a aplicação e efetuadas em períodos de 12 horas.

No caso de Carpophilus sp foi feito 2 tratamentos com 2 repetições, com 50 indivíduos por repetição, além da testemunha. A concentração da bactéria utilizada foi de 1:10 em fubá com leituras iniciadas 12 horas após a aplicação e efetuadas em períodos de 12 horas.

Nos experimentos com larvas de L. molitor foram realizados 2 tratamentos com 30 larvas de 3º estágio cada, além da testemunha. As concentrações da bactéria aplicadas foram de 1:10 e 1:100, com leituras iniciadas 12 horas após a aplicação e

efetuadas a cada 12 horas.

Posteriormente para I. molitor, baseando-se nos ensaios preliminares citados acima, foi determinada uma concentração relativamente alta da bactéria. Foi realizado 7 ensaios com 10 indivíduos de 3^o estágio por repetição, além da testemunha. A concentração de bactéria utilizada foi de 1:5. O desenvolvimento dessas larvas foi acompanhado até o estágio adulto. Os adultos provenientes das larvas infectadas foram colocados em dieta livre do patógeno e também foram observados. As leituras foram iniciadas 24 horas após a emergência dos adultos e efetuadas em intervalos de 12 horas.

Em todos os experimentos os preparados foram homogeneizados manualmente na dieta dos insetos.

Durante a realização dos bioensaios, os insetos foram mantidos em estufa BOD - Mod 347F - Fanem, a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR, na ausência de luminosidade e em placas de Petri (9.0 cm de diâmetro e 1.5 cm de altura).

O registro de mortalidade e os exames macroscópicos de sintomas dos insetos tratados foram efetuados sob lupa microscópica Zeiss. A pesagem das pupas tratadas foi realizada utilizando-se uma balança analítica Mettler H51AR. Os cálculos estatísticos como média e desvio padrão foram efetuados usando-se programa Harvard para microcomputador PC padrão IBM.

3.3 Histopatologia

Para os estudos de histopatologia foram investigados os tecidos do aparelho digestivo e túbulos de Malpighi.

A metodologia de preparação dos cortes histológicos seguiu as técnicas de histologia propostas por Belimer et al., 1976. Os adultos de I. molitor foram dissecados a cada 12 horas e os órgãos removidos fixados em Bouin acético por 24 horas. Após fixação, o material era lavado em água corrente e desidratado em álcool nas seguintes proporções: 70%, 80%, 95%, 100%I e 100%II por um período de 1 hora para cada concentração. Após a diafanização em diafanol, o material foi incluído em parafina. Os cortes foram efetuados em micrótomo, com uma espessura de 7µm e corados com PAS, hematoxilina - eosina e tricrômico de Masson.

As observações microscópicas do material obtido foram feitas em microscópio óptico Zeiss, onde foram realizados registros fotográficos das alterações histológicas.

o preparado fornecido pela BASF, sendo essa a espécie que mostrou maior susceptibilidade ao R. thuringiensis var. Tenebrionis. A mortalidade ocorreu nas fases de larva, pré-pupa e pupa.

Tribolium sp

Com relação à Tribolium sp, os adultos apresentaram um máximo de 10% de mortalidade na concentração mais alta após cerca de 100 horas para o preparado ABG - 6256. Para o preparado fornecido pela BASF, os adultos da mesma espécie apresentaram uma mortalidade estabilizada em apenas de 4,4% na concentração mais alta, 144 horas após a aplicação.

Pode-se observar portanto, que para os adultos dessa espécie, o preparado ABG - 6256 mostrou-se um pouco mais eficiente que o preparado da BASF.

Lasioderma serricorne

Nas avaliações de larvas de L. serricorne, foi constatado que a concentração mais baixa não causou mortalidade.

Para a concentração maior foi verificada uma mortalidade de 15% para o preparado da BASF, 120 horas após a aplicação, enquanto que para o preparado ABG - 6256 houve 40% de mortalidade cerca de 130 horas após a aplicação.

De acordo com os resultados obtidos acima para larvas de 3º estágio dessa espécie, o preparado ABG -6256 mostrou-se mais eficiente que o preparado fornecido pela BASF à base da mesma bactéria.

Como se pode observar seguindo o mesmo padrão da espécie anterior, L. serricornis também se mostrou mais suscetível ao preparado ABG -6256.

Tenebrio molitor

As larvas de L. molitor avaliadas com o preparado ABG -6256 apresentaram 30% de mortalidade para a concentração mais alta, cerca de 136 horas após a aplicação, não sendo observada mortalidade para a concentração mais baixa.

Quando avaliadas com o preparado fornecido pela BASF, as larvas de Tenebrio molitor apresentaram um baixíssimo

índice de mortalidade (4%), cerca de 320 horas após a aplicação.

Cumpra notar que Krieg et al (1983) isolaram a variedade Tenebrionis e revelaram bom nível de susceptibilidade dessa espécie. No presente trabalho, entretanto, a população de larvas de Ienebrion molitor apresentaram um baixo nível de susceptibilidade, nível esse bem inferior aos obtidos pelos pesquisadores mencionados. Apesar dos baixos índices obtidos, o preparado ABG -6256 se mostrou mais eficiente que o preparado fornecido pela BASF para larvas de Ienebrion molitor.

4.2 Diferenças de patogenicidade de Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis com relação às espécies testadas.

Inicialmente é necessário deixar estabelecido que a autora do presente trabalho, baseada em Krieg et al. (1987a), considera as variedades San Diego e Tenebrionis como sendo idênticas.

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se observar que as larvas de Caracophilus sp mostraram-se as mais susceptíveis entre as espécies estudadas para o preparado da BASF.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que B. thuringiensis var. Tenebrionis é patogênico para as seguintes famílias de coleópteros: Nitidulidae, Cucujidae, Anobiidae e Tenebrionidae. Tais resultados estão em desacordo com Langenbruch (1991), Langenbruch et al. (1985) e Krieg et al. (1987b), que afirmam que a variedade Tenebrionis seria patogênica apenas para crisomelídeos. No entanto, Waib e colaboradores (1989) e Waib (1990) conseguiram demonstrar que a patogenicidade desta variedade de B. thuringiensis também se estendem a outros grupos de insetos. Uma possível explicação para as dife-

rentes respostas de diferentes insetos tratados a variedade *Tenebrionis*, está relacionada a diferenças nos seus intestinos que podem afetar a solubilização do cristal, comprometendo a eficiência da protoxina, sendo que tem sido demonstrado que a baixa susceptibilidade de certos insetos está relacionada à baixa solubilidade dos cristais proteicos (Höfte e Whiteley, 1989). Além disso, muitos estudos tem demonstrado que a interação entre as proteínas tóxicas da bactéria e determinados receptores específicos localizados nas membranas das células intestinais determinam a especificidade do bacilo (Hoffman *et al.*, 1988 a e b; VanRie *et al.*, 1989 e 1990 a e b; Bravo *et al.*, 1992 a e b), o que poderia estar ocorrendo nos insetos avaliados, contudo, análises para receptores das proteínas tóxicas produzidas pelas variedades de *B. thuringiensis* foram reportadas apenas para lepidópteros (Hoffman *et al.*, 1988 a e b; Van Rie *et al.*, 1989, 1990 a e b; Ferré *et al.*, 1991). Não há notícias de estudos relacionados a coleópteros e a dípteros.

Outro fator que pode influir nas diferenças do grau de patogenicidade da variedade *Tenebrionis* com relação às espécies estudadas reside no fato de que os cristais proteicos apresentam um grau de estabilidade que pode variar de um isolado para outro. Também cumpre notar que o suco intestinal das diferentes espécies apresentam fatores específicos de relevante importância para a solubilidade dos cristais e conseqüentemente para a susceptibilidade da espécie (Garcia *et al.*, 1982 e Jaquet *et al.*, 1987).

Outro aspecto a ser notado está relacionado ao tempo relativamente prolongado que os coleópteros tratados com a variedade *Tenebrionis* levam para apresentarem os primeiros sintomas causados pela bactéria. Tal fato pode estar relacionado aos hábitos alimentares dos coleópteros pragas de grãos armazenados. Tal hábito depende da quantidade do complexo esporo-cristal ingerido, o que está intimamente ligado ao desencadeamento da bacteriose. A duração elevada do tempo necessário para desencadear a bacteriose indica que a morte seja devido a uma septicemia, o que está de acordo com os resultados obtidos por Krieg *et al.* (1983, 1984).

Em insetos que morrem por septicemia, a ação do esporo é bastante destacada, pois cristais e esporos juntos são muito mais patogênicos que os cristais sózinhos (Habib e Andrade, 1986). Em 1984 Krieg *et al.* demonstraram que existe participação dos esporos no processo patogênico, uma vez que houve decréscimo da mortalidade dos insetos avaliados ao serem ministrados à sua dieta, esporos inativados pela ação de raios ultravioleta.

Bacillus thuringiensis pode persistir por um longo período em locais fechados, semelhantes àqueles onde os grãos são estocados, sendo possível, inclusive, a ocorrência de epizootias nesse tipo de ambiente (Aronson *et al.*, 1986). Tal fato também poderia vir a ocorrer com a variedade *Tenebrionis* em populações de coleópteros pragas de farinhas ou grãos.

4.3 Sintomatologia Externa

A sintomatologia da bacteriose provocada por Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis observada entre os insetos no presente trabalho, seguiram padrões semelhantes àquela causada pela variedade Kurstaki em Anagasta kuhniella. Foram observadas no entanto, diferenças no que se refere ao tempo necessário para o aparecimento dos sintomas e desencadeamento da doença com relação às duas variedades. No caso da variedade Tenebrionis o tempo gasto foi sensivelmente mais longo que o observado para a variedade Kurstaki (Habib, 1982; Habib e Andrade, 1984, 1986) o mesmo fenômeno foi notado por Waib (1992). Também foram constatadas diferenças sintomatológicas entre adultos e larvas de L. molitor tratados com a mesma bactéria; e que será abordado no presente trabalho..

Com relação às larvas de Carpophilus sp, o primeiro sintoma detectado, a lentidão dos movimentos, aparecia no mínimo por volta de 36 horas após a aplicação. Essa alteração dos movimentos ia se acentuando por um período de 12 horas após o que seguia-se a morte. O corpo dessas larvas não apresentava quaisquer sinais de flacidez como sintoma pré-mortal..

Entre 6 e 8 horas após o aparecimento dos primeiros sintomas, as larvas em geral começavam a curvar o cor-



Figura 2- Sequência dos sintomas apresentados pelas larvas de Carocaulus ao serem tratadas com Bacillus thuringiensis var Tenebrionis.

A grande maioria das pré-pupas obtidas de larvas submetidas à ação da bactéria (80%), morriam após uma ecdise parcial ficando a cápsula cefálica bem destacada da cabeça e apresentando restos de exúvia larval presos na extremidade posterior do abdomen . As pré-pupas mortas observadas, apresentavam ressecamento e escurecimento do tegumento.

Quase todas as pupas oriundas de larvas infectadas, morreram cerca de 96 horas (4 dias), obviamente sem alcançar o estágio adulto. Tais pupas apresentavam inicialmente a mesma coloração branco leitosa comum em pupas sadias. Contudo, uma depressão na região dorsal mediana era evidente no abdomen. Nesse caso, é provável que os tecidos internos sofriam mal formação em graus variáveis, que poderiam ter levado à morte a maioria dessas pupas. Apenas 5% chegaram ao estágio adulto, porém com morte precoce e sem reprodução. As pupas doentes apresentavam o mesmo tamanho que as pupas da testemunha e ao final de 96 horas morriam apresentando ressecamento do tegumento.

Foram observados deslocamentos dos olhos. Enquanto que nas pupas não tratadas os olhos localizam-se nas laterais da cabeça; nas pupas submetidas a ação da bactéria, foram detectados olhos localizados no topo da cabeça, mais acima do aparelho bucal, ou ainda localizados na região frontal da cabeça, muito próximos entre si e acima do aparelho bucal. Também foram constatadas pupas com olhos rudimentares ou mesmo ausentes.

O aparelho bucal também foi afetado, sendo constatadas compactações ou até atrofias de seus componentes, formando massas disformes. Atrofia acentuada, e mesmo deformação total de aparelho bucal também foram observados.

Os apêndices torácicos: pernas e asas, apresentavam comprometimento, sendo constatadas as presenças dessas estruturas em tamanho bastante reduzido. Foram registradas ainda pupas com um grau de deformações tão acentuado que se tornou impossível distinguir quaisquer estruturas.

Das pupas obtidas, 47.6% eram aparentemente normais; dessas só emergiram 68.6% de adultos, que eram morfológicamente normais. Esses adultos foram separados e mantidos em dieta sem tratamento. Esses adultos apresentavam mais lentos que os adultos da testemunha. Também deve ser mencionado o fato de que enquanto os élitros podia estar fechados ou parcialmente abertos, o segundo par de asas encontrava-se geralmente desdobrado e exposto, também entraberto. Ao contrário dos adultos cujas larvas foram tratadas, esses não voavam. Esse fato sugere que o bacilo possa ter agido sobre o sistema neuro muscular do inseto. Tal ação sobre esse sistema pode ser observadas em insetos submetidos a outras variedades de B. thuringiensis (Habib, 1982, 1983). Desses adultos obtidos, 43.5% morreram 18 horas após terem emergido e 11.7% morreram 192 horas após emergire, sendo que os adultos restantes sobreviveram por mais de 10 dias. Não houve acasalamento nem oviposição nem por parte desses adultos, fato

pela bacteriose. Das pupas obtidas, 34.7% apresentavam má formação pouco acentuadas. Dessas, 5.4% obtiveram adultos com morfologia externa normal e que sobreviveram por um período de 24 horas sem êxito na reprodução, os outros 94.6% não chegaram a emergir. As pupas restantes (17.7%) apresentavam-se totalmente deformes, não originando quaisquer adultos.

Esse tipo de resultado constatado tanto nas pupas quanto nos adultos poderia ser explicado com base no fato de que em Carpophilus sp, uma das porções do intestino médio das larvas é incorporada no tubo intestinal dos adultos (Crowson, 1981), o que tornaria possível a transferência de esporos, cristais e formas vegetativas da bactéria, propiciando uma continuidade da ação patogênica de E. thuringiensis dentro do hospedeiro adulto.

Com relação às larvas de L. serricornis, a lentidão dos movimentos foi o aspecto mais visível e suas respostas ao toque eram bastante raras. Um dos sintomas clássicos da infecção por E. thuringiensis é o escurecimento do tegumento, que se inicia na fase pré-mortal do processo da bacteriose. Tal processo é bastante visível em larvas de algumas espécies de lepidópteros submetidas ao tratamento com a variedade Kurstaki (Habib, 1982)). No caso de L. serricornis tratados com a variedade Tenebrionis, o escurecimento do tegumento a partir da região mediana do corpo não foi observado na fase pré-mortal. A ausência de mudanças na coloração do tegumento dos insetos tratados com a va-

riedade *Tenebrionis* também foi observada por Waib (1992) para essa mesma espécie.

Os sintomas pós-mortais observados foram o escurecimento do tegumento até atingir fortíssima coloração preta e flacidez do corpo, seguida de ressecamento do mesmo. Tais sintomas seguem o mesmo padrão daqueles observados para *Carborhilus* sp.

No caso de *I. molitor*, as larvas tratadas apresentaram certa lentidão de movimentos cerca de 300 horas após a aplicação, contudo essa lentidão não evoluiu como geralmente acontece com os insetos tratados com a bactéria; o mesmo foi observado para estimulação pelo toque. Também não foram observadas mudanças de coloração, talvez devido à pigmentação naturalmente escura do tegumento dessas larvas; o mais provável, em vista do que se observou com relação aos sintomas é que provavelmente não tenha havido mudanças na coloração dos insetos tratados.

Essas larvas empuparam de maneira normal. As pupas obtidas apresentavam morfologia externa semelhante à das pupas normais da testemunha. Dessas pupas foram obtidos adultos (machos e fêmeas), que foram separados e colocados em dieta apropriada, completando seu ciclo biológico de maneira normal, chegando, inclusive a se reproduzir.

Esses dados revelam que I. molitor foi relativamente menos susceptível que as demais espécies estudadas

Nos adultos cujas larvas foram tratadas com uma concentração maior, de 1:5, pode-se observar que os sintomas começam a se intensificar e pode-se notar uma certa lentidão nos movimentos dos insetos que perderam bastante de sua agilidade natural, apresentando locomoção lenta e sem movimentos espontâneos; o aparelho bucal e membros locomotores reagem apenas por estimulação mecânica.

4.4. Ensaio para os estudos de histopatologia

O interesse nessa parte do trabalho é observar a evolução dos sintomas da bacteriose nos órgãos internos, bem como as alterações histológicas à nível microscópico. Em vista disso, foi escolhida entre as espécies estudadas, aquela cuja estrutura facilitasse as observações, o que não significa que o inseto escolhido apresente o maior grau de susceptibilidade. Baseado nesses critérios, a espécie escolhida foi Janebrino molitor.

Para os ensaios de histopatologia em adultos, a bactéria foi aplicada na dieta de larvas de 3º estágio de I. molitor na proporção de 1:5. Esta dose relativamente forte foi necessária para o desencadeamento da bacteriose.

Num primeiro teste, os adultos obtidos de larvas tratadas continuaram a ser submetidos a essa mesma dieta. Foram tratadas 150 larvas.

No segundo teste, foram tratadas 70 larvas e os adultos emergidos receberam dieta normal sem qualquer tratamento.

Assim como nos ensaios preliminares, também naqueles destinados à histopatologia, as larvas submetidas ao primeiro teste não apresentavam facilmente sintomas externos, não sendo constatadas mudanças na coloração. Quanto às mudanças comportamentais, mais uma vez foram constatadas reações lentas ao toque, mas em nível mais baixo que o de outras espécies submetidas à ação da bactéria. O período de duração dos estádios larvais também não foi afetado, durando em média 2 meses cada, considerado normal para essa espécie (Gallo *et al.*, 1988). Não ocorreu qualquer mortalidade no estágio de larva para os indivíduos tratados.

As pupas originadas dessas larvas não apresentaram alterações aparentes em sua morfologia externa. Foram realizadas medições de peso e comprimento nas pupas submetidas à ação da bactéria e os dados se encontram na Tabela 1. Através de análises estatísticas, encontrou-se $t = 1.55$, o que significa que para 90 graus de liberdade e 95% de probabilidade, não existe diferença significativa entre as pupas saudáveis e as pupas infectadas com relação ao peso e comprimento. A duração do período de pupa também não se mostrou alterada nos indivíduos provenientes de larvas infectadas, levando em média dois meses.

A maior parte dos adultos provenientes dessas pupas, sobreviveram no máximo 72 horas no teste preliminar, ao contrário de Carapophilus sp.

4.0 Resultados e discussão

4.1 Ensaio de susceptibilidade

No início dos trabalhos da presente tese foi necessária a realização de bioensaios preliminares com a finalidade de se descobrir espécies susceptíveis à bactéria, para que a partir dos resultados obtidos se pudesse estabelecer com segurança quais espécies seriam escolhidas para observação das alterações patológicas à nível externo e histológico.

É necessário deixar claro que a finalidade do presente trabalho não é estabelecer comparações à nível de susceptibilidade das espécies testadas ou qual dos preparados à base da bactéria é o mais eficiente, de modo que não houve muito aprofundamento no que se refere a essas questões.

Carpophilus sp

As larvas de Carpophilus sp tratadas apresentaram índice de mortalidade de 82% em 120 horas de tratamento para

TABELA 1: Valores biométricos para pupas de *L. molitor* obtidas de larvas tratadas por *B. thuringsiensis* var. *Tenebrionis*.

n=150	CONTROLE		TRATAMENTO	
	Peso(mg)	Comp. (cm)	Peso(mg)	Comp. (cm)
X	149	1,62	138	1,46
DP	299	0,15	135	0,08
Max.	197	2,00	1070	1,70
Min.	110	1,00	102	1,20

X²=ns (p=0,05)

Waib (1992) também não constatou mortalidade entre as larvas de I. molitor submetidas à ação da bactéria na concentração de 1:10, proveniente da mesma amostra utilizada no presente trabalho, contudo, 340 horas após a aplicação as larvas passavam a apresentar sintomas típicos da bacteriose. No presente trabalho no entanto, as larvas de I. molitor não apresentaram quaisquer sintomas para a mesma concentração do patógeno ou mesmo para concentrações mais altas (1:5), chegando a atingir o estágio adulto.

Os adultos obtidos das pupas cujas larvas foram tratadas, receberam dieta tratada na mesma concentração e serviram aos estudos de histopatologia.

Dos adultos obtidos no segundo teste, dois lotes de 20 indivíduos foram separados 24 e 48 horas após terem emergido e submetidos à cortes histológicos para observação do aparelho digestivo. Os resultados obtidos mostraram que as estruturas observadas estavam perfeitamente normais, o que sugere que a infecção e morte observados anteriormente nos adultos sujeitos à dieta tratada, foi resultado da ingestão da bactéria enquanto adultos.

4.5 Biensaios com adultos submetidos diretamente à ação de B. thuringiensis var Tenebrionis.

Uma vez que os resultados das investigações realizadas nesse trabalho levam a crer que a ação da bactéria nos adultos de L. molitor parece ser independente da infecção nas larvas, 50 adultos foram diretamente submetidos à ação do patógeno, que foi misturado à dieta na proporção de 1:5.

Os resultados obtidos com esses adultos foram semelhantes àqueles obtidos com larvas submetidas à ação do patógeno e mantidos em dieta contaminada.

Com relação à sintomas externos, estes adultos mostravam certa lentidão nas respostas à estímulos de toque em seus membros locomotores, permanecendo parados sobre a dieta, facto que contrasta com o comportamento dos adultos da testemunha, que passam grande parte do tempo se movimentando.

Os cortes histológicos realizados 24, 48 e 60 horas após a aplicação, mostraram os mesmos sintomas já descritos nesse trabalho para adultos de L. molitor: inchaço e alterações nucleares nas células epiteliais do intestino médio e posterior, ruptura das células com consequente extravasamento do conteúdo no

lúmen intestinal, onde também foram observados restos de alimento não digerido, rompimento das microvilosidades, dissociação das camadas musculares e danos nos túbulos de Malpighi.

Tais resultados são de total concordância com a hipótese de que os adultos de I. molitor são susceptíveis à bactéria independente de serem ou não submetidas à ação do patógeno enquanto larvas.

O fato de uma mesma espécie apresentar diferenças de susceptibilidade entre os estágios larvais e o estágio adulto, também foi demonstrada em trabalhos por Hough-Goldstein et al. (1991), onde Lentiniotarsa deacemlineata submetida à variedade San Diego mostrava-se susceptível apenas no estágio larval.

4.6 Anatomia interna de Lentiniotarsa molitor

Nos adultos de I. molitor, o tubo digestivo consiste nas seguintes partes (Figura 3):

a-) Estomodeu

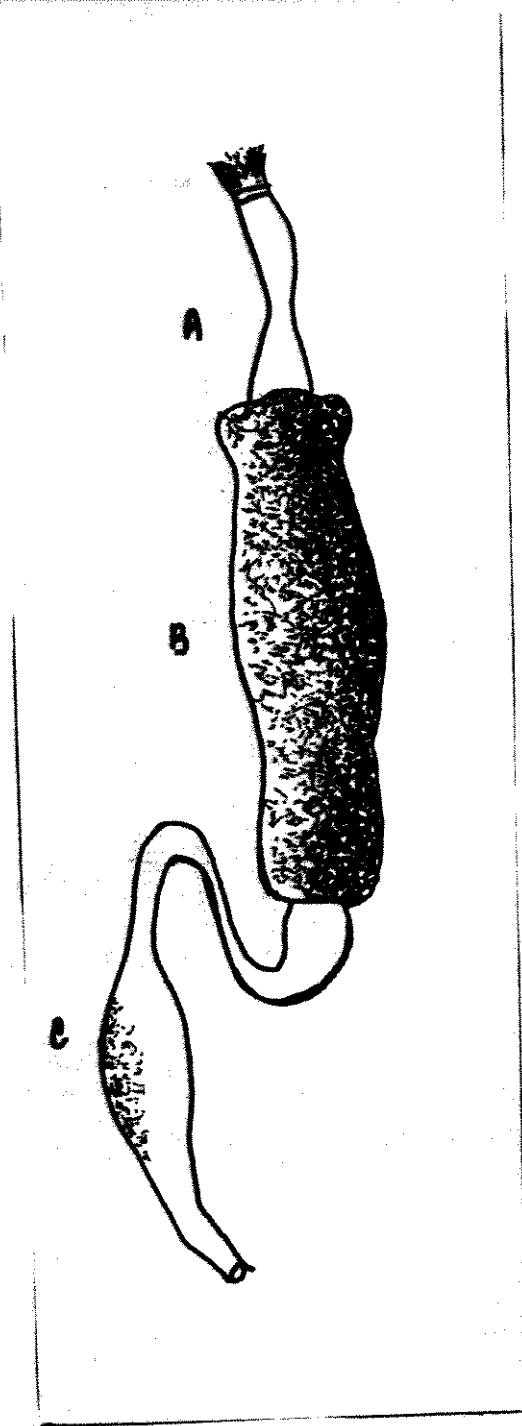


Figura 3- Aparelho digestivo de adulto de Tenebrio molitor.
A: Estomodeu; B: Mesentero; C: Proctodeu.

Consiste na cavidade bucal, faringe, esôfago e proventriculo. A cavidade bucal, espaço localizado atrás do aparelho bucal, termina logo no início da faringe, a qual leva até o esôfago, normalmente estreito, mas que se expande próximo ao proventriculo. Este consiste de porção achatada ao final do estomodeu.

b-) Mesentero

Inicia-se na valvula cárdia, a qual é seguida por uma porção constricta que se dilata em uma porção mais larga do trato digestivo, com aproximadamente três vezes o tamanho do estomodeu.

c-) Proctodeu

Consiste-se do intestino posterior. Na junção do mesentero com o proctodeu existe uma válvula pilórica. O íleo é mais estreito que o cólon, especialmente na região da válvula retal.

O intestino posterior é mais largo na sua porção anterior (onde a válvula retal está localizada, próxima ao reto). Posteriormente ele se estreita até terminar no ânus.

A nível histológico, o epitélio do intestino médio é composto de células colunares, caliciformes e células re-generativas de aparência distinta (Fig 4).

As células colunares apresentam núcleo na re-gião basal e microvilosidades na região apical, voltadas para o lúmen.

O mesentero é revestido internamente por uma fina membrana peritrófica, sendo que as células se encontram ar-ranjadas sobre uma membrana basal.

A musculatura do intestino médio compreende fibras longitudinais localizadas externamente e fibras circulares internamente.

d- Tubulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi são em número de seis e se encontram soltos na cavidade abdominal e metatorácica. O colon possui uma camada externa, a qual apresenta túbulos em zig zag que representam as porções distais dos túbulos de Malpighi. Elas se ligam na porção posterior do colon, mas unidos anterior-mente para formar um único túbulo. Este emerge da porção anterior e posteriormente retornam entre o colon e o íleo, subdivididos em

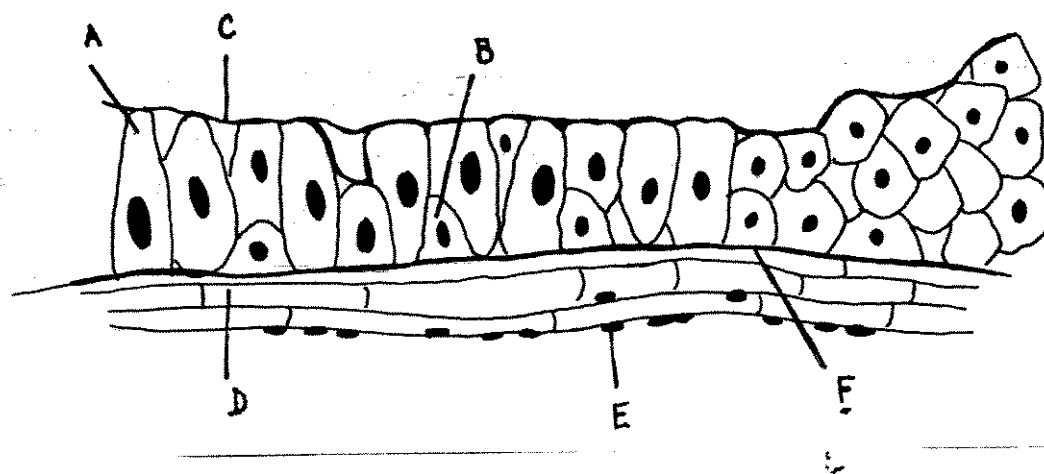


Figura 4- Esquema de corte histológico de intestino médio de adulto de *Tenebrio molitor*. A: Células colunares; B: Células regenerativas; C: Membrana Peritrófica; D: Musculatura longitudinal; E: Musculatura circular; F: Membrana Basal.

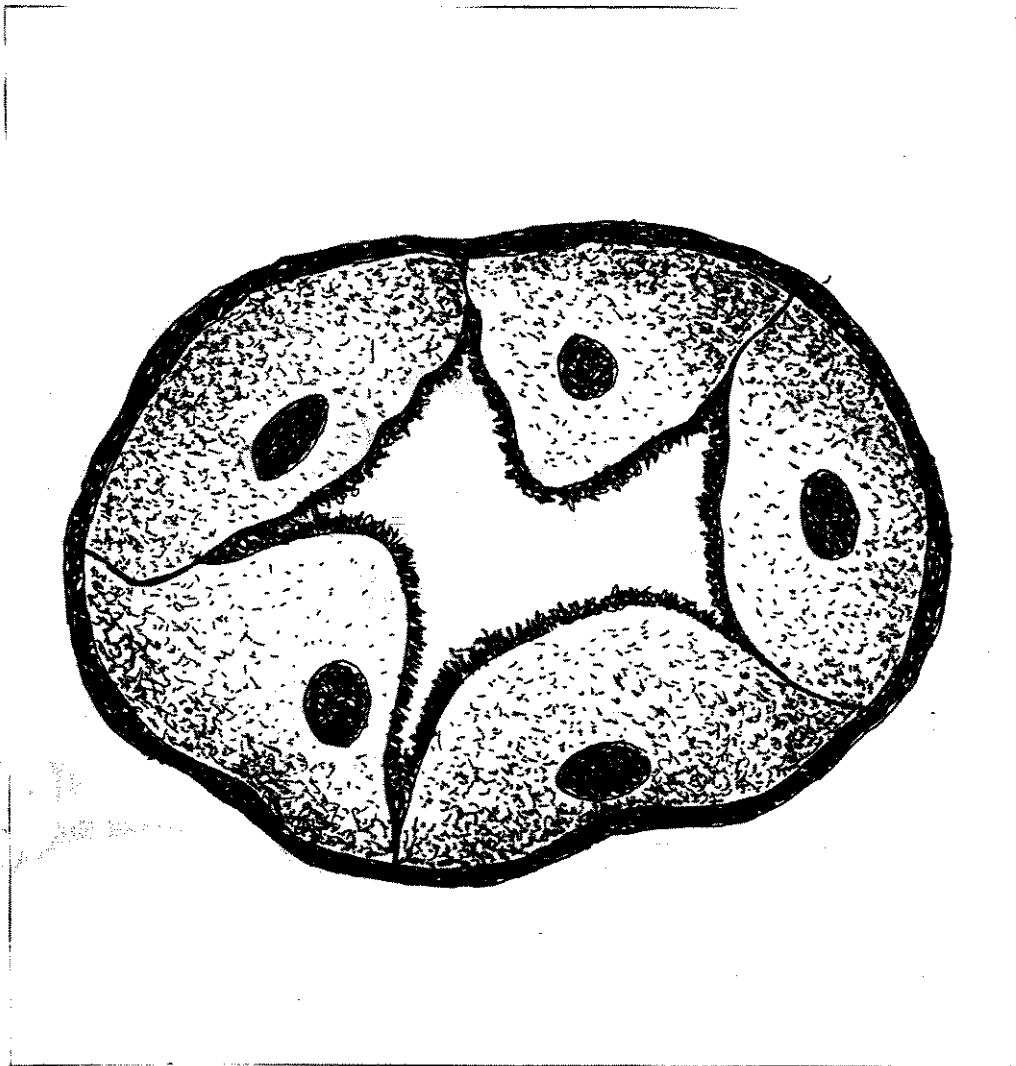


Figure 5- Esquema de corte histológico do tubo de Malpighi de adulto de *Tenebrio molitor*.

dois braços e cada um desses, por sua vez, se divide em mais três túbulos. Os seis túbulos resultantes seguem anteriormente nas cavidades abdominal e metatorácica, mas finalmente voltam para o vazão na válvula pilórica. Em seu curso principal, eles estão associados ao mesentérico.

Histologicamente, os túbulos de Malpighi são envolvidos por uma membrana peritoneal. Cortes transversais mostram de 5 a 8 células epiteliais com citoplasma homogêneo. Essas células se unem numa membrana basal e suas bordas internas apresentam longos filamentos citoplasmáticos. As bordas externas dos túbulos são providas de finas fibras musculares (Figure 5).

4.7 Histopatologia de canal alimentar e tubulos de Malpighi de I. molitor

A sequência temporal dos sintomas em adultos de I. molitor, bem como seu nível anatômica dos órgãos dissecados foram registrados a partir das primeiras 24 horas após a emergência dos adultos. Nesse período, o inseto parece normal em todos os aspectos, incluindo movimentos das partes bucais. O epitélio intestinal apresentava algumas regiões com células epiteliais normais, e outras com algumas alterações. Nas células afetadas foram encontradas grandes quantidades de núcleos em cariorrexis; também foi constatado leve início de condensação anormal de cromatina, que ainda continuava relativamente espalhada pelo núcleo. Tal fato coincide com as observações de Habib (1982) para larvas de Anagasta kuehniella e Alabama argillacea.

No citoplasma de algumas células epiteliais, pode-se notar uma vacuolização incipiente, as demais células apresentavam citoplasma normal.

Foi registrada a presença de alimento não digerido na luz intestinal. Esse fato pode ser resultado de se fixar o animal em atividades normais de alimentação, apesar de infectado, como também pode indicar uma parada nas atividades di-

gestivas.

Bauer e Pankratz (1991) estudando a variedade San Diego em Chrysomela auripes, constataram alterações semelhantes às apresentadas nesse trabalho, contudo, o tempo necessário para o aparecimento dos primeiros sintomas (três horas) foi menor que o tempo necessário para I. molitor (24 horas). Esse fato pode estar relacionado ao inseto utilizado nesse estudo, bem como a variedade da bactéria usada. Cumpre notar ainda as diferenças existentes entre o tempo de aparecimento dos sintomas registrados nesse trabalho, o qual foi bastante longo, e o tempo gasto pela variedade Kurataki em larvas de Bombyx mori e pela variedade Israelense em larvas de Aedes aegypti (Percy e Fast, 1983; Lahkim-Teror et al., 1982).

Com relação aos túbulos de Malpighi, as células dos adultos testados apresentavam-se similares às células dos adultos não expostos à bactéria, com a exceção da presença de pequenos e difusos vacúolos citoplasmáticos no primeiro caso.

As alterações histológicas 36 horas após a infecção, mostraram-se semelhantes às avaliações 48 horas após.

As células epiteliais do intestino apareceram normais em algumas regiões do intestino médio e posterior. Quanto aos núcleos, foram observados vários graus de condensação anormal

da cromatina (Figuras 6 e 7). A nível de citoplasma, 36 horas após a emergência dos adultos notou-se grande número de pequenos vacúolos por vezes unidos formando vacúolos maiores (Figura 8). Mais tarde o conteúdo dessas células acabaram sofrendo autólise. A vacuolização do citoplasma foi verificada nas células epiteliais. Os núcleos de algumas células do epitélio, que normalmente se encontram localizados na região basal da célula migram para a região apical. Pode-se notar um aumento de volume, a princípio na região apical da célula e posteriormente atingindo toda a célula.

Cortes histológicos corados com PAS revelaram a presença de grande número de grãos de glicogênio.

No intestino médio, percebe-se a destruição parcial da membrana peritrófica e da membrana basal, bem como a separação das células epiteliais da membrana basal em algumas regiões do epitélio.

Ainda nessa etapa de 48 horas após a emergência de adultos sujeitos à aplicação, são encontrados na luz do aparelho digestivo, células degeneradas com núcleos em diversos graus de comprometimento: picnose, cariólise, e cariorrexis (Figura 9). Alguns núcleos apresentam ruptura na carioteca e extravasamento do conteúdo nuclear no citoplasma da célula. Como a digestão e absorção ocorram diretamente no intestino médio, isso explica as alterações mais evidenciadas nessa região.

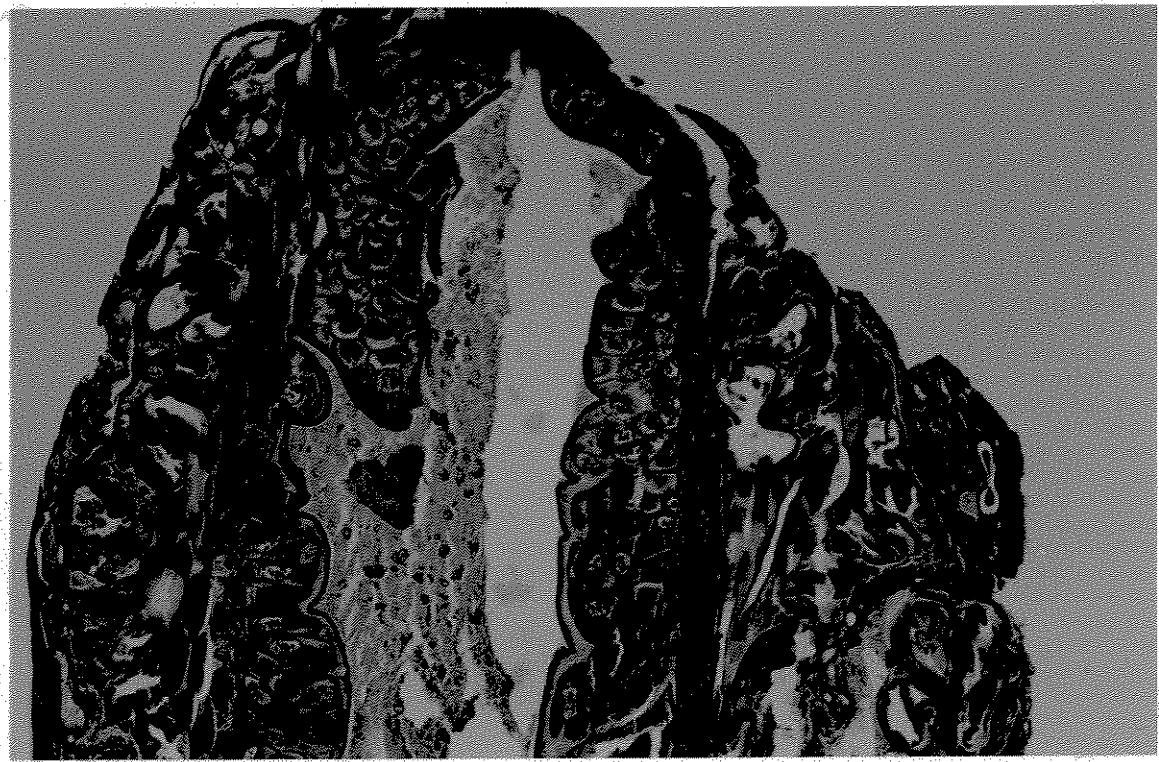


Figura 6- Foto de intestino posterior de adulta de Tenebrio molitor tratado com R. thuringiensis var. Tenebrionis após 36 horas, apresentando núcleos com vários graus de anomalias.



Figura 7 - Detalhe de células do epitélio intestinal posterior de adultos de I. molitor tratados com R. thuringiensis var. Tenebrionis após 36 horas apresentando diversos graus de anomalias



Figura 8- Células do epitélio intestinal médio de adultos de I. molitor tratados com E. thuringiensis var. Tenebrionis e após 36 horas, apresentando extensa vacuolização do citoplasma.

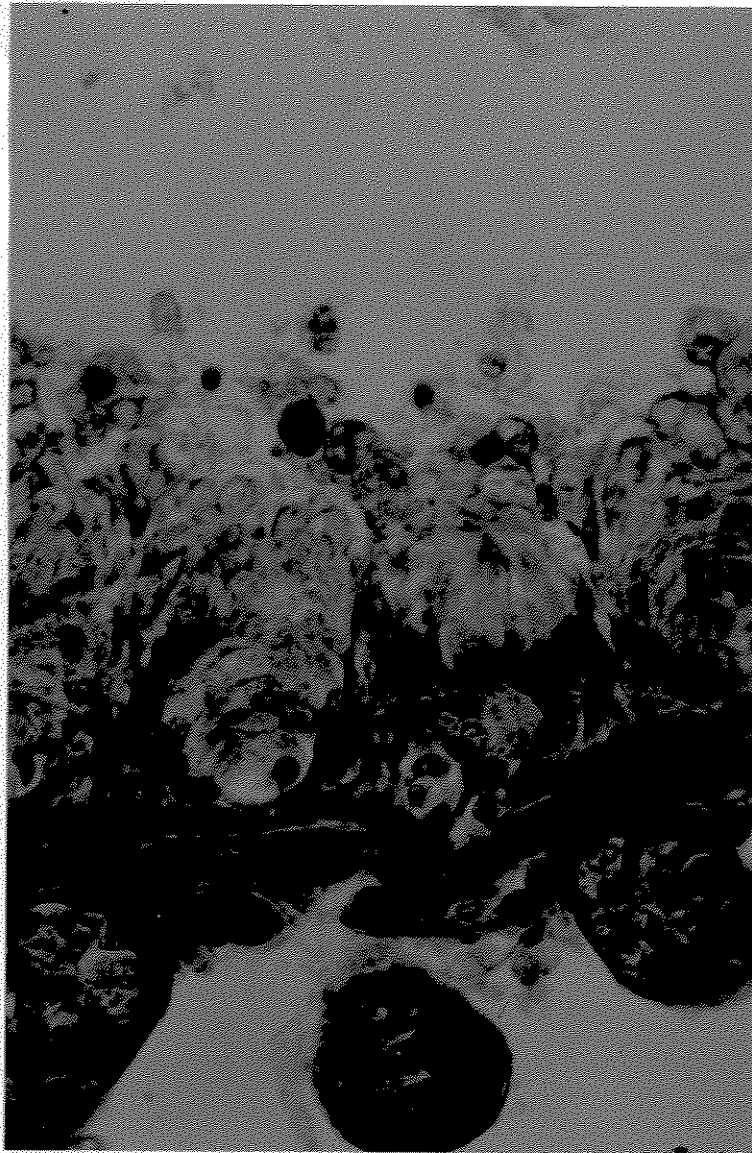


Figura 9- Presença de células com núcleos em cariorrex no interior do lúmen intestinal médio de adultos de *I. molitor* tratados com *B. thuringiensis* var. *Tenebrionis* após 48 horas

Foi detectado o desaparecimento das microvilosidades de algumas células epiteliais, o que poderia ser explicado como consequência do inchaço das mesmas (Spies e Spence, 1985).

Mathavan *et al.* (1989) acreditam que como as células epiteliais do intestino médio sintetizam enzimas que são lançadas no lúmen facilitando a digestão, a toxina agindo à nível de RNA causaria um decréscimo na produção de enzimas, o que seria um motivo para a não digestão dos alimentos encontrados no lúmen intestinal do inseto. A hipótese desses pesquisadores pode fortalecer a segunda possibilidade revelada nesse trabalho, no que se refere à parada das atividades digestivas e a presença de alimentos não digeridos no tubo digestivo.

Ainda no lúmen, misturados ao alimento, são detectados restos de células ou mesmo fragmentos desse epitélio intestinal misturado ao alimento não digerido. Também nesse conteúdo é possível se observar núcleos com diferentes graus de anomalias (Figura 9).

Certas regiões do tecido muscular apresentavam fibras em diferentes graus de dissociação (Figura 10).

Com relação aos túbulos de Malpighi, notou-se nessa etapa de 48 horas, um aumento nos vacúolos no citoplasma, que se apresentavam numerosos na região basal. As microvilosida-

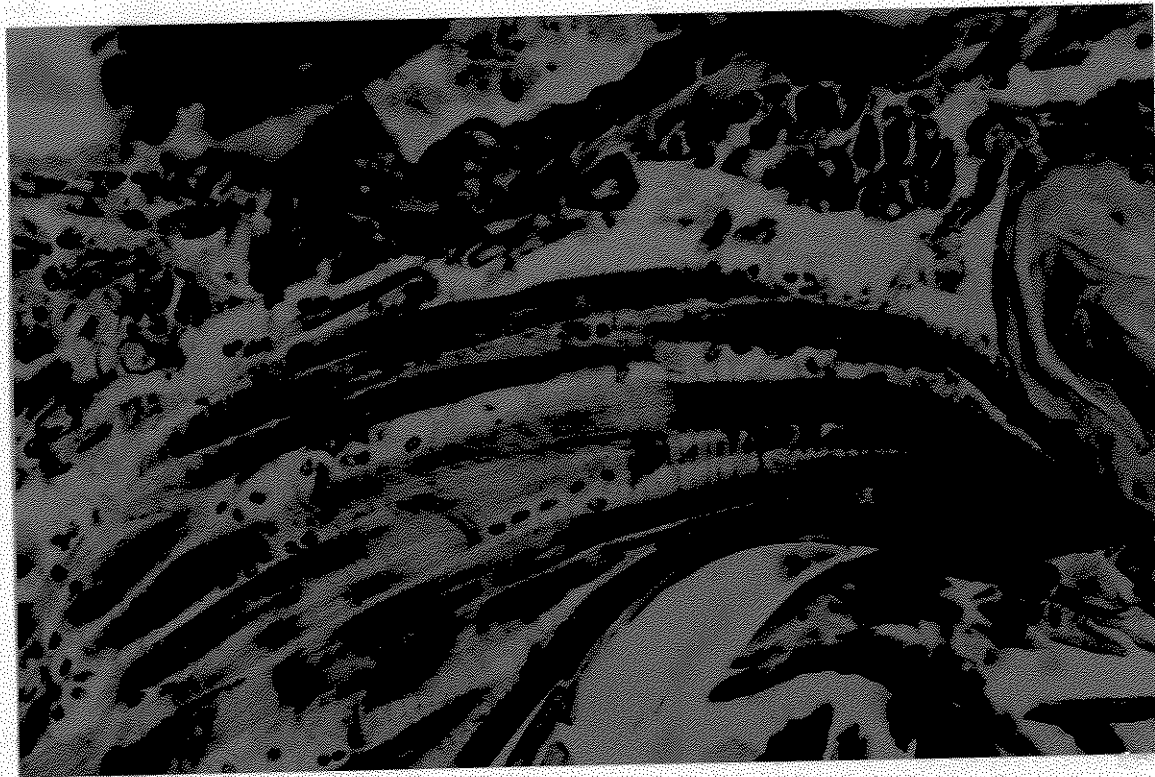


Figura 10- Fibras musculares em adultos de I. molitor de larvas tratadas com E. thuringiensis var. Tenebrionis, após 48 horas, apresentando diferentes graus de dissociação

des mostram indícios de desorganização e em algumas células, a membrana apical mostra-se rompida, o que pode indicar que algumas células sofreram mais a ação das toxinas do que outras. Em todos os casos, o citoplasma das células perdeu a sua homogeneidade (Figura 11). Tais observações estão de acordo com os resultados obtidos por Reiner *et al.*, 1989; Madrell *et al.*, 1988 e Ryerse *et al.*, 1990.

Em termos de tecido adiposo, poucas alterações foram verificadas, desse destacaram-se a degeneração parcial da membrana conectiva e de algumas paredes celulares, além da condensação da cromatina (Figura 11).

Sessenta horas após a emergência o epitélio do intestino médio se encontra bastante degenerado, com o conteúdo das células espalhados pela luz intestinal (Figuras 12, 13).

Pode-se encontrar várias regiões da musculatura dissociadas como efeito secundário da septicemia.

Com relação aos túbulos de Malpighi, as alterações citológicas são mais severas que as observadas anteriormente, envolvendo extensiva desorganização nas estruturas celulares com um aumento na vacuolização do citoplasma e rompimento da membrana apical (Figuras 14 e 15).



Figura. 11- Tecido adiposo de adulto de T. molitor 48 horas após a emergência, tratado com B. thuringiensis var. Tenebrionis apresentando degeneração da membrana conectiva e de algumas paredes celulares.

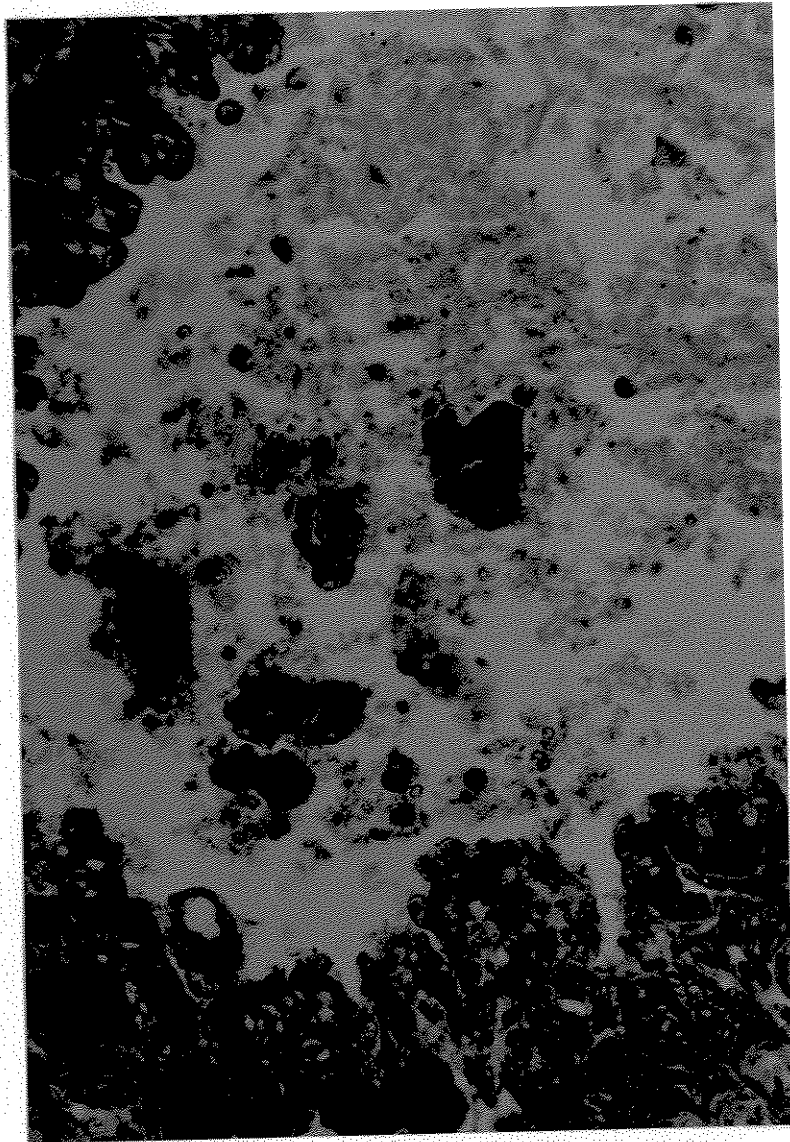


Figura 12- Intestino médio em adição de T. malian de larvas tratadas com B. thuringiensis var. Tenebrionis 60 horas após, apresentando pedaços de epitélio intestinal misturados à alimento não digerido

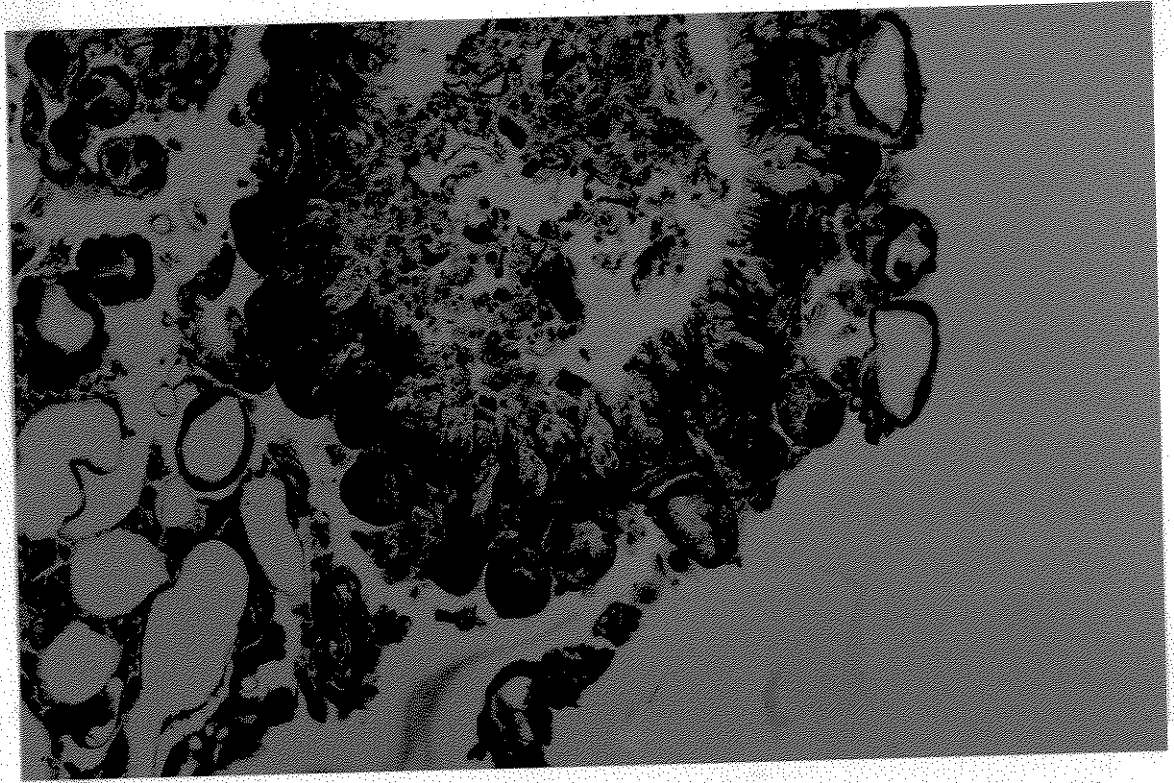


Figura 13- Epitélio intestinal em adultos de T. molitor de larvas tratadas com B. thuringiensis var. tenebrionis 60 horas após, apresentando alto grau de degeneração.

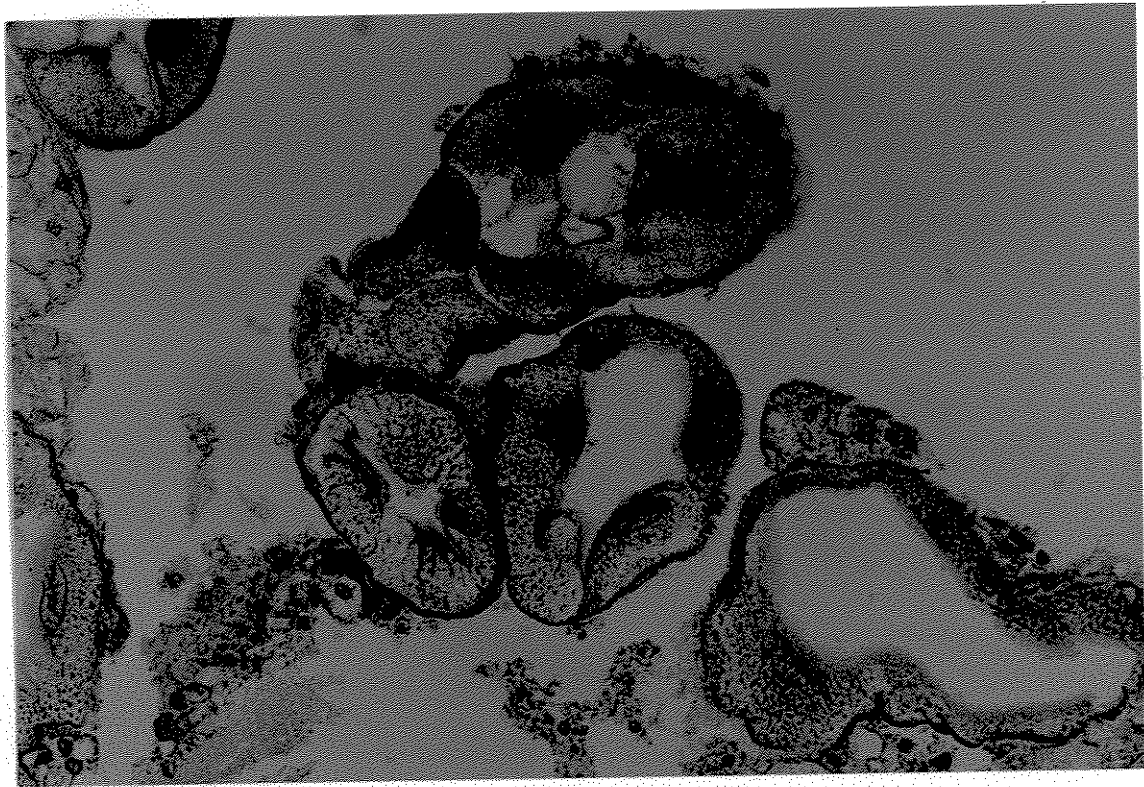


Figura 14- Células dos tubulos de Malpighia em adulto de *I. mali-tor* de larvas tratadas com *E. thuringiensis* var. *Tenebrionis* 60 horas após, apresentando vacuolização do citoplasma e rompimento de microvilosidades.

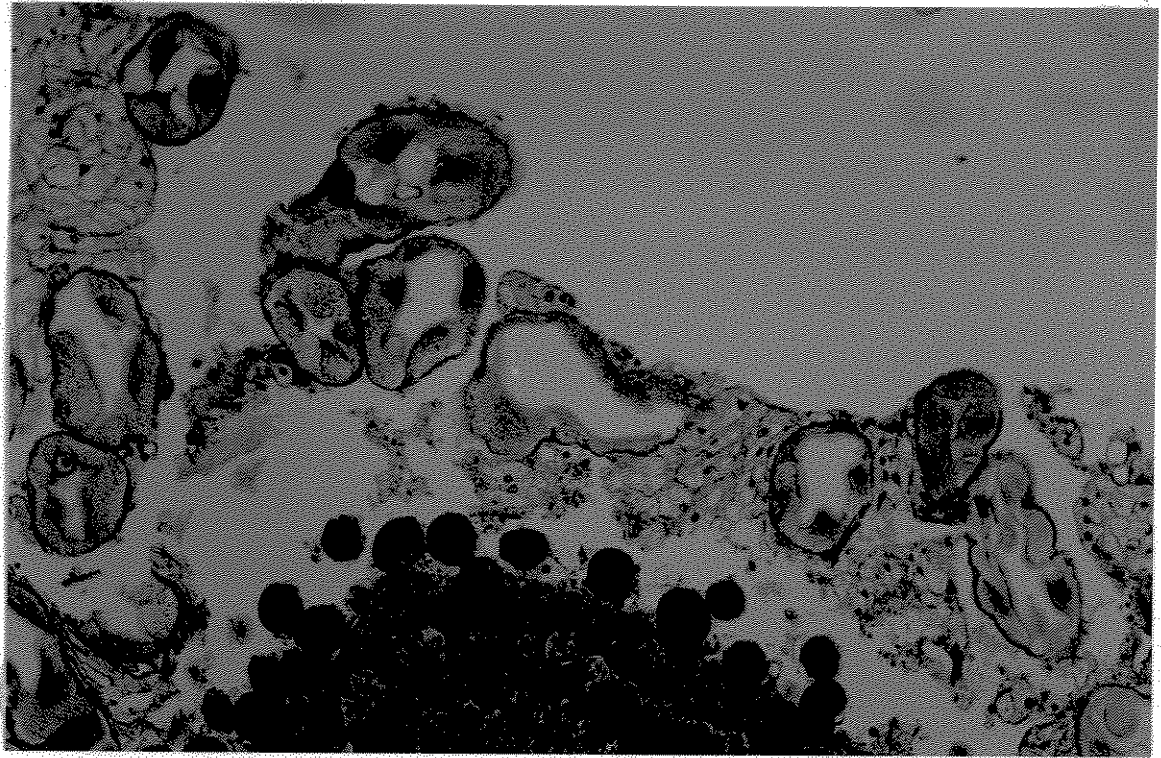


Figura 15- Células dos tubulos de Malpighi em adultos de *L. maritima* de larvas tratadas com *B. chilangensis* var. *Tenebrionis* apresentando vacuolização do citoplasma.

Nos indivíduos mortos de L. molitor, a configuração dos órgãos internos está de tal modo alterada, que se torna praticamente impossível a confecção de cortes histológicos para alterações pós-mortais.

Os órgãos internos adquirem textura pastosa, de coloração marrom escura e forte odor. Estrepações realizadas com esse material e coradas com Giemsa, revelaram a presença da bactéria.

As alterações histológicas observadas no presente trabalho no epitélio intestinal causadas por E. thurinae são similares às aquelas reportadas para outros coleópteros estudados por Kries *et al.* (1983) com a mesma variedade e por Bauer e Pankratz (1991) com a variedade San Diego.

As alterações descritas por Kries *et al.* (1983) também compreendem inchaco das células epiteliais, presença de espaços citoplasmáticos, restos de alimentos no lúmen intestinal e vacúolos típicos de células que estão fadadas a morrer.

De acordo com Bauer e Pankratz (1991), a ruptura das estruturas citoplasmáticas poderiam ser resultado da expansão apical das células afetadas. Os mesmos autores sugerem que a presença de bactérias em estado vegetativo, demonstram

que o intestino oferece condições adequadas para o desenvolvimento da bacteriose.

Os sintomas de inchaço e lise celular são consistentes com aqueles descritos para a variedade *Kurstaki* em lepidópteros susceptíveis (Ebersold *et al.*, 1977; Endo e Nishitsutsuji-Uwo, 1980; Nishitsutsuji-Uwo e Endo, 1980; Percy e Fast, 1983; Chiang *et al.*, 1986 e Ryerse *et al.*, 1990) ou para simuliídeos pela linhagem HD-255 ou HD-261 (Lacey e Federici, 1979). As observações desse trabalho diferem dos estudos desses autores principalmente no que se refere à velocidade dos primeiros sintomas. *E. thuringiensis* var. *Tenebrionis* foi bastante mais lenta que a variedade *Kurstaki*.

Inchaço celular causado por *E. thuringiensis* var. *Tenebrionis* antes da lise celular, parece consistente com o mecanismo de ação da δ -endotoxina proposto por Knowles e Ellar (1987) para *E. thuringiensis*. Eles descrevem um modelo no qual a δ -endotoxina ativada, se liga a um receptor na membrana plasmática, formando poros. A presença desses poros, leva a um desequilíbrio através da membrana, resultando em um influxo de íons e acúmulo de água, o que causaria inchaço e lise das células. No entanto, as respostas comparativamente lentas das células epiteliais dos intestinos tratados com a variedade *Tenebrionis*, sugerem que algumas diferenças no mecanismo de ativação devem existir.

A lentidão da bacteriose em *L. molitor* pode ter alguma relação com as características da δ - endotoxina, principalmente o seu peso molecular e a capacidade de absorção das microvilosidades do intestino médio dessa espécie, isto é, o grau da afinidade citoquímica.

Em outras palavras, esse processo pode resultar de variações no ambiente intestinal do hospedeiro, solubilidade do cristal, a bioquímica da toxina e a interação da toxina com os receptores de membrana.

Um fato interessante foi apontado por Percy e Fast (1983) em seus trabalhos com *E. thuringiensis*, principalmente no que se refere ao inchaço, desintegração de microvilosidades e necrose das células afetadas pela ação do patógeno. Segundo os autores citados, tais sintomas seriam idênticos às alterações causadas pela ingestão de determinadas substâncias químicas tóxicas administradas em fígado de ratos, o que poderia indicar que os danos e posterior necrose das células tratadas com a endotoxina de *E. thuringiensis* não seriam atribuídos à uma específica ação tóxica do cristal proteico.

Células danificadas são frequentemente detectadas próximas à células sadias. Tal fato, também observado por Mathavan *et al.* (1989), sugere que o contato direto com célula é provavelmente necessário para o desencadeamento dos sintomas, não ocorrendo difusão lateral intercelular. Fast *et al.* (1978) apresentaram evidências indiretas de que a toxina atua diretamen-

te na superfície celular, sendo que a ação da toxina nas membranas celulares é coerente com todos os dados de modo de ação estudados.

A ação da toxina nas microvilosidades, causando a sua disruptura, poderia ser explicada por reduções nas concentrações de íons K^+ (Griego *et al.*, 1979b; Percy e Fast, 1983; Gupta *et al.*, 1985; Hofmann *et al.*, 1988 e Lane *et al.*, 1989). Contudo, Fast e Morrison (1972) não detectaram mudanças nas concentrações de K^+ em larvas de *E. mori* tratadas por *E. thuringiensis*. Percy e Fast (1983), por sua vez, sugerem que um influxo de água dentro da célula, como resultado de lesões nas membranas, é resultado do rápido inchaço da região apical do citoplasma, além de propiciar uma redução da concentração de K^+ na região afetada, o que levaria a uma disruptura nas microvilosidades. Bauer e Pankratz (1991) também acreditam que o inchaço das células epiteliais, bem como algumas mudanças estruturais observadas em coleópteros tratados com a variedade San Diego, sejam respostas normais para a regulação do balanço hídrico alterado pela toxina. Esses autores apontam a existência de similaridades entre os inchaços e alterações celulares causados pela toxina de *E. thuringiensis* e as mesmas alterações celulares ocorridas no intestino de mosquitos após o repasto sanguíneo, que também são causadas por um aumento no transporte de excesso de fluídos. Tal similaridade seria uma explicação para as alterações celulares causadas pela toxina de *E. thuringiensis*.

Diferentes graus de permeabilidade das membranas epiteliais são sugeridos por de Lello *et al.* (1984), como uma possível explicação para a presença de células doentes e saudáveis numa mesma região intestinal.

Ainda com relação às membranas celulares, Bravo *et al.* (1992a e b) propõem que a ligação da toxina nas microvilosidades das células epiteliais é um mecanismo específico que pode estar relacionado à toxicidade, sendo que a lise das células é totalmente dependente da relação das toxinas do cristal com as membranas das microvilosidades. Contudo, ainda não está totalmente claro se a integridade da membrana é destruída pela formação de poros não seletivos, por ativação ou indução de canais ión-seletivos.

O fato dos danos causados pela bactéria se darem preferencialmente na região anterior do intestino médio, talvez esteja relacionado à distribuição desigual de receptores nas membranas celulares. Esses receptores implicariam numa interação específica entre a toxina e determinadas proteínas, glicoproteínas, glicolipídios ou fosfolipídios existentes nas membranas das células epiteliais do intestino. Os estudos de Bravo *et al.* (1992a e b) vem confirmar as propostas de Knowles e Ellar (1987) e Ryerse *et al.* (1990).

Além da formação de poros na membrana plasmática, duas outras hipóteses foram propostas para explicar a atividade citopatológica da toxina de *E. thuringiensis*: alterações

no processo de fosforilação oxidativa (Travers *et al.*, 1976) e inibição do transporte de íons (Harvey *et al.*, 1983).

O aumento da alcalinidade da hemolinfa, ocorre devido ao extravasamento do conteúdo intestinal na cavidade do corpo, através das perfurações ocorridas no intestino médio. De Lello *et al.* (1984) apontam como possibilidade de variação no pH, o fato de algumas células intestinais serem sítios de ativa passagem de íons K⁺ da hemolinfa para o intestino, o que poderia aumentar a alcalinidade nas regiões intestinais submetidas à ação do patógeno. Tais observações também são consistentes com as constatações de Endo e Nishiitsutsuji-Uwo (1980) e Nishiitsutsuji-Uwo e Endo (1980).

A presença de grande número de grânulos de glicogênio no citoplasma, observada no presente trabalho, foram sugeridas por Fast e Donaghue (1971) e confirmadas por Mathavan *et al.* (1989) em testes com *E. thuringiensis* *Israelensis* em larvas de *Bombix mori*.

De acordo com Lane *et al.* (1989), mudanças no retículo de Golgi ocasionadas pela ação da bactéria, levariam ao acúmulo e fusão de vacúolos no citoplasma. Segundo os autores, a toxina poderia atuar induzindo um bloqueio no transporte desses vacúolos, causando seu acúmulo no interior das células e consequente participação no processo de autólise.

A δ -endotoxina afetaria os túbulos de Malpighi por inibição da secreção de fluidos e indução de alterações citológicas as quais culminariam com a lise das células e destruição do epitélio. Como efeito à exposição a altas concentrações de toxina, observa-se um aumento na taxa de glicose e uma inibição no transporte de íons K^+ (Fast e Donaghue, 1971; Gupta *et al.*, 1985; English e Cantley, 1985, 1986 e Reisner *et al.*, 1989).

O quadro das alterações nos túbulos de Malpighi dos insetos estudados no presente trabalho, correspondem ao Estágio 2 no quadro de alterações proposto por Reisner *et al.* (1989). Tais alterações envolvem desorganização das microvilosidades e vacuolização do citoplasma.

4.8 Exames Anatômicos do aparelho reprodutor de fêmeas de I. malitor

De um total de 60 fêmeas estudadas pelo exame do aparelho reprodutor, 83.3% (50 indivíduos) apresentavam atividade ovigênica, sendo registrados 10 a 20 ovos por ovário, contudo não chegaram a ovipor. Tais constatações estão em concordância com os resultados obtidos por Kries em 1954.

O restante das fêmeas observadas, 17.7% estavam com o ovário atrófico, sem atividade ovigênica, porém com aspecto saudável.

5- Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho levaram às seguintes conclusões:

1-) A espécie L. molitor mostrou-se relativamente menos susceptível que as demais espécies estudadas.

2-) Apesar de algumas diferenças quanto ao cristal proteico, Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis levou a um padrão de alterações histopatológicas muito semelhantes a variedade Kurstaki.

3-) Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis se mostrou mais lento com relação ao desencadeamento dos primeiros sintomas quando comparado às demais variedades do mesmo bacilo.

4-) A presença de células infectadas próximas à células sadias poderiam comprovar a necessidade do contato da membrana celular com a toxina da bactéria e reforçar a hipótese da existência de receptores de membrana, os quais se ligariam à toxina, provocando o desencadeamento da bacteriose.

6-) Larvas de Jansebrion molitor não se mostraram susceptíveis à ação do patógeno, fato não observado em trabalhos realizados por outros pesquisadores utilizando o mesmo inseto alvo e o mesmo patógeno. A baixa susceptibilidade poderia estar relacionada à características genéticas da população de insetos utilizados nesse trabalho, a qual poderia ser resistente à bactéria.

7-) A bactéria se manifesta apenas no estágio adulto e só quando este for tratado.

6- Resumo

Isolada por Krieg e colaboradores em 1982 na Alemanha, a bactéria entomopatogênica Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis, tem sido considerada um agente promissor para o controle de coleópteros prejudiciais.

O presente trabalho teve como objetivo estudar as alterações histológicas, bem como a sintomatologia externa causadas pela variedade Tenebrionis em cinco espécies de coleópteros pragas de cereais armazenados.

As espécies estudadas foram: Carpophilus sp. (Nitidulidae), Christollestes ferrugineus (Cucujidae), Lasioderma serricorne (Anobiidae), Tenebrio molitor e Tribolium sp. (Tenebrionidae). Para as espécies L. serricorne e Carpophilus sp. larvas de 3^o estágio foram utilizadas nas investigações. Para as espécies C. ferrugineus e Tribolium sp., os estudos foram realizados com o estágio adulto. Para T. molitor, as investigações incluíram tanto larvas como adultos. Esses coleópteros foram mantidos em criação de laboratório sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo em suas dietas específicas.

Para os ensaios de observação da sintomatologia externa, o patógeno era misturado à dieta dos coleópteros e as observações realizadas em intervalos de 12 horas, excepto para Carpophilus sp, cujos intervalos foram de 6 horas.

Bacillus thuringiensis var. Tenebrionis mostrou-se lento com relação ao desencadeamento dos primeiros sintomas quando comparado às demais variedades do mesmo bacilo.

O quadro sintomatológico estudado compreendeu alterações comportamentais, como lentidão dos movimentos e ausência de respostas à estímulos físicos e mecânicos tanto nas larvas como nos adultos dos insetos tratados, excepto no caso de Tenebrio molitor, cujas larvas não se mostraram susceptíveis ao patógeno. Sintomas externos pós-mortais da bacteriose, como flacidez do corpo e escurecimento do tegumento foram observados nas larvas das espécies estudadas. Já nos adultos não foi possível a observação de tais sintomas. Com relação à Carpophilus sp, também foram observadas pupas com variados graus de anomalias.

Nos ensaios de susceptibilidade as espécies de coleópteros que apresentaram maior e menor grau de susceptibilidade ao patógeno, foram respectivamente Carpophilus sp e T. molitor.

Para estudos de alterações histológicas foi escolhida o estágio adulto de T. molitor, cuja estrutura facilitou

to as observações. As estruturas consideradas nesse trabalho foram o tubo digestivo e os túbulos de Malpighi.

As alterações à nível histológico causadas pelo patógeno no tubo digestivo foram inchaço celular e intensa vacuolização no citoplasma das células epiteliais, deslocamento do núcleo da região basal para a região central e apical dessas células, condensação da cromatina nos núcleos das células afetadas e desintegração das microvilosidades dessas células. A presença de células sadias ao lado de células afetadas podem comprovar a necessidade do contato da membrana celular com a toxina, reforçando a hipótese da existência de receptores de membrana. Posteriormente as células afetadas sofreram autólise, extravasando seu conteúdo no lumen intestinal, onde também foram observados restos de alimentos não digeridos e pedaços de tecido epitelial. Também foram observadas dissociações das fibras do tecido muscular e emagrecimento no tecido adiposo. Com relação aos túbulos de Malpighi, foram observadas vacuolização do citoplasma desintegração das microvilosidades das células.

A bacteriose se manifesta apenas no estágio adulto e só quando este for tratado.

7- Summary

Isolated by Krieg et al , in 1982 in Germany, the entomopathogenic bacterium Bacillus thuringiensis var Tenebrionis (H: 8a-8b), has been considered as promising agent for the control of harmful beetles.

The present work was undertaken to study some histological damages as well as sintomatology caused by var. Tenebrionis in some coleopterou species considered harmful for stored products.

The following species were studied in the present work: Carpophilus sp (Nitidulidae), Chrysolastes ferrugineus (Cucujidae), Lasioderma serricorne (Anobiidae), Tenebrio molitor e Tribolium sp (Tenebrionidae). These insect species were maintained under controlled laboratory conditions.

The external symptoms were observed through intervals of 12 hours, except for Carpophilus sp (6 hours).

The disease symptoms observed in the infected hosts included behavioral modifications as slow movements of the treated insects and lack of responses to mechanical and physical stimulus. These symptoms appeared in both larvae and adult of

treated insects, except in the case of L. molitor larva. The post-mortal symptoms caused by the bacteriosis were observed to be occurred only among larvae. The body of the dead larvae became flaccid accompanied with a total darkening of the tegument. Many kinds of damages were observed on pupae of Carpophilus sp.

The most susceptible specie to B. thuringiensis var. Tenebrionis was Carpophilus sp and the less susceptible was L. molitor.

L. molitor adults were utilized in the histological studies due to its practicality and appropriate size. The structures studied in the present work were the alimentary canal and Malpighian tubules.

The histological alterations among the epithelial cells of the gut of L. molitor were swelling, vacuoles formation in the cytoplasm, nuclear damages, disruption of microvilli and posterior cell lysis. Dissociation of muscular fibres were observed on infected hosts. The same symptoms were observed on the Malpighian tubules of the infected insects.

The presence of healthy cells together with infected one indicate the necessity of contact between the cell membrane and the toxin. This fact leads to prove the existence of membrane receptors.

Only the adult stage of L. molitor showed to be susceptible to B. thuringiensis var. Tenebrionis. The disease manifestation occurred only when these adults were infected.

B- Bibliografia

- Andrade, C. F. S. 1989. Ecologia de supressão de populações de culicídeos e simulídeos. Tese de Doutorado/ UNICAMP/ Campinas (SP), 253 pp.
- Andrade, C. F. S. & Castello Branco, A. 1991 Susceptibility of Simulium (Chirostilbia) pertinax Kollar, 1832 (Diptera, Simuliidae) to Bacillus thuringiensis var. israelensis in an atypical breeding habitat. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82(2): 317-318.
- Andrade, C. F. S. & Modolo, M. 1991 Susceptibility of Aedes aegypti larvae to Temephos and Bacillus thuringiensis var. israelensis in integrated control. Rev. Saúde Pública, São Paulo, 25(3): 184-187.
- Amaral FO, B. F. 1986. Estudos Biológicos e Patológicos de Dois Piralídeos Pragas de Produtos Armazenados. Tese de Doutorado/ UNICAMP/ Campinas (SP), 167pp.
- Angus, T. A. & Heimpel, A. M. 1956. An effect of Bacillus sotto on the larvae of bombyx mori. Canad. Entomol., 82: 138-139.

- Aronson, A. J.; Beckman, W. & Dunn, P. 1986. Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. Microbiol. rev., 50: 1-24.
- Bauer, L. S. 1990. Response of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: (Chrysomelidae) to Bacillus thuringiensis var. san diego. Environ. Entomol., 19(2): 429-431.
- Bauer, L. S. 1992. Response of the imported willow leaf beetle to Bacillus thuringiensis var. san diego on poplar and willow. J. Invertebr. Pathol., 59: 330-331.
- Bauer, L. S.; Pankratz, H. S. 1991. Ultrastructural effects of Bacillus thuringiensis var. san diego on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. J. Invertebr. Pathol., 60: 15-25.
- De Barjac, H. 1981. Identification of H-serotype of Bacillus thuringiensis. In: Microbiol. Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Burges, H. D. ed., Academic Press, N Y
- De Barjac, H. & Frachon, E. 1990. Classification of Bacillus thuringiensis strains. Entomophaga, 35 (2): 233-240.

- Belimer, O. A.; Tolosa, E. M. C. & Freitas Neto, A. G. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patologia. EDART São Paulo Livraria e Editôra LTDA. Editora da Universidade de São Paulo, 241 pp.
- Bernhard, K. 1986. Studies on the delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. E. F. M. S. Microbiol. Letters 22: 261-265.
- Berti FR, E. & Gallo, D. 1977. O uso de Bacillus thuringiensis Berliner no controle da lagarta das palmeiras Brassolis astura astura Godart, 1765 (Lepidoptera, Brassolidae). Anais da SER, 4: 85-91.
- Bonnefoi, A. & de Barjac, H. 1963. Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de 1 antigène flagellaire. Entomophaga, 8: 223-229.
- Bowen, N. 1991. World Agrochemical Markets. FJB Publications, Richmond, UK.
- Bravo, A.; Hendrickx, S. J. & Peferoen, M. 1992a. Immunocytochemical analysis of specific binding of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol.; 60: 247-253.

Bravo, A.; Jansens, S. & Peferoen, M. 1992b. Immunocytochemical localization of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. J. Invertebr. Pathol., 60: 237-246.

Bulla, L.; Kramer, K. J. & Davidson, L. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. Journal of Bacteriol., 130 (1): 375-383.

Burgejon, A. & De Barjac, H. 1960. Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner. Compte Rend. Acad. Sci. S., 251: 911-912.

Burges, H. D. 1976. Teratogenicity of the thermostable beta exotoxin of Bacillus thuringiensis in Galleria mellonella. J. Invertebr. Pathol., 26: 419-420.

Burges, H. D. 1981. Microbiol. Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London, NY, 861 pp.

- Burges, H. D. 1986. Production and use of pathogens to control insect pests. J. Appl. Bact. Symp., Suppl.: 1275-1375.
- Carrol, J.; Li, J. & Ellar, D. J. 1989. Proteolytic processing of coleopteran specific δ - endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. Biochem. J., 261: 99-105.
- Cheung, P. Y. K. & Hammock, B. D. 1985. Separation of three biologically distinct activities from the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Curr. Microbiol., 12: 121- 126.
- Chiang, A. S.; Yen, D. F. & Pang, W. K. 1986. Defense reaction of midgut cells in the rice moth larva (Corcyra cephalonica) infected with Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol., 47: 333-339.
- Crowson, R. A. 1981. The biology of Coleoptera. Academic Press, N. Y., 802 pp.

- Donovan, W. P.; Gonzalez Jr., J. M.; Gilbert, M. P. & Dankocisk, C. 1988. Isolation and characterization of EG2158 a new strain of Bacillus thuringiensis, toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol Gen Genet, 214: 365-372.
- Dulmage, H. T. 1989. Production and use of Bacillus thuringiensis. Perspective from 1989. Mem Inst Oswaldo Cruz, 84, Supl. III: 113-122.
- Ebersold, M. R.; Luthy, P. & Muller, M. 1977. Changes in the fine structure of the gut epithelium of Pieris brassicae induced by δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. Bull Soc Entomol Suisse, 50: 269-276.
- Edwards, D. L.; Payne, J. & Soares, G.O. 1990. U. S. Patent 4,948,734.
- Endo, Y. & Nishitsutsuji-Uwo, J. 1980. Mode of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. J Invertebr Pathol, 24: 90-103.
- English, L. H. & Cantley, L. C. 1985. Delta-endotoxin inhibits (Rb⁺) up take, lowers cytoplasmic pH and inhibits a K⁺ - ATPase in Manduca sexta CHE cells. J Membr Biol, 85: 199-204.

English, L. H. & Cantley, L. C. 1986. Delta- endotoxin is a protein inhibitor of the (Na, K) ATP- ase. J. Biol. Chem., 261: 1170-1173.

European Patent Office Application 0462721.

Fast, P. G. & Donaghue, T. P. 1971. The δ - endotoxin of Bacillus thuringiensis. II On the mode of action. J. Invertebr. Pathol., 18: 135-138.

Fast, P. G. & Morrison, I. 1972. The δ - endotoxin of Bacillus thuringiensis. IV. The effect of δ - endotoxin on ion regulation by midgut tissue of Bombax mori larvae. J. Invertebr. Pathol., 20: 208-211.

Fast, P. G.; Murphy, D. W. & Sohi, S. S. 1978 Bacillus thuringiensis δ - endotoxin: evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. Experientia, 34: 762-763.

Ferré, J.; Real, M. D.; Van Rie, J.; Jansens, S. & Peferoen, M. 1991. Resistance to the Bacillus thuringiensis bioinsecticide in a field population of Plutella xylostella is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5119-5123.

- Ferro, D. N. & Gelernter, W. D. 1989. Toxicity of a new strain of Bacillus thuringiensis to colorado potatoe beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol., 82 (3): 750-755.
- Ferro, D. N. & Lyon, S. M. 1991. Colorado potatoe beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval mortality: Operative effects of Bacillus thuringiensis subsp. san diego. J. Econ. Entomol. 84 (3): 806-809.
- Fitz-James, P. C. & Young, E. I. 1959. Comparison of species and varieties of the genus Bacillus. Structure and nucleic acid content of spores. J. Bact., 79: 743-754.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, E. P. L.; Baptista, G. D.; Berti FO, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B. & Vendramin, J. D. 1988. Manual de Entomologia Agrícola. 2ª ed. Ed. Agronômica "Ceres", LTDA; S.P., pp.649.
- Garcia, M. A.; Simões, M. & Habib, M. E. M. 1982. Possible reasons of resistance in larvae of Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797) infected by Bacillus thuringiensis var. kurstaki. Revista de Agricultura, 57 (4): 215-222.

Gill, S. S. & Hornung, J. M. 1987. Cytolytic activity of Bacillus thuringiensis proteins to insect and mammalian cell lines. J. Invertebr. Pathol., 50: 16-25.

Gravena, S. & Pazzini, W. C. 1987. Centro de Manejo Integrado de Pragas - CEMIP III. Resumos de Encontro de Atualização sobre Métodos de Controle de Pragas: 120-126.

Griego, V. M.; Fanher, L. J. & Spence, K. D. 1979a. Scanning electron microscopy of the disruption of tobacco hornworm, Manduca sexta, midgut by Bacillus thuringiensis endotoxin. J. Invertebr. Pathol., 35: 186-189.

Griego, V. M.; Moffet, D. & Spence, K. D. 1979b. Inhibition of K⁺ transport in the tobacco hornworm (Manduca sexta) midgut after ingestion of Bacillus thuringiensis endotoxin. J. Invertebr. Pathol., 25: 2283-2288.

Gupta B. L.; Dow, J. A. T.; Hall, T. A. & Harvey, W. R. 1985. Electron microprobe X-ray microanalysis of the effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki crystal protein insecticide on ions in a electrogenesis K⁺ transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran Manduca sexta, in vi-tro. J. Cell. Sci., 74: 137-152.

Habib, M. E. M. 1968. Histopathological studies on the effect of Bacillus thuringiensis Berliner, on the mediterranean flour moth, Anagasta kuhniella Zeller. Tese de Mestrado/ FAC Agric. Universidade Alexandria/ Egito, 196 pp.

Habib, M. E. M. 1980. Aspectos sanitários em criações de insetos. Anais vi Congr. Bras. Entomol.: 185-192.

Habib, M. E. M. 1982. Patogenicidade de duas variedades de Bacillus thuringiensis para larvas de Lepidoptera e Diptera. Tese de Livre-Docência/ UNICAMP/ Campinas - S.P., 163pp

Habib, M. E. M. 1983. Potency of Bacillus thuringiensis var. israelensis against some aquatical dipterans insects. Z. Ang. Entomol., 25: 368-376.

Habib, M. E. M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dipteros de importância médica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 24 (suplm III): 31-34.

Habib, M. E. M. & Andrade, C. F. S. 1984. Patogenicidade de Bacillus thuringiensis var. kurstaki para curuquerê-do-algodão Alabama argilacea (Hübner, 1918) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Agric., 52 (3): 263-268.

- Habib, M. E. M. & Andrade, C. F. S. 1986. Bactérias Entomopatogênicas. Em: Controle Microbiano de Insetos. Alves, S. B. Ed. Manole LTDA, 407 pp.
- Habib, M. E. M.; Andrade, C. F. S & Fávoro Jr., A. 1986. Classificação patológica e susceptibilidade de larvas de Brassolis asporae (L., 1758) infectadas por Bacillus thuringiensis var. kurstaki (H: 3a-3b). Rev. Agric., 41: 105-113.
- Habib, M. E. M.; Andrade, C. F. S.; Moreira, L. F. D. F. & Castello Branco Jr., A. 1987. Susceptibilidade de larvas de Simulium inaequale ao Bacillus thuringiensis var israelensis (H-14). Resumo do XI Conar Entomol.: 440.
- Hannay, D. L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. Nature, 172: 1004.
- Harvey, W. R.; Goff, M.; Dow, J. A. T. & Wolfersberger, M. A. 1982. Potassium ion transport ATPases in insect epithelia. J. Exp. Biol., 104: 91-117.
- Heimpel, A. K. 1967. A taxonomic key for crystaliferous bacteria related to Bacillus thuringiensis Berliner. J. Invertebr. Pathol., 9: 365-375.

- Heimpel, A. M. & Angus, T. A. 1959. The site of action of crystaliferous bacteria in Lepidopteran larvae. J. Insect Pathol., 1: 152-170.
- Herrnstadt, C.; Soares, G. G.; Wilcox, E. R. & Edwards, E. L. 1986. A new strain of Bacillus thuringiensis with activity against coleopteran insects. Biotransaction, 4: 305-308.
- Herrnstadt, C.; Gilroy, T. E.; Sobieski, D. A.; Bennet, B. D. & Guertner, E. H. 1987. Nucleotide sequence and reduced aminoacid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from Bacillus thuringiensis subspec san diego. Gene, 57: 37-46.
- Himeno, M.; Koyama, N.; Fuanoto, T. & Komano, T. 1987. Mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal - endotoxin on insect cells in vitro. Agric. Biol. Chem., 49: 1461-1468.
- Hofmann, C.; Luthy, P.; Kutter, R. & Fliska, V. 1988a. Binding of the delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (Pieris brassicae). Eur. J. Biochem., 172: 85-91.

Hofmann, C.; Vanderbrugger, H.; Höfte, H.; Van Rie, J.; Jansens, S. & Van Mellaert, H. 1988b. Specificity of Bacillus thuringiensis -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. PROC. NATL. Acad. Sci. USA, 85: 7844-7848

Hofte, H.; Seurinck, J.; Van Hoven, A. & Vaegk, M. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis, toxic against coleoptera. Nucleic Acids Res. 15: 7183.

Hofte, H. & Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 53:242-255.

Hough-Goldstein, J.; Tisler, A. M.; Zehnder, E. W. & Uyeda, K. A. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) consumption of foliage treated with Bacillus thuringiensis var. sao diego and various feeding stimulants. J. Econ. Entomol. 84: 97-98

Huger, A. M. & Krieg, A. 1989. Über zwei typen parasporales kristalle beim kaferwirksamen Stamm BI 256-82 von Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis. J. Appl. Ent. 102: 490-497.

Jahn, N.; Schnetter, W. & Geider, K. 1987. Cloning of an insecticidal toxin gene of Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis and its expression in Escherichia coli cells. E. F. M. S. Microbiol. Letters, 49: 311-315.

Jaquet, F.; Hutter, R. & Luthy, P. 1987. Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 53: 500-504.

Johnson, D. R. 1987. Incidence of insect cell cytolytic activity among Bacillus thuringiensis serotypes. E. F. M. S. Microbiology Letters, 43: 121-125.

Johnson, D. E. & Davidson, L. I. 1984. Specificity of cultured insect tissue cells for bioassay of entomocidal protein from Bacillus thuringiensis. IN VITRO, 20: 66-70

Kissinger, R. A. & Mc Gaughey, W. M. H. 1979. Histopathology effects of Bacillus thuringiensis on larvae of the indian meal moth and the almond moth. Ann. Entomol. Soc. Amer., 72: 787-790.

- Knowles, B. H. & Ellar, D. J. 1986. Characterization and partial purification of a plasmamembrane receptor for Bacillus thuringiensis var. kurstaki lepidopteran specific δ -endotoxin. J. Cell Sci., 83: 89-101.
- Knowles, B. H.; Cheek, T. R.; Merrick, J. D & Schnee, M. 1992. Early events in the action of Bacillus thuringiensis toxins. Society for Invertebrate Pathology XXV Annual Meeting Heidelberg, Germany.
- Knowles, B. H. & Ellar, D. J. 1987. Colloid-osmotic lysis in a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta., 924: 509-518.
- Krieg, A. 1971. Concerning δ -exotoxin produced by vegetative cells of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. J. Invertebr. Pathol., 17: 134-135.
- Krieg, A.; Huger, A. M; Langenbruch, G. A. & Schnetter, W. 1993. Bacillus thuringiensis var. tenebrionis ein neuer gegenüber... Larven von Coleopteren wirksamen pathotyp. Z. angew. Ent., 24: 500-508.

Krieg, A.; Huger, A. M.; Langenbruch, G. A. & Schnetter, W.
1984. Neue Ergebnisse über Bacillus thuringiensis var.
tenebrionis unter besonderer Berücksichtigung seiner
Wirkung auf den Kartoffelkäfer (Leptinotarsa decemlineata).
Anz. Schadlinschutz Pflanzenschutz Umweltschutz, 57: 145-150.

Krieg, A.; Huger, A. M. & Schnetter, W. 1987a. Bacillus
thuringiensis var. san diego Stamm H-7 ist identisch mit dem
zuvor in Deutschland isolierten kaffer-wirksamen B.
thuringiensis subsp. tenebrionis Stamm BI 256-82.
J. Appl. Entomol., 104: 417-424.

Krieg, A.; Schnetter, W.; Huger, A. M. & Langenbruch, G. A.
1987b. Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis strain
BI 256-82: a third pathotype within the H- serotype 8a8b.
System Appl. Microbiol., 2: 138-141.

Lacey, L. A. & Federici, E. A. 1979. Pathogenesis and midgut
histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum
(Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol., 33: 171-182.

- Lahkim-Tsrur, L.; Pascer-Gluzman, C.; Margalit, J. & Barak, Z.
1982. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis serovar H:14 in Aedes aegypti: Histopathological studies. J. Invertebr. Pathol., 41: 104-116.
- Lane, N. J.; Harrison, J. E. & Lee, N. M. 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial δ -endotoxin. J. Cell Sci., 93: 337-347.
- Langenbruch, G. A. 1991. Zur bekämpfung des kartoffelkafers (Leptinotarsa decemlineata) mit Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis. Gesunde Pflanzen, 43: 193-196.
- Langenbruch, G. A. & Riethmüller, U. 1990. Kartoffelkaferbekämpfung mit Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 42: 63-69.
- Langenbruch, G. A.; Krieg, A.; Huger, A. M. & Schnetter, W. 1985. Erste feldversuche zur bekämpfung der larven des kartoffelkafers (Leptinotarsa decemlineata) mit Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. Med. Fac. Landbouww. Rijkuniv. Gent, 50: 441-449.

- Levini, W. C. 1981. Diagnóstico sorológico de Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 em larvas de insetos. Tese de Mestrado/ESALQ - USP/ 153 pp.
- de Lello, E.; Hanton, W. K.; Bishoff, S. T. & Misch, D. W. 1984. Histopathological effects of Bacillus thuringiensis on the midgut of tobacco hornworm larvae (Manduca sexta): low doses compared with fasting. J. Invertebr. Pathol., 43: 169-181.
- Le Minor, L. & Popoff, M. Y. 1987. Designation of Salmonella sp. nov. nom. rev., as the type and only species of genus Salmonella Intern. J. System. Bacteriol., 37: 463-464.
- Li, J.; Henderson, R.; Carroll, J. & Ellar, D. 1988. X-ray analysis of the crystalline parasporal inclusion in Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. J. Mol. Biol., 199: 543-544.
- Maddrell, S. H. P.; Lane, N. J.; Harrison, J. E.; Overton, J. A. & Moreton, R. B. 1988. The initial stages in the action of an insecticidal delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis on the epithelial cells of the Malpighian tubules of the insect Rhodnius prolixus. J. Cell. Sci., 90: 131-144.

- Martouret, D. 1961. Les toxines de Bacillus thuringiensis et leur processus d'action chez les larves de lepidopteres. Symp. Phytopharm. Phytat. 12th Ghent, Belgium, 2: 1-14.
- Mathavan, S.; Sudha, P. M. & Pechimutu, S. M. 1989. Effect of Bacillus thuringiensis israelensis on the midgut cells of Bombax mori larvae: a histopathological and histochemical study. J. Invertebr. Pathol., 53: 217-227.
- Mc Pherson, S. A.; Perlak, F. J.; Fuchs, R. L.; Marrone, G.; Lavrik, P. B. & Fischhoff, D. A. 1988. Characterization of the coleopteran specific protein gene of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. Bio/Technology, 6: 61-66.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J.; Endo, Y. & Himeno, M. 1979. Mode of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin: Effect on TN-368 cells. J. Invertebr. Pathol., 34: 267-275.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. & Endo, Y. 1980. Mode of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin: general characterization of intoxicated Bombax larvae. J. Invertebr. Pathol. 35: 219-228.

Oron, U.; Sokolover, M.; Yawetz, A.; Broza, M.; Sneh, B. & Honigman, A. 1985. Ultrastructural changes in the larval mid-gut epithelium of Spodoptera littoralis following ingestion of - endotoxin of Bacillus thuringiensis var entomocidus. J. Invertebr. Pathol., 45: 353-355.

Pang, A. D. D.; Gringorten, J. L. & Sohi, S. 1990. Entrance-ment of Bacillus thuringiensis var. kurstaki toxin activity by cell lysates. J. Invertebr. Pathol., 55: 444-446.

Percy, J. & Fast, P. G. 1983. Bacillus thuringiensis crystal toxin: Ultrastructural effect on silkworm midgut cells. J. Invertebr. Pathol., 41: 86-98.

Reisner, W. M.; Feir, D.; Lavrik, P. B. & Ryerse, J. S. 1989. Effect of Bacillus thuringiensis kurstaki - endotoxin on insect Malpighian tubules structure and function. J. Invertebr. Pathol., 54: 175-190.

Rhum, S. L.; Jahn, N.; Schnetter, W. & Guderik, K. 1990. Heterologous expression gene from Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis. E. E. M. S. Microbiol. Letters, 44: 95-100.

- Riethmüller, U. & Langenbruch, G. A. 1989. Zwei Biotestmethoden zur prüfung von Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis gegen larven des kartoffelkafers (Leptinotarsa decemlineata). Entomophaga, 34 (2): 237-245.
- Ronchi-Telles, B. & Habib, M. E. M. 1989. Patologia em larvas de Arcia manusta infectadas por Bacillus thuringiensis var. kurstaki. I. Sintomatologia externa e interna. Acta Amazonica, 19 (único): 273-278.
- Ryerse, J. S.; Beck Jr. & Lavrik, P. B. 1990. Light microscope immunolocation of Bacillus thuringiensis kurstaki δ -endotoxin in the midgut and Malpighian tubules of the tobacco budworm, Heliothis virescens. J. Invertebr. Pathol., 54: 86-90.
- Sacchi, V. F.; Parenti, F.; Hanozet, G. M.; Giordana, B.; Luthy, P. & Wolfersberger, M. G. 1986. Bacillus thuringiensis toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of Pieris brassicae midgut cells. FEBS Letters, 204: 213-218.
- Sanders, V. & Ellar, D. J. 1993. Identification and partial purification of a Bacillus thuringiensis Cry IC δ -endotoxin binding protein from Spodoptera littoralis. FEBS Letters, 316 (3): 264-268.

Schnepf, H. E.; Wong, H. C. & Whiteley, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from DNA base sequence. J. Biol. Chem., 260: 6264-6272.

Sekar, V. 1988. The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. Curr. Microbiol., 12: 347-349.

Sharpe, E. S. & Baker, L. S. 1979. Ultrastructure of the unusual crystal of the HDI isolate of Bacillus thuringiensis var. kurataki. J. Invertebr. Pathol., 34: 320-322.

Shibano, Y.; Yamagata, A.; Nakamura, N.; Iizuka, T.; Sugisaki, H. & Takanami, M. 1985. Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of Bacillus thuringiensis crystal protein. Gene, 34: 243-251.

Singh, G. J. P.; Schouest, L. P. & Gill, S. : 1986. Action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin on the ultrastructure of the house fly larvae neuromuscular system in vitro. J. Invertebr. Pathol., 47: 155-166.

Spies, A. G. & Spence, K. D. 1985. Effect of sublethal Bacillus thuringiensis crystal endotoxin on the larval midgut of a moth Manduca sexta. Tissue and Cell, 17 (3):379-394.

Steinhaus, E. A. 1951. Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. Hilgardia, 20: 359-381.

Steinhaus, E. A. 1960. The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. J. Insect Pathol., 2: 225-229.

Steinhaus, E. A. 1963. Insect Pathology. An Advanced Treatise. Vol. 1 & 2. Academic Press, N. Y., 611 p.

Sutter, G. R. & Raun, E. S. 1967. Histopathology of European corn-border larvae treated with Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol., 9: 90-103.

Toumanoff, C. 1953. Ann. Inst. Pasteur, 95: 90-99.

Travers, R. S.; Faust, R. M. & Reichenderfer, C. F. 1976. Effect of Bacillus thuringiensis var. kurataki δ -endotoxin on isolated Lepidopteran mitochondria. J. Invertebr. Pathol. 28: 351-356.

- Vandenberg, J. D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol., 22: 755-759.
- Van Rie, J.; Jansens, S.; Höfte, H.; Degheele, D. & Van Mellaert, H. 1989. Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins: Importance of specificity receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem., 184: 239-247.
- Van Rie, J.; Mc Gaughey, W. H.; Johnson, D. E.; Barnett, E. D. & Van Mellaert, H. 1990a. Mechanism of insect resistance to the microbial Bacillus thuringiensis. Science, 247: 72-74.
- Van Rie, J.; Jansens, S.; Hofte, H.; Degheele, D. & Van Mellaert, H. 1990b. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut determinants of the specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 54: 1378-1385.
- Yamamoto, T. 1983. Identification of entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol., 129: 2595-2603.

- Yan, X. & Mc Carthy, W. J. 1990. Chemical modification of Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis (HD- 524) trypsin- activated endotoxin: Implication of tyrosine residues in Lepidopteran cell lysis. J. Invertebr. Pathol., 57: 101-108.
- Waib, C. M. 1992. Patogenicidade de Bacillus thuringiensis var. tenebrionis para coleópteros de produtos e sub-produtos de grãos armazenados. Tese de Mestrado / UNICAMP, 98pp
- Waib, C. M.; Mendeleck, E. & Habib, M. E. M. 1989. Uma nova variedade de Bacillus thuringiensis Berliner patogênica a coleópteros. XII Congr. Bras. Entomol. Resumos: 231.
- Widner, W. R & Whiteley, H. R. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki possess different hosts range specificities. Journal of Bacteriol., 171 (2): 965-974.
- Zehnder, G. W. & Gelernter, W. D. 1989. Activity of the M- ONE formulation of a new strain of Bacillus thuringiensis against the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Relationship between susceptibility and insect life stage.