

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Obtenção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae e caracterização molecular de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera:Simuliidae) no Brasil

ELENY DA SILVA PEREIRA

Brasília- DF
2011

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Obtenção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae e caracterização molecular de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera:Simuliidae) no Brasil

ELENY DA SILVA PEREIRA

Orientador (a): Rose Gomes Monnerat, Dra.

Coorientador (a): Beatriz Ronchi Teles, Dra.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Brasília- DF
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Eleny da Silva

Obtenção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae e caracterização molecular de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae) no Brasil/ Eleny da Silva Pereira. –Brasília, 2011

Tese (doutorado)- EMBRAPA-Cenargen/ UNB, 2011

Orientador: Monnerat, Rose Gomes

Co-orientador: Ronchi-Teles, Beatriz

Simuliidae

1. Bioensaio. 2. Chave dicotômica. 3. Controle Biológico. 4. Toxina Cry4B

SINOPSE

Este trabalho relata o isolamento e caracterização de duas estirpes de *Bacillus thuringiensis* oriundas de solos amazônicos tóxicas a larvas de Simuliidae. As proteínas presentes no *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* foram testadas separadamente e misturadas para determinar quais delas atuam nas larvas de borrachudos e se existe sinergismo entre elas. Foi realizado ainda coletas de larvas em alguns córregos na região Centro-Oeste, Brasil com confecção de uma chave de identificação para os simulídeos da região. Diferentes populações de *S. pertinax* do Brasil foram caracterizadas por meio do gene COX I do DNA mitocondrial a fim de se determinar a estrutura genética dentro e entre essas populações.

Palavras-chave: 1. Bioensaio. 2. Chave dicotômica. 3. Controle Biológico. 4. Toxina Cry4B

Key –words: 1. Bioassay. 2. Biological Control. 3. Cry4B Toxin. 4. Dichotomic key.

FONTES FINANCIADORAS

A realização deste projeto foi possível devido:

❖ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM/POSGRAD) que concedeu a bolsa de estudo durante o período da realização deste trabalho.

E aos projetos de Pesquisa

❖ INFRA-ESTRUTURA / FAPEAM/ INPA

“Implantação de laboratório temático de prospecção de compostos bioativos de origem microbiana a partir de insetos da Amazônia”

❖ EMBRAPA/ CENARGEN

“Estratégias de produção e utilização de *Bacillus thuringiensis* para o controle de insetos pragas agrícola e vetores de doenças de saúde pública”

DEDICATÓRIA

À Deus....e aos meus pais, José Maria e Maria Senhorinha. Aos meus irmãos Francisco Cesar, Edgar e Francisco Éder. A minha avó Ana.

Ao meu namorado Luís Cláudio

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Pela conquista deste trabalho, quero agradecer:

- ❖ À minha orientadora, Dra. Rose Gomes Monnerat pela confiança a mim depositada para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!!
- ❖ À minha co-orientadora, Dra. Beatriz Ronchi-Teles, por sua amizade, pela sua disponibilidade em todos os momentos e principalmente pela confiança a mim depositada para a realização deste trabalho.
- ❖ À Dra. Neusa Hamada por sua atenção e disponibilidade em me ajudar, por sua orientação, apoio e incentivo.
- ❖ A UNB-Universidade de Brasília e à EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio para a realização do curso.
- ❖ À FAPEAM pelo Programa de Apoio à Formação de Recursos Humanos Pós-Graduados do Estado do Amazonas/ RH- POSGRAD FAPEAM/CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.
- ❖ Ao INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio as coletas de solo na cidade de Manaus.
- ❖ À Dra. Neusa Hamada, Dra. Lúcia Mardini, Dra. Regina Kikuchi e Dr. Mateus Pepinelli por ter concedido amostras de Simuliidae por meio da coleção da Dra. Neusa Hamada obtidos pelo financiamento CNPq/INPA para complemento do material em estudo.
- ❖ À Dra. Ana Pes e ao MSc. Selmo Andrade pela coleta de material de imaturos de Simuliidae e amostras de solo. E pela ajuda imprescindível em tds os momentos que precisei.
- ❖ Aos referes e membros da banca na defesa do projeto e na defesa da tese: Dra. Rose Monnerat, Dr. Cesar Koppe Grisolia, Dra. Ivone Rezende Diniz, Dra. Carmem Pires, Dr. Paulo Queiroz e ao Dr. Edson Suijii que contribuíram na melhoria do trabalho. Em especial ao Dr. Paulo Queiroz por ter gentilmente se disponibilizado a corrigir a versão final do capítulo de Variabilidade Genética (capítulo 2).
- ❖ Ao Dr. Eduardo Cyrino- EMBRAPA/Cerrados, no nome de Dafni pelo empréstimo do aparelho condutivímetro.
- ❖ À Dra. Sheyla Couceiro, Carlos Mota e Vívian Campos pela confecção dos mapas.

- ❖ Ao Dr. Jorge Porto pelos ensinamentos a mim concedidos principalmente no capítulo de Variabilidade Genética.
- ❖ Ao Dr. José Newton e sua esposa Sra. Wanderli pelo apoio e companhia durante a coleta de Simuliidae em Abuña/RO.
- ❖ Aos meus colegas de turma pelo companheirismo durante a realização das disciplinas.
- ❖ À MSc. Ana Karolina Freitas pela ajuda na disciplina de Geoquímica da água.
- ❖ Aos meus amigos do Laboratório de Insetos Aquáticos/INPA nos nomes de Jeferson Oliveira, Naira Gomes e Lívia Fussari pelo apoio na realização de tarefas de laboratório durante as minhas estadas em Manaus.
- ❖ Aos meus colegas do laboratório Controle Biológico pelas boas horas de convivência e pela ajuda nos trabalhos de laboratório.
- ❖ Aos colegas Murilo Xavier (*in memoriam*), a Aldaléia Santos, Felipe Ramos, João, Edylaine e Vanúsia pela companhia e ajuda durante as coletas no campo.
- ❖ Aos motoristas Sr. José Dias, Sr. Waldemar, Sr. Camilo, e Sr. José Maria que com paciência e satisfação me acompanharam as saídas de campo.
- ❖ A Aldaléia Santos e Cristina Macedo (Coração!!) pelos momentos de descontração e lazer. Obrigada pela companhia meninas!
- ❖ Ao meu namorado Luís Cláudio que muitas vezes me acompanhou ao campo, soube compreender a minha ausência, com o seu carinho, atenção e paciência.
- ❖ À minha avó Ana Souza pelo exemplo de vida, por tudo que me ensinou.
- ❖ Aos meus irmãos Francisco César, Edgar e Francisco Edér pelo apoio incondicional em todos os momentos e por respeitarem minha ausência mesmo estando presente.
- ❖ Aos meus sobrinhos Yasmin, Miguel Ângelo e Ana Letícia por alegrarem minha vida.
- ❖ As minhas cunhadas Ana Flávia, Elen Menezes e Ana Karolina pelas boas horas de convivência e pelas palavras de incentivo!
- ❖ À todos os meus familiares e amigos que acreditaram na realização desta estapa. Muito obrigada pelas palavras de apoio e incentivo!!!
- ❖ Agradeço em especial aos meus pais José Maria e Maria Senhorinha por todos os incentivos e dedicação em cada etapa da minha vida, pelo amor incondicional sempre com palavras de força e superação. Muito Obrigada!! Essa vitória é nossa!!
- ❖ De modo especial quero agradecer à Deus que me deu o dom de viver e o desejo de aprender. Obrigada Senhor, por tudo!!!

“⁶Porque é o Senhor quem dá a Sabedoria, e de sua boca procedem conhecimento e prudência.

¹⁰ porque a Sabedoria entrará no teu coração e o conhecimento será o teu prazer.”

Provérbios 2 - A sabedoria vale mais do que tudo

RESUMO

Os simulídeos pertencem a uma família de dipteros, Simuliidae, com ampla diversidade. Por ser um grupo recente na escala dos tempos geológicos, muitas espécies podem ser crípticas e/ ou espécies irmãs. Dentre as muitas espécies já conhecidas algumas possuem interesse econômico abrangendo as áreas médica, agrícola, veterinária e da indústria turística. Algumas espécies podem ser vetoras de agentes etiológicos causadores de doenças como o *Simulium damnosum*, vetor da oncocercose na África. Outras importunam o homem e animais de criação como *Simulium pertinax* no Brasil. Muitas dessas espécies de interesse econômico pertencem a complexos de espécies, que possuem algumas similaridades entre si. Mapear a fauna de Simuliidae de um determinado lugar é importante para se tentar conhecer espécies semelhantes as espécies de interesse econômico ou ainda pra tentar incrementar as informações existentes das espécies já identificadas e nomeadas. Alguns estudos taxonômicos e de sistemática tem sido realizados para relacionar espécies próximas principalmente às de interesse para o controle. Dependendo dos resultados dos diferentes estudos essas espécies “próximas” podem ser elevadas à categoria de mesma espécie ou separadas em espécies distintas. Para essa separação é necessário o uso de chaves taxonômicas onde os caracteres morfológicos de larvas, pupas e do adulto são comparados. Algumas vezes, entretanto, somente por esses caracteres não é possível a separação dessas espécies. Com isso se faz necessário o uso de marcadores moleculares, dentre os quais, os dos genes do DNA mitocondrial. O gene COX I tem sido usado para se mapear essas espécies. No Brasil, uma das formas de controle de *S. pertinax* tem sido realizada com a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. Neste trabalho, de 96 estirpes isoladas a partir de amostras de solos oriundos da Amazônia duas estirpes S2271 e S2272 foram tóxicas a larvas de *Simulium* sp. A caracterização bioquímica e molecular das duas estirpes mostrou que ambas apresentavam amplicons correspondentes aos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, e proteínas de 130kDa, 72kDa e 30kDa sendo compatível com as proteínas Cry4A e Cry4B (130kDa), Cry10 e Cry11 (72kDa) e Cyt1 e Cyt2 (30kDa) semelhante ao *Bacillus thuringiensis israelensis*, S1806, utilizado como padrão. A toxicidade das proteínas produzidas pelo *B. thuringiensis israelensis* foram testadas individualmente e em conjunto. Foi verificado que a proteína Cry4B apresentou maior toxicidade, no entanto, todas as toxinas juntas apresentam sinergismo, sendo, portanto a melhor forma para o controle do inseto. Exemplares de borrachudos foram coletados em 71 córregos do Distrito Federal e Goiás e

foram identificados perfazendo um total de 22 espécies: *Simulium dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. botulibranchium*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. exiguum*, *S. anamariae*, *S. jujuyense*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*, *S. rorotaense*, *S. hirtipupa*, *S. nigrimanum*, dessas 10 espécies foram registradas pela primeira vez, na área de estudo (*S. serranum*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. botulibranchium*, *S. anamariae*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa*). Uma chave de identificação com estas espécies foi confeccionada para auxiliar estudos nestas áreas de estudo. Além disso, diferentes populações de *S. pertinax* identificadas nas coletas e outras, coletadas previamente em outros estados brasileiros (Pará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Goiás e Rondônia) foram caracterizadas molecularmente através do gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial. Destas populações, três indivíduos de cada estado foram separados para o estudo intra e interpopulacional. Entre as populações e entre os indivíduos de uma mesma população de *S. pertinax*, não houve diferenças gênicas significativas entre estas.

ABSTRACT

Black flies are dipteran insects, from Simuliidae family and possess a wide diversity. Being a group in recent geologic time scale, many species are cryptic and/or sister species. Among many known species, some have economic interest, like in the medical, agricultural, veterinary and tourism industry. Some species are vectors of etiologic agents of diseases such as *Simulium damnosum*, vector of onchocerciasis in Africa. Others disturb the man and livestock as *Simulium pertinax* in Brazil. Many of these species of economic interest belong to species complexes that have some similarities. Map Simuliidae fauna of a place is important to try to know the rate of similarity between species of economic interest or to try and improve the existing information of species already identified and named. Some taxonomic and systematic studies have been conducted to relate closely related species of mainly interest for the control. Depending on the results of different studies these species are "close" can be elevated to the category of the same species or separated into distinct species. For such separation is necessary to use taxonomic keys where the morphological characters of larvae, pupae and adults are compared. Sometimes, however, only through these characters is not possible to separate these species. Thus it is necessary the use of molecular markers, among which the genes of mitochondrial DNA. The COX I gene has been used to map these species. In Brazil, one of the ways to control *S. pertinax* has been conducted with the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. In this work, of 96 strains isolated from soil samples from the Amazon two new strains S2271 e S2272 of these bacteria were toxic to larvae of *Simulium* spp. The biochemical and molecular characterization of two strains showed that both had amplicons corresponding to genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* and *cyt2*, and proteins 130kDa, 72kDa e 30kDa is compatible with protein Cry4A e Cry4B (130kDa), Cry10 e Cry11 (72kDa) and Cyt1 e Cyt2 (30kDa) similar to *Bacillus thuringiensis israelensis*, S1806, used as standard. The toxicity of the proteins produced by *B. thuringiensis israelensis* was tested individually and together. It was found that protein Cry4B showed higher toxicity, however, all toxins together have synergistic toxins, making it the best way to control this insect. Samples of blackflies were collected in 71 rivers in Goiás and Distrito Federal and they were identified a total of 22 species: *Simulium dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. botulibranchium*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. exiguum*, *S. anamariae*, *S. jujuyense*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*,

S. rorotaense, *S. hirtipupa*, *S. nigrimanum*, these 10 species were recorded for the first time in the study area (*S. serranus*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. botulibranchium*, *S. anamariae*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa*). An identification key to these species was made to aid research in these areas. Furthermore, different populations of *S. pertinax* identified in the collections and other previously collected in other Brazilian states (Pará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Goiás e Rondônia) were characterized molecularly through mitochondrial DNA COX I gene. These populations, three individuals from each state were separated for studying intra-and inter. Among populations and among individuals within populations of *S. pertinax*, no genetic differences between them.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	III
SINOPSE.....	III
FONTES FINANCIADORAS.....	IV
DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT.....	XI
SUMÁRIO.....	XII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE ANEXOS	XX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXI
I-INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	7
II- OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9

CAPÍTULO I

Distribuição e chave de identificação de pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito Federal e algumas localidades no estado de Goiás, Brasil

1. Resumo.....	10
2. Abstract.....	11
3. Introdução.....	12
4. Material e Métodos.....	13
5. Resultados e Discussão.....	19
5.1 Chave para identificar pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito Federal e algumas áreas no seu entorno, no estado de Goiás, Brasil.....	29

CAPÍTULO II

Variabilidade genética (intra e inter- populacional) de *Simulium pertinax* baseado no gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial

1. Resumo.....	57
2. Abstract.....	58

3. Introdução.....	58
4. Material e Métodos.....	63
4.1 Espécie a ser Utilizada como Outgroup.....	63
4.2 Área de Estudo.....	63
4.3 Extração de DNA Total.....	66
4.3.1 Reações de Amplificação de fragmentos de DNA por PCR com COI.....	67
4.3.2 Obtenção de Perfis Eletroforéticos.....	67
4.3.3 Purificação e Quantificação dos Produtos de PCR.....	68
4.3.4 Obtenção das Sequências dos Produtos de PCR.....	68
4.3.5 Estudos de Variabilidade Genética de Populações de <i>S. pertinax</i>	68
5. Resultados e Discussão.....	69

CAPÍTULO III

Seleção de estirpes amazônicas de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera)

1. Resumo.....	84
2. Abstract.....	85
3. Introdução.....	85
4. Material e Métodos.....	87
4.1 Coleta das Amostras de Solo.....	87
4.2 Isolamento.....	88
4.3 Bioensaios Seletivo Contra Larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	89
4.4 Bioensaios Contra Larvas de Simuliidae.....	90
4.4.1 Obtenção dos Insetos.....	90
4.4.2 Estirpes Utilizadas.....	91
4.4.3 Bioensaio Seletivo.....	92
4.4.4 Bioensaio de Dose.....	93
4.5 Caracterização das Estirpes Tóxicas.....	95
4.5.1 Caracterização Sorológica.....	95
4.5.2 Caracterização de Proteínas através de SDS-PAGE.....	95
4.5.3 Caracterização Molecular.....	96
5. Resultados e Discussão.....	96

CAPÍTULO IV

Susceptibilidade de Simuliidae a toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915

1. Resumo.....	102
2. Abstract.....	103
3. Introdução.....	103
4. Material e Métodos.....	106
4.1 Toxinas Bt.....	106
4.2 Obtenção dos Insetos.....	106
4.3 Bioensaio Seletivo.....	107
4.4 Bioensaio de Dose.....	107
4.5 Determinação do Fator de Sinergismo.....	108
5. Resultados e Discussão.....	109

III-CONCLUSÃO	114
IV-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Distribuição e chave de identificação de pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito Federal e algumas localidades no estado de Goiás, Brasil

Tabela 1	Espécies de Simuliidae coletadas em 71 localidades no Distrito Federal e áreas no entorno no estado de Goiás, número de locais em que ocorreram, frequência de ocorrência (%).....	20
----------	--	----

CAPÍTULO II

Variabilidade genética (intra e inter- populacional) de *Simulium pertinax* baseada no gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial

Tabela 1	Local de coleta dos espécimes examinados de <i>Simulium pertinax</i> (Diptera: Simuliidae) com coordenadas geográficas, data de coleta, (n) indivíduos utilizados para o sequenciamento da região amplificada com o oligonucleotídeo COI e número de pares de bases de cada sequência.....	71
Tabela 2	Frequência da composição nucleotídica de todos os sítios das sequências das populações de <i>S. pertinax</i> analisadas. T: Timina, C: Citosina, A: Adenina e G: Guanina.....	73
Tabela 3	Estimativa da probabilidade máxima composto do padrão de substituição de nucleotídeos.....	74
Tabela 4	Número de haplótipos encontrados nas diferentes populações geográficas de <i>Simulium pertinax</i> do Brasil. Distrito Federal (DF-1, DF-2, DF-3), Goiás (GO-1, GO-2, GO-3), Mato Grosso (MT-1, MT-2, MT-3), Pará (PA-1, PA-2, PA-3), Rondônia (RO-1, RO-2, RO-3), Rio Grande do Sul (SP-1, SP-2, SP-3) e São Paulo (SP-1, SP-2, SP-3). <i>S. decuplum</i> é a espécie do grupo externo.....	75
Tabela 5	Matriz com resultados dos estudos populacionais de <i>Simulium pertinax</i> com a espécie do grupo externo <i>Simulium decuplum</i> pelo método de distância.....	78
Tabela 6	Análise da variação molecular de populações de <i>S. pertinax</i> (Diptera: Simuliidae) de alguns estados brasileiros.....	80
Tabela 7	Análise da variação molecular de populações de <i>S. pertinax</i> (Diptera: Simuliidae) da região Norte com os estados do Pará e Rondônia.....	80
Tabela 8	Análise da variação molecular de populações de <i>S. pertinax</i> (Diptera: Simuliidae) da região Centro-Oeste com o Distrito Federal e os estados do Goiás e Mato Grosso.....	80

CAPÍTULO III**Seleção de estirpes amazônicas de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera)**

Tabela 1	Alíquotas de estirpes de Bt utilizadas na realização de bioensaio com larvas de Simuliidae.....	94
Tabela 2	Toxicidade de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> CL ₅₀ (mg/mL) contra larvas de <i>Simulium</i> spp.....	99

CAPÍTULO IV**Susceptibilidade de Simuliidae a toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915**

Tabela 1	Alíquotas de estirpes de Bt utilizadas na realização de bioensaio com larvas de Simuliidae.....	109
Tabela 2	Toxicidade CL ₅₀ (mg/mL) de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> contra larvas de Simuliidae.....	102

LISTA DE FIGURAS**INTRODUÇÃO**

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Simulium</i> sp. com quatro estágios de desenvolvimento. Desenho: Hamada, N.....	1
Figura 2	Vista frontal mostrando diferenças no adulto de Simuliidae. a) macho; b) fêmea.....	2
Figura 3	a) Danos causados por adultos de <i>S. pertinax</i> em perna de criança (oito anos) na Balsa do rio Abuna/RO; b) Visão próxima da picada de <i>S. pertinax</i>	4
Figura 4	a) Microscopia de contraste de fases de <i>B. thuringiensis</i> (1000X). b) Microscopia eletrônica de varredura de <i>B. thuringiensis</i> mostrando: (c) cristais; (e) esporo.....	5

CAPÍTULO I**Distribuição e chave de identificação de pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito Federal e algumas localidades no estado de Goiás, Brasil**

Figura 1	Distribuição dos pontos de coleta de Simuliidae (Diptera: Nematocera) no Distrito Federal e alguns municípios e no estado de Goiás, Brasil.....	15
----------	---	----

Figura 2	Principais tipos de habitats e substratos de algumas localidades em que larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) foram coletadas no Distrito Federal e Goiás. 1) Rio Cabano, Fazenda Saco; 2) Ponte Alta- Gama/DF; 3) Morro da Cruz/São Sebastião/ DF; 4) Rio Maranhão/ Bacia do Rio Tocantins-DF 180; 5) Rio Cocal/GO; 6) Rio Parana, próximo a “João Cara-Limpa”/GO 440; 7) Cachoeira do Itiquira- Br020/GO; 8) Córrego do Urubu/ Mansões do Lago Norte/ DF; 9) rio São Bartolomeu/ DF 250; 10) Córrego Santos Dumont/ DF130-Planaltina; 11) Rio Lambaris/GO; 12) Rio Mangabeira/ GO; 13) Córrego DVO/DF-Planaltina; 14) Córrego da Rajadinha/ DF 130; 15) Rio Descoberto Fazenda Jibóia/ DF-130; 16) Córrego Samambaia/ DF180; 17) Córrego Libóreo/ GO 118; 18) Córrego Roncador/ GO 118; 19) Córrego das Branca I/ GO 118; 20) Córrego Vereda Grande/ DF 205; 21) Córrego Pipiripau/ DF230; 22) Córrego Bananal/ Br020; 23) Córrego do Torto/ Br020; 24) Córrego da Palma/ DF205; 25) Córrego Santana/ DF140; 26) Córrego Lamarão/ DF125; 27) Embrapa Hortaliças/DF; 28) Córrego das Lajes/ DF290; 29) Córrego Rodeador/DF 430; 30) Brazilândia-Brás Gás/DF.....	18
Figura 3	<i>Simulium jujuyense</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos.....	34
Figura 4	<i>Simulium subpallidum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito filamentos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica; b) vista ventral da cápsula cefálica com gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “U”.....	35
Figura 5	<i>Simulium subnigrum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos.....	36
Figura 6	<i>Simulium pertinax</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação; b) vista ventral da cápsula cefálica, com gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “V” aberto.....	37
Figura 7	<i>Simulium inaequale</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, vista geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos.....	38
Figura 8	<i>Simulium lutzianum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista lateral e; b) dorsal; c) filamentos branquiais com oito ramos. Casulo com textura de feltro.....	39
Figura 9	<i>Simulium nigrimanum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral da pupa; c) filamentos branquiais com 18 filamentos....	40
Figura 10	<i>Simulium dekeyseri</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) d) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação; b) vista ventral da cápsula cefálica, mostrando o gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “V” fechado.....	41
Figura 11	<i>Simulium spinibranchium</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista lateral; b) vista dorsal; c) filamentos branquiais com oito ramos.....	42
Figura 12	<i>Simulium perflavum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.....	43

Figura 13	<i>Simulium rubrithorax</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) detalhe da região anterior do casulo, em vista lateral; d) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal e; b) ventral da cápsula cefálica, mostrando fenda gular em forma de “Y” em 180 °C.....	44
Figura 14	<i>Simulium anamariae</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista lateral e; b) dorsal; c) filamentos branquiais com seis ramos c) detalhe anterior da vista dorsal do casulo. Larva: a) detalhe da região distal do abdome com as papilas ventrais; b) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação.....	45
Figura 15	<i>Simulium lobatoi</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos. Larva: d) vista dorsal da cápsula cefálica; e) vista ventral da cápsula cefálica, mostrando gânglio subesofageano levemente pigmentado.....	46
Figura 16	<i>Simulium rappae</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa – Goiás/ Formosa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos; Goiás/ Alto Paraíso. d) vista dorsal e; e) lateral da pupa; f) filamentos branquiais com quatro ramos. Larva: a) vista dorsal e; b) ventral da cápsula cefálica.....	47
Figura 17	Variação no número e forma dos filamentos branquiais de <i>Simulium rappae</i> (Diptera: Simuliidae). a) e b) ponto de coleta de número 71, Goiás-Alto Paraíso; c) ponto de coleta de número 12, Goiás- Formosa; d) ponto de coleta de número 7, Goiás- Corumbá; e) ponto de coleta de número 11, Goiás- Formosa.....	48
Figura 18	<i>Simulium botulibranchium</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais. Larva: a) vista dorsal e b) ventral da cápsula cefálica com fenda gular pouco profunda.....	49
Figura 19	<i>Simulium exiguum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal totalmente despigmentada e; b) vista ventral da cápsula cefálica.....	50
Figura 20	<i>Simulium serranus</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.....	51
Figura 21	<i>Simulium hirtipupa</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com doze ramos; d) vista lateral do casulo com rugosidades irregulares.....	52
Figura 22	<i>Simulium brachycladum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspectos gerais: a) filamentos branquiais com seis ramos; b) vista dorsal do casulo e c) vista lateral do casulo.....	53
Figura 23	<i>Simulium dinelli</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.....	54
Figura 24	<i>Simulium ochraceum</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) filamentos branquiais com oito ramos; c) vista dorsal do casulo, mostrando a expansão lateral e d) vista lateral do casulo.....	55
Figura 25	<i>Simulium rorotaense</i> (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) casulo sem a pupa, mostrando as aberturas na região anterior, lateral do casulo; d) filamentos branquiais.....	56

CAPÍTULO II

Variabilidade genética (intra e inter- populacional) de *Simulium pertinax* baseado no gene Citocromo Oxidase c I do DNA mitocondrial

Figura 1	Estágios imaturos de <i>Simulium pertinax</i> . a) larva com filamentos branquiais em detalhe; b) aspecto geral pupa.....	62
Figura 2	Locais de coleta das populações de <i>S. pertinax</i> (Díptera: Simuliidae) nos diferentes estados Brasileiros.....	65
Figura 3	Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do gene Citocromo oxidase I do DNA mitocondrial de espécimes de <i>Simulium pertinax</i> coletados em diferentes estados Brasileiros. Linha 1, 2 e 3: marcador de quantificação <i>Lambda</i> com 1, 3 e 5 μ L; de 4 a 6: Pará; 7 a 9: Mato Grosso; 10 a 12: Rio Grande do Sul; 13 a 15: São Paulo; 16 a 18: Distrito Federal; 19 a 21: Goiás; 22 a 24: Rondônia.....	72
Figura 4	Dendrograma das estimativas de relações entre as sequências das populações de <i>Simulium pertinax</i> (Diptera: Simuliidae) do Brasil demonstrando suas similaridades. Distrito Federal (DF-1, DF-2, DF-3), Goiás (GO-1, GO-2, GO-3), Mato Grosso (MT-1, MT-2, MT-3), Pará (PA-1, PA-2, PA-3), Rondônia (RO-1, RO-2, RO-3), Rio Grande do Sul (SP-1, SP-2, SP-3) e São Paulo (SP-1, SP-2, SP-3). <i>S. decuplum</i> é a espécie do grupo externo.....	76

CAPÍTULO III

Seleção de estirpes amazônicas de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera)

Figura 1	a) método de coleta das amostras de solo com boca de lobo. (b e c) solos argilosos com e sem vegetação respectivamente e (d) com solo arenoso.....	88
Figura 2	Sacos plásticos colocadas nos leitos dos córregos para colonização e obtenção de larvas de Simuliidae para os bioensaios.....	91
Figura 3	Bioensaio de simulídeos. (a) larvas coletadas no campo; (b) beckers contendo larvas em agitação.....	93
Figura 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com Dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) das estirpes tóxicas a <i>Simulium</i> sp. M=marcador; 1: S1806 (padrão), 2: S1785, 3: S2271, 4: S2272, 5: S1704, 6: S2023.....	100
Figura 5	Caracterização molecular das estirpes S2271, S2272, mostrando fragmentos de DNA para a detecção da presença dos genes <i>cyt1</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry10</i> e <i>cry11</i> . M=marcador; O= controle negativo; S1806= <i>Bti</i> ; S2271 e S2272= estirpes amazônicas.....	101

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 Datas de coleta, lugares amostrados, coordenadas, caracterização do habitat (pH, Conde = condutividade, Temp. = temperatura), coletores (col.) e espécies de *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae) de Goiás e Distrito Federal, Brasil. Coletores: EP, Eleny Pereira; LS, Luis Siqueira; FR, Felipe Ramos; MX, Murilo Xavier; NH, Neusa Hamada. JF, Jerfeson Oliveira da Silva; MP, Mateus Pepinelli; RK, Regina Kikuchi; LF, Livia Fusari; AF, Adnilton Fonseca. Espécies: 1: *S. dekeyseri*; 2: *S. pertinax*; 3: *S. serranum*; 4: *S. spinibranchium*; 5: *S. subpallidum*; 6: *S. dinellii*; 7: *S. ochraceum*; 8: *S. lobatoi*; 9: *S. rubrithorax*; 10: *S. botulibranchium*; 11: *S. inaequale*; 12: *S. rappae*; 13: *S. subnigrum*; 14: *S. exiguum*; 15: *S. anamariae*; 16: *S. jujuyense*; 17: *S. bipunctatum*; 18: *S. lutzianum*; 19: *S. perflavum*; 20: *S. rorotaense*; 21: *S. hirtipupa*; 22: *S. nigrimanum*; dnc: dados não coletados..... 138
- Anexo 2 Número das amostras, data, localização e coletores das amostras de solo coletadas na Amazônia brasileira. N: número de amostras, Lat.: Latitude, Lon.: Longitude, Col., Coletores: AS, Aldaléia Santos; EP, Eleny Pereira e SC, Selmo Costa, AMST. ANAL.: Amostras Analisadas, Bt: Amostras positivas para *Bacillus thuringiensis*..... 146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
~	aproximadamente
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie <i>israelensis</i>
CL ₅₀	Concentração que mata 50% da população testada
CO I	Citocromo Oxidase subunidade I
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAmt	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
DNAr	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
Fig.	Figura
FS	Fator Sinergismo
g	Grama
GO	Goiás
h	horas
kb	Quilo bases (1000 pares de bases)
kDa	Quilodalton
Km	Kilômetro
L	Litro
M	mol/L
mg	Miligrama
min	minuto
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma

ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotação por minuto
S	sul
s.l.	<i>sensu lato</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
spp	espécies
Tab.	Tabela
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
U	unidade enzimática
W	oeste
δ	delta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar (micromol por litro)

I-INTRODUÇÃO

A família Simuliidae Newman pertence à ordem Diptera Linnaeus, subordem Nematocera Berthold. Insetos dessa ordem possuem distribuição mundial, estando ausente somente na Antártida e em alguns desertos e ilhas onde não ocorre água corrente. De acordo com as regiões, recebem diferentes denominações. No Norte do Brasil, as espécies de Simuliidae são conhecidas popularmente como piuns, enquanto na região Sul como borrachudos (Currie e Adler, 2008).

Os adultos de Simuliidae são vistos como pequenas moscas que medem entre 1,2 a 6,0 mm. Porém, a forma do corpo é totalmente diversa em seu desenvolvimento, pois são insetos holometábolos, possuindo metamorfose completa, com quatro estágios de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Adler, 1994). (Fig. 1).

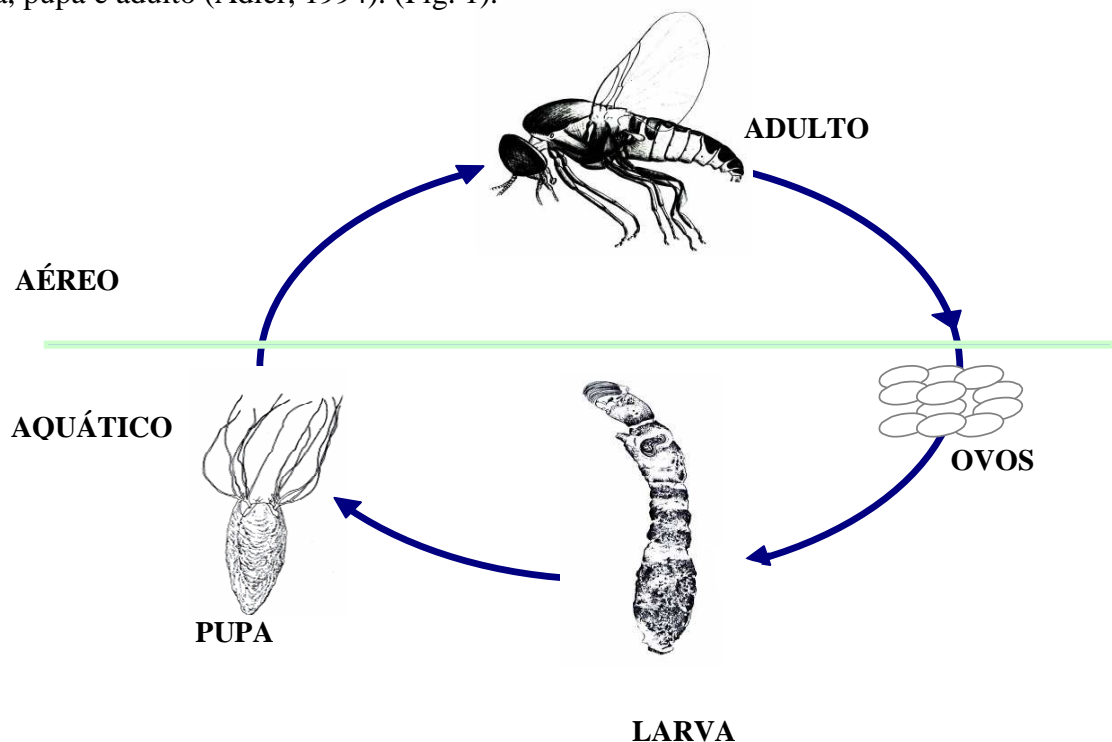


Figura 1- Ciclo de vida de espécies de Simuliidae com quatro estágios de desenvolvimento.

Desenho: Hamada, N.

O estágio adulto apresenta dimorfismo sexual. Além das diferenças no formato das genitálias, os sexos podem ser diferenciados pelo formato dos olhos. Os machos possuem olhos holópticos, cujas margens internas se tocam na região dorsal e omatídeos superiores diferenciados dos inferiores, enquanto as fêmeas possuem olhos dicópticos, separados e os omatídeos não são diferenciados (Fig. 2).

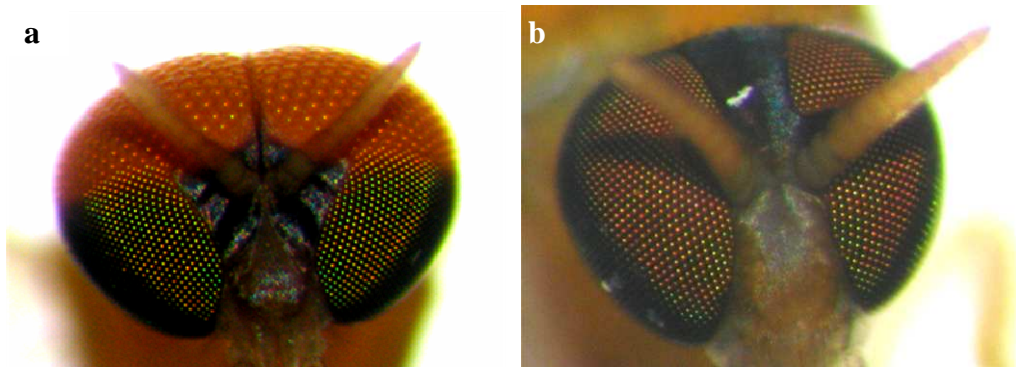


Figura 2- Vista frontal mostrando diferenças no adulto de Simuliidae. a) macho; b) fêmea.

Fonte: Pereira, E.S.

Os estágios imaturos habitam quase todos os tipos de ambientes aquáticos (Rey, 1973; Adler, 1994), ocupando, principalmente, cachoeiras ou corredeiras e saídas de barragens. Esses habitats podem ser classificados como fixos (córregos permanentes) e temporários (só existem em determinada época do ano) (Briceño-Iragorry, 1943). Os adultos de Simuliidae têm habitat terrestre. Os habitats aquáticos são selecionados pela fêmea, de acordo com as condições físico-químicas dos criadouros para o acasalamento e ovoposição (Hamada e McCreadie, 1999; Hamada e Adler, 2001).

As larvas são principalmente filtradoras não seletivas, alimentando-se de matéria orgânica particulada fina, compreendendo organismos planctônicos, perifíticos e até microinvertebrados (Alencar *et al.*, 2001). Os machos adultos alimentam-se de néctar de

flores ou seiva de plantas (Ruas Neto *et al.*, 1984; Neves, 1991), enquanto as fêmeas adultas, são hematófagas, necessitando de sangue para o amadurecimento dos ovos (Cunha, 2001).

A atividade hematofágica das fêmeas de Simuliidae é realizada principalmente durante o dia, embora algumas espécies, de acordo com as condições ambientais, possam ter atividade bimodais, apresentando um pico de atividade durante o período da manhã e outro no período da tarde (Py-Daniel *et al.*, 1999).

As formas imaturas dos Simuliidae são abundantes na comunidade de insetos aquáticos sendo importante na dieta alimentar de outros organismos, contribuindo para o fluxo de matéria orgânica na rede alimentar de outras formas jovens de insetos e também na dieta de peixes (Burton e McRae, 1972; Ruas Neto *et al.*, 1984; Adler, 1994; Alencar *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2000). Além disso, podem ser utilizados como bioindicadoras da qualidade de água, pois algumas espécies são suscetíveis a ambientes poluídos (Adler, 1994).

Os adultos de algumas espécies são de grande interesse sócio-econômico, pois quando em alta densidade podem causar sérios prejuízos. Para as pessoas sensíveis as picadas, podem induzir uma resposta alérgica, inflamação da pele, náuseas, cefaléia e febre (Molloy, 1990). Infecção bacteriana localizada pode ocorrer após as pessoas coçarem áreas picadas (Fig. 3a e 3b). Em áreas agrícolas a alta abundância de Simuliidae reduz a qualidade do trabalho, prejudicando a produtividade dos trabalhadores rurais (Souza, 1984; Adler e Mason, 1997) e a produção de alimentos de importância comercial, devido ao incômodo que causam aos animais durante a alimentação provocando “stress” nos mesmos (Campos-Gaona e Andrade, 1999). Na indústria turística, a alta abundância desses insetos impede o acesso a áreas que poderiam ser exploradas economicamente, pois suas picadas causam incômodos (Araújo-Coutinho *et al.*, 1988). Na área veterinária, a importância dos simulídeos está

relacionada à transmissão de protozoários e filárias, que podem causar mortalidade em grandes populações de aves, prejudicando a produção.

No entanto, a maior relevância desses insetos está relacionada à saúde, pois sendo as fêmeas hematófagas, são vetores e hospedeiros em potencial de vírus, bactérias, protozoários e helmintos (Hamada, 1993; Adler, 1994). Algumas espécies são vetores de filárias como *Mansonella ozzardi* Manson, 1897, causadora da Mansonelose, e *Onchocerca volvulus* Leuckart, 1983, nematóide parasita de humanos causadores da Oncocercose (Marcondes, 2001), doença popularmente conhecida como cegueira dos rios (Cunha, 2001).



Figura 3– a) Danos causados por adultos de *S. pertinax* em perna de criança (oito anos) na Balsa do rio Abuna/RO; b) Visão próxima da picada de *S. pertinax*. Fonte: Pereira, E.S.

Por serem as larvas de Simuliidae filtradoras não seletivas, alimentam-se também de microrganismos como bactérias (Fredeen, 1963).

As bactérias são encontradas em diversos nichos, desempenhando um importante papel ecológico (e.g. Moretti, 2003), dentre o qual pode se citar o efeito patogênico de algumas espécies a diversos insetos (Bulla-Jr., 1975). Bactérias entomopatogênicas, principalmente, da família Bacillaceae do gênero *Bacillus* vem assumindo importância relevante em programas de controle biológico de insetos vetores e pragas agrícolas.

Dentre as bactérias entomopatogênicas esporulantes, *Bacillus thuringiensis* Berliner é a mais estudadas (Fig. 4a). Essas bactérias possuem ampla distribuição, sendo encontradas em ambientes terrestres e aquáticos (Martins e Travers, 1989) e caracterizam-se pela produção de um cristal protéico (Fig. 4b) com ação tóxica para insetos. *B. thuringiensis* sorotipo H-14 foi isolado de amostras coletadas em criadouros em Israel (de Barjac, 1978), é tóxico às espécies de Culicidae e Simuliidae (Regis *et al.*, 2001) e tem sido empregado em programas de controle no oeste da África e América do Sul (Regis *et al.*, 2000). No Brasil, tem sido utilizado, sobretudo na região Sudeste e Sul para controle de *Simullium pertinax* Kollar (Andrade e Branco Jr., 1991; Rabinovitch *et al.*, 2000; Regis *et al.*, 2000; Cavados *et al.*, 2001), tendo substituído com vantagens os inseticidas químicos e diminuindo consequentemente os impactos causados por estes.

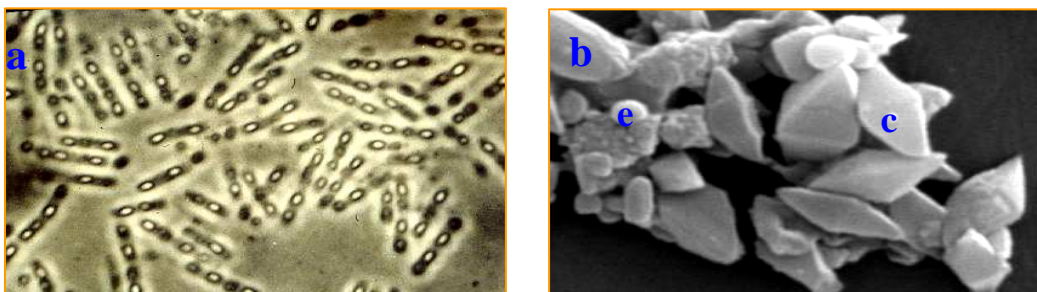


Figura 4-a) Microscopia de contraste de fases de *B. thuringiensis* (1000X). b) Microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo.

Fonte: EMBRAPA/CENARGEN.

As técnicas de biologia molecular têm facilitado a execução de estudos filogenéticos de muitas populações de Diptera tais como Culicidae, Simuliidae e Tephritidae. Para auxiliar os estudos entomológicos, muitos marcadores moleculares estão disponíveis (e.g. Post e Flook, 1992; Wilson e Post, 1994; Tang *et al.*, 1995; Flook e Post, 1997; Dumas *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2000; Conn *et al.*, 2001; Dueñas *et al.*, 2002; Morales-Hojas *et al.*, 2002).

O DNA mitocondrial tem sido amplamente estudado para resolver problemas principalmente de sistemática, filogenia e estrutura populacional em vários grupos de organismos. Este possui vários genes codificantes (Loxdale e Lushai, 1998), dentre os quais o gene Citocromo Oxidase subunidade I tem sido amplamente empregado para estudos com Simuliidae com intuito de diferenciar principalmente espécies crípticas ou grupos de espécies de interesse econômico.

Na África, estudos têm sido relatados para o grupo de espécies *Simulium damnosum* principal vetor de oncocercose na África (Higazi *et al.*, 2000; Krueger e Hennings, 2006). Prues *et al.* (2000), utilizaram o gene Citocromo Oxidase II do DNA mitocondrial para inferir relações filogenéticas entre espécies de Simuliidae em diferentes níveis taxonômicos e espécies-irmãs. Problemas filogenéticos também foram resolvidos para populações de Simuliidae da Tailândia (Phayuhasena *et al.* 2010). Esta ferramenta tem sido bastante empregada em análises filogenéticas de grupos próximos. Day *et al.* (2008) por meio do gene Citocromo Oxidase I conseguiram diferenciar dois morfótipos larvas de *Simulium reptans* (Linnaeus) na Grã-Bretanha, uma espécie típica e uma variedade *S. reptans* var. *galeratum* que existiam simpatricamente. Na região Neártica Rivera e Currie (2009) utilizaram esta mesma ferramenta para criar um perfil de 65 espécies distintas morfologicamente e de espécies irmãs.

O gene COX I tem mostrado ser uma ferramenta útil para resolver questões principalmente de grupos de espécies irmãs que não podem ser diferenciadas em todos os estágios.

1.1 Justificativa

A importância econômica e epidemiológica de espécies da família Simuliidae tem estimulado estudos em muitas áreas como a taxonomia, ecologia, manejo, citogenética e biologia molecular (Crosskey, 1990).

Simulium pertinax Kollar é considerado uma praga de grande importância econômica em várias regiões do Brasil (Mardini *et al.*, 2000; Regis *et al.*, 2000; Campos e Andrade, 2002). O controle deste inseto tem sido realizado com a utilização de inseticidas sintéticos ou biolarvicidas (Mardini *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001; Campos & Andrade, 2002; Araújo-Coutinho *et al.*, 2003; Cavados *et al.*, 2004 e 2005). Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil o controle de *S. pertinax* é bastante complexo, pois muitas populações apresentaram resistência aos inseticidas sintéticos (Ruas Neto, 1984; Mardini *et al.*, 2000; Campos & Andrade, 2002). Porém, com os métodos de controle alternativos, como o uso de biolarvicida (*Bti*), a densidade populacional de simúlídeos diminuiu nas regiões em foco.

No entanto, existem poucos produtos utilizados comercialmente nos programas de controle biológico visto sua indisponibilidade no mercado nacional e o seu alto custo de importação. Uma das alternativas para contornar este problema é o desenvolvimento de produtos nacionais, que possam reduzir os custos financeiros, facilitando sua acessibilidade aos agricultores ou órgãos de saúde pública.

Nesse sentido, a identificação de novas estirpes bacterianas é um passo fundamental no processo. Diversos grupos de pesquisadores, em diversas partes do mundo, buscam novas estirpes promissoras.

Simulium pertinax é a espécie que afeta em maior proporção às populações humanas e às criações de animais. Entender os padrões de dispersão para mapear os principais criadouros é importante para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle, visto que a principal forma de controle desses insetos visa os habitats das formas imaturas.

O conhecimento da estrutura genética populacional, do fluxo gênico entre populações e a busca de uma identificação mais rápida, são ferramentas importantes no combate a *S. pertinax*. Até hoje, poucos estudos utilizaram métodos moleculares para investigar a variabilidade genética intra e inter populacional para esta espécie.

Neste estudo análises moleculares sobre populações da espécie *S. pertinax* foram realizadas fornecendo subsídios para melhor compreensão da variabilidade genética intra e inter populacional por meio do gene Citocromo Oxidase subunidade I. E, ainda realizou-se uma ampla amostragem de solos no município de Manaus com o objetivo de isolar, identificar e caracterizar estirpes tóxicas para espécies de Simuliidae de interesse econômico. Estas estirpes poderão ser utilizadas como base para o desenvolvimento de produtos para programas de controle biológico no Brasil, proporcionando uma melhor qualidade de vida aos moradores das regiões em foco ou em áreas turísticas.

II- OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar as diferentes espécies de *Simulium* presentes na região do Centro-oeste, determinar a variabilidade genética de populações de *S. pertinax* e selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a Simuliidae e analisar a toxicidade de proteínas isoladas.

2.2 Objetivos específicos

- Inventariar e obter informações sobre as espécies de simúlídeos (Diptera: Simuliidae) ocorrentes no Distrito Federal e em algumas localidades no seu entorno, no estado de Goiás, assim como fornecer uma chave para identificar espécies da região baseada em características morfológicas;
- Determinar a variabilidade genética de diferentes populações de *S. pertinax* provenientes de vários Estados brasileiros por meio do Gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial;
- Isolar e identificar *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo da cidade de Manaus, Amazônia Central;
- Selecionar estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas às larvas de Simuliidae;
- Caracterizar os aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares as estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas obtidas;
- Testar a susceptibilidade de estirpes de *Bt jegathesan* e *Bt medelin* do banco de bactérias do Cenargen/Embrapa.
- Testar a susceptibilidade de Simuliidae a toxinas Cry e Cyt de *B. thuringiensis israelensis*.

CAPÍTULO I

Distribuição e chave de identificação de pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito Federal e algumas localidades no estado de Goiás, Brasil

1. Resumo

Com o objetivo de inventariar e obter informações sobre as espécies de simuliídeos (Diptera: Simuliidae) ocorrentes no Distrito Federal e em algumas localidades no seu entorno, no estado de Goiás foram amostradas larvas coletadas em 71 cursos d'água. Uma chave para identificar as espécies ocorrentes nessa região, baseada em pupas, foi elaborada para subsidiar estudos ecológicos e programas de controle populacional de espécies de Simuliidae antropofílicas, quando necessário. Para diferenciar espécies próximas, morfologicamente similares no estágio pupal, foram avaliados caracteres de larvas e/ou de fêmeas. Foi coletado um total de 22 espécies: *Simulium dekeyseri*; *S. pertinax*; *S. serranum*; *S. spinibranchium*; *S. subpallidum*; *S. dinellii*; *S. brachycladum*; *S. lobatoi*; *S. rubrithorax*; *S. botulibranchium*; *S. inaequale*; *S. rappae*; *S. subnigrum*; *S. exiguum*; *S. anamariae*; *S. jujuyense*; *S. ochraceum*; *S. lutzianum*; *S. perflavum*; *S. rorotaense*; *S. hirtipupa*; *S. nigrimanum*. De todas as espécies já registradas para o Goiás e para o Distrito Federal, *S. incrustatum*, *S. travassoi*, *S. cuasiexiguum*, *S. siolii*, *S. minusculum*, *S. guianense* e *S. scutistriatum* não estavam presentes no presente estudo. Como resultado do inventário realizado 10 espécies foram registradas pela primeira vez, na área de estudo (*S. serranum*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. botulibranchium*, *S. anamariae*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa*).

Palavras- chave: borrachudo, insetos aquáticos, inventário, rios e córregos do Centro-Oeste, taxonomia.

2. Abstract

In order to identify species of blackfly (Diptera: Simuliidae) occurring in the Federal District and in some localities in its surroundings, at state of Goiás, insect samples were collected in 71 rivers. A key to identify the species occurring in this region, based on pupae, was prepared to support ecological studies and population control programs for species of anthropophilic Simuliidae. To distinguish between closely related species that are morphologically similar in the pupal stage, characters of larvae and/or females were evaluated. A total of 22 species were collected: *Simulium dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. botulibranchium*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. exiguum*, *S. anamariae*, *S. jujuyense*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*; *S. perflavum*, *S. rorotaense*, *S. hirtipupa*, *S. nigrimanum*. Of all the species already described present in Goiás and Distrito Federal, *S. incrustatum*, *S. travassoi*, *S. cuasiexiguum*, *S. siolii*, *S. minusculum*, *guianense* e *S. scutistriatum* were not present in this study. As a result of inventory held 10 species were recorded for the first time in the study area (*S. serranus*, *S. dinellii*, *S. brachycladum*, *S. botulibranchium*, *S. anamariae*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa*).

Key-words: aquatic insects, black fly, inventory, rivers and streams of the midwest, Brazil, taxonomy.

3. Introdução

A família Simuliidae possui ampla distribuição geográfica e por sua importância médico-veterinária e econômica tem estimulado muitos estudos de ecologia, biologia, manejo, controle químico ou biológico, citogenética e de taxonomia (e.g. Crosskey, 1990; Mardini *et al.*, 2000; Py-Daniel *et al.*, 2000; Campos & Andrade, 2002; Hamada *et al.*, 2002; Alvan-Aguilar *et al.*, 2005; Pepinelli *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2010; Figueiró e Gil-Azevedo, 2010).

Há no mundo, aproximadamente 2100 espécies de Simuliidae, destas, 338 (16%) estão presentes na região Neotropical e 94 no Brasil (Adler e Crosskey, 2010). O conhecimento sobre a distribuição de espécies e de seus habitats é importante para entender padrões de diversidade e riqueza e, no caso de espécies de importância médico-veterinária e econômica é essencial para subsidiar programas de controle das espécies associadas ao problema. Informações dessa natureza podem diminuir o uso de recursos financeiros, uma vez que as ações de controle, que no caso de Simuliidae são direcionadas para os criadouros dos imaturos, podem ser concentradas nas espécies-alvo.

Embora haja na literatura registros de ocorrência e descrição de espécies de Simuliidae para a região do Centro-Oeste do Brasil (e.g. Coscarón, 1981; Shelley e Py-Daniel, 1981; Py-Daniel, 1987; Shelley *et al.*, 2001; Luna-Dias *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2008), não há ainda chave taxonômica disponível para identificar as espécies ocorrentes nos cursos d'água nessa área, sendo esta útil para uma identificação mais rápida desses insetos.

Os objetivos do presente estudo foram inventariar e obter informações sobre as espécies de simulídeos (Diptera: Simuliidae) ocorrentes no Distrito Federal e em algumas localidades no seu entorno, no estado de Goiás, assim como elaborar uma chave para identificar espécies da região, fornecendo subsídios para estudos ecológicos e para programas

de controle populacional de espécies de importância médico-veterinária e econômica, na área de estudo.

4. Material e Métodos

As coletas dos imaturos de Simuliidae para confecção da chave dicotômica foram realizadas em algumas cidades satélites do Distrito Federal e em alguns municípios de Goiás nos anos de 2003, 2007, 2008 e 2009, na região Centro-Oeste do Brasil, com predomínio da vegetação do Cerrado (Anexo 1) (Figs. 1 e 2).

As coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram registradas com o GPS (GPSMAP 76S- GARMIN).

Larvas e pupas de Simuliidae foram coletadas nos diferentes substratos disponíveis, tanto naturais (e.g. folhas decíduas, folhas da vegetação marginal e macrófitas submersas, galhos, rochas e leito rochoso) quanto introduzidos pelo homem (e.g. sacolas plásticas e roupas) (Fig. 2). A coleta foi realizada por meio de catação direta, com auxílio de uma pinça entomológica e os espécimes foram fixados em etanol absoluto. Algumas pupas faradas (adulto envolto pela cutícula da pupa) foram mantidas em tubos de polipropileno com papel filtro úmido até a emergência do adulto. Embora a chave de identificação seja para pupas, algumas estruturas de larvas como a cápsula cefálica e o pronoto dos adultos foram ilustradas, pois foram utilizadas para auxiliar a identificação específica. Para identificação das pupas, caracteres como o casulo e os filamentos branquiais foram utilizados.

Alguns adultos foram desidratados, de acordo com a metodologia de Sabroski (1966) e, montados a seco em alfinetes entomológicos para visualização de alguns caracteres do tórax. As espécies foram identificadas por meio de literatura especializada incluindo trabalhos de descrição de espécies, catálogos com registros de ocorrências e chaves

taxonômicas de outras localidades abrangendo a região Neotropical (e.g. Coscaron, 1981, 1987; Shelley e Py- Daniel, 1981; Maia-Herzog *et al.*, 1985; Hamada e Fouque, 2001; Hamada e Adler, 2001; Hamada e Grillet, 2001; Hamada *et al.*, 2003, 2006; Gil-Azevedo *et al.*, 2004; Luna-Dias *et al.*, 2004; Gil-Azevedo *et al.*, 2005; Py-Daniel *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007, 2007; Hernández *et al.*, 2008). Todo o material identificado foi revisado pela taxonomista de Simuliidae do Laboratório de Insetos Aquáticos/INPA-Manaus, AM.

As figuras que compõem a chave de identificação foram obtidas por meio de um microscópio estereoscópio Leica M165C, conectado a um equipamento de aquisição de imagem digital e um microcomputador, utilizando o programa de auto-montagem Leica, Aplicativo Suite V3. Estruturas menores foram fotografadas sob um microscópio óptico Olympus BX 51, com uma câmera Olympus com sistema de aquisição digital modelo DP 72 utilizando o programa Cell D. Todos os espécimes identificados foram depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus-AM/ Brasil.

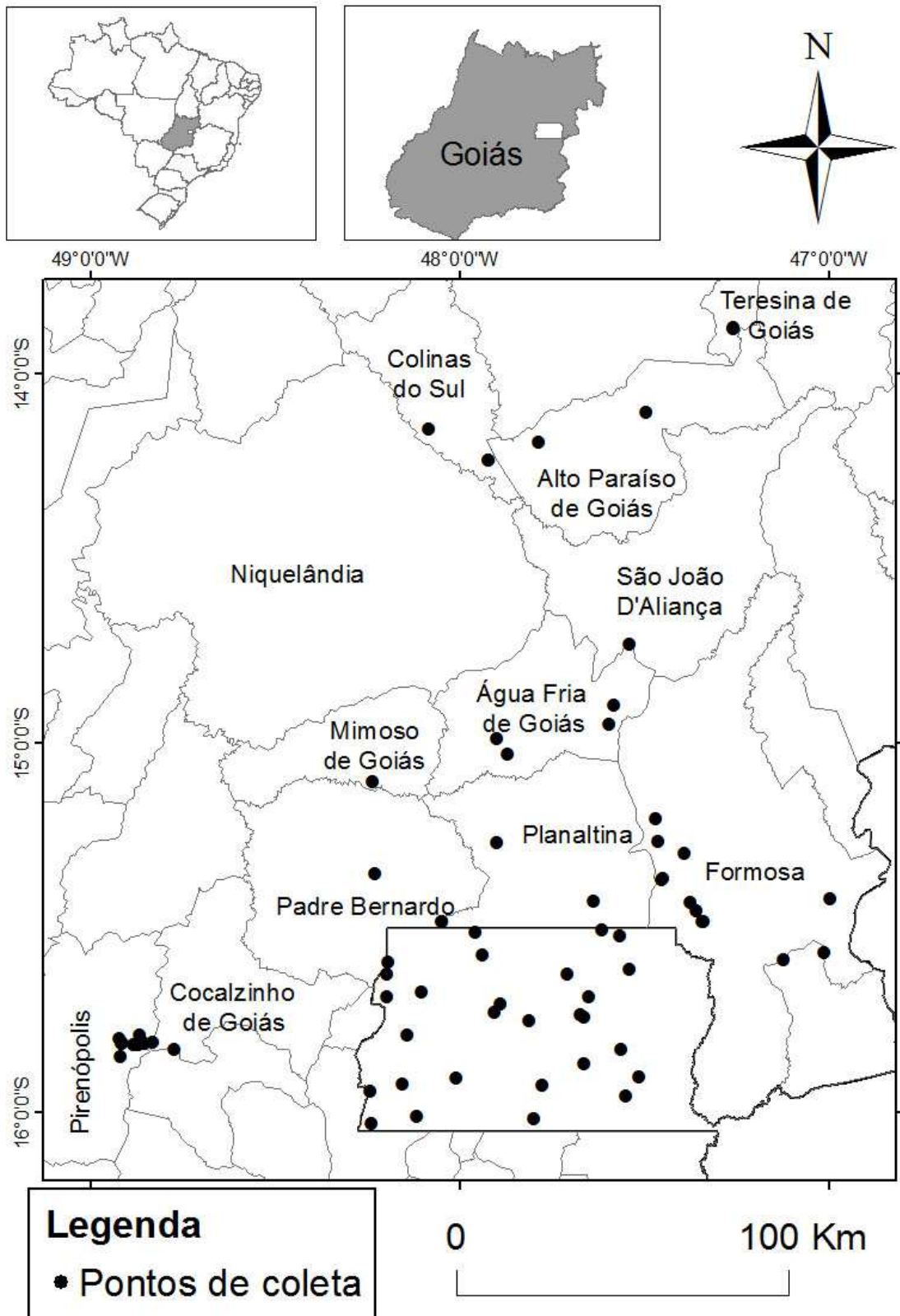


Figura 1- Distribuição dos pontos de coleta de Simuliidae (Diptera: Nematocera) no Distrito Federal e alguns municípios no estado de Goiás, Brasil.





Figura 2- Principais tipos de habitats e substratos de algumas localidades em que larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) foram coletadas no Distrito Federal e Goiás. 1) Rio Cabano, Fazenda Saco; 2) Ponte Alta- Gama/DF; 3) Morro da Cruz/São Sebastião/ DF; 4) Rio Maranhão/ Bacia do Rio Tocantins-DF 180; 5) Rio Cocal/GO; 6) Rio Parana, próximo a “João Cara-Limpa”/GO 440; 7) Cachoeira do Itiquira- Br020/GO; 8) Córrego do Urubu/ Mansões do Lago Norte/ DF; 9) rio São Bartolomeu/ DF 250; 10) Córrego Santos Dumont/ DF130-Planaltina; 11) Rio Lambaris/GO; 12) Rio Mangabeira/ GO; 13) Córrego DVO/DF-Planaltina; 14) Córrego da Rajadinha/ DF 130; 15) Rio Descoberto Fazenda Jibóia/ DF-130; 16) Córrego Samambaia/ DF180; 17) Córrego Libóreo/ GO 118; 18) Córrego Roncador/ GO 118; 19) Córrego das Branca I/ GO 118; 20) Córrego Vereda Grande/ DF 205; 21) Córrego Pípiripau/ DF230; 22) Córrego Bananal/ Br020; 23) Córrego do Torto/ Br020; 24) Córrego da Palma/ DF205; 25) Córrego Santana/ DF140; 26) Córrego Lamarão/ DF125; 27) Embrapa Hortaliças/DF; 28) Córrego das Lajes/ DF290; 29) Córrego Rodeador/DF 430; 30) Brazilândia-Brás Gás/DF.

Resultados e Discussão

Foram amostrados 71 cursos d'água no Distrito Federal e nas localidades amostradas em Goiás, onde foram coletadas 22 espécies (Anexo 1), pertencentes a oito subgêneros de Simuliidae. As seguintes espécies foram coletadas no Distrito Federal e Goiás: *Simulium (Chirostilbia) dekeyseri* Shelley & Py-Daniel, 1981; *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832; *Simulium (Chirostilbia) serranus* Coscarón, 1981; *Simulium (Chirostilbia) spinibranchium* Lutz, 1910; *Simulium (C.) subpallidum* Lutz, 1910; *Simulium (Ectemnaspis) dinellii* (Joan, 1912); *Simulium (Hemicnetha) brachycladum* Lutz & Pinto 1932; *Simulium (H.) lobatoi* Luna Dias, Hernández, Maia-Herzog & Shelley, 2004; *Simulium (H.) rubrithorax* Lutz, 1909; *Simulium (Inaequalium) botulibranchium* Lutz, 1910; *Simulium (I.) inaequale* (Paterson & Shannon, 1927); *Simulium (I.) rappae* Py-Daniel & Coscarón, 1982; *Simulium (I.) subnigrum* Lutz, 1910; *Simulium (Notolepria) exiguum* Rouband, 1906; *Simulium (Psaroniocompsa) anamariae* Vulcano, 1962; *Simulium (P.) jujuyense* Paterson & Shannon, 1927; *Simulium (Ectemnaspis) ochraceum* Walker, 1861; *Simulium (E.) lutzianum* Pinto, 1931; *Simulium (E.) perflavum* Roubaud, 1906; *Simulium (E.) rorotaense* Floch & Abonnenc, 1946; *Simulium (Thyrsopelma) hirtipupa* Lutz, 1910 e *Simulium (Trichodagmia) nigrimanum* Macquart, 1838. As espécies *S. serranus*, *S. lobatoi*, *S. rappae*, *S. exiguum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa* não foram coletadas no Distrito Federal. Somente as espécies *S. brachycladum* e *S. ochraceum* não foram coletadas no estado de Goiás. As espécies *S. subpallidum* (49,3%), *S. jujuyense* (49,3%) e *S. subnigrum* (46,5%) foram as que apresentaram as maiores frequências de ocorrência (Tab. 1). As espécies *S. dinelli*, *S. brachycladum*, *S. ochraceum* e *S. rorotaense* só ocorreram em um dos 71 locais amostrados (Tab. 1).

Para separar espécies muito similares no estágio pupal foi necessário analisar características de outros estágios de desenvolvimento (larva e/ou adulto).

Tabela 1- Espécies de Simuliidae coletadas em 71 localidades no Distrito Federal e áreas no entorno no estado de Goiás, número de locais em que ocorreram, frequência de ocorrência (%).

Espécies	Frequência (%)
<i>S. jujuyense</i>	35 (49,3)
<i>S. subpallidum</i>	35 (49,3)
<i>S. subnigrum</i>	33 (46,5)
<i>S. pertinax</i>	21 (29,6)
<i>S. inaequale</i>	17 (23,9)
<i>S. lutzianum</i>	16 (22,5)
<i>S. nigrimanum</i>	14 (19,7)
<i>S. dekeyseri</i>	11 (15,5)
<i>S. spinibranchium</i>	11 (15,5)
<i>S. perflavum</i>	8 (11,3)
<i>S. rubrithorax</i>	7 (9,9)
<i>S. anamariae</i>	6 (8,5)
<i>S. lobatoi</i>	6 (8,5)
<i>S. rappae</i>	6 (8,5)
<i>S. botulibranchium</i>	3 (4,2)
<i>S. exiguum</i>	3 (4,2)
<i>S. serranum</i>	2 (2,8)
<i>S. hirtipupa</i>	2 (2,8)
<i>S. brachycladum</i>	1 (1,4)
<i>S. dinellii</i>	1 (1,4)
<i>S. ochraceum</i>	1 (1,4)
<i>S. rorotaense</i>	1 (1,4)

Seguem abaixo informações sobre as espécies ocorrentes na área de estudo, estas são apresentadas de acordo com suas frequências de ocorrência.

Simulium (P.) jujuyense (Fig. 3). Esta espécie, assim como *S. subpallidum*, foi a que apresentou maior frequência de ocorrência na área amostrada (35,5%) (Tab. 1). Ela já havia sido registrada

anteriormente na área de estudo (Adler e Crosskey 2010). Esta espécie co-ocorreu com a maioria das espécies amostradas no presente estudo, exceto *S. serranus*, *S. dinelli*, *S. brachycladum* e *S. rorotaense*. Quanto ao hábito alimentar, as fêmeas são altamente antropofílicas (Hernández *et al.*, 2007). Registrou-se no presente estudo essa espécie em atividade de antropofilia em alguns lugares.

Simulium (C.) subpallidum- (Fig. 4). Esta espécie apresentou frequência de ocorrência de 35%, na área de estudo e, apresenta ampla distribuição no Brasil (Adler e Crosskey, 2010). A forma de bifurcação dos filamentos branquiais das pupas é altamente variável e, algumas vezes, confunde-se com *S. exiguum*. Para diferenciar essas duas espécies é necessário examinar a cápsula cefálica das larvas, *S. subpallidum* apresenta, em vista dorsal, mancha estreita, escura, bem característica (Fig. 4) enquanto que a larva de *S. exiguum* não possui pigmentação na cápsula cefálica, em vista dorsal (Fig. 19). *Simulium subpallidum* (Tab 1 e Anexo 1) também ocorreu em uma ampla variedade de córregos. No presente estudo, esta espécie co-ocorreu com a maioria das espécies coletadas, exceto, *S. ochraceum*, *S. rorotaense* e *S. hirtipupa* (Anexo 1).

Simulium (I.) subnigrum (Fig. 5). Esta espécie já havia sido registrada anteriormente na área de estudo (Adler e Crosskey, 2010) e, ocorreu com uma frequência de 33% (Tab. 1) na área amostrada. Ela foi coletada em córregos de dossel aberto ou semi-aberto, com leito contendo cascalho ou argiloso. Esta espécie co-ocorreu com a maioria das espécies da região, exceto, *S. dinelli*, *S. brachycladum*, *S. exiguum* e *S. hirtipupa* (Anexo 1). Há registros de hematofagia desta espécie em humanos no estado de São Paulo e zoofilia em cavalos (Hernandez *et al.*, 2007; Pepinelli *et al.*, 2003).

Simulium (C.) pertinax (Fig. 6). Esta espécie apresentou frequência de ocorrência de 29,6% e, sua distribuição está de acordo com Adler e Crosskey (2010). Esta espécie foi coletada tanto em ambientes de mata quanto em ambientes modificados pelo homem, estando de acordo com relatos existentes na literatura, de que ela tem forte habilidade para se adaptar em diferentes ambientes (e.g. Branco-Jr. e Andrade, 1992). Esta espécie co-ocorreu com a maioria das espécies coletadas, exceto *S. serranus*, *S. dinelli*, *S. brachycladum*, *S. ochraceum* e *S. rorotaense*. As fêmeas são altamente antropofílicas e, por esse fato, é uma das espécies que mais causa problemas em áreas de agricultura e turismo na região sul e sudeste do Brasil (Mardini *et al.*, 2000; Campos e Andrade, 2002).

Simulium (I.) inaequale (Fig. 7). Esta espécie já havia sido registrada anteriormente na área de estudo (Adler e Crosskey, 2010) e, apresentou uma frequência de 23,9% nos córregos amostrados (Tab. 1). Ela foi coletada principalmente sobre folhas decíduas ao longo do leito, concordando com algumas observações da literatura (e.g. Coscarón e Arias, 2007). Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. botulibranchium*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. anamariae*, *S. auripellitum*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum* e *S. nigrimanum* (Anexo 1). As fêmeas desta espécie podem ser antropofílicas ou zoofílicas (e.g. Coscarón, 1991; Shelley *et al.*, 2004; Coscarón e Arias, 2007).

Simulium (E.) lutzianum (Fig. 8). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste, com uma frequência de ocorrência de 22,5% (Tab. 1). Os córregos nos quais ela foi coletada apresentavam, geralmente, dossel fechado, com leito do rio com solo argiloso, misto (argiloso ou encascalhado) ou em forma de laje (Fig. 1 e Anexo 1). Os espécimes foram coletados sobre substrato (folhas submersas) da vegetação marginal. Esta espécie co-ocorreu com *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. rubrithorax*, *S. botulibranchium*,

S. inaequale, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. exiguum*, *S. anamariae*, *S. auripellitum* e *S. nigrimanum* (Anexo 1).

Simulium (T.) nigrimanum (Fig. 9). Esta espécie já havia sido registrada anteriormente na área de estudo (Adler e Crosskey, 2010). Foi coletada em córregos com dossel aberto, com pouca profundidade e leito com solo argiloso ou rochoso. Ela co-ocorreu com *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. exiguum*, *S. anamariae*, *S. auripellitum* e *S. lutzianum* (Anexo 1). As fêmeas são antropofílicas (Coscarón e Arias, 2007).

Simulium (C.) dekeyseri (Fig. 10). Esta espécie ocorreu com uma frequência de 15,5% e, sua distribuição está de acordo com Adler e Crosskey (2010). Possui grande similaridade morfológica com a espécie *S. pertinax* no estágio de pupa. De acordo com Shelley e Py-Daniel (1981) *S. dekeyseri* pode ser encontrada principalmente em águas limpas, sobre vegetação emergente e, suas fêmeas são zoofílicas. No presente estudo, *S. dekeyseri* co-ocorreu com a maioria das espécies exceto, *S. serranum*, *S. exiguum*, *S. ochraceum*, *S. rorotaense* e *S. nigrimanum*.

Simulium (C.) spinibranchium (Fig. 11). Esta espécie ocorreu em 15,5% dos criadouros amostrados e, sua ocorrência na área de estudo já havia sido registrada anteriormente (Adler e Crosskey, 2010). Larvas e pupas foram coletadas em córregos de dossel aberto, com leito rochoso com pouca profundidade, características similares já haviam sido citadas, anteriormente, na literatura (Coscarón, 1991, Coscarón e Arias, 2007). No entanto, esta espécie foi coletada, também, em um córrego altamente impactado (Anexo 1, número 42), que recebe águas do lago Veredinha, na cidade satélite de Brazlândia, DF (Fig 1; Tab. 1 e Anexo 1). No presente estudo esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. brachycladum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. botulibranchium*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S.*

subnigrum, *S. auripellitum*, *S. lutzianum*, *S. hirtipupa* e *S. nigrimanum* (Anexo 1). Fêmeas foram capturadas em atividade de antropofilia, durante a realização do trabalho de campo, corroborando com outros relatos na literatura (Hernandez *et al.*, 2007).

Simulium (E.) perflavum (Fig. 12). Esta espécie é registrada pela primeira vez no Distrito Federal e, com uma frequência de ocorrência de 11% na área amostrada (Tab. 1). Larvas e pupas foram coletadas em córregos com ambientes abertos. No presente estudo, alguns pontos de coleta foram realizados debaixo de pontes ao longo da rodovia BR-070 onde os espécimes foram coletados geralmente em tufo de folhas verdes presentes no meio do leito dos córregos. No ponto de coleta de número 2 foram coletados em sacos plásticos. Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. anamariae* e *S. jujuyense* (Anexo 1).

Simulium (H.) rubrithorax (Fig. 13). No presente estudo esta espécie é registrada pela primeira vez no Distrito Federal, sua ocorrência em Goiás já havia sido observada anteriormente (Adler e Crosskey, 2010). Esta espécie ocorreu com uma frequência de 9,9% dos locais amostrados (Tab. 1). Larvas e pupas foram coletadas em córregos com dossel aberto, aderidas principalmente a rochas e, muitas vezes em aglomerados grandes, principalmente onde a correnteza da água era muito alta, corroborando informações já existentes na literatura (e.g. Coscarón e Coscarón-Arias, 2007). Essa espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. lobatoi*, *S. botulibranchium*, *S. inaequale*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. auripellitum*, *S. lutzianum* e *S. nigrimanum* (Anexo 1).

Simulium (P.) anamariae (Fig. 14). Esta espécie é registrada pela primeira vez em Goiás e no Distrito Federal (Anexo 1), com frequência de ocorrência de 8,5% (Tab. 1). Os exemplares dessa espécie coletados na área de estudo apresentaram uma diferença morfológica no casulo da pupa,

quando comparado com a descrição original. Pupas de *S. anamariae* apresentam, tipicamente, uma projeção anterior no casulo, que se bifurca resultando em dois prolongamentos longos, estreitos, na região anterior. Os exemplares coletados na área de estudo apresentaram no máximo, uma pequena bifurcação na região anterior do casulo, resultando em uma aparência similar ao casulo de *Simulium brevifurcatum* Lutz. No entanto, essas duas espécies se diferenciam pela disposição das bifurcações dos filamentos branquiais; em *S. brevifurcatum* estas se localizam próximo da base das brânquias e, em *S. anamariae*, os ramos se bifurcam primeiro próximo da base, dividindo-se a primeira dorsal de imediato e as secundárias quase na metade da longitude total do comprimento do filamento. Esta espécie ocorreu em córregos com dossel aberto e fechado, com leito argiloso e vegetação ripária, tanto em áreas pouco antropizadas até locais com grande impacto (Anexo 1). Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. serranum*, *S. subpallidum*, *S. inaequale*, *S. subnigrum*, *S. auripellitum*, *S. ochraceum*, *S. lutzianum*, *S. perflavum* e *S. nigrimanum* (Anexo 1).

Simulium (H.) lobatoi (Fig. 15). Esta espécie ocorreu apenas no estado de Goiás, onde já havia sido registrada anteriormente (Adler e Crosskey, 2010), com uma frequência de ocorrência de 8,5% (Tab. 1). Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. rubrithorax*, *S. rappae*, *S. subnigrum*, *S. auripellitum*, *S. hirtipupa* e *S. nigrimanum* (Anexo 1). O hábito alimentar até o momento é pouco conhecido, no entanto, alguns espécimes foram coletados picando o homem em Mato Grosso (Luna-Dias *et al.*, 2004).

Simulium (I.) rappae (Figs. 16 e 17). Esta espécie ocorreu em Goiás e sua presença já havia sido registrada nessa área anteriormente (Adler e Crosskey, 2010); apresentou frequência de ocorrência de 8,5% na área de estudo (Tab. 1). Variações observadas na espessura e número de

bifurcações dos filamentos branquiais das pupas (Fig. 17) dessa espécie corroboram as observações de Hernández *et al* (2007), para a região sudeste do Brasil. Pelo fato das variações nos filamentos braquiais serem grandes, com o número de filamentos variando de quatro a seis, sugere-se que futuros estudos, incluindo análises cromossômicas e moleculares sejam realizados com o intuito de determinar se essas variações representam diferenças intraspecíficas ou interespecíficas. Os imaturos foram coletados em córregos de dossel aberto, leito com solo argiloso ou rochoso, sobre folhas decíduas, galhos e na vegetação riparia (Fig. 2, Tab. 1 e Anexo 1) concordando com observações existentes na literatura (e.g. Coscarón, 1991; Coscarón e Arias, 2007). Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. lobatoi*, *S. rubrithorax*, *S. inaequale*, *S. subnigrum*, *S. auripellitum*, *S. lutzianum*, *S. hirtipupa* e *S. nigrimanum* (Anexo 1).

Simulium (I.) botulibranchium (Fig. 18). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste, ocorrendo no Distrito Federal e em Goiás (Anexo 1), com frequência de ocorrência de 4,2% (Tab. 1). Os córregos ocupados por esta espécie apresentavam dossel aberto, leito variando de rochoso a argiloso, com vegetação ripária e macrófitas aquáticas. Os espécimes estavam aderidos a folhas decíduas e, às folhas da vegetação marginal. Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. pertinax*, *S. spinibranchium*, *S. subpallidum*, *S. rubrithorax*, *S. inaequale*, *S. subnigrum*, *S. auripellitum* e *S. lutzianum* (Anexo 1).

Simulium (N.) exiguum (Fig. 19). Esta espécie foi coletada apenas em Goiás, onde já havia sido registrada anteriormente (Adler e Crosskey, 2010), com uma frequência de ocorrência de 4,2% na área amostrada (Tab. 1). Imaturos foram coletados em córregos de dossel aberto com leito do tipo cascalho, com pouca vegetação lateral, sobre folhas decíduas, macrófitas e folhas submersas da vegetação marginal, em áreas com alta correnteza. Esta espécie co-ocorreu com *S. pertinax*, *S.*

subpallidum, *S. auripellitum* e *S. lutzianum* (Anexo 1). De acordo com a literatura, esta espécie pode ser antropofílica ou zoofílica, dependendo da estação do ano e distribuição (Shelley, 1988). Sua distribuição inclui, além do Brasil, Venezuela, Colômbia e Equador onde é vetor da oncocercose (e.g. Coscarón, 1991).

Simulium (C.) serranus (Fig. 20). Esta espécie ocorreu em 2,8% dos córregos amostrados. Neste estudo, ela foi registrada pela primeira vez no estado de Goiás, anteriormente, ela só havia sido registrada nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e São Paulo (Adler e Crosskey, 2010). Ela ocorreu no rio Mangabeira, em Goiás, que é um rio largo e de água limpa, com as espécies *S. subpallidum*, *S. subnigrum*, *S. anamarie*, *S. lutzianum* e *S. nigrimanum* (Anexo 1). De acordo com a literatura, as fêmeas na região da Chapada dos Guimarães, no Mato Grosso são antropofílicas e agressivas (Coscarón, 1991; Coscarón e Arias, 2007).

Simulium (T.) hirtipupa (Fig. 21). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste e, ocorreu com uma frequência de 2,8% na área amostrada (Tab. 1). Esta espécie co-ocorreu com *S. pertinax*, *S. spinibranchium* e *S. auripellitum*. O hábito alimentar das fêmeas é desconhecido (Coscarón e Arias, 2007).

Simulium (H.) brachycladum (Fig. 22). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste, no Distrito Federal, e, apresentou uma frequência de ocorrência de 1,4% (Tab. 1). Este córrego possui dossel aberto e leito em laje e os espécimes coletados estavam aderidos ao leito rochoso ou em folhas secas e soltas. Segundo Coscarón e Arias (2007) estas ocorrem em córregos de fundo rochoso e águas limpas. Esta pode ser encontrada ocorrendo com as espécies *S. spinibranchium* e *S. subpallidum* (Anexo 1).

Simulium (E.) dinelli (Fig. 23). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste, no estado de Goiás, mas ocorreu em apenas um curso d'água (Tab. 1). De acordo com


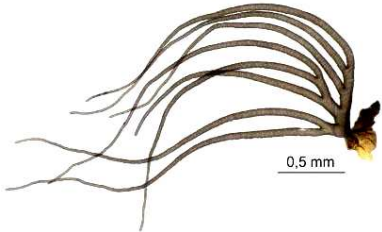

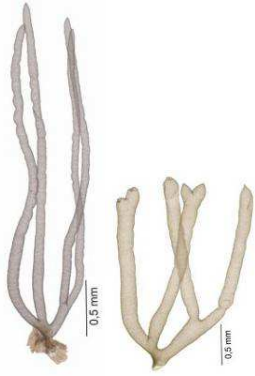
Coscarón e Coscarón-Arias (2007), as principais características dos córregos onde esta espécie ocorre são águas claras, às vezes quentes e com alto nível de Fe, Su e Cl. Esta espécie co-ocorreu com *S. dekeyseri*, *S. subpallidum* e *S. subnigrum* (Anexo 1). Segundo Coscarón (1991) as fêmeas são altamente antropofílicas mostrando preferência pelas mãos e rosto.


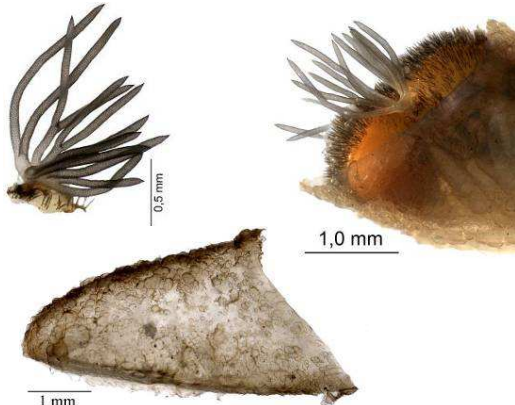






Simulium (P.) ochraceum (Fig. 24). Neste estudo, esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste (Tab. 1). Larvas e pupas foram coletadas em folhas decíduas, em áreas com pouca correnteza. Esta espécie co-ocorreu com *S. inaequale*, *S. subnigrum*, *S. anamariae* e *S. auripellitum*. As fêmeas de *S. ochraceum s.l.* são altamente antropofílicas na América Central e na região do Alto Amazonas, no Brasil. No Equador e nas ilhas Caribenhas são principalmente zoofílicas (Hernández *et al.*, 2007).


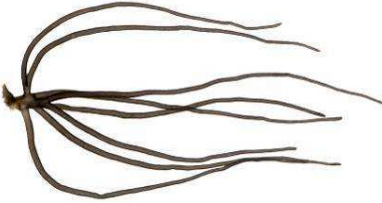
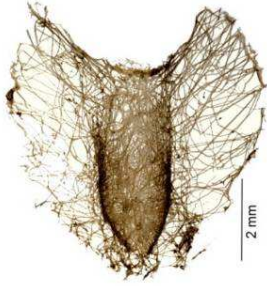



Simulium (E.) rorotaense (Fig. 25). Esta espécie é registrada pela primeira vez na região Centro-Oeste, ela é característica da região Amazônica (Coscarón e Arias, 2007), porém de acordo com Adler e Crosskey (2010) registrou-se também para o estado de Minas Gerais. No presente estudo, o córrego em que ocorreu esta espécie é de águas claras, com pequenas cachoeiras. Esta espécie co-ocorreu com *S. subnigrum*. As fêmeas são antropofílicas e zoofílicas, se alimentando sobre o gado (Coscarón e Arias, 2007).


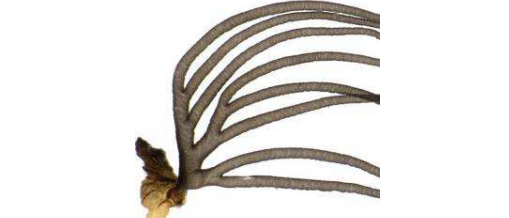
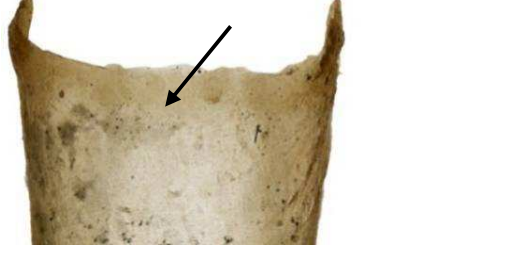
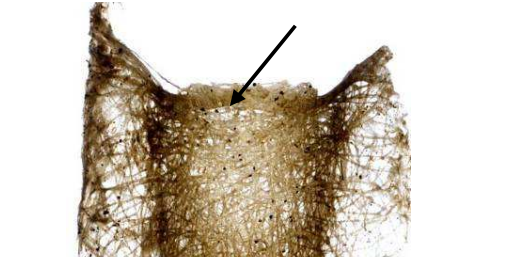


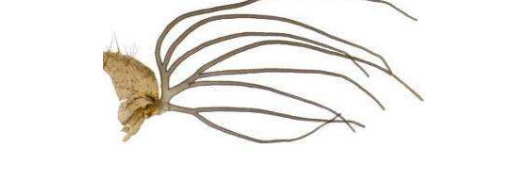
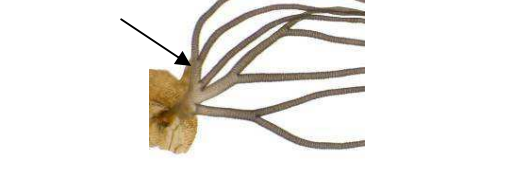
Chave de identificação de pupas de espécies de Simuliidae (Diptera) ocorrentes no Distrito

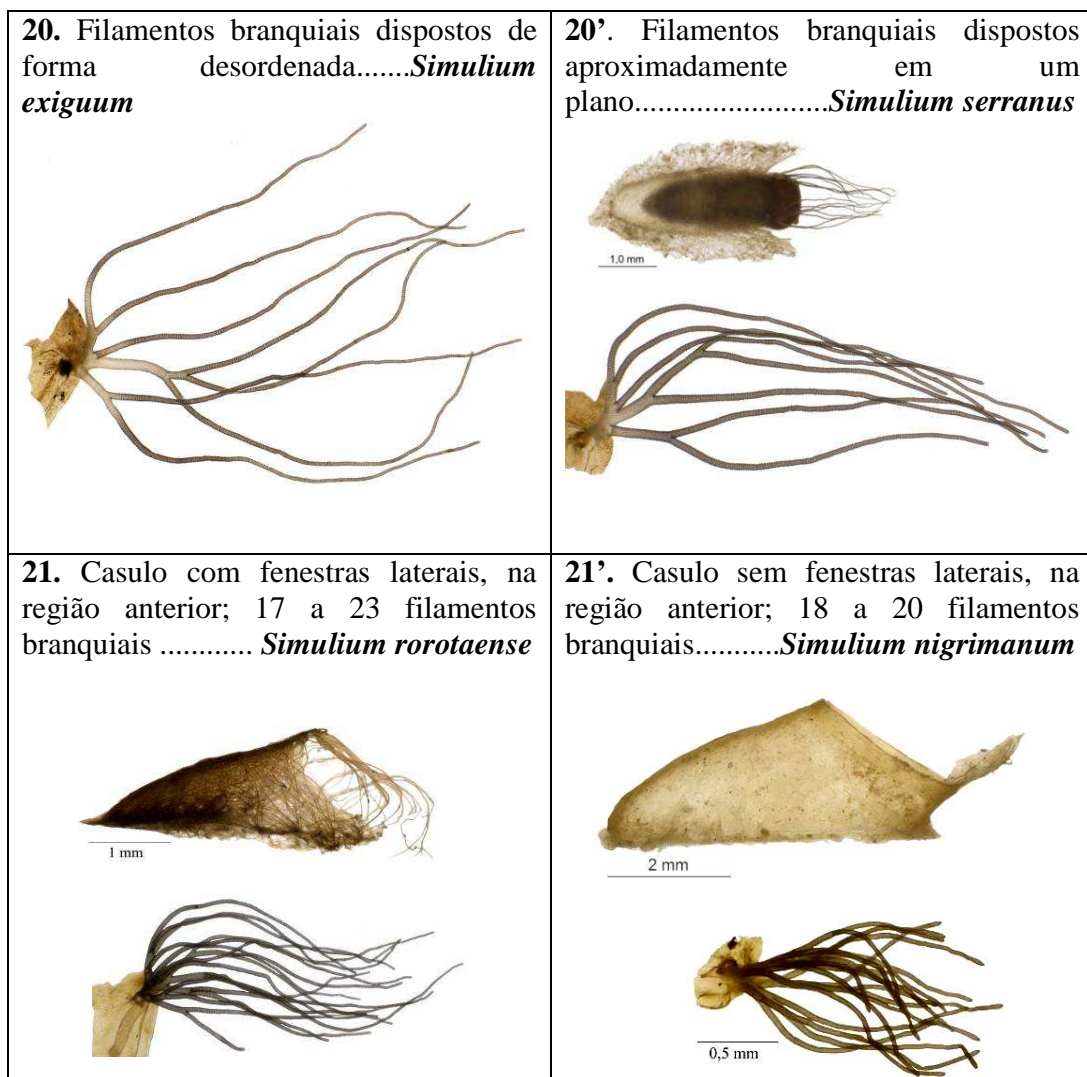
Federal e algumas localidades no estado de Goiás, Brasil.

<p>1. Filamentos branquiais não filiformes, inflados, ou com filamentos espessos, chegando às vezes, a levemente inflados.....2</p> 	<p>1'. Filamentos branquiais filiformes, delgados, com filamentos entre número de 6 a mais de 20 ramos.....3</p> 
<p>2. Filamentos branquiais inflados, com 3 a 4 ramificações<i>Simulium botulibranchium</i></p> 	<p>2'. Filamentos espessos chegando às vezes a levemente inflados, com 4 a 6 ramos.....<i>Simulium rappae</i></p> 
<p>3. Filamentos com ápices pontiagudos com 6 ou 12 filamentos. Se 6 ramos, casulo sapatiforme.....4</p>	<p>3'. Filamentos com ápices arredondado ou mamiliforme; brânquias com 6 ou mais ramos. Se 6 ramos, casulo chineliforme5</p>
<p>4. Filamentos branquiais em número de 6 ramos; região cefálica e torácica não cobertas por numerosas projeções cuticulares esclerotizadas; casulo sem rugosidades irregulares<i>Simulium brachycladum</i></p>	<p>4'. Filamentos branquiais em número de 12 ramos; região cefálica e torácica cobertos por numerosas projeções cuticulares esclerotizadas; casulo com rugosidades irregulares.....<i>Simulium hirtipupa</i></p>

	
<p>5. Filamentos branquiais com seis ramos.....6</p>	<p>5'. Filamentos branquiais com oito ou mais ramos.....9</p>
<p>6. Filamentos branquiais ramificando-se próximo da base.....<i>Simulium inaequale</i></p> 	<p>6'. Filamentos branquiais ramificando-se distantes da base.....7</p> 
<p>7. Casulo com projeção dorsal mediana, na região anterior, bifurcada ou não <i>Simulium anamariae</i></p> 	<p>7'. Casulo sem projeção dorsal mediana, na região anterior.....8</p> 
<p>8. Filamentos branquiais com região apical mamiliforme.....<i>Simulium subnigrum</i></p> 	<p>8'. Filamentos branquiais com região apical não mamiliforme.....<i>Simulium jujuyense</i></p> 
<p>9. Filamentos branquiais com oito ramos.....10</p>	<p>9'. Filamentos branquiais com mais de oito filamentos.....21</p>

<p>10. Filamentos branquiais ramificando-se próximo da base.....11</p>	<p>10'. Filamentos branquiais ramificando-se a diferentes distâncias da base.....16</p>
<p>11. Filamentos branquiais com área basal espessa, rígida, que se afinam em direção ao ápice.....<i>Simulium spinibranchium</i></p> 	<p>11'. Filamentos branquiais sem área basal espessa.....12</p> 
<p>12. Casulo chineliforme sem expansões laterais.....13</p>	<p>12'. Casulo sapatiforme, se chineliforme com expansões laterais.....14</p>
<p>13. Tricomas torácicos com 1 a 2 ramos<i>Simulium perflavum</i></p>	<p>13'. Tricomas torácicos com 3 a 5 ramos.....<i>Simulium dinelli</i></p>
<p>14. Casulo com expansões laterais bem evidentes.....<i>Simulium ochraceum</i></p> 	<p>14'. Casulo sem expansões laterais.....15</p> 
<p>15. Casulo com projeções anteriores em forma de alças.....<i>Simulium rubrithorax</i></p> 	<p>15'. Casulo com projeções anteriores não formando alças.....<i>Simulium lobatoï</i></p> 
<p>16. Filamentos branquiais do ramo dorsal não arqueados, casulo com textura de feltro, borda anterior espessa.....<i>Simulium lutzianum</i></p>	<p>16'. Filamentos branquiais do ramo dorsal arqueados, sem casulo com textura de feltro.....17</p>

	
<p>17. Casulo com tramas do tecido compacta.....18</p>	<p>17' Casulo com tramas do tecido visível.....19</p>
	
<p>18. Filamentos branquiais tão longos quanto o comprimento lateral do casulo.....<i>Simulium dekeyseri</i></p>	<p>18'. Filamentos branquiais mais curtos que o comprimento lateral do casulo.....<i>Simulium pertinax</i></p>
	
<p>19. Os três filamentos dorsais originando-se distantes da base com ramificação secundária bem distinta.....<i>Simulium subpallidum</i></p>	<p>19'. Os três filamentos dorsais originando-se próximo da base, com o tronco basal curto, ramificação primária quase imperceptível.....20</p>
	



A seguir, são apresentadas pranchas contendo ilustrações que caracterizam cada espécie coletada durante o desenvolvimento deste estudo, na área amostrada.

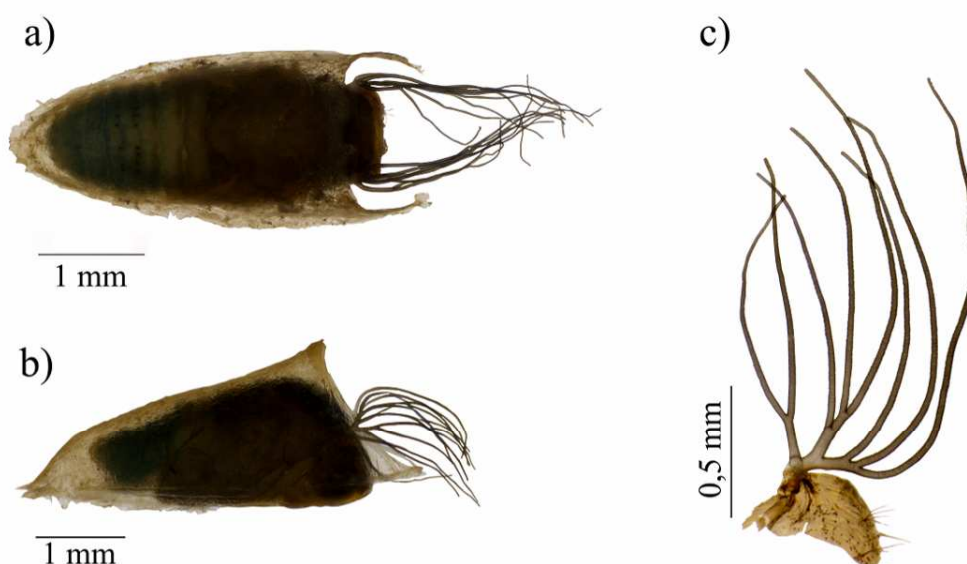
Simulium (Psaroniocompsa) jujuyense Paterson & Shannon, 1927



Figura 3-*Simulium jujuyense* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos.

Simulium (Chirostilbia) subpallidum Lutz, 1910

PUPA



LARVA

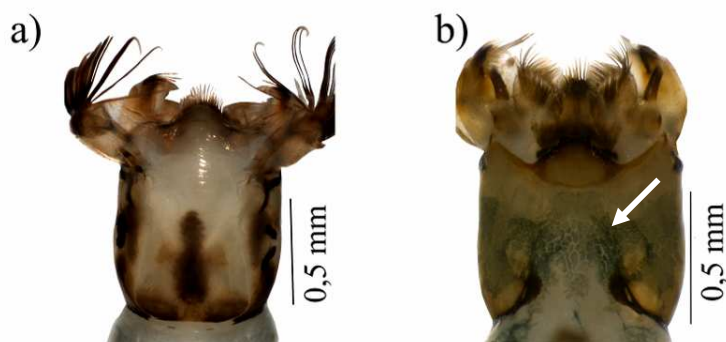


Figura 4 - *Simulium subpallidum* (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito filamentos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica; b) vista ventral da cápsula cefálica com gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “U”.

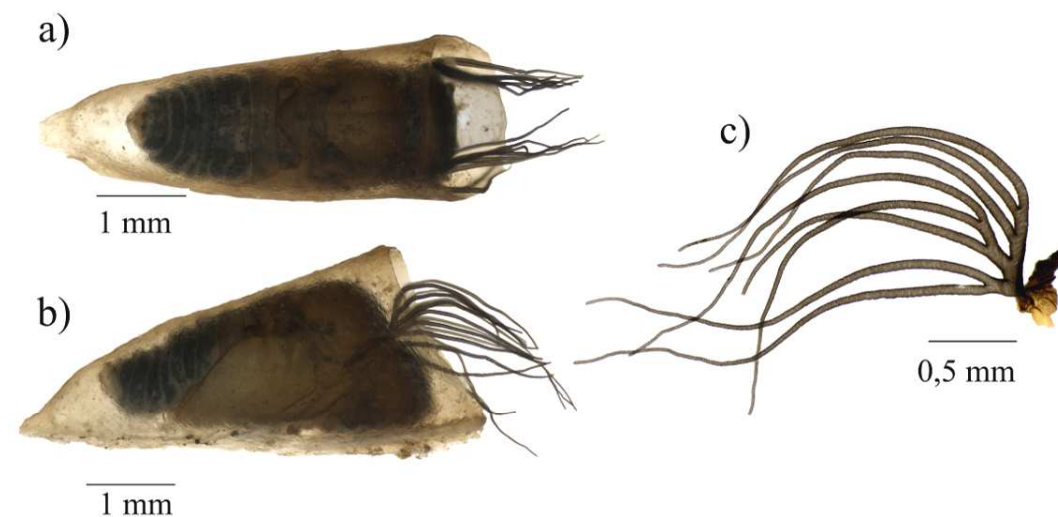
Simulium (Inaequalium) subnigrum Lutz, 1910



Figura 5- *Simulium subnigrum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos.

Simulium (Chirostilbia) pertinax Kollar, 1832

PUPA



LARVA

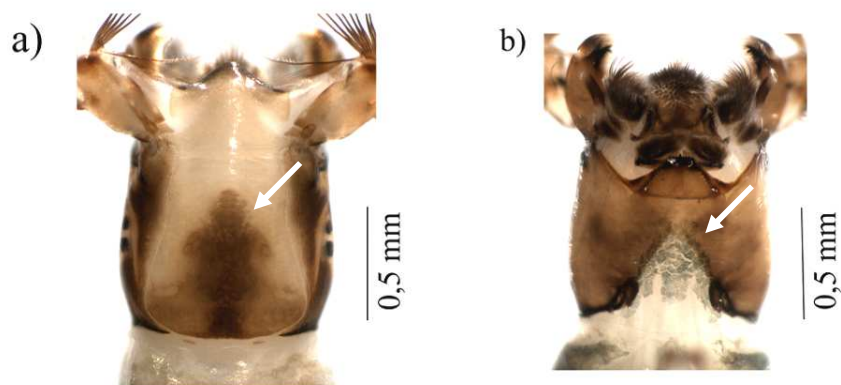


Figura 6- *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação; b) vista ventral da cápsula cefálica, com gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “V” aberto.

Simulium (Inaequalium) inaequale Paterson & Shannon, 1927

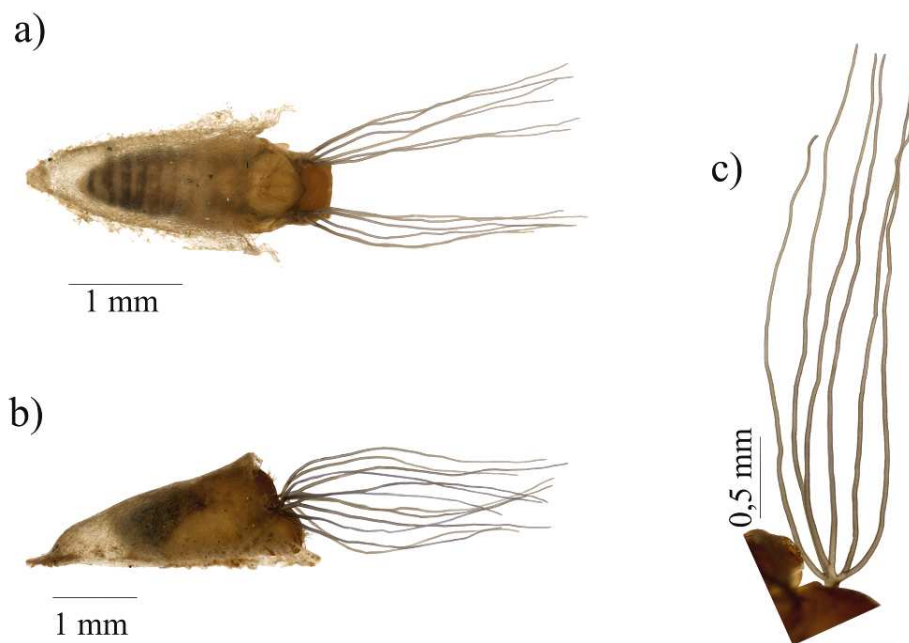


Figura 7- *Simulium inaequale* (Diptera: Simuliidae). Pupa, vista geral: a) vista dorsal e; b) lateral;
c) filamentos branquiais com seis ramos.

Simulium (Ectemnaspis) lutzianum Pinto, 1931

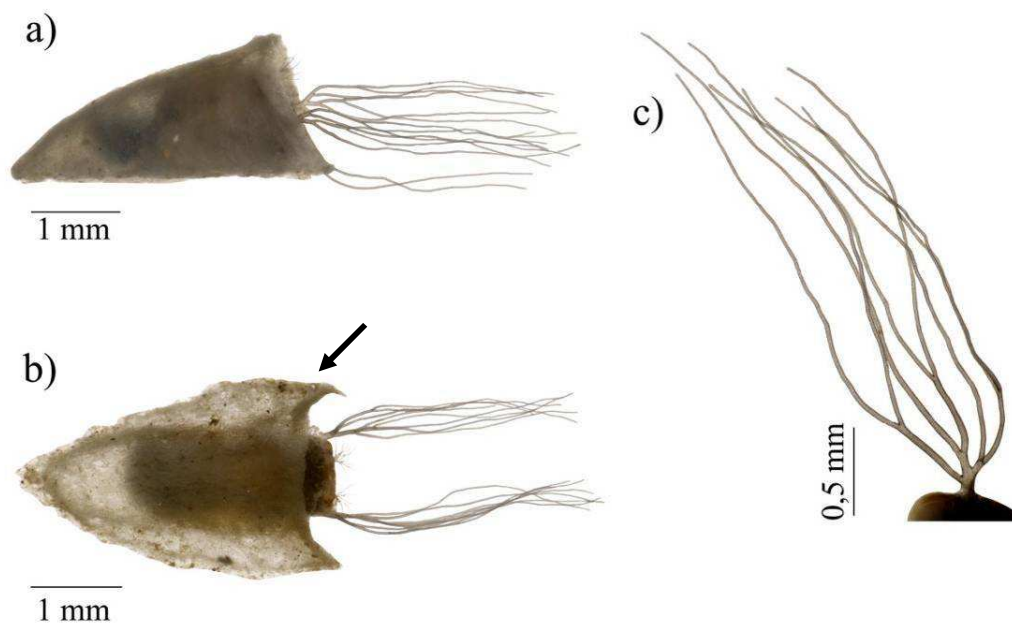


Figura 8- *Simulium lutzianum* (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista lateral e; b) dorsal; c) filamentos branquiais com oito ramos. Casulo com textura de feltro.

Simulium (Trichodagmia) nigrimanum Macquart, 1838

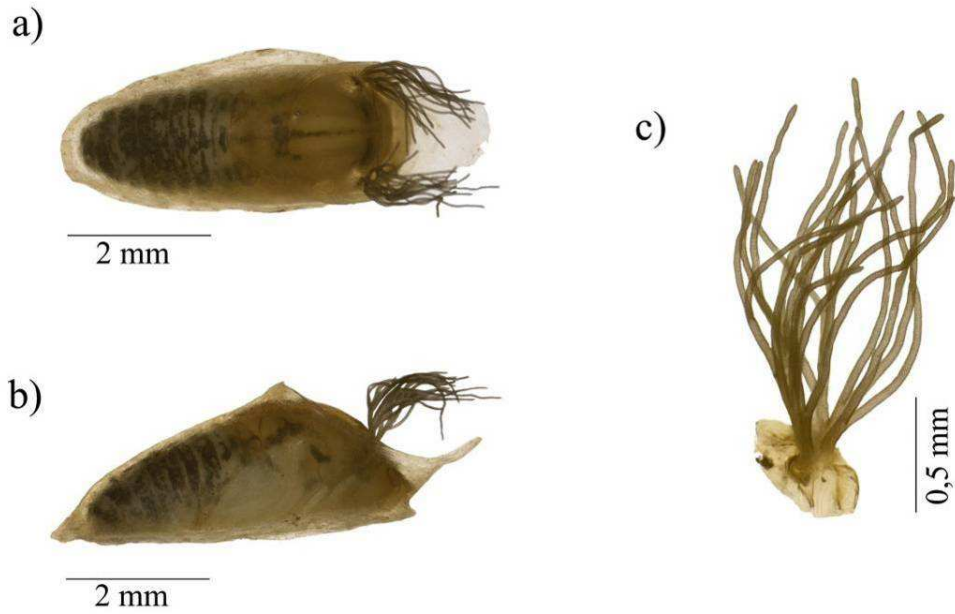


Figura 9 - *Simulium nigrimanum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral da pupa; c) filamentos branquiais com 18 ramos.

Simulium (Chirostilbia) dekeyseri Shelley & Py-Daniel, 1981

PUPA



LARVA

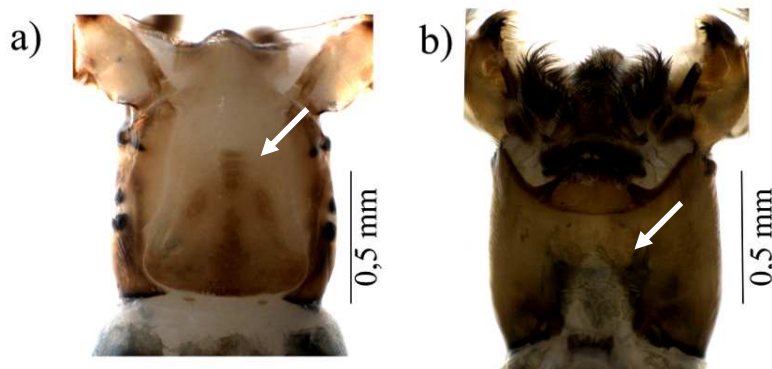


Figura 10- *Simulium dekeyseri* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) d) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação; b) vista ventral da cápsula cefálica, mostrando o gânglio subesofageano pigmentado e fenda gular em forma de “V” fechado.

Simulium (Chirostilbia) spinibranchium Lutz, 1910

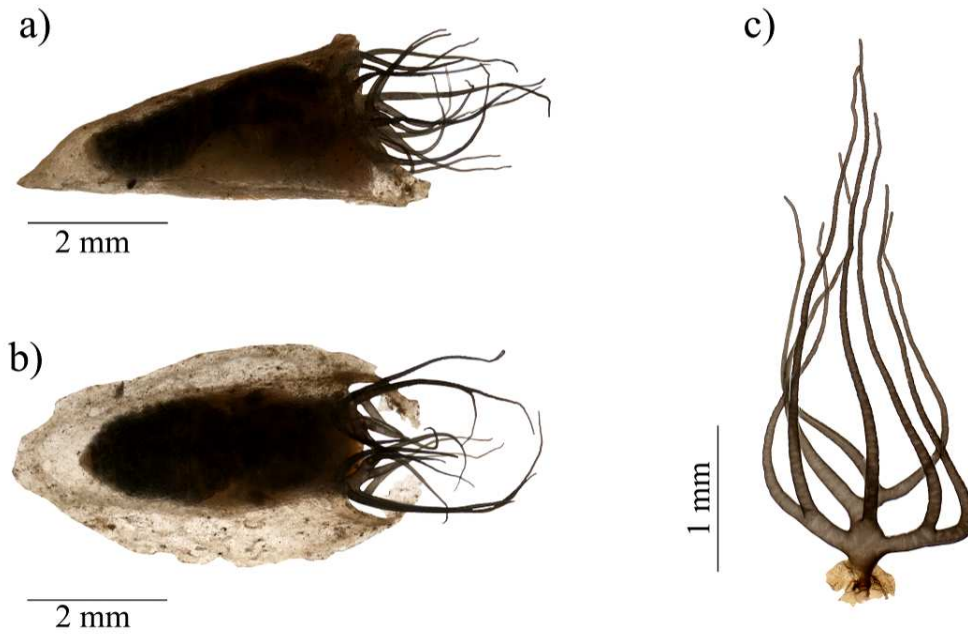


Figura 11- *Simulium spinibranchium* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista lateral; b) vista dorsal; c) filamentos branquiais com oito ramos.

Simulium (Ectemnaspis) perflavum Roubaud, 1906

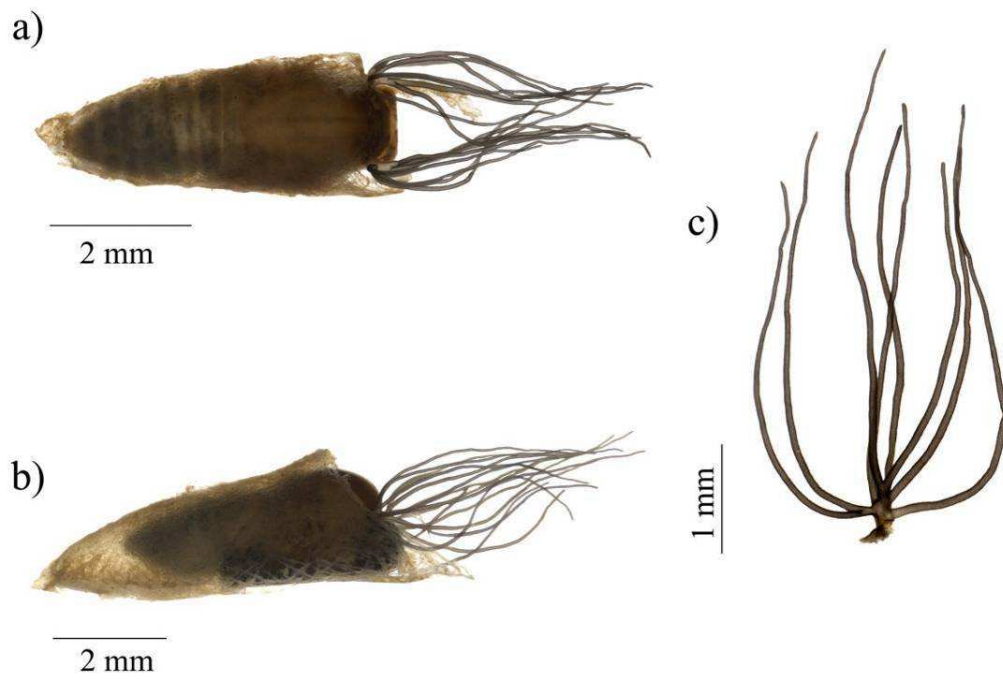
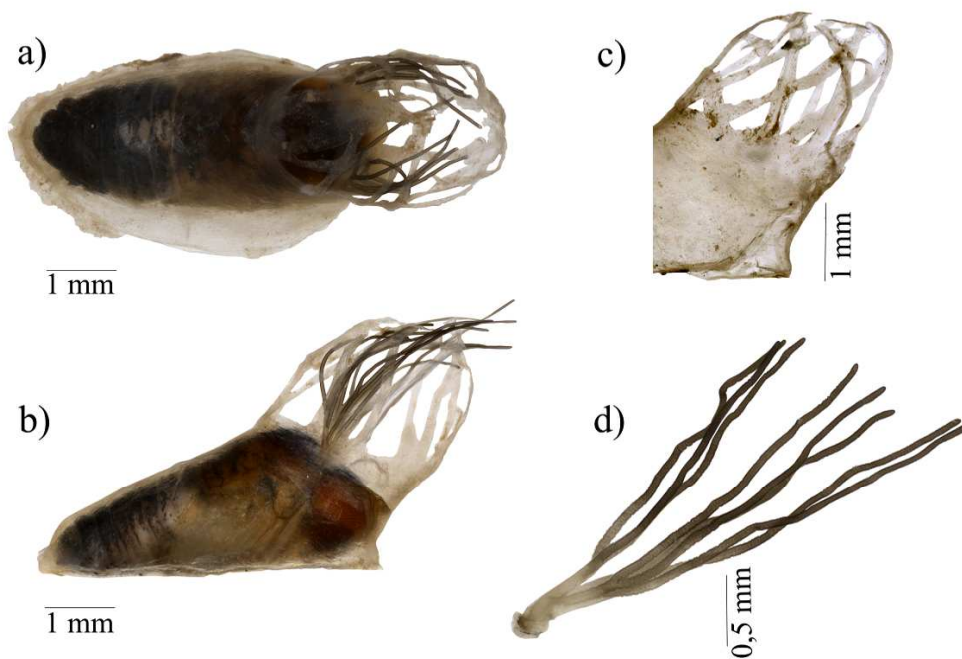


Figura 12- *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.

Simulium (Hemicnetha) rubrithorax Lutz, 1909

PUPA



LARVA

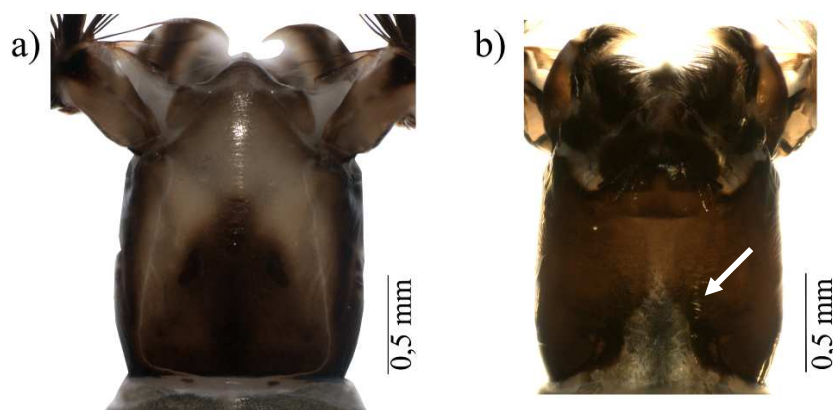


Figura 13- *Simulium rubrithorax* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) detalhe da região anterior do casulo, em vista lateral; d) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal e; b) ventral da cápsula cefálica, mostrando fenda gular em forma de “Y” em 180 °C.

Simulium (Psaroniocompsa) anamariae Vulcano, 1962

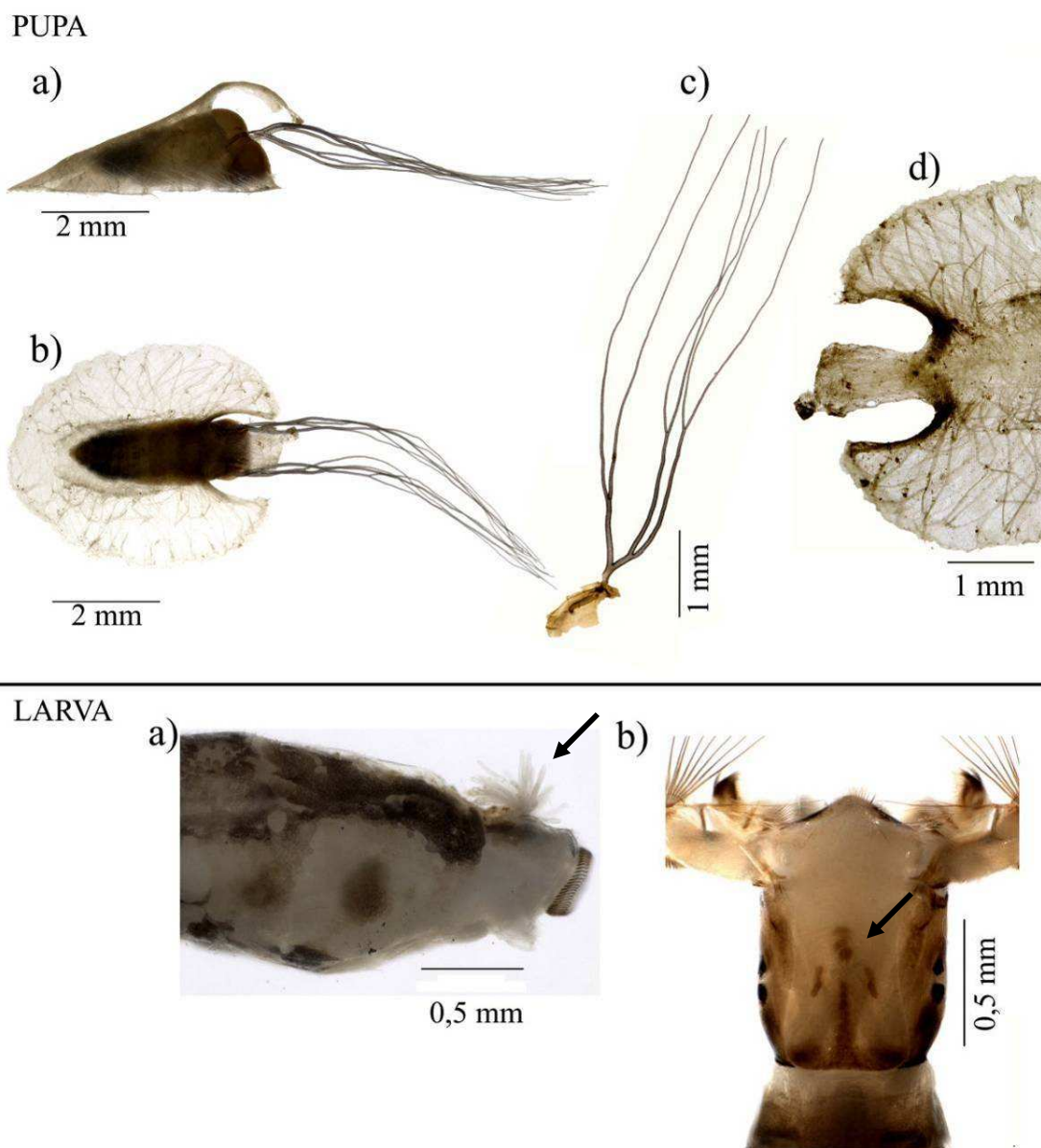


Figura 14- *Simulium anamariae* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista lateral e; b) dorsal; c) filamentos branquiais com seis ramos c) detalhe anterior da vista dorsal do casulo. Larva: a) detalhe da região distal do abdome com as papilas ventrais; b) vista dorsal da cápsula cefálica, mostrando o padrão de pigmentação.

Simulium (Hemicnetha) lobato Luna Dias, Hernández,
Maia-Herzog & Shelley, 2004

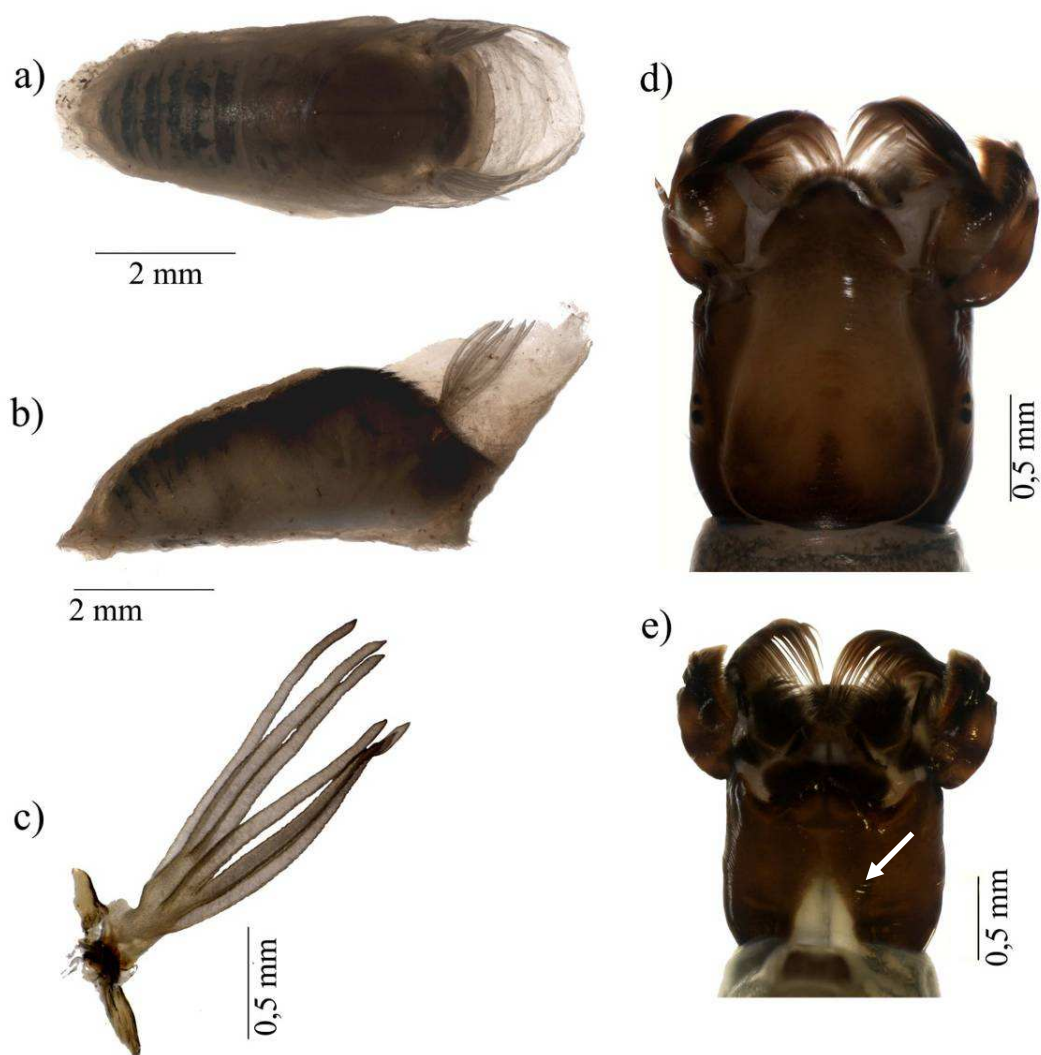
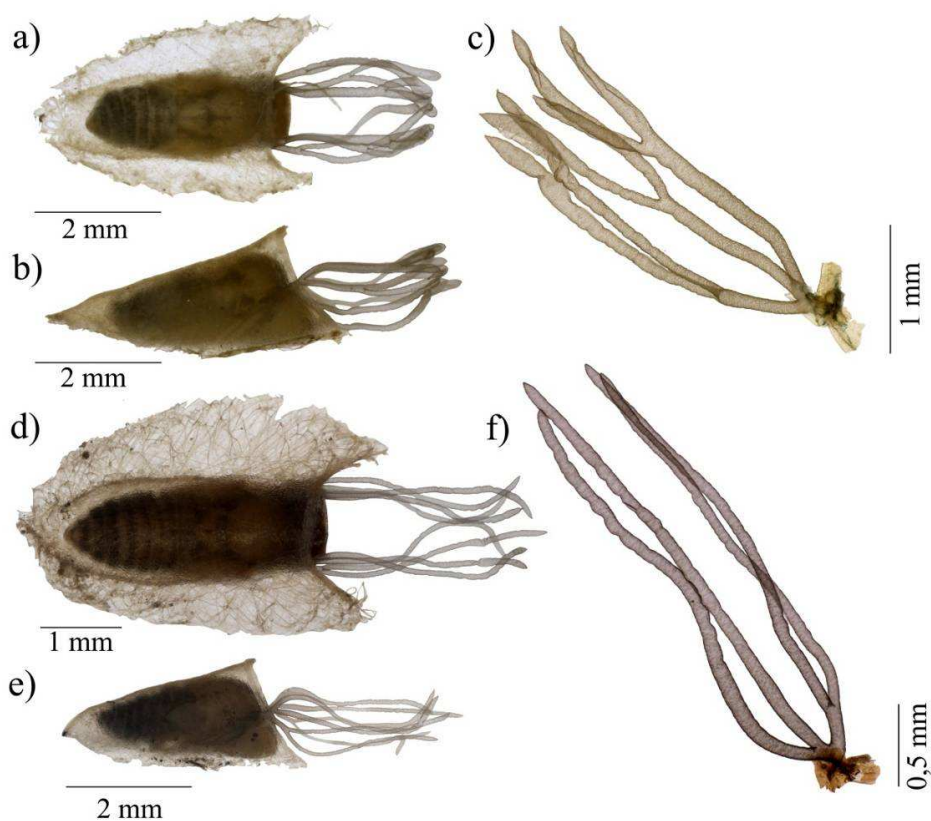


Figura 15- *Simulium lobato* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos. Larva: d) vista dorsal da cápsula cefálica; e) vista ventral da cápsula cefálica, mostrando gânglio subesofageano levemente pigmentado.

Simulium (Inaequalium) rappae Py-Daniel & Coscarón, 1982

PUPA



LARVA

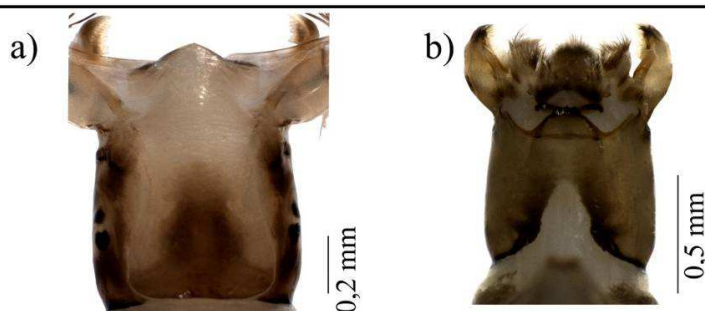


Figura 16- *Simulium rappae* (Diptera: Simuliidae). Pupa – Goiás/ Formosa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com seis ramos; Goiás/ Alto Paraíso. d) vista dorsal e; e) lateral da pupa; f) filamentos branquiais com quatro ramos. Larva: a) vista dorsal e; b) ventral da cápsula cefálica.

Simulium (Inaequalium) rappae Py-Daniel & Coscarón, 1982

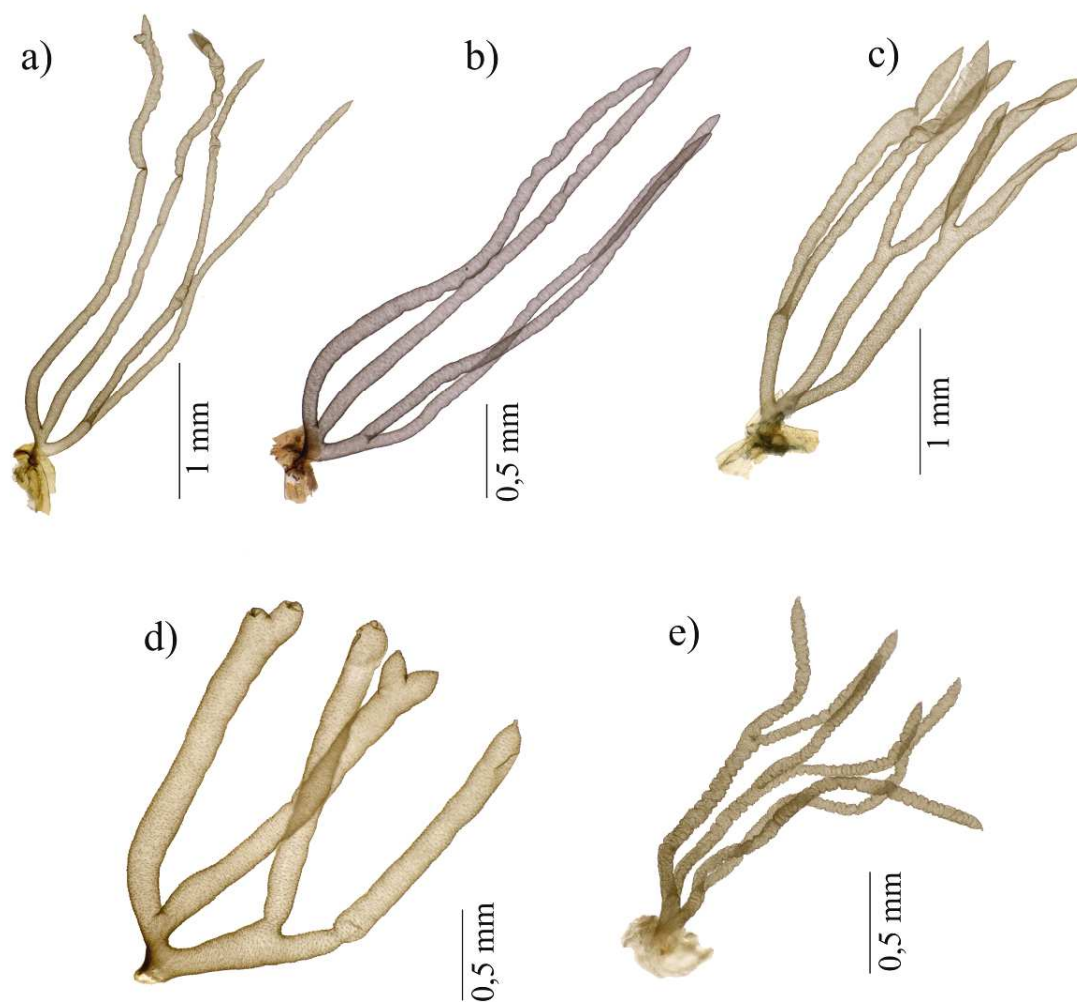
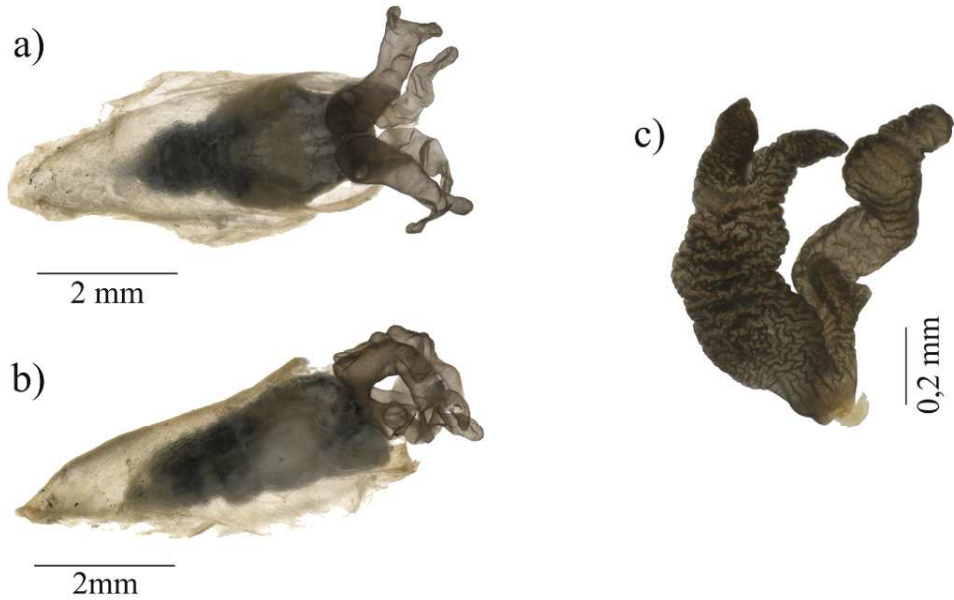


Figura 17- Variação no número e forma dos filamentos branquiais de *Simulium rappae* (Diptera: Simuliidae). a) e b) ponto de coleta de número 71, Goiás-Alto Paraíso; c) ponto de coleta de número 12, Goiás- Formosa; d) ponto de coleta de número 7, Goiás-Corumbá; e) ponto de coleta de número 11, Goiás- Formosa.

Simulium (Inaequalium) botulibranchium Lutz 1910

PUPA



LARVA

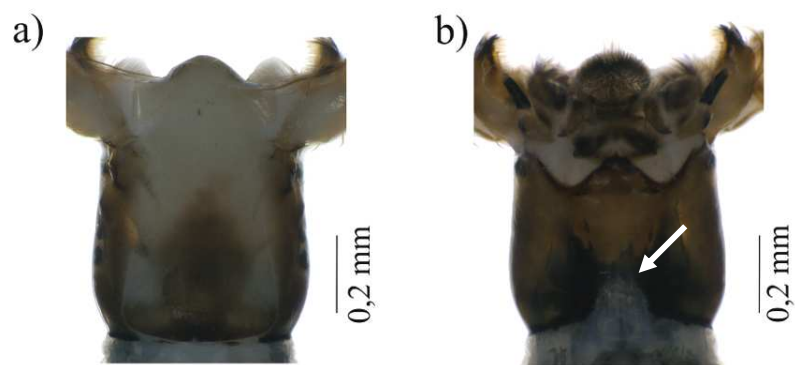


Figura 18- *Simulium botulibranchium* (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais. Larva: a) vista dorsal e b) ventral da cápsula cefálica com fenda gular pouco profunda.

Simulium (Notolepria) exiguum Rouband, 1906

PUPA



LARVA

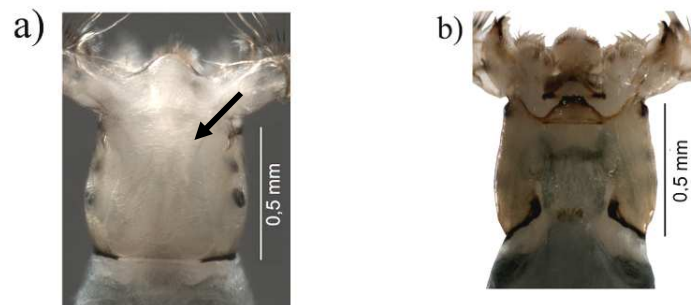


Figura 19- *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos. Larva: a) vista dorsal totalmente despigmentada e; b) vista ventral da cápsula cefálica.

Simulium (Chirostilbia) serranus Coscarón, 1981

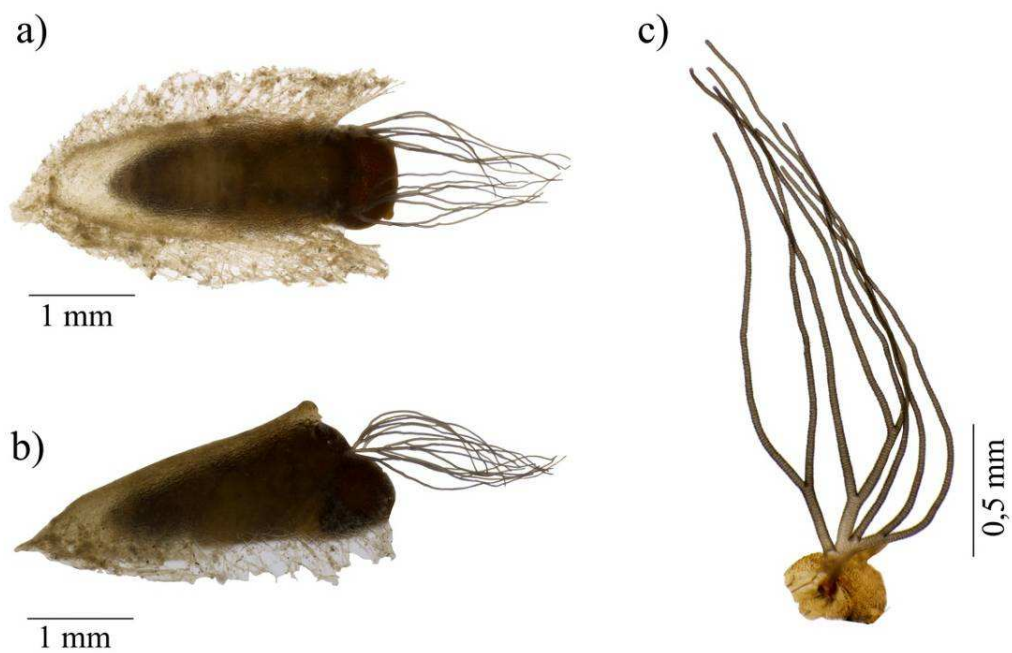


Figura 20- *Simulium serranus* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.

Simulium (Thyrsopelma) hirtipupa Lutz, 1910

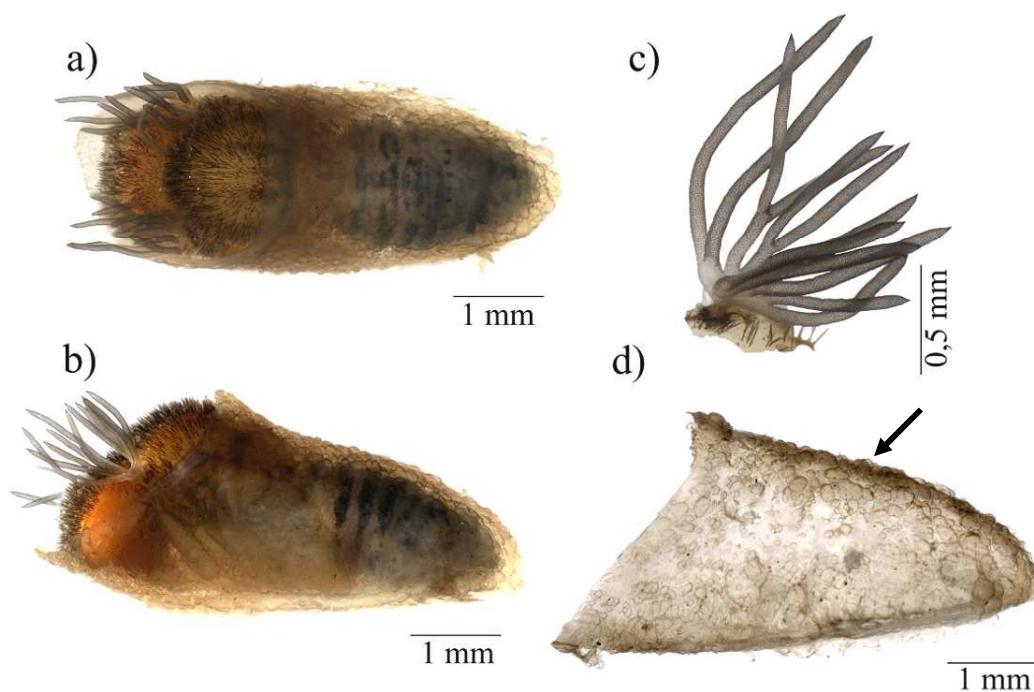


Figura 21- *Simulium hirtipupa* (Diptera: Simuliidae). Pupa: a) vista dorsal e; b) lateral; c) filamentos branquiais com doze ramos; d) vista lateral do casulo com rugosidades irregulares.

Simulium (Hemicnetha) brachycladum Lutz & Pinto 1932

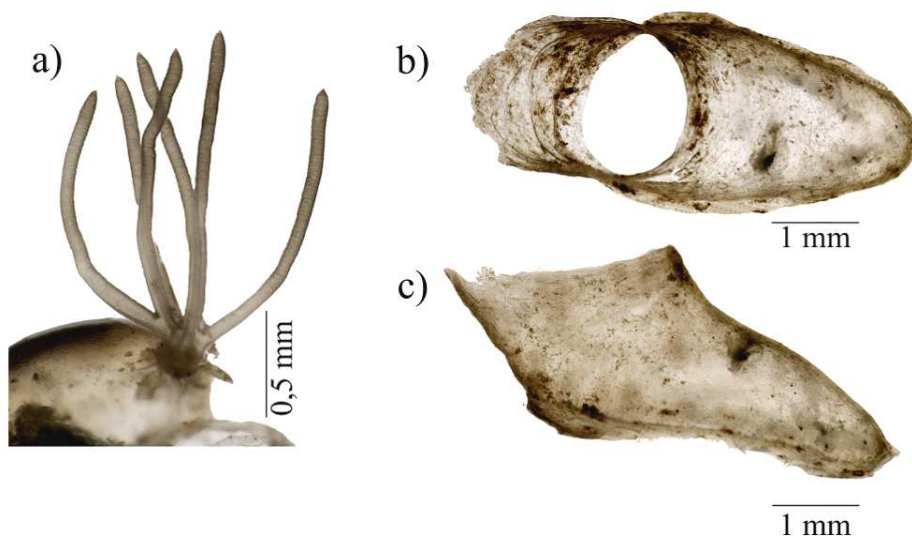


Figura 22- *Simulium brachycladum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspectos gerais: a) filamentos branquiais com seis ramos; b) vista dorsal do casulo e c) vista lateral do casulo.

Simulium (Ectemnaspis) dinellii (Joan, 1912)

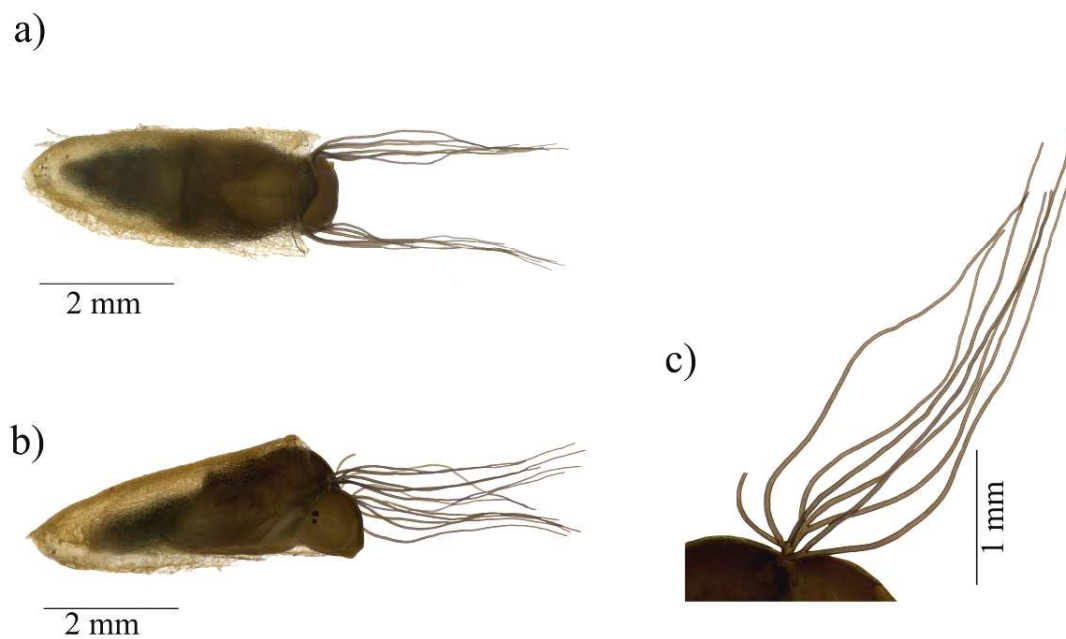


Figura 23- *Simulium dinelli* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) vista lateral; c) filamentos branquiais com oito ramos.

Simulium (Ectemnaspis) ochraceum Walker, 1861

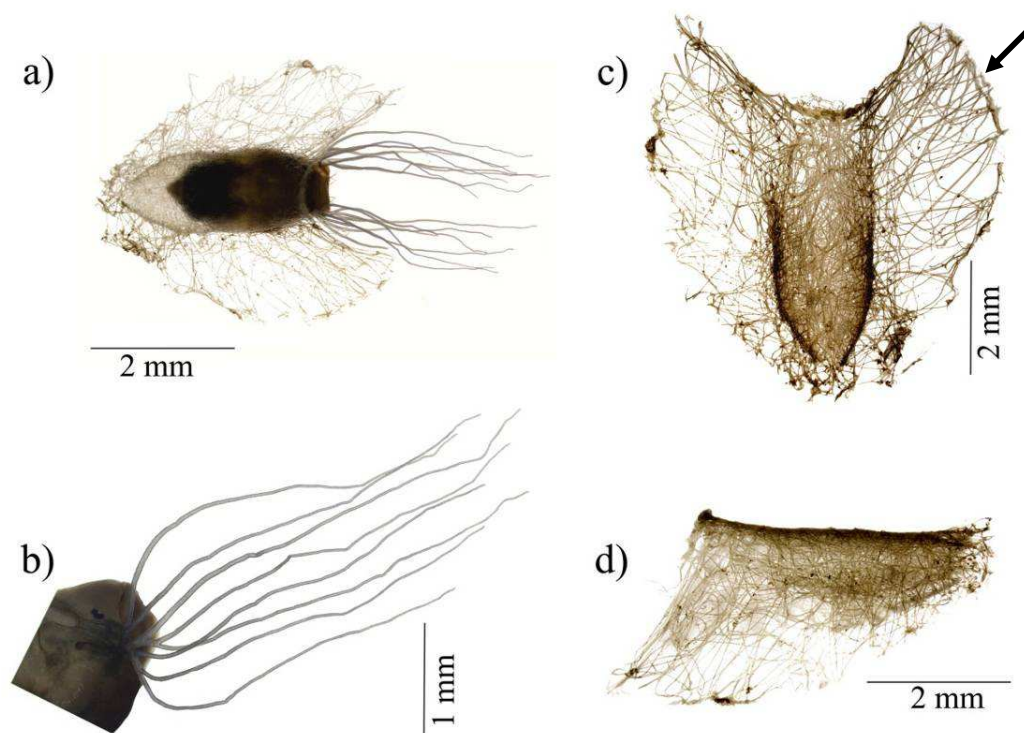


Figura 24- *Simulium ochraceum* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal; b) filamentos branquiais com oito ramos; c) vista dorsal do casulo, mostrando a expansão lateral e d) vista lateral do casulo.

Simulium (Ectemnaspis) rorotaense Floch & Abonnenc 1946

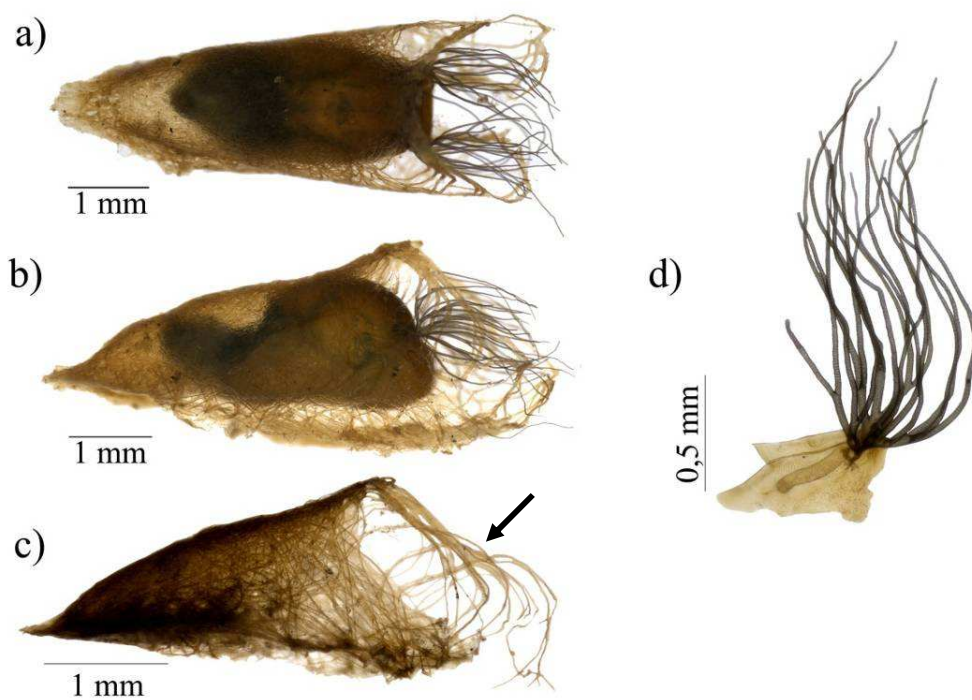


Figura 25- *Simulium rorotaense* (Diptera: Simuliidae). Pupa, aspecto geral: a) vista dorsal e; b) lateral; c) casulo sem a pupa, mostrando as aberturas na região anterior, lateral do casulo; d) filamentos branquiais.

CAPÍTULO II

Variabilidade genética (intra e inter-populacional) de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) baseado no gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial

1. Resumo

A importância econômica e epidemiológica de espécies da família Simuliidae tem estimulado estudos em muitas áreas. *Simulium pertinax* é a espécie que afeta em maior proporção às populações humanas e às criações de animais no Brasil. As técnicas de biologia molecular têm facilitado estudos de muitas populações de Diptera. Para auxiliar os estudos entomológicos, marcadores moleculares estão disponíveis. Dentre eles podemos citar o Citocromo Oxidase I (COI), gene presente no DNA mitocondrial. Este vem respondendo perguntas principalmente sobre estudos de filogenia, evolução, ecologia e dinâmica das populações. O presente estudo buscou determinar a variabilidade genética de diferentes populações de *Simulium pertinax* provenientes de vários Estados brasileiros por meio do Gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial, visando entender os padrões de dispersão desta espécie.

Palavras-chave: Citocromo Oxidase I, DNAm, Simuliidae, Variabilidade Genética.

2. Abstract

The epidemiological and economic importance of species of the family Simuliidae has stimulated studies in many areas. *Simulium pertinax* is one of the mainly important specie because affects a greater proportion to human populations and animal breeding in Brazil. Techniques of molecular biology have facilitated studies of many populations of Diptera. To assist entomological studies, molecular markers are available. Among them we can cite the cytochrome oxidase I (COI) gene on mitochondrial DNA. This comes mainly answering questions about studying phylogeny, evolution, ecology and population dynamics. The present study investigates the population structure of *Simulium pertinax* in some regions of Brazil by the Cytochrome Oxidase I in order to understand patterns of dispersal of this species.

Key-words: Cytochrome Oxidase I, DNAm, Genetic Variability, Simuliidae.

3. Introdução

Os simulídeos (Diptera: Simuliidae) são insetos de grande importância econômica tanto na área médica quanto na área veterinária. *S. pertinax* é considerado uma praga e tem sido objeto de estudo em várias regiões brasileiras (Mardini *et al.*, 2000; Regis *et al.*, 2000; Campos e Andrade, 2002). As fêmeas por apresentarem hábito hematófago voraz têm causado sérios incômodos ao homem e a outros animais, diminuindo a produção agrícola e o turismo, atividade de desenvolvimento econômico de muitas regiões brasileiras (Souza, 1984).

Técnicas de biologia molecular têm facilitado estudos populacionais de Diptera, tais como Culicidae, Simuliidae e Tephritidae (Berlocher, 1984). Os trabalhos de mosquitos e

simulídeos enfatizam principalmente a discriminação e identificação de espécies irmãs de importância médica.

Para auxiliar os estudos entomológicos, a biologia molecular tem disponibilizado alguns marcadores. Ambos, DNA e proteína, revolucionaram o campo de estudo das diversas áreas da biologia apresentando-se como uma ferramenta no auxílio aos estudos de filogenia, evolução, ecologia e dinâmica das populações (*e.g.* Post e Flook, 1992; Wilson e Post, 1994; Tang *et al.*, 1995; Flook e Post, 1997; Dumas *et al.*, 1998; Loxdale e Lushai, 1998; Davies *et al.*, 2000; Conn *et al.*, 2001; Dueñas *et al.*, 2002; Morales-Hojas *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2008).

Marcadores baseados no DNA total, rDNA e DNA mitocondrial tem sido empregados em estudos de sistemática, filogenia e variabilidade genética para espécies de Simuliidae (Morales-Hojas *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2008; Rivera e Currie, 2009). O DNA mitocondrial é um marcador genético importante, pois os genes que o compõem são transmitidos maternamente. Possuem genótipos com caracteres não-recombinantes, transmitidos pelo parental do sexo feminino. Este marcador é uma molécula circular fechada, com 15 a 20 kilobases (kb) de comprimento e composto de aproximadamente 37 genes codificando para 22 tRNAs, 2 rRNAs e 13 mRNAs. Esses genes possuem os rearranjos geralmente estáveis no DNA mitocondrial (Avisé, 1994). Os genes que codificam para proteínas são organizados em categorias: ATP sintetase, NADH desidrogenase (complexo I), Coenzima Q- citocromo c redutase/Citocromo b (complexo III) e citocromo C oxidase (complexo IV). Na categoria do Complexo IV encontra-se os genes MT-CO1, MT-CO2 e MT-CO3 (<http://biologia.uab.es/biocomputacio/tutorial/sessio6/tutorialdnamit.htm>).

Esta ferramenta tem sido empregada por causa do tipo de sua herança, pequeno tamanho quando comparado com o DNA nuclear, natureza não-recombinante e altos níveis de polimorfismo. Portanto, é uma ferramenta útil para o estudo de processos como fluxo gênico, efeito fundador e, mais recentemente para inferências filogenéticas (Avisé *et al.*, 1987; Dueñas *et al.*, 2002).

Estudos moleculares com DNA mitocondrial tem sido realizados por meio do sequenciamento de genes específicos, os quais devem ser previamente amplificados por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como um marcador. Sequências podem ser mapeadas com algumas dezenas ou centenas de pares de bases. De acordo com Avisé (1994), essas sequências podem ser usadas na construção de filogenias moleculares para avaliar evolução de um gene em particular ou de uma família de genes; avaliar as alterações evolutivas entre as espécies; e, construir filogenias de espécies diferentes. Porém, esta técnica possui um custo elevado, principalmente quando um número grande de indivíduos precisa ser avaliado, além de requerer mais trabalho na preparação das amostras (Hoy, 1994).

Estudos baseados no sequenciamento dos genes 16S, COI, ND4, 16SrRNA do DNA mitocondrial, que são utilizados como marcadores moleculares têm fornecido informações importantes para responder questões de relações filogenéticas entre espécies de *Simulium* spp. (Krueger e Hennings, 2006; Phayahasena *et al.*, 2010).

Polimorfismos cromossômicos têm sido comumente registrados em Simuliidae indicando variabilidade temporal e geográfica. Tang *et al.* (1995, 1996) ao analisarem sequências dos genes de DNA mitocondrial, 16S e ND4, conseguiram distinguir nove espécies crípticas do complexo *S. damnosum* s.l. do oeste Africano, sendo seis delas consideradas vetores em potencial da onconcerose. Dumas *et al.* (1998) caracterizaram cinco locus microssatélites a partir de

marcadores de DNA, para diferenciar populações de *S. damnosum* s.l. da savana de Mali, demonstrando que essa ferramenta é eficiente no estudo de estrutura de genética de populações.

S. pertinax pertence ao subgênero *Chirostilbia* Enderlein com as seguintes espécies: *Simulium bifenestratum* Hamada & Pepinelli, 2004, *Simulium dekeyseri* Shelley & Py-Daniel, 1981, *Simulium distinctum* Lutz, 1910, *Simulium empascae* Py-Daniel & Moreira, 1988, *Simulium friedlanderi* Py-Daniel, 1987, *Simulium jefersoni* Hamada, Hernández, Luz & Pepinelli, 2006, *Simulium obesum* Vulcano, 1959, *Simulium papaveroi* Coscarón, 1982, *Simulium pertinax* Kollar, 1832, *Simulium riograndense* Py-Daniel, Souza & Caldas, 1988, *Simulium serranus* Coscarón, 1981, *Simulium spinibranchium* Lutz, 1910, *Simulium subpallidum* Lutz, 1910. *S. pertinax* possui semelhanças com algumas espécies do grupo ao qual pertence. Esta espécie pode ser confundida anatomicamente com *S. laneportoi* pela semelhança da pupa e *S. dekeyseri* por ser similar em todos os estágios, diferenciando somente o mesonoto da fêmea (Shelley e Py-Daniel, 1981).

Esta espécie de *Simulium* tem na América do Sul a sua distribuição geográfica, até o momento, restrita ao Paraguai, Bolívia, Argentina e Brasil. Neste último ocorre nos estados do Amazonas, Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Paraíba (Adler e Crosskey, 2009). É uma espécie de tamanho médio, de 2 a 4 mm, coloração geralmente negra (Coscarón, 1987). Os estágios imaturos (larvas e pupas) apresentam oito filamentos brânquias, de largura e comprimentos semelhantes (Gil-Azevedo *et al.*, 2004) (Fig. 1).

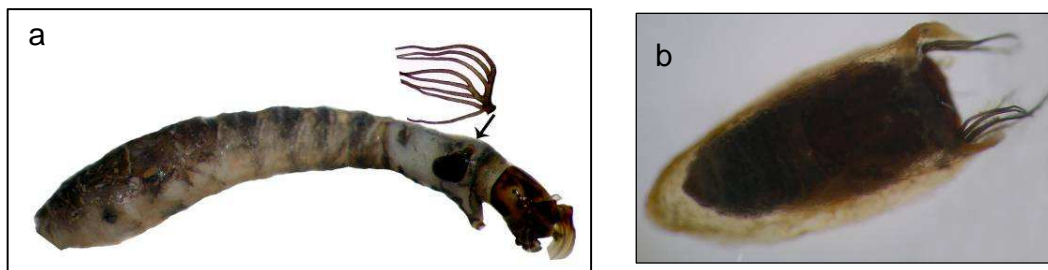


Figura 1- Estágios imaturos de *Simulium pertinax*. a) larva com filamentos branquiais em detalhe; b) aspecto geral da pupa.

Para se fazer a distinção da espécie *S. pertinax* das outras espécies do grupo o qual se confunde, seria necessário obter todos os estágios imaturos (larva e pupa) e o estágio adulto (macho e fêmea) para comparação dos caracteres morfológicos entre as duas espécies. Normalmente a obtenção de todos os estágios não é possível em uma mesma coleta. Por isso estudos morfológicos conjuntamente a estudos moleculares para identificar espécies irmãs ou crípticas são necessários para identificar com mais precisão as espécies de interesse econômico (Coscarón, 1987).

Simulium pertinax é a espécie que afeta em maior proporção as populações humanas e as criações de animais. Entender os padrões de dispersão desta espécie é importante para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle.

O conhecimento da estrutura genética populacional, do fluxo gênico entre populações e a busca de uma identificação mais rápida, serão ferramentas importantes para auxiliar programas de controle no combate a *S. pertinax*. Poucos estudos utilizaram métodos moleculares para investigar a variabilidade genética intra e inter populacional para Simuliidae. No presente

estudo, determinou-se a variabilidade genética de diferentes populações de *S. pertinax* provenientes de vários Estados brasileiros por meio do Gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial.

4. Material e Métodos

4.1. Espécie a ser utilizada como outgroup

Em estudos filogenéticos utilizam-se alguns indivíduos como outgroup para tentar relacionar o quanto as espécies do grupo em estudo podem ser próximas ou semelhantes. No presente estudo utilizou-se a sequência de *Simulium decuplum* que codifica a proteína Citocromo Oxidase I na mesma região em que codifica para as sequências de *S. pertinax*. A sequência de *S. decuplum* foi obtida por meio do site (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Pramual, 2011).

4.2. Área de Estudo

Este trabalho foi realizado com populações de *S. pertinax* dos estados do Pará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Goiás e Rondônia/Brasil (Fig. 2). O material (larva e pupa) foi coletado nos anos de 2003, 2004, 2007, 2008 e 2009. Os espécimes foram retirados do substrato (folhas verdes, folhas decíduas ou sacolas plásticas) com auxílio de pinça entomológica e fixados em frascos contendo álcool absoluto 100% e guardados a 4 °C. No laboratório de Insetos Aquáticos, as amostras foram separadas de outras espécies de Simuliidae, identificadas em nível de espécie a partir de caracteres morfológicos de acordo com a chave de Coscarón (1987); Gil-Azevedo *et al.* (2004); Gil-Azevedo *et al.* (2005) e contabilizadas, totalizando 606 indivíduos. Estas foram colocadas em frascos devidamente etiquetados para

posterior extração do DNA genômico. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, núcleo Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF/Brasil. Material testemunho dessa pesquisa será depositado na Coleção de Invertebrados do INPA.

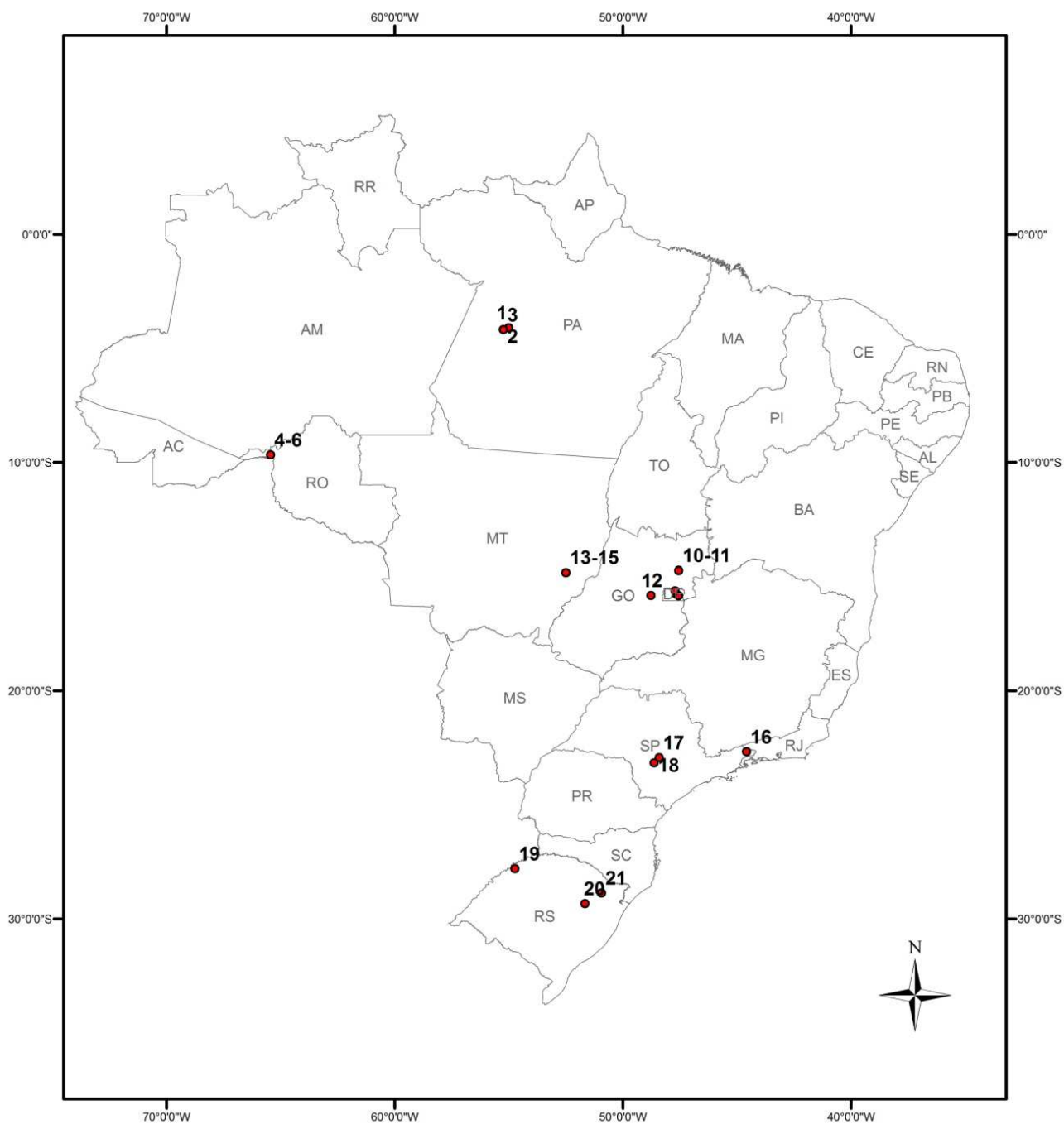


Figura 2– Locais de coleta das populações de *S. pertinax* (Diptera: Simuliidae) nos diferentes estados Brasileiros.

4.3. Extração de DNA Total

Para extração de DNA e posterior amplificação por PCR usando o oligonucleotídeo Citocromo Oxidase I foram utilizados 195 indivíduos. Destes, os três melhores resultados de cada local visualizados no gel de agarose foram utilizados para o sequenciamento “forward” e “reverse”.

O DNA total foi extraído de larvas, pupas e adultos de *S. pertinax*. Este foi obtido macerando-se um indivíduo inteiro por vez utilizando-se o protocolo adaptado de Ayres *et al.* (2002). No caso de pupa, foi retirado o casulo e no caso das larvas foi retirada uma das brânquias para ser depositado na Coleção de Invertebrados do INPA como material testemunho.

Os espécimes foram macerados com um bastão de vidro, e em seguida acrescentou-se 500 µL de tampão de lise (0,4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 120 µg mL⁻¹ proteinase K e 1, 5% SDS). Posteriormente incubou-se o homogenato a 65 °C por 3 h; acrescentou-se 420 µL de NaCl 5 M e por várias vezes inverteu-se o tubo, centrifugando-os por 20 min a 12000xg. Colocou-se 460 µL do sobrenadante em um novo tubo de plástico e acrescentou-se 460 µL de isopropanol gelado e manteve-se a solução a menos 20 °C por 16 horas. No dia seguinte, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 20 minutos e em seguida descartou-se o sobrenadante acrescentando 500 µL de etanol 70 % gelado. Centrifugou-se a solução a 12000 rpm por 10 min, descartando o sobrenadante e acrescentando 500 µL de etanol 70 % gelado. Centrifugou-se a 12000 rpm por 10 min, descartando o sobrenadante. O excesso de etanol foi retirado em papel toalha. As amostras foram colocadas em speed vac por 20 minutos e posteriormente foram ressuspensas com 100 µL em TE 0,1X.

Todo DNA foi preservado em microtúbulos de 1,5 mL com identificação e as eluições do DNA mantidos em caixas e conservados a menos 20 °C até o momento do uso.

4.3.1 Reações de amplificação de fragmentos de DNA por PCR com COI

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 30 µL de reação contendo 19,8 µL de água miliQ, tampão TBE 10x (Tris HCl, Ácido Bórico e EDTA), 0,5 µl dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleotídeo COI barcode a 10 µM com as sequências HCO2198 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' e LCO1490 5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' (Folmer *et al.*, 1994), 0,25 U/µL de *Taq* DNA polimerase (Amersham) e 5 µl de DNA (100 ng). As análises do DNA foram realizadas adaptando o protocolo de Mattos (2007).

4.3.2 Obtenção de Perfis Eletroforéticos

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 35 ciclos, contendo uma etapa final de desnaturação de 5 minutos a 94 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 94 °C, anelamento por 1 minuto a 45 °C e extensão por 1 minuto a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1x (Tris borato 9mM e EDTA 1mM), fotografados e arquivados no sistema Eagleeye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp-GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

4.3.3 Purificação e Quantificação dos Produtos de PCR

Para purificação dos produtos foi utilizado o Kit da INVITROGEN, Pure Link™ PCR purification. Para a quantificação dos produtos de PCR foi utilizado o marcador "Lambda" com 100 ng, 300 ng e 500 ng, a fim de determinar visualmente a concentração das amostras em estudo.

4.3.4 Obtenção das sequências dos Produtos de PCR

O sequenciamento dos produtos do DNA-PCR foi feito utilizando o aparelho ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando um Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB (http://genoma.ib.usp.br/?page_id=170. Acessado em 12/ 2010).

4.3.5 Estudos de variabilidade genética de populações de *Simulium pertinax*

Para manipulação das sequências foi utilizado o programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>, Acessado em 12/2010), para o alinhamento das mesmas por meio do programa Clustal W e Neighbor-joining, método UPGMA versão 3,6 (agrupamento de pares não ponderados baseados na média aritmética) para agrupar as sequências relacionadas (Thompson *et al.*, 1997). As sequências foram traduzidas em aminoácidos, testando as três posições do códon.

Uma das sequências nucleotídica consenso foi conferida no site do BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, acesso 02/2011) e comparada com outras sequências de *Simulium* para verificar se codificava a proteína Citocromo Oxidase I na mesma região de interesse.

As sequências nucleotídicas foram cortadas em regiões onde apresentaram maior homogeneidade totalizando fragmentos de 534 pb. Estas foram conferidas, com o auxílio do programa MEGA 3.0 (Análise Genética de Evolução Molecular) (Kumar *et al.*, 2004).

Usando o programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) árvore filogenética foi obtida baseada nos valores de distância 2 Parâmetros de Kimura, pelo método de *neighbor-joining* (NJ).

As frequências dos haplótipos nas populações foram estimadas usando o programa DNASP (Sequências Polimórficas do DNA) 3.0 (Rozas e Rozas, 1999).

O programa utilizado para a análise da variabilidade genética foi o Arlequin versão 3.11 utilizando o método estatístico Amova que consiste em avaliar a estrutura genética da população por meio do índice de fixação de estimativa genética (F_{st}) a fim de fornecer informações das medidas de diversidade genética dentro e entre populações. Isto é feito pela permutação dos haplótipos, individual, ou populacional, entre indivíduos, populações ou grupos de populações (Excoffier *et al.*, 2006). Quanto mais próximo do valor 1, infere-se populações diferentes. Este programa lida com várias formas de dados haplótipos e genotípicos. No primeiro contexto, os dados genéticos podem ser apresentados sob a forma de haplótipos, ou seja, uma combinação de alelos em um ou mais loci, sendo resultado das análises de genomas haplóides como exemplo o DNA mitocondrial. Por isso aqui neste estudo foi definido cada sequência como haplótipo.

5. Resultados e Discussão

Foram separadas 37 populações de *S. pertinax* abrangendo sete estados brasileiros (Pará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Goiás e Rondônia). Destas populações, três indivíduos de cada estado foram separados para o estudo intra e

interpopulacional. Houve pouca variação no tamanho das sequências (número de nucleotídeos) analisadas entre os indivíduos de uma mesma população e entre as populações (Tab. 1) quase imperceptíveis quando os fragmentos dos produtos de amplificação a partir de espécimes de *S. pertinax* foram visualizados em gel de agarose (Fig. 3). Nos estudos de Morales-Hojas *et al* (2002) houve variação do tamanho do fragmento (número de nucleotídeos) amplificado entre os indivíduos a partir do gene IGS-ETS do DNA ribossomal em populações de *S. sanctipauli*.

Tabela 1- Local de coleta dos espécimes examinados de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) com coordenadas geográficas, data de coleta, (n) indivíduos utilizados para o sequenciamento da região amplificada com o oligonucleotídeo COI e número de pares de bases de cada sequência.

Região	Procedência		Latitude/ Longitude (S/O)	Data de coleta	n	Estágio	(n°)pb
Norte	PA	PA-1=Rurópolis/Córrego do Grim	04° 05'35,6"/ 55° 00'27,2"	23.10.2007	1	pupa	900
		PA-2=Rurópolis2/ Rio Tinga	04° 10'49,7"/ 55° 14'21,8"	22.10.2007	1	pupa	715
		PA-3=Rurópolis3/ Rio Tinga	04° 10'49,7"/ 55° 14'21,8"	27.10.2007	1	pupa	718
	RO	RO-1=Rio Abunã (exemplar 2)	09° 40'21,1"/ 65° 26'52,5"	24.05.2007	3	adulto	678
		RO-2=Rio Abunã (exemplar 1)				adulto	715
		RO-3=Rio Abunã (exemplar 3)				adulto	718
Centro Oeste	DF	DF-1=Córrego da Rajadinha	15° 44,469' / 47° 39,867'	02.10.2008	1	pupa	713
		DF-2=Córrego Estanslau	15° 49,729' / 47° 34,007'	16.10.2008	1	pupa	917
		DF-3=Córrego do DVO	15° 37,336' / 47° 42,726'	02.10.2008	1	larva	715
	GO	GO-1=Córrego Roncador1	14° 43,868' / 47° 32,644' 15° 49'37,1" / 48° 46'34,8"	24.05.2007	2	pupa	777
		GO-2=Córrego Roncador2		24.05.2007		pupa	716
		GO-3=Goiás		26.06.2003		pupa	712
	MT	MT-1=Nova Xavantina-Córrego do Chupador (exemplar 2)	14°50'08.2" 052°30'05.0"	11.12.2009	3	pupa	714
		MT-2=Nova Xavantina-Córrego do Chupador (exemplar 1)				pupa	715
		MT-3=Nova Xavantina-Córrego do Chupador (exemplar 3)				pupa	703
Sudeste	SP	SP-1=Córrego da Barreira (Usina)	22° 40'30,7"/ 44° 34'46,1"	15.05.2003	1	pupa	715
		SP-2=Córrego da Mata (Botucatu)	22° 55'49,9"/ 48° 24'19,9"	12.05.2004	1	pupa	720
		SP-3=Rio Itaúne (Itatinga)	23° 09'42,9"/ 48° 37'50,4"	11.05.2004	1	pupa	714
Sul	RS	RS-1= Córrego Santo Cristo	27° 47'41,9"/ 54° 43'57,5"	11.09.2004	1	pupa	779
		RS-2= Córrego da Calha	29° 19'32,1"/ 51° 39'32,4"	05.09.2004	1	pupa	716
		RS-3= Rio São Marcos	28° 51'59,6"/ 50° 56'21,5"	07.09.2004	1	pupa	718

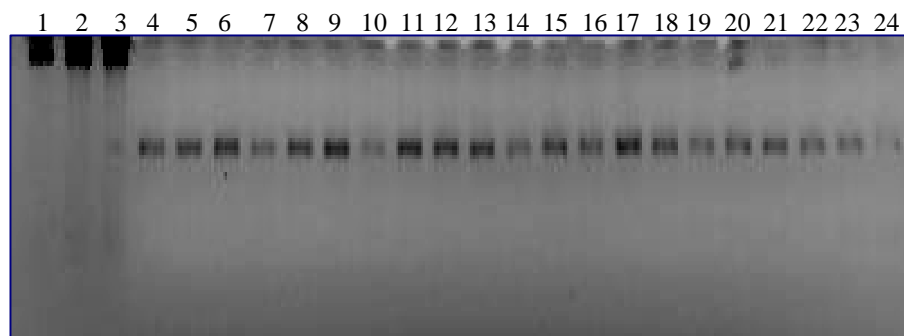


Figura 3- Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do gene Citocromo oxidase I do DNA mitocondrial de espécimes de *Simulium pertinax* coletados em diferentes estados Brasileiros. Linha 1, 2 e 3: marcador de quantificação *Lambda* com 1, 3 e 5 μ L; de 4 a 6: Pará; 7 a 9: Mato Grosso; 10 a 12: Rio Grande do Sul; 13 a 15: São Paulo; 16 a 18: Distrito Federal; 19 a 21: Goiás; 22 a 24: Rondônia.

Para garantir a homologia entre os sítios comparados, a partir do alinhamento múltiplo de todas as sequências, as regiões iniciais e finais foram excluídas.

A partir dos cálculos obtidos pelo programa MEGA 4 2, as frequências dos nucleotídeos foram determinadas. Para todas as sequências analisadas obtiveram-se altas taxas de Adenina (28,8%) e Timina (36,9%) e, taxas equivalentes para Citosina (17,6%) e Guanina (16,7%), de todas as populações de *S. pertinax* (Tab. 2).

Na análise da composição de bases nucleotídicas, observaram-se diferentes taxas de substituições de transição (**negrito**) e transversão (*itálico*). A razão das taxas de transição/transversão foi para purinas de $k_1 = 12,706$ e para pirimidinas de $k_2 = 10,62$, com transição/transversão geral de $R = 4.33$. Todas as posições que contém “*gaps*” e dados perdidos foram eliminadas do conjunto de dados onde anteriormente foi escolhido a

opção de exclusão completa. Houve um total de 584 nucleotídeos examinados no conjunto final (Tab. 3).

Tabela 2- Frequência da composição nucleotídica de todos os sítios das sequências das populações de *S. pertinax* analisadas. T: Timina, C: Citosina, A: Adenina e G: Guanina.

Populações	Composição nucleotídica			
	T(U)	C	A	G
DF-1	37.3	17.1	29.1	16.6
DF-2	37.6	16.8	29.2	16.4
DF-3	37.3	17.1	29.1	16.6
GO-1	37.3	17.1	29.1	16.6
GO-2	37.3	17.3	28.9	16.6
GO-3	37.1	17.3	29.1	16.6
MT-1	36.6	17.8	28.8	16.8
MT-2	36.8	17.6	29.6	16.1
MT-3	37.6	17.6	28.0	16.8
PA-1	36.5	17.8	28.8	17.0
PA-2	36.6	17.8	28.6	17.0
PA-3	36.9	17.6	28.7	16.8
RO-1	36.4	17.9	28.9	16.8
RO-2	36.1	18.3	29.1	16.6
RO-3	36.2	18.1	29.1	16.6
RS-1	37.6	17.4	28.0	16.9
RS-2	36.9	17.6	28.7	16.8
RS-3	36.9	17.6	28.7	16.8
SP-1	36.9	17.6	28.7	16.8
SP-2	36.9	17.6	28.7	16.8
SP-3	36.9	17.6	28.7	16.8
Total	36.9	17.6	28.8	16.7

Tabela 3- Estimativa da probabilidade máxima composto do padrão de substituição de nucleotídeos.

	A	T	C	G
A	-	2.72	1.3	15.58
T	2.13	-	13.76	1.23
C	2.13	28.9	-	1.23
G	27.02	2.72	1.3	-

Do conjunto de 22 sequências representadas cada uma por 585 pb nucleotídicos de todas as populações de *S. pertinax*, 422 sítios foram invariáveis e 124 sítios são polimórficos. Ocorreram 143 mutações com 60 sítios oferecendo informações para parcimônia.

De todas as sequências obteve-se 16 haplótipos (Tab. 4) com uma alta diversidade haplotípica de 0.9481. Duas populações do Rio Grande do Sul compartilham o mesmo haplótipo (haplótipo 15) com as três populações de São Paulo, representantes das regiões Sul e Sudeste Brasileiro. O haplótipo três é compartilhado por uma população de Goiás e por uma população do Distrito Federal, representantes de populações de *S. pertinax* da região Centro-Oeste. O haplótipo seis é compartilhado entre uma população do Pará e uma população do Mato Grosso, representante das regiões Norte e Centro-Oeste. Os outros haplótipos foram representados por diferentes populações do Brasil. As populações de Rondônia apresentaram um maior número de haplótipos onde cada indivíduo corresponde a um haplótipo diferenciado. As populações de São Paulo compartilham o mesmo haplótipo.

Estes resultados são confirmados ao se analisar o dendrograma (Figura 4) que foi obtido pelo método *neighbor-joining*, modelo nucleotídeo 2 Parâmetro de Kimura. Este leva em consideração que as taxas de transição e transversão são diferentes, mas assume frequências de bases iguais.

Tabela 4– Número de haplótipos encontrados nas diferentes populações geográficas de *Simulium pertinax* do Brasil. Distrito Federal (DF-1, DF-2, DF-3), Goiás (GO-1, GO-2, GO-3), Mato Grosso (MT-1, MT-2, MT-3), Pará (PA-1, PA-2, PA-3), Rondônia (RO-1, RO-2, RO-3), Rio Grande do Sul (SP-1, SP-2, SP-3) e São Paulo (SP-1, SP-2, SP-3). *S. decuplum* é a espécie do grupo externo.

Haplótipos	Nº de haplótipos	Distribuição
1	1	DF-1
2	1	DF-2
3	2	DF-3/ GO-1
4	1	GO-2
5	1	GO-3
6	2	MT-1/ PA-2
7	1	MT-2
8	1	MT-3
9	1	PA-1
10	1	PA-3
11	1	RO-1
12	1	RO-2
13	1	RO-3
14	1	RS-1
15	5	RS-2/ RS-3/ SP-1/ SP-2/ SP-3
16	1	<i>S. decuplum</i>

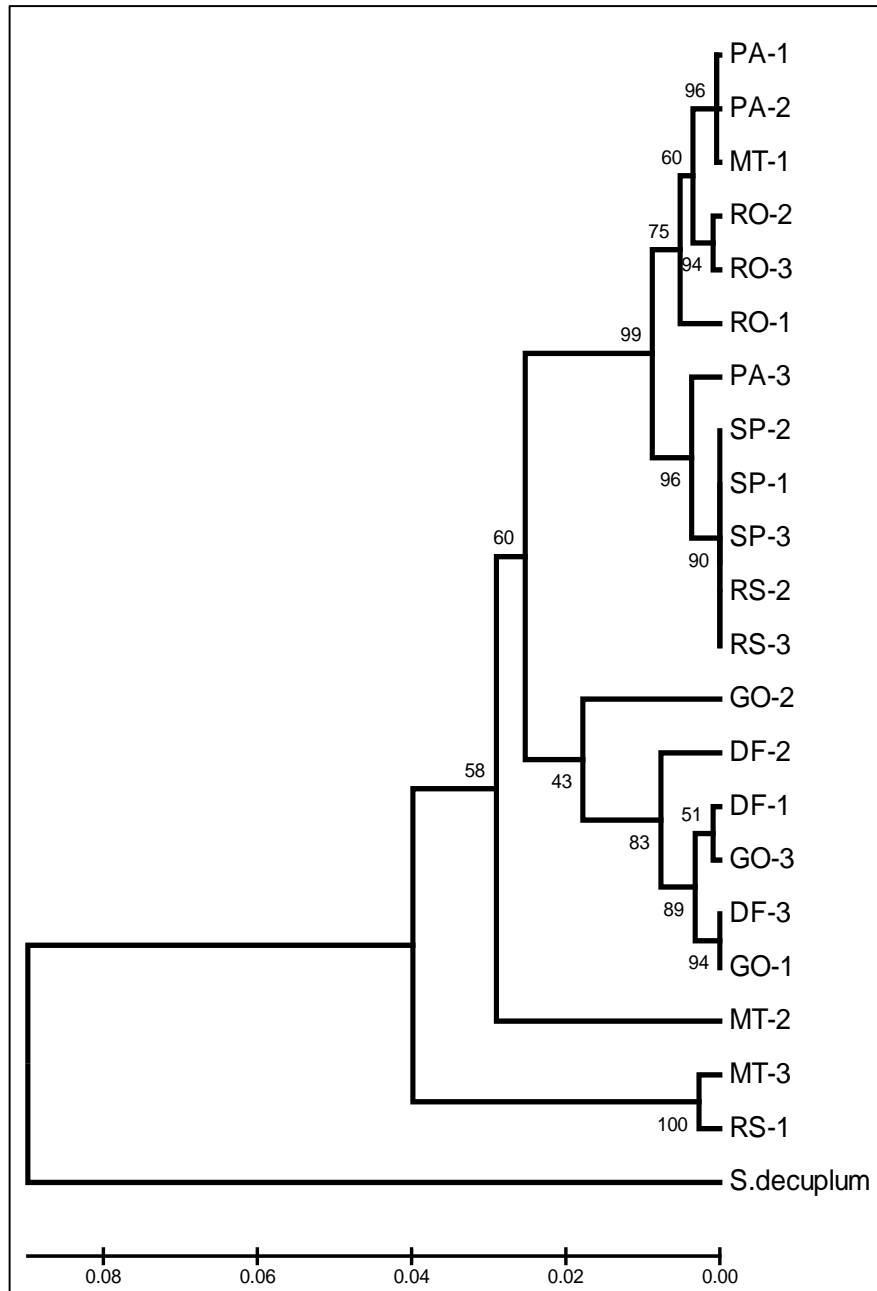


Figura 4- Dendrograma das estimativas de relações entre as sequências das populações de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) do Brasil demonstrando suas similaridades. Distrito Federal (DF-1, DF-2, DF-3), Goiás (GO-1, GO-2, GO-3), Mato Grosso (MT-1, MT-2, MT-3), Pará (PA-1, PA-2, PA-3), Rondônia (RO-1, RO-2, RO-3), Rio Grande do Sul (SP-1, SP-2, SP-3) e São Paulo (SP-1, SP-2, SP-3). *S. decuplum* é o grupo externo.

Observa-se na matriz de distância genética (Tab. 5) baseada no modelo de 2 Parâmetros de Kimura, que compara as sequências par a par, que não houve uma distância genética interpopulacional entre os indivíduos das populações de São Paulo examinadas. Ao contrário, para as populações do Rio Grande do Sul houve uma distância genética interpopulacional maior de 0,09 (9%) demonstrando baixa similaridade entre essas populações. Para as populações do Distrito Federal, houve uma distância genética interpopulacional variando de 0,01 a 0,02, demonstrando alta similaridade entre os indivíduos das populações amostradas para este estado. Observa-se a mesma distância genética inter e intrapopulacional para os indivíduos examinados para o estado do Pará e Goiás com 0,02 e 0,03 respectivamente, não havendo assim diferenças entre os indivíduos de uma mesma população e entre populações. A distância genética entre os indivíduos de todas as populações de *S. pertinax* neste estudo variou de 0,01 a 0,09.

Os valores de diferenciação genética intra e interpopulacional foram calculados pelo índice de estrutura populacional (F_{st}) para as 21 sequências (haplótipos) das populações de *S. pertinax*. Com 1023 permutações entre os haplótipos, observa-se que a variância intrapopulacional entre todas as populações de *S. pertinax* foi maior (5,75641) correspondendo a aproximadamente 66,8% e interpopulacional (2,85545) correspondendo a 33,1%. Observa-se com isso que entre os grupos há uma menor variabilidade do que dentro dos grupos. A permutação entre os haplótipos dos diferentes indivíduos de *S. pertinax* das várias regiões examinadas mostra um índice de fixação F_{st} de 0,33 determinando (Tab. 6) com isso que não há tanta variabilidade entre os indivíduos dentro e entre as populações.

Observa-se que entre as populações da região Norte, considerando os estados do Pará e Rondônia, há uma variância 94% dentro das populações e de aproximadamente 6% entre as populações com índice de estrutura populacional de F_{st} de 0,06 (Tab. 7). Para a região do Centro-Oeste considerando o Distrito Federal e os estados do Goiás e Mato Grosso há uma variância intrapopulacional de 89,1% e interpopulacional de 10,8% com índice de estrutura populacional de F_{st} de 0,1 (Tab. 8). Considerando os índices de estrutura populacional para as regiões Norte e Centro-Oeste, observa-se que as populações do Centro-Oeste possuem uma baixa estrutura populacional em relação as populações do Norte. Ao analisar as Tabelas 6, 7 e 8 observa-se que há maior variação entre os indivíduos da mesma população do que entre indivíduos de populações diferentes. Com isso, podemos inferir que há menor variabilidade genética entre indivíduos de populações diferentes do que entre indivíduos da mesma população, provavelmente por haver maior troca gênica entre esses.

Tabela 6- Análise da variação molecular de populações de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) de alguns estados brasileiros.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação
Interpopulacional	6	83,367	2,85545 Va	33,16
Intrapopulacional	13	74,833	5,75641 Vb	66,84
Total	19	158,200	8,61186	

Tabela 7- Análise da variação molecular de populações de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) da região Norte com os estados do Pará e Rondônia.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação
Entre populações	1	8,367	0,45370 Va	5,87
Dentro das populações	3	21,833	7,27778 Vb	94,13
Total	4	30,200	7,73148	

Tabela 8- Análise da variação molecular de populações de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) da região Centro-Oeste com o Distrito Federal e os estados do Goiás e Mato Grosso.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação
Entre populações	2	21,556	0,96296 Va	10,88
Dentro das populações	6	47,333	7,88889 Vb	89,12
Total	8	68,889	8,85185	

Pelo dendrograma (Fig. 4), observa-se que todas as populações possuem um grau de similaridade entre si. Pode-se inferir dessa forma que populações de *S. pertinax* migraram do Sul do Brasil para o Norte. E, pela similaridade dessas populações podemos sugerir que esses insetos podem viver em constante troca gênica por um provável

corredor natural existente entre essas populações. Esses dados corroboram com os dados da Tabela 6 onde a porcentagem de variação entre as populações foi de 33% com pouca diferença apresentando um índice de fixação de F_{st} 0,33.

Quando Campos *et al* (2001) compararam seis populações de *S. pertinax* de diferentes localidades do Brasil a partir de estudos com cromossomos politênicos demonstraram também não haver variação entre as populações comparadas.

Ao contrário, em estudos filogenéticos com 147 indivíduos de 16 populações de *Simulium tani* Takaoka & Davies, revelou uma alta diferenciação genética entre as regiões do norte, oeste e sudeste da Tailândia, usando o gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial. Sugere-se que houve uma expansão populacional durante o período do Pleistoceno o que gerou uma grande diversidade populacional pela resposta que as espécies deram em relação às flutuações climáticas da época (Pamual *et al.*, 2005).

Inicialmente, por estarem os simulídeos mais antigos concentrados em regiões no norte do globo terrestre, sugere-se que tiveram origem em ambientes frios, de córregos pequenos e de áreas montanhosas. Estes, na nova adaptação passaram a colonizar habitats de ambientes alterados em que as condições de temperatura e nutrientes imitam um criadouro de rio natural (Adler *et al.*, 2010).

A dinâmica de distribuição das diferentes espécies de Simuliidae está associada aos fatores climáticos dos locais de reprodução e as características destes como o substrato de adesão, correnteza, abastecimento das corredeiras, luz, condições físico-químico dentre outros (Figueiró e Gil-Azevedo, 2010). *S. pertinax* ocorre em águas claras de ambientes lóticos ou em águas lentas de ambientes modificados antropicamente, tendo esta espécie uma forte habilidade de se adaptar em diferentes ambientes (Branco-Jr. e

Andrade, 1992; Coscarón e Arias, 2007). As fêmeas são antropofílicas com picadas bastante incômodas. No presente estudo imaturos de *S. pertinax* foram coletados em vários substratos, naturais ou artificiais, indicando a plasticidade de locais utilizados para reprodução desta espécie. Esta espécie é muito encontrada no sul do Brasil e no nordeste da Argentina e Paraguai (Coscarón e Arias, 2007). Nos últimos anos, *S. pertinax* tem sido encontrada em outras regiões do Brasil como o Centro-Oeste e Norte. De acordo com Adler *et al.* (2010) os simulídeos migram de pequenas a longas distâncias dependendo da espécie.

Por ter o Brasil uma extensa rede hidrográfica interligada onde os grandes rios possuem muitos afluentes e por estes insetos voarem a grandes distâncias, sugere-se aqui que as diferentes populações de *S. pertinax* tenham divergido de uma mesma população ancestral, a qual pode estar, ao longo do tempo, conquistando grandes espaços geográficos.

Sugerem-se duas hipóteses: primeiro por ser uma espécie altamente generalista, migrou para outros tipos de criadouros conquistando habitats diferenciados, tanto de ambientes antropizados quanto de ambientes totalmente naturais, o que caracterizaria uma conquista de grandes amplitudes geográficas. E segundo, em muitos lugares, principalmente no norte do Brasil, florestas primárias tem sido alvo de grandes desmatamentos. Esses lugares sofrem colonização pelo homem e animais domésticos proporcionando oferta de alimento para esses insetos além de modificarem o aspecto físico, químico e biológico, sugerindo uma irradiação adaptativa.

O gene utilizado no presente estudo tem resolvido problemas taxonômicos e filogenéticos em muitas populações de Simuliidae (Ball *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2008;

Rivera e Currie, 2009). No presente estudo, os dados moleculares são limitados pelo baixo número de haplótipos examinados. Sugere-se que um número maior de sequências de indivíduos das mesmas populações seja analisado para se estabelecer uma biblioteca com o gene Citocromo Oxidase I. Com isso em estudos futuros os perfis dessas sequências podem ser utilizados para criar um código de barras para identificação de *S. pertinax* das diferentes regiões brasileiras.

CAPÍTULO III

Seleção de estirpes amazônicas de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera)

1. Resumo

Os borrachudos (*Simulium* spp.) possuem ampla distribuição geográfica e quando em alta densidade, podem causar sérios prejuízos econômicos, pois além de serem vetores de doenças, incomodam o ser humano e outros animais gerando prejuízos à saúde, agropecuária e para a indústria turística. Uma das alternativas para controle deste inseto são os bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, entretanto existem poucos produtos utilizados comercialmente nos programas de controle biológico, no Brasil visto o alto custo de importação e a dificuldade de sua aquisição. Um dos fatores importantes para a síntese de novos bioinseticidas é a descoberta de novas estirpes tóxicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar estirpes amazônicas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Simulium* spp. Foram isoladas 96 estirpes a partir de solos coletados na Amazônia e duas destas, S2271 e S2272 mostraram alta toxicidade a larvas de *Simulium* spp. A caracterização bioquímica e molecular das duas estirpes mostrou que ambas apresentavam amplicons correspondentes aos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, e proteínas de 130kDa, 72kDa e 30kDa sendo compatível com as proteínas Cry4A e Cry4B (130kDa), Cry10 e Cry11 (72kDa) e Cyt1 e Cyt2 (30kDa) semelhante ao *Bacillus thuringiensis israelensis*, S1806, utilizado como padrão.

Palavras chave: controle biológico, bioinseticida, borrachudos, *Bacillus thuringiensis*

2. Abstract

The blackflies (*Simulium* spp.) have broad geographic distribution and when occurring in high density, can cause serious economic damage, since in addition to being disease vector, they disturb being and other animals by damaging health, livestock and the tourist industry. One of the alternative for control of this insect is the use of bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis*, although, there are few products used commercially in biological control programs, in Brazil, due to the high import cost and difficulty of its acquisition. One of the important factors for the synthesis of new insecticides is the discovery of new strains toxic. Thus, the present study has as an objective to isolate and characterize Amazon strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Simulium* sp. Ninety-six strains were isolated from soil collected in the Amazon and two of these showed high toxicity to larvae of *Simulium* spp. The biochemistry and molecular characterization of the two strains show that both produced amplicons with primers for *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* and *cyt2* genes and produced protein profiles similar to that of the standard Bti 1806 with bands with molecular weights around 130kDa, 72kDa and 30kDa, consistent with Bti-like proteins Cry4A and Cry4B (~130kDa), Cry10 and Cry11 (~72kDa) and Cyt1 and Cyt2 (~30kDa).

Key-words: biological control, bioinsecticide, blackflies, *Bacillus thuringiensis*

3. Introdução

Simulídeos são considerados uma praga de grande importância econômica em várias regiões do Brasil (Mardini *et al.*, 2000; Regis *et al.*, 2000) com grande impacto em populações humanas e às criações de animais. O controle desses insetos tem sido

realizado pela utilização de inseticidas sintéticos ou biolarvicidas (Mardini *et al.*, 2000; Cavados *et al.*, 2004 e 2005). Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil o controle deste inseto é um sério problema, pois muitas populações apresentam resistência aos inseticidas químicos utilizados (Mardini *et al.*, 2000; Campos e Andrade, 2002). Porém, o uso de biolarvicidas a base de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), vem apresentando ótimos resultados reduzindo a densidade populacional de simúlídeos nas regiões em foco (Mardini *et al.*, 2000).

Bacillus thuringiensis possui ampla distribuição, sendo encontrado em ambientes terrestres e aquáticos (Martin e Travers, 1989). É uma bactéria Gram-positiva e aeróbica. A primeira menção a doenças em insetos causada por Bt data de 1902, quando Ishiwata no Japão descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori* (Linnaeus) e a chamou de *Bacillus sotto* (Ishiwata). Em 1911, Berliner, na Alemanha, redescreveu a mesma bactéria isolada de lagartas conhecidas popularmente por traças-da-farinha, *Anagasta kuhniella* (Zeller) e, em 1915, chamou-a de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem a região de onde as lagartas foram coletadas (Whiteley e Schnepf, 1986; Dias, 1992). *Bacillus* (por sua forma cilíndrica) *thuringiensis* (em homenagem à região alemã da Turíngia) e caracteriza-se pela produção de um cristal protéico com ação tóxica para algumas espécies de Culicidae e Simuliidae (Rabinovitch *et al.*, 2000; Regis *et al.*, 2001).

Bacillus thuringiensis sorotipo *israelensis* (H-14) tem sido empregado em programas de controle no oeste da África e na América do Sul, estando o Brasil entre os pioneiros (Regis *et al.*, 2000) apresentando bons resultados. Apesar disso, existem poucos produtos utilizados nos programas de controle biológico visto a dificuldade de

aquisição e ao alto custo de importação. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos nacionais, que estejam disponíveis no mercado, reduzindo assim os custos de aquisição, e facilitando a acessibilidade aos agricultores e Órgãos Públicos de Saúde.

Embora Bti seja ativo no controle de mosquitos, borrachudos, quironomídeos e outros dípteros incômodos, outras estirpes de outros sorotipos apresentaram toxicidade à dípteros, como por exemplo as pertencentes as subespécies *medellín* e *jegathesan*, apenas estirpes do sorotipo *israelensis* foram usadas em campo para controle do borrachudo. Neste estudo a toxicidade de estirpes do Banco de Bactéria do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, Cenargen/Embrapa pertencentes aos 3 diferentes sorotipos foram avaliadas, assim como a toxicidade de novas estirpes isoladas de solos da Amazônia. Essas novas estirpes foram caracterizadas de acordo com características morfológicas, bioquímicas e moleculares.

4. Material e Métodos

4.1 Coleta das Amostras de Solo

As estirpes utilizadas neste trabalho foram isoladas a partir de 200 amostras de solo provenientes do município de Manaus e arredores (Anexo 2). Estas amostras foram retiradas abaixo de 10 cm a partir do solo exposto. Para isso, primeiramente abriu-se um pequeno buraco com auxílio de uma 'boca de lobo' (Fig. 1) e posteriormente com auxílio de uma colher, uma pequena quantidade de terra foi colocada em saco plástico, levada ao laboratório e mantida em temperatura ambiente para posterior isolamento.

4.2 Isolamento

Todas as amostras foram utilizadas para o isolamento das estirpes bacterianas. O isolamento foi realizado no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF/Brasil, utilizando a metodologia descrita pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1987).



Figura 1– a) método de coleta das amostras de solo com boca de lobo. (b e c) solos argilosos com e sem vegetação respectivamente e d) com solo arenoso. Fonte: Pereira, E.S.

Um grama de cada amostra de solo foi colocado em tubos estéreis com 10 mL de solução salina (NaCl 8,5g/L) e agitado em vortex por dois minutos. Em seguida, 1,5 mL foram transferidos para microtubos estéreis e submetidos a choque térmico (12 minutos a 80 °C e 5 minutos no gelo). As amostras foram diluídas 1000 vezes em solução salina estéril, semeadas em placas de Petri contendo meio EMBRAPA (Monnerat *et al.*,

2007) sólido, contendo 100 µl/mL de penicilina e incubadas a 30 °C por 48 horas. Colônias detectadas foram crescidas em meio EMBRAPA líquido, incubadas em incubador rotativo a 200 rpm, 28 °C por 72 horas e durante intervalos de 24, 48 e 72 horas, foram observadas por meio de microscopia óptica em contraste de fases (Olympus PH-2) para acompanhamento do desenvolvimento das estruturas (esporos e cristais) de acordo com as características descritas por Silva-Werneck e Monnerat (2001).

4.3 Bioensaios Seletivo contra Larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

Para selecionar as estirpes patogênicas a Simuliidae, foi primeiramente realizada uma pré-seleção das estirpes de *B. thuringiensis* provenientes de solos da Amazônia a partir de bioensaio seletivo utilizando larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus) e *Culex quinquefasciatus* Say, visto a facilidade de obtenção desses insetos na criação massal mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a inexistência de uma metodologia de criação de Simuliidae em laboratório.

As estirpes de Bt foram crescidas em meio EMBRAPA (Monnerat *et al.*, 2007) durante 72 horas em agitador rotativo (LAB-LIME incubador-Shaker Modelo 3526), a 200 rpm e a 28°C. O bioensaio foi realizado colocando 1 mL do caldo final das estirpes crescidas, em copos plásticos de 250 mL, contendo 100 mL de água e 25 larvas de 2º estágio de *A. aegypti* ou de *C. quinquefasciatus*. *B. thuringiensis israelensis* (Bti), estirpe S1806, foi utilizado como padrão e controle positivo. Esta estirpe foi originária da coleção do Instituto Pasteur denominada Bti T14001. Para os controles positivos, negativos e para as linhagens a serem testadas foram utilizadas duas repetições. O ensaio

com larvas de *A. aegypti* foi avaliado após 24 horas e para *C. quinquefasciatus* após 48 horas, quando foi realizada a leitura do número de larvas mortas. As estirpes que causaram 50% ou mais de mortalidade do total de larvas examinadas foram consideradas patogênicas (Monnerat *et al.*, 2005), e selecionadas para a realização dos bioensaios seletivo e de dose com larvas de *Simulium* spp.

4.4 Bioensaios contra Larvas de Simuliidae

Para o bioensaio com as larvas de Simuliidae foi necessário fazer uma padronização deste método de bioensaio levando em consideração a biologia deste inseto, visto que este se desenvolve em água com turbulência (com oxigênio) na água para completar seu ciclo de vida. Para isto algumas etapas são descritas a seguir.

4.4.1 Obtenção dos Insetos

Sacolas plásticas foram colocadas em um córrego da Fazenda Sucupira/Embrapa (15°54'20,2"S 48°00'40,0"W) localizada no Distrito Federal, na cidade satélite do Riacho Fundo, para colonização das larvas (Fig. 2). Cinco dias depois, as sacolas foram retiradas dos córregos e colocadas em baldes contendo água do córrego (Fig. 3a), tampados e levados imediatamente ao Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas para utilização no bioensaio. No laboratório, as larvas foram colocadas em beakers de 600 mL contendo 100 mL de água do córrego e colocadas em incubador rotativo a 130 rpm, para simular o ambiente natural em torno de 28°C. As larvas ficaram aderidas a parede dos recipientes. Para a realização dos bioensaios, as coletas ocorreram diariamente. A identificação das espécies de Simuliidae foi feita a

partir de caracteres morfológicos de larvas e pupas segundo a chave taxonômica de Coscarón (1987) e chave desenvolvida no capítulo anterior.



Figura 2- Sacos plásticos colocadas nos leitos dos córregos para colonização e obtenção de larvas de Simuliidae para os bioensaios. Fonte: Pereira, E.S.

4.4.2 Estirpes Utilizadas

Para o bioensaio seletivo, foram utilizadas as estirpes amazônicas que mataram mais de 50% das larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* e oito estirpes da Coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pertencentes a diferentes sorotipos: 2 *B. thuringiensis israelensis* (S1785 e S1806), esta ultima originária do Instituto Pasteur, registrada como T1401, 1 *B. thuringiensis jegathesan* (S2023),

proveniente do Instituto Pasteur registrada como T28, 1 *B. thuringiensis medellin* (S1704) proveniente do CIB, Medellin, Colômbia, registrada como 163-0131, 1 *B. thuringiensis aizawai* (S1576), 2 *B. thuringiensis kustaki* (S1905 e S1450) e 1 *B. thuringiensis tenebrionis* (S1122). A estirpe S1806 foi utilizada como controle positivo.

4.4.3 Bioensaio Seletivo

As estirpes de Bt (*B. thuringiensis jegathesan* S2023, *B. thuringiensis israelensis* S1806 e S1785, *B. thuringiensis medellin* S1704, *B. thuringiensis aizawai* S1576, *B. thuringiensis kurstaki* S1905 e S1450 e *B. thuringiensis tenebrionis* S1122) foram então submetidas a bioensaios contra larvas de *Simulium*.

Após crescimento das estirpes, os ensaios foram realizados colocando-se 1mL do caldo bacteriano crescido (cultivado em meio EMBRAPA) (Monnerat *et al.*, 2007) por 72 horas em agitador rotativo a 200 rpm e a 30°C em becker contendo 100 mL de água do criadouro e 25 larvas de *Simulium* spp. Para o controle negativo, foi utilizado somente a água do criadouro sem a adição da bactéria. Os beckeres foram então colocados em incubador rotativo a 120 rpm proporcionando bastante aeração as larvas (Fig. 3b), os ensaios foram realizados em triplicata totalizando ao final 75 larvas para cada tratamento. Os dados referentes à mortalidade das larvas foram avaliados 24 horas após o início do ensaio.



Figura 3-Bioensaio de simúlídeos. (a) larvas coletadas no campo; (b) beckers contendo larvas em agitação. Fonte: Pereira, E.S.

4.4.4 Bioensaio de Dose

As estirpes que mataram 50% ou mais nos bioensaios seletivos foram submetidas a bioensaios de dose contra larvas de *Simulium* spp. para determinar a concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL₅₀).

Para a realização deste bioensaio, as estirpes em estudo foram crescidas em meio EMBRAPA (Monnerat *et al.*, 2007) durante 72 horas em agitador rotativo, 200 rpm a 28°C, centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min. a 4°C, congeladas por 18 horas e liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock por 18h. Foram feitas diluições com as culturas bacterianas liofilizadas segundo a metodologia descrita para o ensaio com *A. aegypti* no Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas. A concentração final de cada estirpe variou entre 2,5 e 500 ng/mL (Tab. 1).

Para cada amostra testada reservaram-se três tubos de ensaio com 10, 9,9 e 9 mL de água destilada, nomeando-os respectivamente de tubo A, B e C. Posteriormente

pesou-se 0,05g da amostra e transferiu-se para o tubo de ensaio A. Em seguida, transferiu-se 100 μ L do tubo A para o tubo B e deste transferiu-se 1000 μ L para o tubo C. Alíquotas retiradas da solução C foram pipetadas de acordo com a Tabela 1 e colocadas nos béqueres.

Tabela 1- Alíquotas de estirpes de Bt utilizadas na realização de bioensaio com larvas de Simuliidae.

Dose	Suspensão das Alíquotas (μ L/mL)	Concentração (ng/ mL) final no recipiente
1	50	2,5
2	100	5
3	200	10
4	400	20
5	800	40
6	1000	50
7	1500	75
8	2000	100
9	3000	150
10	4000	200
11	8000	400
12	10000	500

Como testemunha foi utilizada água destilada sem adição de bactéria. O ensaio foi realizado em triplicata. A contagem do número de larvas mortas foi realizada 24 horas após o início do ensaio. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados por meio de Probits (Finney, 1971) para determinação da CL₅₀ (concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas). Essas estirpes foram posteriormente caracterizadas para determinar seus sorotipos, composição de genes *cry* e perfis protéicos.

4.5 Caracterização das Estirpes Tóxicas

4.5.1 Caracterização Sorológica

As estirpes foram caracterizadas de acordo com o protocolo descrito por De Barjac e Frachon (1990). Os soros utilizados foram gentilmente cedidos pelo Instituto Pasteur Paris.

4.5.2 Caracterização de Proteínas por meio de SDS-PAGE

A caracterização bioquímica das estirpes foi feita por meio de eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). A extração de proteínas foi realizada segundo o protocolo descrito por Lecadet *et al.* (1991), com algumas modificações. As estirpes foram crescidas em meio EMBRAPA (Monnerat *et al.*, 2007) por 72h em incubador rotativo (Labline 3526) a 28° C e 200 rpm. Em seguida 4,5 mL da cultura bacteriana foi centrifugada em microcentrífuga (Eppendorf 5410) a 14.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em 1,5 mL de NaCl 5M, resuspendido em 1,5 mL da solução de inibidores de proteases (1 mM de PMSF + 100 mM de EDTA) e centrifugado em velocidade máxima 14000 rpm por 15 minutos por duas vezes (Jouan BR- 4i). Para finalizar, o sedimento foi resuspendido em 200 µL da solução de PMSF 1 mM e EDTA 100 mM. A estirpe S1806 foi utilizada como padrão.

As amostras foram desnaturadas a 100° C por 5 minutos e carregadas em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE numa concentração de 10%. O gel foi corado em solução de Comassie Blue corante (40% de metanol absoluto, 10% de ácido acético e 25% de Comassie blue 250R) por 16 horas e descorado em solução descorante (40%

metanol absoluto e 10% de ácido acético) até a completa visualização das bandas protéicas.

4.5.3 Caracterização Molecular

As estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto à presença de genes codificadores de proteínas Cry, por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos para a detecção dos genes *cyt1*, *cyt2*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11* (Bravo *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2003).

A extração de DNA foi realizada a partir de adaptação do protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). As reações de PCR foram realizadas em tubos de polipropileno 0,2 mL em termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100TM). Foram transferidos 10µL de DNA de cada amostra para um tubo de polipropileno contendo 8,0 µM de cada oligonucleotídeo específico, 5 mM de dNTP mix, tampão de *Taq* 10x e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase para uma reação de 50 µL. As condições de amplificação foram descritas por Bravo *et al.* (1998) e Ibarra *et al.* (2003). Após amplificação, 20 µl de cada produto de PCR foi carregado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta. A estirpe S1806 de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* foi utilizada como padrão.

5. Resultados e Discussão

Das duzentas amostras de solo, 96 estirpes de *B.thuringiensis* foram isoladas. Essas estirpes foram nomeadas e depositadas na Coleção de Bactérias Entomopatogênicas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Essas estirpes foram testadas inicialmente contra larvas de mosquitos e as tóxicas foram então testadas contra larvas de *Simulium*, pois estes tiveram de ser coletados no campo, estando, portanto disponíveis em menor número. A identificação das larvas coletadas para os bioensaios revelou que 90% pertenciam a *Simulium perflavum* Roubaud, espécie típica de ambientes abertos e antropizados como era o local de coleta.

Das 96 novas estirpes, duas, S2271 e S2272, causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos contra larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. A estirpe S2271 pertence ao sorotipo *israelensis*, enquanto a estirpe S2272 foi auto-aglutinante e não pode ser sorotipada. Ambas estirpes produziram amplicons com oligonucleotídeo para identificar os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* e produziram perfis protéicos similares aos da estirpe padrão S1806 (Figura 4) com bandas de peso molecular de aproximadamente 130kDa, 72kDa e 30kDa, correspondendo as proteínas: Cry4A e Cry4B (~130kDa), Cry10 e Cry11 (~72kDa) e Cyt1 e Cyt2 (~30kDa).

Dessas 10 estirpes, seis causaram 100% de mortalidade a larvas de Simuliidae em bioensaios seletivos (S2271 e S2272 provenientes da Amazônia, S1785, S1806, S2023 e S1704 da coleção da EMBRAPA). Essas estirpes foram então submetidas a bioensaios de dose para se determinar a concentração letal para matar 50% da população alvo (CL₅₀).

As estirpes S1785, S2271 e S1806 foram as mais tóxicas, apresentando CL₅₀ entre 9,5 e 15,1 mg/mL sendo consideradas similares pois seus intervalos de confiança estão entre 7,1 – 21,8 (Tab. 2). A estirpe S2272 apresentou CL₅₀ de 18,3 mg/mL, de acordo com o intervalo de confiança é semelhante a estirpe S1806. *Bt jegathesan* (S2023)

e *Bt medellin* (S1704) foram agrupados num terceiro grupo de toxicidade (inferior) apresentando valores de CL₅₀ de 89,1 e 108,2 mg/mL (Tab. 2).

As estirpes *Bt kurstaki* (S1450 e S1905) e *aizawai* (S1576) são tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera (Monnerat *et al.*, 2007), *Bt tenebrionis* (S1122) é tóxica a insetos da ordem Coleoptera (Martins *et al.*, 2007) e nenhuma delas foi tóxica a larvas de *Simulium*.

Bt medellin e *Bt jegathesan* mostraram toxicidade para espécies de Culicidae (Orduz *et al.*, 1991; Kawalek *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2004). Em estudos, o sorotipo *israelensis* foi descrito como tóxico às larvas de espécies de *Simulium* (Myburgh e Nevill, 2003, Petry *et al.*, 2004; Stoops e Adler, 2006), mas até hoje não existem relatos da atividade tóxica de estirpes dos sorotipos *jegathesan* e *medellin* a simulídeos, como realizado neste trabalho. Estudos preliminares realizados com *Bt jegathesan* e *Bt medellin* mostraram que ainda que estas estirpes sejam tóxicas para larvas de mosquitos, elas são 10 vezes menos tóxicas que o *Bt israelensis* em condições de laboratório (Thiery *et al.*, 1999). Os resultados deste trabalho com *Simulium* são semelhantes aos obtidos com *Culex pipiens* Linnaeus e *Aedes aegypti*, mostrando que *Bt jegathesan* e *medellin* produzem valores de CL₅₀ 6-10 vezes maiores que os obtidos com a estirpe *israelensis* testada. A nova estirpe amazônica, S2272 também apresentou alta toxicidade, entretanto, ainda que não tenha sido caracterizado seu perfil gênico indicou ser similar ao *Bti*. Estudos preliminares mostraram que outra estirpe de *Bt* (LFB-FIOCRUZ 1035) isolada no suldeste do Brasil apresentou alta toxicidade contra larvas de *Simulium pertinax* (Cavados *et al.* 2005).

Tabela 2- Toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* CL₅₀ (mg/mL) contra larvas de *Simulium* spp.

Estirpes	Sorotipo	CL₅₀ (mg.mL⁻¹)	Intervalo confiança (mg.mL⁻¹)
S2271	<i>Israelensis</i>	9,5	7,1-12,4
S1785	<i>Israelensis</i>	10,5	7,2-12,6
S1806	<i>Israelensis</i>	15,1	10,3-21,8
S2272	autoaglutinação	18,3	13,1- 26,4
S1704	<i>Medelin</i>	89,1	72,2- 106,3
S2023	<i>Jegathesan</i>	108,2	81,2-136,5

Os resultados de caracterização obtidos mostraram que as estirpes S1785, S2271 e S2272 apresentaram perfil protéico semelhante ao da estirpe padrão S1806 apresentando proteínas de peso molecular em torno de 130k Da, 72k Da e 30k Da sendo compatível com os das proteínas Cry4A e Cry4B (~130kDa), Cry10 e Cry11 (~72kDa) e Cyt1 e Cyt2 (~30kDa) (Fig. 4). Todas essas proteínas são efetivas contra dípteros (Monnerat e Praça, 2006). Os sorotipos *medellin* (S1704) e *jegathesan* (S2023) apresentaram perfis de proteínas distintos em relação ao do sorotipo *israelensis* (Fig. 4).

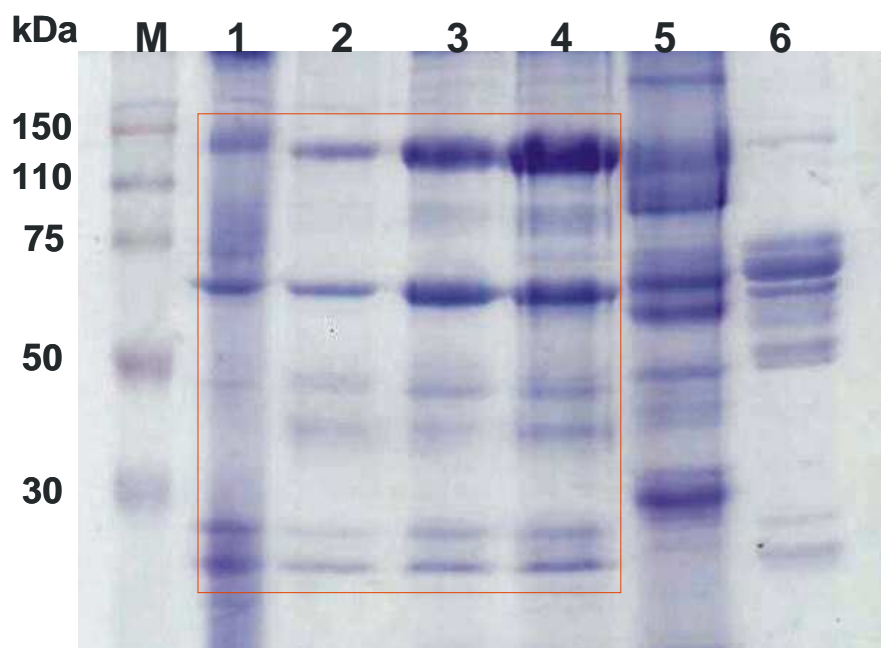


Figura 4-Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com Dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) das estirpes tóxicas a *Simulium* sp. M=marcador; 1: S1806 (padrão), 2: S1785, 3: S2271, 4: S2272, 5: S1704, 6: S2023.

As duas estirpes amazônicas (S2271 e S2272) apresentaram produtos de amplificação por PCR nos tamanhos esperados nas reações com oligonucleotídeos descritos para detecção dos genes *cry4A* (459 pb), *cry4B* (321 pb), *cry11* (345 pb), *cyt1* (478 pb) e *cyt2*(356 pb) (Fig. 5). Esses resultados complementam o perfil de proteínas obtidas para as estirpes estudadas mostrando similaridade entre estas estirpes com o sorotipo *israelensis*.

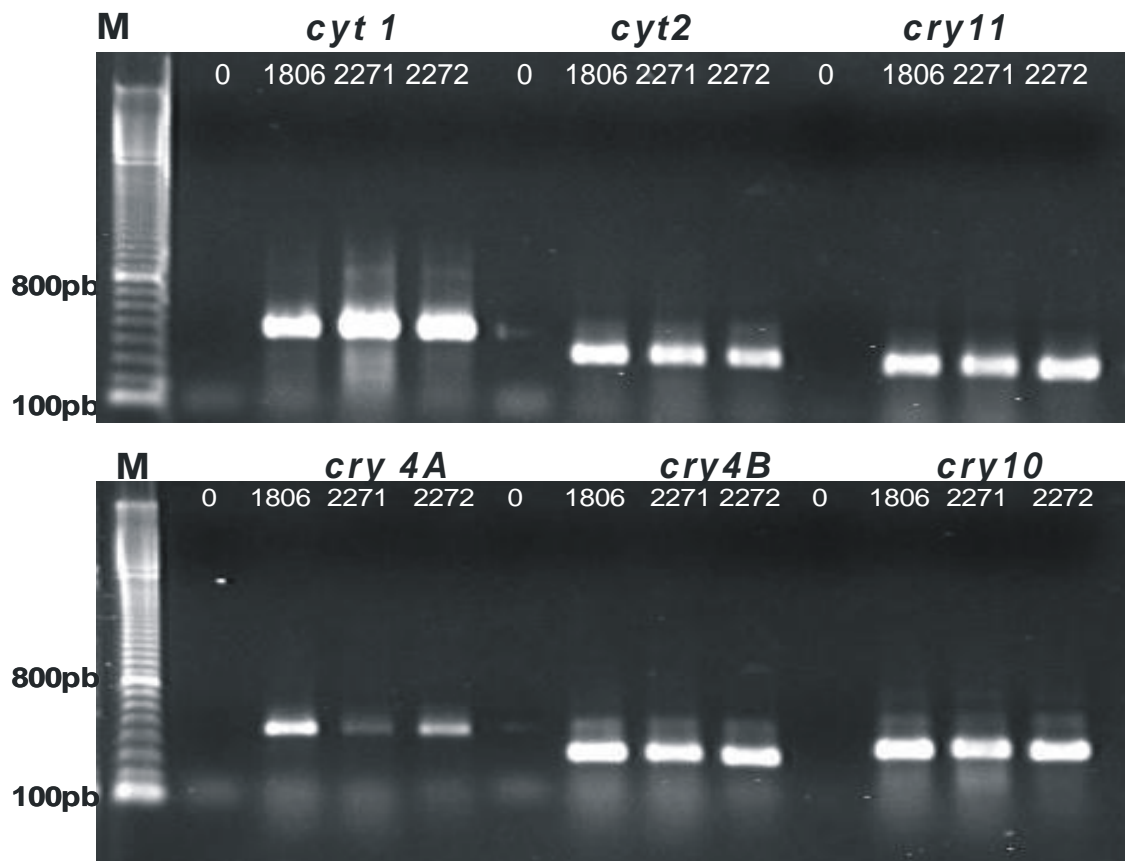


Figura 5-Characterização molecular das estirpes S2271, S2272, mostrando fragmentos de DNA para a detecção da presença dos genes *cyt1*, *cyt2*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11*. M=marcador; O= controle negativo; S1806= *Bti*; S2271 e S2272= estirpes amazônicas.

Neste capítulo foi mostrado que os sorotipos de *Bt israelensis*, *medellin* e *jegathesan*, são tóxicos à larvas de *Simulium*. Todavia as estirpes pertencentes ao sorotipo *israelensis* foram as mais tóxicas.

CAPÍTULO IV

Susceptibilidade de Simuliidae a toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner 1915

1. Resumo

Algumas espécies de *Simulium* causam sérios prejuízos econômicos, incomodam seres humanos e outros animais, gerando prejuízos na agricultura, saúde e turismo. Uma alternativa para o controle desse inseto é o uso de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti). Esta bactéria produz várias toxinas Cry e Cyt e produtos à base destas tem sido amplamente utilizada em programas de controle biológico de simulídeos. Trabalhos realizados com outras ordens de insetos têm mostrado que algumas dessas proteínas mostraram um efeito sinérgico. Porém, não há relatos sobre a atividade individual das toxinas contra larvas *Simulium*. Este estudo avaliou a toxicidade de proteínas puras e da mistura de Bti para determinar um possível efeito sinérgico contra larvas de *Simulium*. As toxinas testadas foram Cyt1Aa, Cry4AA, Cry4B, Cry11A e Cry10A. Cry4B apresentou a maior toxicidade, seguida por Cry4A e Cry11A. Cry10A e Cyt1A não foram tóxicas. Efeitos sinérgicos foram detectados em muitas misturas tóxicas, mas maior fator de sinergismo (4,6) foi observado com a mistura de toxinas indicando ser a melhor para controlar simulídeos.

Palavras chave: borrachudos, *Bacillus thuringiensis*, Proteínas Cry, Sinergismo.

2. Abstract

Some species of *Simulium* cause serious economic harm annoy humans and other animals, creating losses in health, agriculture and tourism industry. One alternative for controlling this insect is the use of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti). This bacterium produces several Cry and Cyt toxins and products based on it have been widely used in biological control programs of blackflies. Works undertaken with other orders of insect have shown that some of these proteins showed a synergistic effect. Although there are no reports relating the activity of individual toxins against *Simulium* larvae. This study examined the toxicity of single and mixed proteins of Bti to determine a possible synergistic effect against larvae of *Simulium*. The toxins tested were Cyt1Aa, Cry4AA, Cry4B, Cry11A and Cry10A. Cry4B showed the highest toxicity followed by Cry4A and Cry11A. Cry10A and Cyt1A were not toxic. Synergic effect was detected in many toxin mixtures, but all toxins together presented the higher synergism factor, 4.6, indicating to be the best to control black flies.

Key-words: blackflies, *Bacillus thuringiensis*, Cry protein, Synergism.

3. Introdução

Os simulídeos conhecidos no Brasil como “pium” ou borrachudos possuem ampla distribuição e seus estágios imaturos habitam quase todos os tipos de ambientes aquáticos lóticos e lênticos (Adler, 1994). Os adultos possuem grande relevância por serem vetores e hospedeiros de vírus, helmintos, protozoários e bactérias (Hamada, 1993; Adler, 1994). Na área médico-veterinária são vetores de filárias como *Mansonella ozzardi* e *Onchocerca volvulus* (Marcondes, 2001). Quando em alta densidade, algumas

espécies causam prejuízos econômicos, pois sendo as fêmeas hematófagas, incomodam o ser humano e outros animais gerando prejuízos na saúde, na agropecuária e na indústria turística (Ruas Neto e Matias 1985; Adler e Mason, 1997).

As larvas de Simuliidae são filtradoras não seletivas, alimentam-se de matéria orgânica em suspensão além de microrganismos como bactérias (Fredeen, 1963). Essas bactérias podem ser encontradas em diversos nichos desempenhando importante papel ecológico entre os quais o efeito patogênico de algumas espécies a diversos insetos (Bulla-Jr., 1975). Dentre as bactérias entomopatogênicas esporulantes mais estudadas está *Bacillus thuringiensis*. Esta produz cristais compostos de proteínas (δ -endotoxinas) com potencial inseticida para o controle de algumas espécies de Culicidae e Simuliidae (Regis *et al.*, 2000; 2001). As δ -endotoxinas, também denominadas proteínas Cry e Cyt, apresentam ação extremamente tóxica a diversas ordens de insetos (Bravo *et al.*, 2007).

O uso de biolarvicidas a base de Bti tem sido empregado no controle biológico como forma alternativa ao uso dos inseticidas sintéticos. O modo de ação das toxinas Cry tem sido caracterizado em insetos da ordem Lepidoptera e Diptera (Bravo *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008). É necessário que a proteína passe por várias etapas até que atinja a forma tóxica: Após a ingestão dos cristais e esporos pelas larvas suscetíveis, ocorre a solubilização do cristal pelo pH alcalino e a consequente liberação das protoxinas, no lúmen intestinal. Essas protoxinas são reconhecidas e cortadas por proteases intestinais, para produzir toxinas ativas que se ligam a receptores específicos presentes nas células epiteliais do intestino médio. Consequentemente poros são formados na membrana que permitem a passagem livre de íons e água, resultando em

inchaço e lise das células do epitélio intestinal e a posterior morte das larvas (Bravo *et al.*, 2007; Pigott e Ellar, 2007).

Bacillus thuringiensis israelensis produz quatro proteínas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa e Cry11Aa) e duas proteínas Cyt (Cyt1Aa e Cyt2Ba) tóxicas que individualmente mostram atividades contra larvas de mosquitos principalmente dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. As proteínas Cry4 e Cry11 são as principais toxinas, com atividade larvicida para *A. aegypti* (Chen *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2009).

Essas proteínas quando em conjunto mostram um efeito sinérgico em alguns insetos. Pérez *et al.*, (2005; 2007), demonstram que a proteína Cyt1Aa age em sinergismo com a proteína Cry11 melhorando a efetividade desta, pois Cyt1Aa insere-se na membrana formando poros (estrutura pré-poro oligomérica) funcionando como um receptor de membrana para Cry11 em larvas de mosquito Fernández-Luna *et al.* (2010) realizaram testes de concentração única mostrando sinergismo entre toxinas de *Bt israelensis* Cyt1Aa em conjunto com Cry4Ba e com Cry11Aa contra larvas do mosquito *Anopheles albimanus*, vetor da malária no México. Sinergismo também ocorreu entre as toxinas Cyt1Aa e Cry4A de *Bt israelensis* para larvas dos primeiros estádios de *Tipula paludosa* (Meigen) sendo o mecanismo da proteína Cyt1Aa desconhecido para esta espécie de tipulídeo (Oestergaard *et al.*, 2007).

Bacillus thuringiensis vêm sendo também bastante empregado nos programas de controle biológico para larvas de Simuliidae (Myburgh e Nevill, 2003; Petry *et al.*, 2004; Stoops e Adler, 2006), no entanto não há relatos de susceptibilidade de toxinas puras as larvas de Simuliidae. Por isso, o presente estudo teve como objetivo

analisar a toxicidade de proteínas isoladas e em conjunto Cry e Cyt de Bt verificando quais são as proteínas tóxicas no Bti e a possível sinergia entre elas.

4. Material e Métodos

4.1 Toxinas Bt

Todos os genes de toxinas Bt usados nesse estudo foram expressos individualmente em *B. thuringiensis israelensis* acristalífero, estirpe 4Q7 (*Bacillus* genetic Stock Center). O vetor utilizado foi o pHT315 (Arantes *et al.*, 1991) onde foram clonados os genes codificadores das seguintes proteínas: Cyt1Aa, Cry4A, Cry4B e Cry11A. O gene codificador da toxina Cry10Aa foi clonado em pSVP27A e expresso em *B. thuringiensis israelensis* acristalífero, estirpe IPS78/11. Esse gene foi clonado de uma estirpe brasileira de Bt chamada S1804.

4.2. Obtenção dos Insetos

A toxicidade das estirpes de Bt contra larvas de simúlídeos foi determinada utilizando um método adaptado do descrito por Barton *et al.* (1991). Os insetos foram coletados diariamente de um rio localizado na fazenda experimental da EMBRAPA, em Brasília (DF). A identificação das espécies coletadas foi realizada baseada em características morfológicas das larvas e pupas de acordo com a Chave taxonômica de Coscarón (1987).

4.3. Bioensaio Seletivo

Estirpes de Bt expressando diferentes toxinas foram cultivadas em meio EMBRAPA (Monnerat *et al.*, 2007) (suplementado com eritromicina (15mg/mL) ou clorafenicol (34 mg/mL), quando necessário para manutenção dos plasmídeos) por 72 horas em incubador rotativo a 200 rpm e 28 °C. Quando a porcentagem de esporulação era superior a 95% foram realizados testes adicionando 1 mL do caldo final de cada estirpe (toxinas individualizadas) em beckers de 600 mL contendo 100 mL de água do rio e 25 larvas de de *Simulium* spp. Os beckers foram colocados em incubador rotativo a 130 rpm a 28 °C e os experimentos foram realizados em triplicata. Como controle negativo foi usado água do criadouro sem adição da bactéria. Dados da mortalidade das larvas foram avaliados 24 horas apos o início dos testes.

4.4 Bioensaio de Dose

Toxinas que mataram mais de 50% das larvas de *Simulium* foram utilizadas em bioensaios quantitativos. Para a realização desses ensaios Bt, contendo genes expressando diferentes toxinas foram crescidos em meio EMBRAPA como descrito anteriormente e então os esporos foram submetidos a centrifugação a 12.000g por 30 min a 4° C. Posteriormente eles foram congelados por 18 horas e liofilizados em liofilizador Labconco modelo Lyphlock por 18 h.

Para cada amostra testada (toxina pura) reservou-se três tubos de ensaio com 10, 9,9 e 9 mL de água destilada, nomeando-os respectivamente de tubo A, B e C. Posteriormente pesou-se 0,05 g da amostra e transferiu-se para o tubo de ensaio A. Em seguida, transferiu-se 100 µL para o tubo B e deste transferiu-se 1000 µL para o tubo C.

A solução C foi utilizada para a realização do bioensaio de dose de acordo com a Tabela 1.

Para o cálculo da CL_{50} da mistura utilizou-se duas estirpes ao mesmo tempo, pesou-se 0,025g de cada uma (1:1) e transferiu-se para o tubo de ensaio A. Em seguida, continuou-se o protocolo acima descrito. A solução C foi utilizada para a realização do bioensaio de dose de acordo com a Tabela 1.

Para o cálculo de todas as estirpes juntas, pesou-se 0,01 g de cada amostra e transferiu-se para o tubo de ensaio A. Posteriormente seguiu-se o mesmo protocolo acima descrito. A solução C foi utilizada para a realização do bioensaio de dose de acordo com a Tabela 1.

Os testes foram realizados em triplicata e o controle foi deixado sem adição da bactéria. Os testes foram realizados em triplicata e avaliados 24 horas após o início do teste por meio da Análise de Probit (Finney, 1971) para determinar a CL_{50} (concentração necessária para matar 50% das larvas testadas).

4.5. Determinação do Fator de Sinergismo

O fator de sinergismo foi determinado pela fórmula descrita por Tabashnik (1992). CL_{50} esperada = $[ra+rb/CL_{50a}+CL_{50b}]$, onde **ra** é a proporção relativa a quantidade da toxina “a”, **rb** é a proporção relativa a quantidade da toxina “b”, **CL_{50a}** é a CL_{50} obtida experimentalmente pela análise de Probit da toxina a e **CL_{50b}** é a CL_{50} obtida experimentalmente pela análise de Probit da toxina b. . Existe sinergismo quando o valor da CL_{50} esperada é maior que o limite superior do intervalo de confiança ($P = 0, 095$) da CL_{50} obtida experimentalmente. Neste caso, o fator de sinergismo (FS) é determinado

dividindo-se o valor da CL_{50} esperada pelo valor da CL_{50} observada para as combinações das toxinas, conforme $FS = CL_{50} \text{ esperada} / CL_{50} \text{ observada}$.

Tabela 1- Alíquotas de estirpes de Bt utilizadas na realização de bioensaio com larvas de Simuliidae.

Dose	Suspensão das Alíquotas (mg/mL)	Concentração (ng/mL) final no recipiente
1	1000	50
2	2000	100
3	3000	150
4	4000	200
5	5000	250
6	9000	450
7	13000	650
8	17000	850
9	21000	1050

5. Resultados e Discussão

As toxinas Cry4A, Cry4B e Cry11A causaram 100% de mortalidade das larvas, não ocorrendo o mesmo para as toxinas Cyt1Aa e Cry10A em bioensaios seletivos.

Combinações de toxinas foram então testadas e as seguintes misturas também causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos: Cyt1Aa+Cry4A; Cyt1Aa+Cry4B; Cyt1Aa+Cry11A; Cry4A+Cry4B; Cry4A+Cry11A; Cry4A+Cry10A; Cry4B+Cry11A; Cry4B+Cry10A; Cry11A+Cry10A; Cyt1Aa+Cry4A+Cry4B+Cry11A+Cry10A. Essas toxinas únicas e misturadas foram

submetidas a novos bioensaios para determinar a concentração letal para matar 50% da população alvo (CL_{50}), como mostrado na Tabela 1.

Do grupo das toxinas isoladas, a toxina Cry4B foi a mais tóxica, apresentando CL_{50} de 92 mg/mL^{-1} , seguida de Cry4A (560 mg/mL^{-1}) e Cry11A (830 mg/mL^{-1}). A mistura de amostras contendo Cry4B e Cry4A produziu a mais tóxica das combinações testadas neste estudo ($CL_{50} 54 \text{ mg/mL}^{-1}$) e esta interação apresentou um fator de sinergismo (FS) de 2,9. Combinações de outras proteínas Cry4B+Cry11A e Cry4A+Cry11A foram também sinérgicas (FS 1,6 e 1,8 respectivamente). Misturas de Cry4B, Cry4A e Cry11A com Cyt1Aa (que não era tóxica sozinha) apresentaram interações sinérgicas, assim como as combinações de Cry4B, Cry11A com Cry10A (Tab. 2). Cry4A testado com Cry10A apresentou toxicidade, mas não existem evidências que esta interação seja sinérgica. O valor da CL_{50} esperada está dentro do intervalo de confiança de 95% do valor da CL_{50} observada. Isso indica que não há efeito sinérgico entre essas duas proteínas.

Cry10A e Cyt1Aa, que não eram tóxicas quando testadas isoladamente também não foram tóxicas em conjunto. A mistura de todas as toxinas produzidas pela estirpe apresentou o maior fator de sinergismo (FS) de 4,6 (Tab. 2).

Proteínas Cry4A, Cry4B e Cry11A são as principais responsáveis pela atividade tóxica do *B. thuringiensis israelensis* para o mosquito *Aedes aegypti* (Crickmore *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2009), sinergismo entre toxinas aumenta toxicidade (Crickmore *et al.*, 1995) podendo retardar ou evitar resistência (Wirth *et al.*, 1997). Crickmore *et al.* (1995) demonstraram que em *A. aegypti* existe sinergismo entre Cry4B e Cry11A como observado para *Simulium* nesse estudo.

Em *A. aegypti* Cyt1Aa interage sinergicamente com Cry4A, Cry4B e Cry11A (Wu *et al.*, 1994; Crickmore *et al.*, 1995). Fernandez-Luna *et al.* (2010) demonstraram que existe sinergismo entre Cyt1Aa e Cry4Ba e Cry11Aa em larvas do mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemman novamente como foi obtido neste trabalho. Sinergismo foi também observado entre toxinas Cyt1Aa e Cry4A para estágios jovens de *Tipula paludosa* (Meigen) (Oestergaard *et al.*, 2007). Em *Chironomus tepperi* Skuse, entretanto, enquanto Cyt1Aa sinergiza com Cry4A, parece que anatagoniza com Cry11A (Hughes *et al.*, 2005).

Foi sugerido que Cyt1A age de forma sinérgica com Cry11A em *A. aegypti* funcionando como um receptor de membrana para Cry11A e facilitando a formação de um pré-poro (Pérez *et al.*, 2005, 2007). Os resultados obtidos nesses estudos indicam ação sinérgica de Cyt1A, mas não podem inferir sobre sua função como receptor.

Tabela 2- Toxicidade CL_{50} (mg/mL) de estirpes de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de Simuliidae.

Toxinas de Bt (proporções relativas)	CL_{50} (mg.mL ⁻¹) Observada	CL_{50} (mg.mL ⁻¹) Esperada	Fator de sinergismo (FS)
Cry4B	92 (55-120)	-	-
Cry 4A	560 (430-690)	-	-
Cry11A	830 (790-890)	-	-
Cry10A	-	-	-
Cyt1Aa	-	-	-
Cry4B +Cry4A (0.5 : 0.5)	54 (33 - 70)	160	2.9
Cry4B+Cry11A (0.5 : 0.5)	110 (78 - 150)	180	1.6
Cry4A+Cry11A (0.5 : 0.5)	370 (250 - 460)	670	1.8
Cry4B + Cyt1Aa (0.5 : 0.5)	120 (110 - 130)	200	1.7
Cry4A+Cyt1Aa (0.5 : 0.5)	840 (780 - 920)	1100	1.3
Cry11A+Cyt1Aa (0.5 : 0.5)	710 (610 -860)	2000	2.8
Cry4B+Cry10A (0.5 : 0.5)	97 (70 - 120)	200	2.1
Cry11A+Cry10A (0.5 : 0.5)	1000 (920 - 1100)	2000	1.9
Cry4A+Cry10A (0.5 : 0.5)	1700 (1200 - 7100)	1300	-
Cyt1Aa+Cry 10A (0.5 : 0.5)	-	-	-
Cyt1Aa+Cry4A+ Cry4B +Cry11A+Cry10A (0.2 : 0.2 : 0.2 : 0.2 : 0.2)	87 (62-110)	400	4.6

* (FS) = CL_{50} Esperada/ CL_{50} Observada

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que Cry4B é a proteína mais tóxica, e quando ela é usada em conjunto com as demais ocorre sinergismo. Desta forma, esses resultados indicam que para o controle, a melhor estratégia é usar todas as toxinas presentes na bactéria, como tem sido feito ao longo dos anos nos programas de Controle Biológicos já implantados no Rio Grande do Sul (Mardini *et al.*, 2000).

Até então, não há relatos do mecanismo de ação das proteínas Cry e Cyt para larvas de Simuliidae sendo este trabalho pioneiro em estudos de sinergismo para este inseto. Propõe-se para trabalhos futuros determinar o mecanismo molecular básico da interação específica das proteínas Cry com as células do intestino médio de larvas de

Simulidae a fim de identificar possíveis receptores destas proteínas. E, posteriormente um ensaio de competição pra se conhecer a ligação e a competição das proteínas em estudo aos receptores de membrana extraídos de simulídeos.

III- CONCLUSÃO

Capítulo I

- ❖ Neste estudo, a técnica de bioensaio foi desenvolvida e validada e será utilizada para futuros estudos;
- ❖ Os diferentes sorotipos de Bt, subsp. *medellin*, proveniente do CIB, Medellin, Colômbia, Bt, subsp. *israelensis* e Bt, subsp. *jegathesan* ambas do Instituto Pasteur apresentaram atividade contra espécies de *Simulium*, sendo que Bti foi o mais tóxico.

Capítulo II

- ❖ A proteína Cry4B foi a que apresentou melhor efeito tóxico. Entretanto a mistura de todas as proteínas (Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A e Cyt1Aa) apresentou o maior fator de sinergismo, indicando ser esta a melhor forma de ser usado para produzir um produto que possa ser utilizado em programas de controle para Simuliidae;
- ❖ Propõe-se para trabalhos futuros determinar o mecanismo molecular básico da interação específica das proteínas Cry com as células do intestino médio de larvas de Simuliidae a fim de identificar possíveis receptores destas proteínas. E, posteriormente um ensaio de competição para se conhecer a ligação e a competição das proteínas em estudo aos receptores de membrana extraídos de simulídeos.

Capítulo III

- ❖ Das 18 espécies de Simuliidae já registradas anteriormente para o Distrito Federal e Goiás, 10 foram identificadas no presente estudo. E, 10 espécies tiveram primeiro registro para essas áreas;
- ❖ Foram identificadas 22 espécies as quais foram utilizadas para o confeccionamento de uma chave dicotômica de identificação para a região do Distrito Federal e para os lugares amostrados no estado de Goiás. Esta ajudará na identificação de espécies Simuliidae para esta região de forma mais rápida e precisa. Esta chave dicotômica é o primeiro relato da simuliofauna encontrada no Distrito Federal e arredores, na região do Centro-Oeste brasileiro;

Capítulo IV

- ❖ Foi estabelecida uma estratégia para análise por PCR a partir de amostras conservadas há sete anos (material coletado nos anos de 2003, 2004, 2007, 2008 e 2009);
- ❖ Obteve-se êxito no protocolo adaptado para extração de DNA de *S. pertinax*, anteriormente utilizado para extração de Culicidae;
- ❖ As sequências de DNA mitocondrial obtidas aqui fornecem informações a nível molecular que conjuntamente aos estudos morfológicos contribuem para o entendimento e separação da espécie *S. pertinax* de outras espécies do mesmo grupo. Observa-se isso na matriz de distância genética com grande similaridade entre os indivíduos avaliados, diferenciando assim da espécie outgroup;

- ❖ Entre as populações e entre os indivíduos de uma mesma população de *S. pertinax*, não houve diferenças gênicas entre estas.

IV- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, P.H. Simuliidae. In: MORSE, J.C., YANG, L., TIAN, L. (Eds). *Aquatic Insects of China useful for monitoring water quality*. University Hohal. 1994. p. 478-487.
- ADLER, P.H., MASON, P.G. Black flies (Diptera: Simuliidae) of east-central Saskatchewan, with descriptions of new species and implications for pest management. **The Canadian Entomologist**, v. 129, p. 81-91. 1997.
- ADLER, P.H., CROSSKEY, R.W. World Blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 119pp. (<http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>). Acesso: 19/08/2010. 2009.
- ADLER, P.H., CROSKEY, R.W. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. (<http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>). Acesso: 9/10/2010. 2010.
- ADLER, P.H., CHEKE, R.A., POST, R.J. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 846-865. 2010.
- ALENCAR, Y.B., LUDWIG, T.A.V., SOARES, C.C., HAMADA, N. Stomach Content Analyses of *Simulium perflavum* Roubaud 1906 (Diptera: Simuliidae) larvae from streams in Central Amazônia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 561-576. 2001.
- ALVAN-AGUILAR, M. A., HAMADA, N., ADLER, P.H., LUZ, S.L.B. Cytotaxonomy of *Simulium cauchense* Floch & Abonnenc and *Simulium quadrifidum* Lutz (Diptera:

- Simuliidae) in Brazilian Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 249-257. 2005.
- ANDRADE, C.F.S., BRANCO JR., A.C. Susceptibilidade de populações de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax*, Kollar, 1832 (Culimorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 367-370. 1991.
- ANDRADE, H.T.A., NASCIMENTO, R.S.S., GURGEL, H.C.B., MEDEIROS, J.F. Simuliidae (Diptera) integrantes da dieta de *Poecilia vivípara* Bloch & Schneider, 1801 (Atheriniformes, Poeciliidae) no Rio Ceará Mirim, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 1, p. 119-122. 2000.
- ARANTES, O., LERECLUS, D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, v. 108, p. 115-119. 1991.
- ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C., MAIA-HERZOG, M., SOUZA, B.C. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera: Simuliidae) no litoral norte do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, n. 1, p. 11-17. 1988.
- AVISE, J.C. *Molecular markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall., New York, London. 1994. 511p.
- AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMBT, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A., SAUNDERS, N. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 89-522. 1987.

- AYRES, C.F.J., ROMÃO, T.P.A., MELO-SANTOS, M.A.V., FURTADO, A.F. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 871-875. 2002.
- BALL, S.L., HEBERT, P.D.N., BURIAN, S.K., WEBB, J.M. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, n. 3, p. 508-524. 2005.
- BARTON, W.E., NOBLET, R., KURTAK, D.C. A simple technique for determining relative toxicities of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations against larval blackflies (Diptera: Simuliidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, p. 313-315. 1991.
- BRANCO JR., C.A., ANDRADE, C.F.S. Susceptibility of *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in an atypical breeding habitat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 2, p. 317-318. 1992.
- BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435. 2007.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, M., LINA, L., VILLA-LOBOS, F.J., PENA, G., NUÑEZ-VALDEZ, M.E., SOBERÓN, M., QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972. 1998.

- BRICEÑO-IRAGORRY, L. Nota sobre simulídeos Del Valle de Caracas. **Boletín del Laboratorio de la Clínica Luis Razetti**, v. 3, n. 10, p. 181-186. 1943.
- BULLA JR., L.A. Bacteria as Insect Pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 23, p. 163-190. 1975.
- BURTON, G.J., MCRAE, T.M. Observations on Trichopteran Predators of Aquatic Stages of *Simulium damnosum* and other *Simulium* species in Ghana. **Journal of Medical Entomology**, v. 9, n. 4, p. 289-294. 1972.
- CAMPOS-GAONA, J., ANDRADE, C.F.S. Aspectos da Entomologia Médica e Veterinária dos borrachudos (Diptera, Simuliidae) - Biologia, Importância e controle. **Revista Lecta**, v. 17, n. 1, p. 51-65. 1999.
- CAMPOS, J., ANDRADE C.F.S.. Resistência a inseticidas em populações de *Simulium* (Diptera, Simuliidae). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 661-671. 2002
- CAMPOS, J., ANDRADE, C.F.S., RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal comparisons among and within population of *Simulium (Chrirostilbia) pertinax* (Diptera: Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 365-369. 2001.
- CAVADOS, C.F.G., FONSECA, R.N., CHAVES, J.Q., ARAUJO-COUTINHO, C.J.P.C., RABINOVITCH, L. A new black fly isolate of *Bacillus thuringiensis* autoagglutinating strain highly toxic to *Simulium pertinax* (Kollar) (Diptera, Simuliidae) larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 795-797. 2005.
- CAVADOS, C.F.G., MAJEROWICZ, S., CHAVES, J.Q., ARAUJO-COUTINHO, C.J.P.C., RABINOVITCH, L. Histopathological and ultrastructural effects of δ -

- endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 493-498. 2004.
- CAVADOS, C.F., FONSECA, R.N., CHAVES, J.Q., RABINOVITCH, L., ARAÚJO-COUTINHO, C.J. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p.1017. 2001.
- CHEN, J., AIMANOVA, K.G., FERNÁNDEZ, L.E., BRAVO, A., SOBERON, M., GILL, S.S. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biochemical Journal**, v. 424, n. 2, p. 191-200. 2009.
- CONN, J.E., BOLLBACK, J.P., ONYABE, D.Y., ROBINSON, T.N., WILKERSON, R.C., PÓVOAS, M.M. Isolation of polymorphic microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 223-225. 2001.
- COSCARÓN, S. Notas sobre simulidos Neotropicales XI. Sobre El subgénero *Simulium* (*Chirostilbia*) Enderlein, con la descripción de dos especies nuevas del S. E. Del Brasil (Díptera, Insecta). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 40, n. 1/4, p. 157-164. 1981.
- COSCARÓN, S. *El género Simulium Latreille en la región Neotropical: Análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae: Diptera)*. Museo Paraense Emilio Goeldi: Coleção Emílio Snethlage. 1987. 111p.

- COSCARÓN, S. *Fauna de agua dulce de la República Argentina. Insecta, Diptera, Simuliidae*. Buenos Aires: FECIC. 1991. 304p.
- COSCARÓN, S., ARIAS, C.L.C. *Neotropical Simuliidae (Diptera:Insecta): Aquatic Biodiversity in Latin America (ABLA)*. Pensoft: Sofia-Moscow. 2007. v. 3, 685p.
- CRICKMORE, N., BONE, E. J., WILLIAMS, J. A., ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 249-254. 1995.
- CROSSKEY, R.W. *The natural history of blackflies*. John Wiley & Sons: Chichester. 1990. 711p.
- CUNHA, M.C.I. Simulídeos (Borrachudos). In: Marcondes, C.B. (Ed). *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 31-47.
- CURIE, D.C., ADLER, P.H.. Global diversity of black flies (Diptera: Simuliidae) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 469-475. 2008
- DAVIES, J.B., BASÁÑEZ, M.G., FRONTADO, H., VILLAMIZAR, N., RAYBOULD, J.N., PETRALANDA, I. Phosphoglucomutase and trehalase isoenzymes of Venezuelan *Simulium* vectors of *Onchocerca volvulus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 321-331. 2000.
- DAY, J.C., Goodall, T.I., Post, R.J. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular Taxonomy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 55-61. 2008.
- DE BARJAC, H., FRACHON, E.. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, v. 35, n. 2, p. 233-240. 1990

- DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 59-76. 1992.
- DUEÑAS, J.C.R., PANZETTA-DUTARI, G.M., BLANCO, A., GARDENAL, C.N. Restriction Fragment-Length Polymorphism of the mtDNA A+T- Rich Region as a Genetic Marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 3, p. 352-359. 2002.
- DUMAS, V., HERDER, S., BEBBA, A., CADOUX- BARNABÉ, C., BELLEC, C., CUNY, G. Polimorphic microsatélites in *Simulium damnosum* s.l. and their use for differentiating two savannah populations: implications for epidemiological studies. **Genome**, v. 41, p. 154-161. 1998.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50. 2006.
- FERNÁNDEZ, L.E., GÓMEZ, I., PACHECO, S., ARENAS, I., GILL, S.S., BRAVO, A., Soberón, M. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Peptides**, v. 29, n. 2, p. 324-329. 2008.
- FERNÁNDEZ, L.E., MARTINEZ-ANAYA, C., LIRA, E., CHEN, J., EVANS, A., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, S., LANZ-MENDOZA, H., BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. **Biochemistry**, v. 48, n. 37, p. 8899-8907. 2009.
- FERNÁNDEZ-LUNA, M.T., TABASHNIK, B.E., LANZ-MENDOZA, H., BRAVO, A., SOBERÓN, M., MIRANDA-RÍOS, J. Single concentration tests show synergism

among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 3, p. 231-233. 2010.

FIGUEIRÓ, R., GIL-AZEVEDO, L.H. The Role of Neotropical Blackflies (Diptera: Simuliidae) as vectors of the Onchocerciasis: a short overview of the Ecology behind the disease. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, 745-755. 2010.

FINNEY, D. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 50-80. 1971.

FLOOK, P.K., POST, R.J. Molecular population studies of *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) using a novel interspersed repetitive DNA marker. **Heredity**, v. 79, p. 531-540. 1997.

FOLMER, O., BLACK, M, HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 294-299. 1994.

FREDEEN, F.J.H. Bacteria as food for blackfly larvae (Diptera: Simuliidae) in laboratory cultures and in natural streams. **Canadian Journal of Zoology**, v. 42, p. 527-548. 1963.

GARMS, R., WALSH, J.F., DAVIES, J.B. Studies on the reinvasion of the Onchocerciasis control programme in the Volta river basin by *Simulium damnosum* s.l. with emphasis on the south-western areas. **Tropenmed Parasitol**, v. 30, p. 345-362. 1979.

- GIL- AZEVEDO, L.H., FERREIRA Jr., N., MAIA-HERZOG, M. Chave de identificação de pupas de Simuliidae (Diptera) do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 742-752. 2005.
- GIL-AZEVEDO, L.H., SANTOS-MALLET, J.R., MAIA-HERZOG, M. Caracteres Diagnósticos de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 433-437. 2004.
- HAMADA, N., PEPINELLI, M., MATTOS, A.A., LUZ, S.L.B. A new black fly species from Brazil, closely related to *Simulium guianense* Wise (Diptera, Simuliidae), revealed by morphological and DNA barcoding. **Zootaxa**, v. 2428, p. 22-36. 2010.
- HAMADA, N., PEREIRA, E.S., ADLER, P.H. Polytene chromosomes of *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhani* (Diptera: Simuliidae) from Central Amazonia, Brazil. **Zootaxa**, v. 1676, p. 57-62. 2008
- HAMADA, N., PEPINELLI, M., MARDINI, L.B.L.F. Simulídeos: Programa Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil: chave para identificação de pupas da família Simuliidae (Díptera: Nematocera) para apoio as equipes regionais e municipais na determinação das espécies. Porto Alegre: CEVS. 2006.
- HAMADA, N., ALE- ROCHA, R., LUZ, S.L.B. Description of *Simulium damascenoi* (Diptera: Simuliidae) male and the Black flies species from the state of Amapá, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 353-360. 2003.
- HAMADA, N., MCCREDIE, J.W., ADLER, P.H. Species richness and special distribution of blackflies (Diptera: Simuliidae) in streams of Central Amazonia, Brazil. **Freshwater Biology**, v. 47, p. 31-40. 2002.

- HAMADA, N., ADLER, P. Bionomia e chave para imaturos e adultos de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) na Amazônia Central, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 1, p. 109-132. 2001.
- HAMADA, N., FOUQUE, F. Black flies (Diptera: Simuliidae) of French Guiana: Cytotaxonomy and a Preliminary list of species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 955-959. 2001.
- HAMADA, N., GRILLET, M.E.. Black flies (Diptera: Simuliidae) of the Gran Savana (Venezuela) and Pacaraima region (Brazil): Distributional data and identification keys for larvae and pupae. **Entomotropica**, v. 16, n. 1, p. 29-49. 2001
- HAMADA, N, MCCREADIE, J.W. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. **Hydrobiologia**, v. 397, p. 71-78. 1999.
- HAMADA, N. Association between *Hemedromia* sp. (Diptera: Empididae) and *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) in Central Amazonia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 169-170. 1993.
- HERNÁNDEZ, L.M., HAMADA, N., PEPINELLI, M., KIKUCHI, R.M. Description of the larva of *Simulium lobatoi* Luna Dias, Hernández, MaiaHerzog & Shelley (Diptera: Simuliidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1732, p. 65-68. 2008.
- HERNÁNDEZ, L.M., SHELLEY, A.J., LUNA DIAS, A.P.A.D., MAIA-HERZOG, M. New specific synonymies and taxonomic notes on Neotropical black flies (Diptera: Simuliidae) belonging to the subgenera *Chirostilbia* Enderlein, *Hemicnetha* Enderlein, *Inaequalium* Coscarón & Wygodzinsky, *Psaroniocompsa* Enderlein and *Psilopelmia* Enderlein. **Zootaxa**, v. 1506, p. 1-80. 2007.

- HERNÁNDEZ, L.M., Shelley, A.J., Luna Dias, A.P.A.D., Maia-Herzog, M. Review of the Neotropical blackfly subgenus *Inaequalium* Coscarón & Wygodzinsky (Diptera: Simuliidae) based on adults and pupal morphology. **Zootaxa**, v. 1649, p. 1-96. 2007.
- HIGAZI, T.B., BOAKYE, D.A., WILSON, M.D., MAHMOUD, B.M., BARAKA, O.Z., MUKHTAR, M.M., UNNASCH, T.R. Cytotaxonomic and molecular analysis of *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* sensu lato (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 547-553. 2000.
- HOY, M.A. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. San Diego, California: Academic Press, 1994. 546p.
- HUGHES, P.A., STEVENS, M.M., PARK, H.W., FEDERICI, B.A., DENNIS, E.S., AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 1, p. 34-39. 2005.
- IBARRA, J., RINCÓN, C., ORDÚZ, S., NORIEGA, D., BENINTENDE, G., MONNERAT, R., REGIS, L., OLIVEIRA, C.M.F., LANZ, H., RODRIGUEZ, M.H., SÁNCHEZ, J., PEÑA, G., BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5269-5274. 2003.
- KAWALEK, M.D., BENJAMIN, S., LEE, H.L., GILL, S.S. Isolation and Identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2965-2969. 1995.

- KRUEGER, A., HENNINGS, I.C. Molecular phylogenetics of blackflies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, p. 83-90. 2006.
- LECADET, M.M., CHAUFaux, J., RIBIER, J.E., LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849. 1991.
- LOXDALE, H.D., LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, v. 88, p. 577-600. 1998.
- LUNA-DIAS, A.P.A., HERNANDÉZ, L.M., MAIA-HERZOG, M., SHELLEY, A.J. *Simulium lobatoi*, new species of blackfly (Diptera: Simuliidae) from the states of Mato Grosso and Goiás, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 37-43. 2004.
- MAIA-HERZOG, M., SHELLEY, A.J., LUNA-DIAS, A.P.A. *Simulium hirtipupa* Lutz, 1910 (Diptera: Simuliidae): descrição dos adultos e larva e redescricao da pupa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 4, p. 483-490. 1985.
- MARCONDES, C.B. *Entomologia: Médico e Veterinário*. São Paulo: Atheneu. 2001. 432p.
- MARDINI L.B., TORRES M.A., SILVEIRA G.L., AM, Atz. *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 211-214. 2000.

- MARTIN, P.A.W., TRAVERS, R.S. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2437-2442. 1989.
- MARTINS, E., PRAÇA, L., DUMAS, V., SILVA WERNECK, J.O., SONE, E., WAGA, I., BERRY, C., MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil. **Biological Control**, v. 40, p. 65-68. 2007.
- MATTOS, A.A. *Caracterização molecular e citológica de diferentes populações geográficas de Simulium guianense Wise s.l., no Brasil*. Manaus, 2007. 109p. Dissertação de Mestrado-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2007
- MEDEIROS, J.F., PY-DANIEL, V., IZZO, T.J. The influence of climatic parameters in the haematophagic daily activity of *Cerqueirellum argentiscutum* (Shelley & Luna Dias) (Diptera: Simuliidae) in Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 563-568. 2006.
- MOLLOY, D.P. Progress in the Biological Control of Black flies with *Bacillus thuringiensis israelensis*, with emphasis on temperate climates. In: DE BARJAC, H., SUTHERLAND, D.J. (Eds). *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies: Biochemistry, Genetics & Applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick, The States of America. 1990. p. 161-186.
- MONNERAT, R.G., DIAS, D.G.S., SILVA, S.F., MARTINS, E., BERRY, C., FALCÃO, R., GOMES, A.C.M., PRAÇA, L., SOARES, C.M.S. Screening of

- Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 103-106. 2005.
- MONNERAT, R.G., PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C., MONNERAT, R.G. (Eds). *Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas*. Embrapa cerrados. Planaltina- DF. 2006. p. 121-155.
- MONNERAT, R.G., BATISTA, A.C., MEDEIROS, P., MARTINS, E., MELATTI, V.M., PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295. 2007.
- MORALES- HOJAS, R., POST, R.J., CHEKE, R.A., WILSON M.D. Assessment of rDNA IGS as a molecular marker in the *Simulium damnosum* complex. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p. 395-403. 2002.
- MORETTI, P.E. Microbiota bacteriana animal. (http://www.Fam.br/microrganismos/microbac_microbiota_animal.htm). Acesso : 23/08/2006. 2003.
- MYBURGH, E., NEVILL, E.M. Review of blackfly (Diptera: Simuliidae) control in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 4, p. 307-316. 2003.
- MPAGI, J., KATAMANYWA, J., GARMS, R. Dispersal range of *Simulium neavei* in an onchocerciasis focus of western Uganda. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 95-99. 2000.
- NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu. 1991. p. 379-382.

- OESTERGAARD, J., EHLERS, R-U., MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C., REAL, M.D. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3623-3629. 2007.
- ORDUZ, S., ROJAS, W., Correa, M.M., MONTOYA, A.E., DE BARJAC, H. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colômbia toxic to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 99-103. 1991.
- PAMUAL, P., KUVANGKADILOK, C., BAIMAI, V., WALTON, C. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3989-4001. 2005.
- PEPINELLI M., HAMADA, N., TRIVINHO-STRIXINO S. New records of Simuliidae (Diptera, Nematocera) in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, p. 653-655. 2003.
- PEPINELLI, M., TRIVINHO -STRIXINO, S., HAMADA, N. Imaturos de Simuliidae (Diptera, Nematocera) e caracterização de seus criadouros no Parque Estadual Intervales. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, p. 527-530. 2005.
- PÉREZ, C., FERNANDEZ, L.E., SUN, J., FOLCH, J.L., GILL, S.S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **PNAS**, v. 102, n. 51, p. 18303-18308. 2005.
- PÉREZ, C., MUÑOZ-GARAY, C., PORTUGAL, L.C., SÁNCHEZ, J., GILL, S.S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances

- activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2931-2937. 2007.
- PETRY, F, LOZOVEI, A.L., FERRAZ, M.E., SANTOS NETO, L.G. dos. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 127-132. 2004.
- PHAYUHASENA, S., COLGAN, D.J., KUVANGKADILOK, C., PRAMUAL, P., BAIMAI, V. Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. **Genetica**, v. 138, n. 6, p. 633-648. 2010.
- PIGOTT, C.R., ELLAR, D.J.. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 71, n. 2, p. 1092-2172. 2007
- POST, R.J., FLOOK, P.K. DNA probes for the identification of members of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 379-384. 1992.
- PRUESS, K.P., ADAMS, B.J., PARSONS, T.J., ZHU, X., POWERS, T.O. Utility of the mitochondrial Cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among blackflies (Diptera: Simuliidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 16, n. 2, p. 286-295. 2000.
- PY-DANIEL, V. Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) no Brasil. V- sobre o *Simulium* (*Chirostilbia*) *friedlanderi* sp. n e revisão do *Simulium* (*C.*) *laneportoi* Vargas, 1941. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 331-341. 1987.

- PY-DANIEL, V, PASSOS, M.C.V., MEDEIROS, J.F. ANDREAZZE, R. Dinâmica da atividade hematofágica (Preferências horárias- Tópicas) e estado reprodutivo das fêmeas de *Thyrsopelma guianense* (Wise, 1911) (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae), principal vetor da filaria *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) no Brasil. **Entomologia y vectores**, v. 6, n. 4, p. 339-360. 1999.
- PY-DANIEL, V., ANDREAZZE, R., MEDEIROS, J.F. Projeto Piloto Xitei/Xidea, (Roraima). I – índices epidemiológicos da transmissão de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) para os anos de 1995-1996. **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 4, p. 389-444. 2000.
- PY-DANIEL, V., DARWICH, S.M., MARDINI, L.B., Strieder, M.N., Coscarón, S. Simuliidae (Diptera, Culicomorpha) no Brasil-XII sobre o gênero *Thyrsopelma* Enderlein, 1934: descrição de *T. jeteri* Sp.N., considerações sobre o cibário e chave para as pupas. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 4, p. 463-472. 2005.
- RABINOVITCH, L., SILVA, C.M.B., ALVES, R.S.A. Controle Biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds). *Controle Biológico*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente: São Paulo. 2000. v. 2, p. 17-90.
- REGIS, L., DA SILVA, S.B., MELO-SANTOS, M.A.V. The use of bacterial larvicides in mosquito and blackflies control programmes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 207-210. 2000.
- REGIS, L., SILVA-FILHA, M.H., NIELSEN-LEROUX, C., CHARLES, J.F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 377-380. 2001.

- RESTREPO, N., GUTIERREZ, D., PATINO, M.M., THIÉRY, I., DELÉCLUSE, A., ORDUZ, S. Cloning, expression and toxicity of a mosquitocidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 257-262. 1997.
- REY, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabarra. 1973. 681p.
- RIVERA, J., CURRIE, D.C. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 224-236. 2009.
- RUAS NETO, A.L., MATIAS, R.S. Controle integrado do *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832. A competição interespecífica como possível método de controle natural. **Boletim da Saúde**, v. 12, p. 21-24. 1985.
- RUAS NETO, A.L., CALDAS, E.P., SOUZA, M.A.T. Programa estadual de controle de borrachudos: controle dos simulídeos no Rio Grande do sul, aspectos gerais. **Boletim da Saúde**, v. 11, n. 2, p. 4-7. 1984.
- SABROSKI, CW. Mounting insects from alcohol. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 12, p. 349. 1966.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 417p.
- SHELLEY, A.J., PY-DANIEL, V. Simuliidae of Goiás state and Federal District (Brasília): 1. A Description of *Simulium* (*Chirostilbia*) *dekeyseri*, new species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 23-32. 1981.
- SHELLEY, A.J., Biosystematics and distribution of Simuliid vectors of human onchocerciasis in south America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 399-403. 1988.

- SHELLEY, A.J., LUNA DIAS, A.P.A., MAIA-HERZOG, M., LOWRY, C.A., GARRITANO, P.R., PENN, M., CAMARGO, M. *Simulium cuasiexiguum*, a new blackfly species (Diptera: Simuliidae) from the Minaçu Area in the State of Goiás, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 483-496. 2001.
- SHELLEY, A.J., HERNÁNDEZ, L.M., DAVIES, J.B. Blackflies (Diptera: Simuliidae) of southern Guyana with keys for the identification of adults and pupae- a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 443-470. 2004.
- SILVA-WERNECK J.O., MONNERAT R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica nº10- Embrapa .4p. 2001.
- SOUZA, M.A.T. Atendimento médico por picadas de Simulídeos. **Boletim da Saúde**, v. 11, n. 2, p. 8-11. 1984.
- STOOPS, C.A., ADLER, P.H. Feeding behavior of larval black flies (Diptera: Simuliidae) with and without exposure to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 79-83. 2006.
- TABASHNIK, B.E. Evaluation of Synergism among *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3343-3346. 1992.
- TANG, J., TOÈ, L., BACK, C., UNNASCH, T.R. Intra-specific Heterogeneity of the rDNA Internal Transcribed Spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) Complex. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 1, p. 244-252. 1996.
- TANG, J., TOÈ, L., BACK, C., ZIMMERMAN, P.A., PRUESS, K., UNNASCH, T.R. The *Simulium damnosum* species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. **Insect Molecular Biology**, v. 4, n. 2, p. 79-88. 1995.

- THIÉRY, I., FOUQUE, F., GAVEN, B., LAGNEAU, C. Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 3, p. 371-9. 1999.
- THOMPSON, J.D., GIPSON, T.J., PLEWMAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, G.D. The clustal_x Windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882. 1997.
- WHITELEY, H.R., SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576. 1986.
- WILSON, M.D., POST, R.J. Integration of Morphometric, Cytogenetic and Molecular Techniques: A Case Study of *Simulium damnosum*. In: HAWKSWORTH, D.L. (Ed.). *The identification and Characterization of Pest Organisms*. Wallingford: CAB International. 1994. p. 215-224.
- WIRTH, M.C., DELECLUSE, A., WALTON, W.E. Laboratory selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* or a component toxin, Cry11B, in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 435-441. 2004.
- WIRTH, M.C., GEORGHIOU, G.P., FEDERICI, B.A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10536-10540. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors. WHO Mimeograph Document 87.3. 1987.

WU, D., JOHNSON, J.J., FEDERICI, B.A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 965-972. 1994.

Anexo 1- Datas de coleta, lugares amostrados, coordenadas, coletores (col.) e espécies de *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae) coletados em Goiás e Distrito Federal, Brasil. Coletores: EP, Eleny Pereira; LS, Luis Siqueira; FR, Felipe Ramos; MX, Murilo Xavier; NH, Neusa Hamada. JF, Jerfeson Oliveira da Silva; MP, Mateus Pepinelli; RK, Regina Kikuchi; LF, Livia Fusari; AF, Adnilton Fonseca. Espécies: 1: *S. dekeyseri*; 2: *S. pertinax*; 3: *S. serranum*; 4: *S. spinibranchium*; 5: *S. subpallidum*; 6: *S. dinellii*; 7: *S. ochraceum*; 8: *S. lobatoi*; 9: *S. rubrithorax*; 10: *S. botulibranchium*; 11: *S. inaequale*; 12: *S. rappaie*; 13: *S. subnigrum*; 14: *S. exiguum*; 15: *S. anamariae*; 16: *S. jujuyense*; 17: *S. bipunctatum*; 18: *S. lutzianum*; 19: *S. perflavum*; 20: *S. rorotaense*; 21: *S. hirtipupa*; 22: *S. nigrimanum*; dnc: dados não coletados.

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
1 18/x/2007 20/x/2007 23/xi/2009	DF/cidade satélite Ceilândia, córrego das Pedras	15° 47' 12,3"S 48° 08' 23,88"O	EP; LS	2, 4, 5, 10, 11, 13, 16
2 27/ix/2007 12/xii/2008	DF/cidade satélite Riacho Fundo, Embrapa, Fazenda Sucupira	15° 54' 20,2"S 48° 00' 40,0"O	EP; FR	2, 11, 13, 15, 16, 19
3 04/x/2007 15/x/2009	DF/cidade satélite Gama, córrego Ponte Alta	16° 00' 37,5"S 48° 07' 04,0"O	EP;LS	5, 11
4 04/x/2007 30/xi/2009	DF/cidade satélite São Sebastião, setor de Chácaras, Morro da cruz	15° 55' 25,2"S 47°46' 40,06"O	EP;LS	11, 13
5 06/x/2007 14/x/2009	GO-430/ Planaltina de Goiás divisa com o Distrito Federal, Ponte sob o Rio Maranhão	15° 30' 18,5"S 47° 37' 06,4"O	EP;LS	2,15, 16, 18, 22

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
6 06/x/2007 14/x/2009	GO/ Planaltina de Goiás, RioCocal (estrada de terra)	15° 16' 0,24"S 47° 41' 25,9"O	EP;LS	5, 14, 16, 18, 22
7 06/x/2007 01/x/2008 14/x/2009	GO-230/Água Fria de Goiás, povoado de Mato Seco, rio Mangabeira	14° 59' 6,96"S 47° 54' 10,6"O	EP;LS	3, 5, 13, 15, 18, 22
8 06/x/2007 14/x/2009	GO/Água Fria de Goiás, fazenda Saco, rio Cabano	15° 01' 43,3"S 47° 52' 25,0"O	EP;LS	4, 5, 9, 13
9 09/x/2007	GO-116/Formosa de Goiás, estrada de Formosa	15° 28' 49,0"S 47° 20' 37,3"O	EP;LS	4, 11, 12, 16, 18
10 09/x/2007 16/x/2009	GO-116/Formosa, entrando 4 Kms no ramal do restaurante "São João Cara Limpa", rio Paranã	15° 17' 48,4"S 47° 23' 36,1"O	EP;LS; MX	14
11 09/x/2007	GO-116/Formosa, cachoeira do Itiquira	15° 21' 50,5"S 47° 27' 4,86"O	EP;LS	2, 5, 8, 12, 13, 22
12 09/x/2007 19/x/2009	DF- 205/cidade satélite Sobradinho II, próximo à Fercal, sítio Renascer, em frente a Chácara "Boca da Ponte"	15° 34' 23,22"S 47° 56' 26,9"O	EP;LS	11, 13, 15, 16, 17
13 09/x/2007 19/x/2009	DF-205/cidade satélite Sobradinho II, Povoado Ribeirão, sentido Fercal, córrego Pedreira	15° 30' 34,3"S 47° 57' 38,1"O	EP;LS	5,16, 18, 22
14 12/x/2007	BR-080/cidade satélite Brazlândia, próximo a polícia Rodoviário Militar	15° 37' 19,08"S 48° 11' 58,5"O	EP;LS	11, 13, 16, 19

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
15 12/x/2007	BR-080, Km 24/Próximo ao Clube Mediterrâneo, rio do Sal	15° 35' 29,2"S 48° 11' 49,6"O	EP;LS	13
16 12/x/2007 16/x/2009	BR-080/Padre Bernardo, Goiás, rio Taboquinha	15° 21' 3,18"S 48° 13' 54,0"O	EP;LS	1, 2, 8
17 12/x/2007	GO-230/entre Padre Bernado e Mimoso de Goiás, rio dos Meninos	15° 06' 10,8"S 48° 14' 20,1"O	EP;LS	3
18 12/x/2007 21/x/2008 19/x/2009	DF-205/Planaltina de Goiás, rio da Palma	15° 28' 52,3"S 48° 02' 59,4"O	EP;LS	5, 16, 22,
19 17/x/2007	DF/Mansões do Lago Norte, Brasília, Córrego do Urubu	15° 45' 0,5"S 47° 48' 55,6"O	EP;LS	1, 11, 13, 15, 16
20 17/x/2007 21/x/2009	DF-250/Cidade satélite Planaltina, Rio São Bartolomeu	15° 44' 2,7"S 47° 40' 32,4"O	EP;LS	5, 16
21 17/x/2007 23/x/2009	DF 130, Km 6/ cidade satélite Planaltina, próximo ao Vale do Amanhecer, córrego Santos Dumont	15° 41' 4,26"S 47° 39' 8,34"O	EP;LS	13, 16
22 01/x/2008 14/x/2009	GO/Planaltina de Goiás, estrada de terra indo para Biboca, rio Lambaris	15° 25' 34,8"S 47° 38' 23,22"O	EP	2, 5, 14, 16, 18,
23 02/x/2008 19/x/2009	BR-180/Cidade satélite Planaltina do DF, córrego do DVO	15° 37' 20,16"S 47° 42' 43,56"O	EP	1, 2, 4, 9, 10, 11, 13, 18

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
24 02/x/2008 21/x/2009	DF-130/Fazenda Velha, córrego da Rajadinha	15° 44'28,14"S 47° 39'52,02"O	EP	2, 5, 11, 13, 16, 18
25 03/x/2008 15/x/2009	DF-180/Serra Jibóia Fazenda Jibóia, rio Descoberto	15° 52'4,98"S 48° 16'41,4"O	EP	5, 16
26 03/x/2008	DF-190/cidade satélite Samambaia, divisa com Santo Antônio do Descoberto, córrego Samambaia	15° 56'32,58"S 48° 14'47,16"O	EP	5, 11
27 06/x/2008 16/x/2009	GO-118/Água Fria de Goiás, córrego Libóreo	14° 56'54,3"S 47° 35'56,22"O	EP;MX	13, 16
28 06/x/2008 16/x/2009	GO-118, Km 93/Água Fria de Goiás, estrada saindo de São Gabriel indo para São João da Aliança, córrego Roncador	14° 43'52,08"S 47° 32'38,64"O	EP;MX	2, 5, 13, 16
29 06/x/2008 16/x/2009	GO-118, km 73/Água Fria de Goiás, ribeirão das Branca I	14° 53'48,9"S 47° 35'1,62"O	EP;MX	2
30 07/x/2008	DF-205/Distrito Federal, córrego Vereda Grande	15° 31'9,66"S 47° 34'8,88"O	EP	13
31 09/x/2008 19/x/2009	DF-230/cidade satélite Planaltina, córrego Piriripau	15° 36'39" 47° 32'36,54"	EP	16, 18
32 16/x/2008 04/xi/2009	DF-120/cidade satélite Paranoá, córrego Estanislau	15° 49'43,74"S 47° 34'0,42"O	EP	2, 5, 16, 18

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
33 20/x/2008 25/xi/2009	BR-020/Asa Norte indo para a cidade satélite Sobradinho, próximo a Embrapa Cenargen, córrego Bananal	15° 43'42,12"S 47° 54'35,52"O	EP; FR	16
34 20/x/2008	BR-020/Asa Norte indo para a cidade satélite Sobradinho, próximo a Embrapa Cenargen, córrego do Torto	15° 42'21,48"S 47° 53'29,34"O	EP; FR	2, 5, 11, 16, 19
35 12/x/2007 21/x/2008 19/x/2009	DF-205/cidade satélite Sobradinho I, DF, rio da Palma	15° 28' 52,3"S 48° 02' 59,4"O	EP	5, 9, 16, 22
36 23/x/2008 23/x/2009	DF-140/Entre as cidades satélites Santa Maria e São Sebastião, próximo Escola Classe Jataí, córrego Santana	16° 00'52,02"S 47° 48'5,58"O	EP	13, 16
37 23/x/2008 23/x/2009	DF-125/ cidade satélite Paranoá, DF, Vilarajo Capão Seco, córrego Lamarão,	15° 57'10,98"S 47° 33'3,42"O	EP	11, 13, 16, 19
38 24/x/2008	DF/cidade satélite Recanto das Emas, Embrapa Hortaliças, área nova	15° 55'15,12"S 48° 09'27,06"O	EP; FR	13, 15
39 24/x/2008	DF-290/estrada que liga o Engenho das Lajes a cidade satélite Gama, córrego das Lajes	16° 01'44,46"S 48° 14'28,44"O	EP	5
40 27/x/2008 04/xi/2009	DF-120/ cidade satélite Paranoá, córrego Cariru	15° 54'4,92"S 47° 31'33"O	EP	18
41 28/x/2008 26/x/2009	DF-430/cidade satélite de Brazilândia, DF, córrego Rodeador	15° 40'22,08"S 48° 06'24,24"O	EP	16

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
42 28/x/2008 26/x/2009	DF/cidade satélite Brazilândia, DF, estabelecimento Brás gás, suspiro do Lago Veredinha	15° 41' 11,52''S 48° 12' 1,32''	EP; LS; AS	4, 5, 7
43 9/i/2003	GO/Pirenópolis, ribeirão Santa Maria, cachoeira Santa Maria	15° 48' 29,5''S 48° 55' 10,0''O	NH	5, 8
44 9/i/2003	GO/Pirenópolis, córrego Lajeado	15° 48' 41,0''S 48° 55' 6,8''O	NH	1, 2, 5, 11
45 9/i/2003	GO/Pirenópolis, córrego do Lázaro	15° 47' 52,7''S 48° 55' 32,2''O	NH	1, 2, 5, 13, 16, 19
46 9/i/2003	BR-070/Pirenópolis, serra dos Pirineus, córrego da Santa	15° 47' 16,7''S 48° 52' 16,8''O	NH	13, 20
47 11/i/2003	GO/Colinas do Sul, Goiás	14° 13' 55,7''S 47° 55' 31,3''O	NH	1, 5, 6, 13, 23
48 11/i/2003	GO/Pirenópolis, serra dos Pirineus, morro Cabeludo, pequeno tributário do córrego Cabeludo (abaixo- passa pelas pedras)	15° 48' 26,1''S 48° 49' 59,2''O	NH	1, 4, 13
49 11/i/2003	GO/Pirenópolis, Goiás, morro Cabeludo, córrego Capitão do Mato	15° 48' 41,9''S 48° 51' 22,6''O	NH	1, 13
50 11/i/2003	GO/Pirenópolis, Goiás, morro Cabeludo, córrego da Cachoeira do Macaco	15° 48' 54,1''S 48° 52' 21,6''O	NH	13
51 11/i/2003	GO/Pirenópolis, Goiás, parque dos Pirineus, córrego Barriguda	15° 48' 58,8''S 48° 53' 11,4''O	NH	1, 2, 13, 16
52 14/i/2003	GO/Alto Paraíso, Vale da Lua, córrego Temporário	14° 11' 01,5''S 47° 47' 24,5''O	NH	10

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
53 14/i/2003	GO-241/Colinas do Sul, Goiás, pequeno córrego que corre para baixo das piscinas termais do Eden	14°13'55,7''S 47°55'31,3''O	NH	11, 16, 19
54 14/i/2003	GO- 080/ Colinas do Sul, Morro Vermelho, Sítio do Antônio Carlos dos Santos, à 14 Km de São Jorge	15°48'41,9''S 48°51'22,6''O	NH	19
55 30/vi/2003	GO/Formosa, Bacia do Rio São Francisco, córrego Urucuia	15°34'00,5''S 47°00'59,2''O	NH; JOS	4, 5, 9,13, 18, 22
56 1/vii/2003	GO/ Formosa, Salto do Itiquira	15°22'03,6''S 47°27'15,0''O	NH; JOS	2, 5, 8, 12, 22
57 26/vi/2003	GO/Pirenópolis, córrego Barriguda	15°50'46,1''S 48°55'17,1''O	NH; JO; MP; RK	5, 12, 13, 16
58 24/vi/2003	GO/ Pirenópolis, córrego Lajinha	15°48'41,2''S 48°55'06,7''O	NH; JO; MP; RK	2, 4
59 30/vi/2003	BR-030/Formosa, Goiás, sitio de Jose, rio Pream	15°25'11,1''S 47°00'0,60''O	NH; JOS	9
60 7/viii/2003	GO/Alto Paraíso, rio Saltadeira, cachoeira dos Cristais	14°06'06,5''S 47°29'53,8''O	NH; JOS	1, 13
61 7/vii/2003	GO/Formosa, rio Banderinha	15°28'50,9''S 47°20'32,7''O	NH; JOS	5, 9, 12, 18, 22
62 7/viii/2003	GO/Alto Paraíso, rio das Pedras	13°52'30,7''S 47°15'38,5''O	NH; JOS	1, 2, 4, 5, 8, 12, 16, 21
63 26/vi/2003	BR-414/ Corumbá de Goiás, salto do Corumbá	15°49'37,1''S 48°46'34,8''O	NH; JOS; MP; RK	2, 5, 8, 9, 22,
64 2/vii/2003	GO/Formosa, córrego Jenipapo	15°25'47,8''S 47°22'34,0''O	NH; JOS	4, 5, 13, 16, 18, 22
65 30/vi/2003	GO- 346/Formosa, córrego Bezerra	15°35'06,5''S 47°07'32,2''O	NH; JOS	11, 16, 19

n°/ Data de coleta	Localização	Latitude Longitude	Col.	Espécies coletadas
66 2/vii/2003	GO-116/Formosa, córrego Lavadeira	15°12'13,5''S 47°28'17,8''O	NH; JOS	5, 13
67 2/vii/2003	GO-116/Formosa, córrego Palmeira	15°15'57,9''S 47°27'58,7''O	NH; JOS	2, 5, 18, 22
68 2/vii/2003	GO-116/ Formosa, córrego Muzungo	15°27'04,8''S 47°21'43,3''O	NH; JOS	5, 16, 18
69 6/ii/2007	BR-010/Teresina de Goiás, Poço Encantado-	13°52'24,3''S 47°15'41,2''O	NH; LF; EP; AF	2, 4, 16, 21
70 6/ii/2007	GO/Alto Paraíso de Goiás, Cachoeira Loquinhas (Sr. Onório)	13°52'33,1''S 47°15'40,4''O	NH; LF; EP; AF	13
71 6/iii/2007	GO/ Colinas do Sul de Goiás, Cachoeira da Igrejinha	14°08'56,1''S 48°05'10,2''O	NH; LF; EP; AF	5, 11, 22

Anexo 2. Número das amostras, data, localização e coletores das amostras de solo coletadas na Amazônia brasileira. N: número de amostras, Lat.: Latitude, Lon.: Longitude, Col., Coletores: AS, Aldaléia Santos; EP, Eleny Pereira e SC, Selmo Costa, + *Bacillus*: Amostras positivas para *Bacillus*. *Bti*= Amostras positivas para *Bacillus thuringiensis israelensis*

N	DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	<i>Bacillus</i>	<i>Bti</i>
	6/i/2008- AM 010/ Rio Preto da Eva							
1	Km 18, próximo ao Posto Br/Barreira		02° 57' 49,2"	60° 00' 55,6"	AS	x		
2	Km 21		02° 56' 31,4"	60° 00' 39,7"	AS	x		x
3	Km 24, próximo ao Balneário Recanto da Harmonia		02° 55' 09,1"	59° 59' 45,5"	AS	x		
4	Km 27, próximo Reserva Ducke		02° 54' 21,9"	59° 58' 28,7"	AS			
5	Km 30, próximo a Vivenda D. Carmita		02° 53' 28,7"	59° 57' 33,5"	AS	x		x
6	Km 33, próximo ao balneário Água Fria		02° 52' 14,5"	59° 56' 54,4"	AS	x		
7	Km 36		02° 50' 55,6"	59° 56' 48,1"	AS	x		
8	Km 39		02° 49' 30,7"	59° 56' 26,9"	AS	x		
9	Km 42, próximo a Granja		02° 47' 57,0"	59° 55' 55,2"	AS			
10	Km 45, próximo ao sítio Vovó Raidina		02° 46' 32,3"	59° 55' 23,2"	AS	x		x
11	Km 48, próximo Fazendas		02° 45' 16,4"	59° 54' 52,2"	AS			
12	Km 51, próximo a Taberna 4 Irmãos		02° 44' 38,9"	59° 53' 37,5"	AS			
13	Km 54, próximo ao 12° Comando Militar		02° 44' 06,4"	59° 52' 20,7"	AS	x		
14	Km 57, próximo ao sítio Flor do Campo		02° 43' 28,6"	59° 51' 04,8"	AS	x		x
15	Km 60		02° 44' 11,9"	59° 49' 54,1"	AS	x		x
16	Km 63, próximo ao Hoteleiro Comercial		02° 43' 44,7"	59° 48' 24,1"	AS	x		
17	Km 66		02° 44' 07,7"	59° 46' 58,2"	AS	x		
18	Km 69, próximo ao SPA Tropical		02° 44' 24,0"	59° 45' 32,1"	AS			
19	Km 72		02° 43' 22,2"	59° 44' 46,4"	AS	x		
20	Km 75, próximo ao Hotel Fazenda Cowboy		02° 42' 20,6"	59° 43' 19,0"	AS			
21	Km 78, próximo a Usina Termelétrica		02° 41' 58,7"	59° 42' 28,0"	AS			

DATA - LOCALIZAÇÃO						
6/i/2008- AM 010/ Rio Preto da Eva		LAT.	LON.	COL.	+	Bti
N					Bacillus	
22	Km 81, próximo a Ramala São Benedito	02° 41' 25,3"	59° 40' 53,9"	AS		
23	Km 84, próximo a Vivenda Ábila Madyr	02° 40' 21,8"	59° 39' 39,9"	AS	x	x
24	Km 87	02° 39' 21,3"	59° 38' 43,2"	AS		
25	Km 90	02° 38' 03,7"	59° 37' 34,9"	AS	x	x
26	Km 93, próximo a Fazenda Fâto & Nico	02° 37' 59,3"	59° 66' 00,5"	AS	x	
27	Km 96, próximo ao Sítio Abençoado	02° 38' 50,4"	59° 34' 52,4"	AS	x	
28	Km 99	02° 39' 59,3"	59° 33' 55,1"	AS	x	
29	Km102, próximo à Bodega do Brother	02° 40' 47,7"	59° 32' 47,9"	AS		
30	Km 105, próximo a Escola Mun. Divino Espírito Santo	02° 41' 40,0"	59° 31' 31,6"	AS	x	
31	Km 108, próximo a Fazenda Nova Esperança	02° 43' 10,7"	59° 30' 50,8"	AS	x	
32	Km 111, próximo ao Bar Carioca	02° 44' 06,4"	59° 29' 44,3"	AS	x	
33	Km 114	02° 45' 31,9"	59° 29' 14,3"	AS	x	
34	Km 117, próximo a Chácara Green Ville	02° 47' 02,5"	59° 28' 23,4"	AS	x	x
35	Km 120, próximo ao Sítio Sonho Meu	02° 48' 22,9"	59° 27' 37,5"	AS	x	x
36	Km 123, próximo ao Sítio Bom Futuro	02° 48' 55,8"	59° 26' 33,5"	AS	x	
37	Km 126, próximo a Fazenda Terra Prometida	02° 49' 55,9"	59° 25' 14,8"	AS	x	
38	Km 129, próximo ao Sítio São Vicente	02° 51' 21,7"	59° 24' 36,5"	AS	x	
39	Km 131, próximo a Chácara Eliza	02° 52' 30,6"	59° 23' 44,5"	AS	x	
40	Km 134, próximo ao Ramal do Cafezal	02° 52' 18,9"	059° 22' 7,5"	AS	x	x
15/i/2008 - AM070/Estrada Manaus-Manacapuru						
(Manoel Urbano)						
41	Km 7, Próximo ao posto Equador	03° 10' 10,2"	60° 05' 35,1"	EP; AS	x	x
42	Km 10, Próximo a Olaria	03° 10' 37,6"	60° 06' 49,3"	EP; AS	x	
43	Km 13, próximo a entrada da comunidade Parque dos Barões	03° 11' 24,6"	60° 08' 04,9"	EP; AS	x	x
44	Km 16	03° 11' 52,2"	60° 09' 34,0"	EP; AS	x	x

DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	Bti
N	15/i/2008 - AM070/Estrada Manaus-Manacapuru (Manoel Urbano)					
45	Km 19	03° 11' 58,2"	60° 11' 06,9"	EP; AS	x	x
46	Km 22	03° 11' 18,7"	60° 12' 29,3"	EP; AS	x	x
47	Km 25	03° 10' 11,3"	60° 13' 32,8"	EP; AS		
48	Km 28, Próximo ao restaurante Três irmãos	03° 09' 11,3"	60° 14' 44,8"	EP; AS	x	
49	Km 31	03° 09' 46,8"	60° 16' 06,9"	EP; AS	x	x
50	Km 33	03° 09' 57,9"	60° 17' 25,1"	EP; AS		
51	Km 36	03° 09' 31,7"	60° 18' 55,9"	EP; AS		
52	Km 39	03° 09' 05,3"	60° 20' 34,2"	EP; AS	x	
53	Km 41, próximo ao restaurante Bicho preguiça	03° 08' 11,3"	60° 21' 43,2"	EP; AS	x	
54	Km 44	03° 08' 13,0"	60° 23' 05,4"	EP; AS	x	x
55	Km 47	03° 09' 24,7"	60° 23' 51,5"	EP; AS	x	
56	Km 50	03° 10' 00,1"	60° 25' 06,8"	EP; AS		
57	Km 53	03° 10' 16,3"	60° 26' 05,1"	EP; AS	x	
58	Km 56	03° 11' 46,6"	60° 26' 34,1"	EP; AS	x	
59	Km 59	03° 13' 19,4"	60° 26' 50,3"	EP; AS	x	
60	Km 62	03° 14' 09,8"	60° 28' 00,7"	EP; AS		
61	Km 65	03° 14' 24,4"	60° 29' 34,9"	EP; AS	x	
62	Km 68, próximo ao sítio Vovó Querida	03° 14' 06,7"	60° 32' 00,5"	EP; AS	x	
63	Km 71, próximo ao sítio Kabocãos	03° 13' 27,8"	60° 33' 29,3"	EP; AS	x	
64	Km 74	03° 13' 47,4"	60° 35' 20,5"	EP; AS		
65	Km 77	03° 14' 28,6"	60° 36' 25,0"	EP; AS	x	x
66	Km 81	03° 15' 40,6"	60° 37' 13,4"	AS; EP	x	
67	Km 84 próximo a Entrada a Estrada de Novo Airão	03° 15' 47,0"	60° 38' 58,1"	AS; EP	x	

DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	Bti
N	15/i/2008 - AM 352/Estrada Novo Airão					
68	Km 4, próximo ao sítio Praiano	03° 14' 52,1"	60° 39' 02,8"	AS; EP	x	
69	Km 7, próximo ao restaurante Recanto da Rosa	03° 13' 28,8"	60° 39' 31,1"	AS; EP	x	
70	Km 10	03° 12' 16,8"	60° 40' 54,4"	AS; EP	x	
71	Km 13	03° 11' 32,4"	60° 42' 29,0"	AS; EP	x	
72	Km 16	03° 10' 32,1"	60° 42' 37,4"	AS; EP		
73	Km 20, próximo ao sítio Felicidade e restaurante Três Manias	03° 09' 10,7"	60° 42' 53,5"	AS; EP	x	
74	Km 24, próximo ao refúgio Verde	03° 07' 43,6"	60° 44' 05,6"	AS; EP	x	
75	Km 26, próximo ao sítio "Nosso sítio Papie"	03° 06' 27,0"	60° 44' 57,7"	AS; EP	x	
76	Km 30, próximo ao sítio Santa Rosa	03° 05' 50,4"	60° 46' 19,6"	AS; EP	x	
77	Km 33, próximo a Chácara dos meninos	03° 05' 56,7"	60° 47' 25,8"	AS; EP	x	
78	Km 36, próximo ao sítio da Tia Júlia Benacon	03° 05' 31,9"	60° 48' 48,54"	AS; EP	x	
79	Km 38, próximo ao sítio Jonatas	03° 04' 24,2"	60° 49' 50,8"	AS; EP	x	
80	Km 41, próximo ao sítio Maria Arlete	03° 03' 34,8"	60° 51' 13,6"	AS; EP	x	
81	Km 44, próximo ao sítio Luz do Sol	03° 02' 16,6"	60° 52' 00,3"	AS; EP	x	
82	Km 47	03° 00' 51,7"	60° 52' 45,9"	AS; EP	x	
83	Km 50	02° 59' 25,0"	60° 53' 28,7"	AS; EP	x	
84	Km 52, próximo ao sítio Filhos do Homem	02° 58' 46,6"	60° 54' 51,9"	AS; EP	x	
85	Km 55	02° 58' 08,5"	60° 56' 13,2"	AS; EP	x	x
86	Km 58	02° 57' 18,8"	60° 57' 24,2"	AS; EP		
87	Km 61	02° 55' 49,6"	60° 57' 48,6"	AS; EP	x	
88	Km 64	02° 54' 17,7"	60° 58' 02,8"	AS; EP		
89	Km 67	02° 52' 40,5"	60° 58' 15,5"	AS; EP	x	
90	Km 70, próximo ao sítio Coladinho	02° 51' 13,0"	60° 58' 02,4"	AS; EP	x	x
91	Km 73	02° 50' 30,6"	60° 56' 43,9"	AS; EP	x	x
92	Km 76	02° 49' 26,8"	60° 55' 37,6"	AS; EP	x	x
93	Km 79	02° 47' 51,9"	60° 55' 30,5"	AS; EP	x	

DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	Bti
N	15/i/2008 - AM 352/Estrada Novo Airão				Bacillus	
94	Km 82	02° 46' 35,0"	60° 56' 17,7"	AS; EP	x	
95	Km 85	02° 45' 03,4"	60° 56' 25,5"	AS; EP	x	
96	Km 88	02° 43' 33,4"	60° 56' 22,1"	AS; EP	x	
97	Km 91	02° 42' 10,1"	60° 56' 01,6"	AS; EP	x	
98	Km 94	02° 40' 46,2"	60° 56' 22,3"	AS; EP	x	
99	Km 97	02° 39' 37,9"	60° 56' 50,2"	AS; EP	x	
100	Km 100, na entrada da cidade Novo Airão	02° 38' 08,6"	60° 56' 29,9"	AS; EP	x	
28/i/2008 - Cidade de Manaus						
101	Lagoa do Japiim, ao lado do supermercado Macro	03° 06' 39,1"	59° 58' 51,0"	EP	x	
102	Bairro Colônia Oliveira Machado, estrada do Paredão	03° 08' 52,7"	59° 59' 48,8"	EP	x	x
103	Porto do Bairro da Glória	03° 07' 37,3"	60° 02' 08,4"	EP	x	x
104	Porto do Bairro de São Raimundo	03° 07' 30,4"	60° 02' 31,2"	EP	x	x
105	Bairro de S. Jorge, em frente ao Comando Militar da Amazônia	03° 05' 02,3"	60° 04' 24,6"	EP	x	
106	Bairro da Ponta Negra, condomínio Jardim Europa	03° 04' 23,3"	60° 05' 18,6"	EP	x	
107	Bairro da Ponta Negra, porto Marina Tauá	03° 03' 13,6"	60° 06' 34,5"	EP	x	
108	Estrada do Turismo em frente a boate Celeiro Country	03° 03' 20,3"	60° 04' 54,4"	EP	x	x
109	Estrada do Turismo em frente a boate Touro Louco	03° 01' 43,0"	60° 03' 55,2"	EP	x	
110	Estrada do Tarumã, próximo a cachoeira Grande	03° 01' 00,3"	60° 03' 31,1"	EP	x	x
111	Estrada do Tarumã, próximo ao balneário Escorpião	02° 59' 53,6"	60° 02' 50,0"	EP	x	x
112	Estrada da Vivenda verde, próximo ao café Carimã	02° 58' 57,4"	60° 03' 58,7"	EP	x	x
113	Estrada da Vivenda verde, próximo ao café regional Otoriel	02° 58' 45,0"	60° 05' 03,5"	EP	x	x
114	Estrada da Vivenda verde, próximo ao Recanto das Araras	02° 58' 40,3"	60° 05' 56,9"	EP	x	
115	Estrada da Vivenda verde	02° 57' 57,1"	60° 06' 14,6"	EP	x	x
116	Estrada da Vivenda verde, no final	02° 58' 50,6"	60° 05' 39,7"	EP	x	x
117	Estrada do Tarumã, logo após a cachoeira	02° 58' 57,1"	60° 02' 57,9"	EP	x	x

DATA -LOCALIZAÇÃO						
28/i/2008 - Cidade de Manaus		LAT.	LON.	COL.	+ Bacillus	Bti
N						
118	Bairro Nova Cidade, próximo ao Detran	02° 59' 35,8"	60° 01' 13,9"	EP	x	x
119	Bairro Nova Cidade	03° 00' 03,9"	60° 00' 14,3"	EP	x	
	Bairro Nova Cidade,avenida Margarita, próximo a escola Estadual					
120	Roberto dos Santos Vieira	03° 00' 15,5"	59° 58' 42,4"	EP	x	
121	Bairro Nova Cidade,avenida Margarita	03° 00' 38,2"	59° 57' 38,2"	EP	x	
122	Bairro Nova Cidade, próximo ao Jardim Botânico do INPA	03° 00' 27,3"	59° 56' 25,9"	EP	x	
123	Estrada Grande Circular, próximo ao Nildo Auto peças	03° 01' 09,9"	59° 49' 35,6"	EP		
124	Bairro Jorge Teixeira, próximo ao Distrito de Saúde Leste Disa	03° 02' 35,0"	59° 56' 20"	EP	x	x
125	Entrada do Ramal do Brasileirinho	03° 01' 35,2"	59° 54' 55,2"	EP	x	
126	Ramal do Brasileirinho, próximo ao sítio Passos	03° 01' 20,5"	59° 53' 16,7"	EP	x	
127	Ramal do Brasileirinho, km 9	03° 00' 59,5"	59° 52' 15,9"	EP	x	x
128	Ramal do Brasileirinho, próximo ao sítio Fé em Deus	03° 00' 46,9"	59° 50' 49,1"	EP	x	
129	Ramal do Brasileirinho, abatedouro do Alemão	03° 01' 10,5"	59° 49' 35,4"	EP	x	x
130	Bairro do Aleixo, estrada Alameda Cosme Ferreira	03° 04' 46,3"	59° 56' 04,4"	EP	x	
	Bairro do Aleixo, estrada Alameda Cosme Ferreira, próximo ao número					
131	residencial 11.000	03° 05' 53,0"	59° 55' 16,8"	EP	x	
	Bairro do Aleixo, estrada Alameda Cosme Ferreira, próximo a					
132	Fazendinha Ipê	03° 05' 36,7"	59° 53' 58,6"	EP	x	x
	Bairro Colônia Antônio Aleixo, próximo a praça do Posto de					
133	Abastecimento d'água	03° 05' 03,4"	59° 53' 42,9"	EP	x	x
1/ii/2008 - Cidade de Manaus						
134	Bairro do Aleixo, estrada V-8, próximo ao INPA	03° 05' 25,3"	59° 59' 32,8"	EP	x	x
135	Bairro do Parque Dez, avenida Tancredo Neves, próximo ao Mindú	03° 04' 54,3"	60° 00' 21,2"	EP	x	
136	Bairro de Flores, rua Marquês de Quixamorbin, próximo ao posto Shell	03° 03' 38,7"	59° 59' 48,5"	EP	x	x
137	Bairro de Flores, avenida Timbiras, próximo ao "NossaPousada"	03° 02' 54,5"	59° 58' 57,3"	EP	x	x

N	DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	<i>Bti</i>
	1/ii/2008 - Cidade de Manaus						
138	Bairro Cidade Nova, avenida Marques Teixeira		03° 01' 46,9"	59° 58' 22,6"	EP	x	x
139	Bairro Cidade Nova, avenida Ramo-D, quadra 9		03° 02' 05,4"	59° 57' 41,6"	EP	x	x
140	Bairro Cidade Nova, próximo a igreja Católica São João Batista		03° 02' 38,8"	59° 58' 19,0"	EP	x	
141	Bairro Manoa, rua 3		03° 01' 13,2"	59° 59' 42,0"	EP	x	
142	Bairro Galiléia, avenida principal		03° 00' 42,9"	59° 58' 58,3"	EP	x	x
143	Bairro Cidade Nova, avenida D, conj. Sérgio Pessoa Neto, próximo a Unidade Basica de Saúde		03° 00' 56,2"	59° 58' 02,1"	EP	x	x
144	Bairro Cidade de Deus, avenida Grande Circular		03° 01' 34,2"	59° 56' 02,7"	EP	x	x
145	Estrada do aeroporto, próximo ao terminal logística de cargas		03° 01' 42,2"	60° 02' 24,5"	EP	x	x
146	Estrada Torquato Tapajós, próximo ao Fastline		03° 02' 18,7"	60° 01' 28,5"	EP	x	x
147	Bairro Parque das Laranjeiras, conjunto Shangrilá, rua N, número 7		03° 03' 59,9"	59° 59' 55,2"	EP	x	
148	Bairro Parque Dez, no portal do Japão		03° 04' 12,2"	59° 59' 43,6"	EP	x	x
149	Bairro Coroado, conjunto Petros		03° 04' 29,5"	59° 58' 56,0"	EP	x	x
150	Bairro Distrito Industrial, entrada da estrada Puraquequara		03° 05' 14,6"	59° 55' 30,4"	EP	x	
151	Bairro Distrito Industrail II, estrada do bairro Puraquequara, km 3		03° 04' 10,4"	59° 54' 35,8"	EP	x	x
152	Bairro Distrito Industrail II, estrada do bairro Puraquequara, km 6		03° 03' 14,5"	59° 53' 48,0"	EP	x	x
153	Bairro Distrito Industrail II, estrada do bairro Puraquequara, km 9		03° 03' 47,7"	59° 52' 22,9"	EP	x	
154	Bairro Distrito Industrail II, estrada do bairro Puraquequara, km 12		03° 03' 40,4"	59° 50' 54,7"	EP	x	x
155	Bairro Puraquequara, final do bairro, beira do rio		03° 03' 45,6"	59° 50' 44,6"	EP	x	x
156	Bairro Puraquequara, balneário Remanso do Boto		03° 04' 16,6"	59° 50' 55,6"	EP	x	x
157	Bairro Grande Vitória, rua Londriz, número 1257		03° 03' 37,5"	59° 55' 25,7"	EP	x	x
158	Bairro Santa Inês		03° 02' 49,9"	59° 55' 25,8"	EP	x	x

DATA -LOCALIZAÇÃO						
N	1/ii/2008 - Cidade de Manaus	LAT.	LON.	COL.	+ Bacillus	Bti
159	Bairro Aleixo, próximo ao colégio Agrícola	03° 05' 16,2"	59° 55' 46,4"	EP	x	x
160	Bairro Distrito Industrial, rua Armando Mendes	03° 05' 52,6"	59° 56' 14,1"	EP	x	x
161	Bairro Distrito Industrial, avenida dos Oitis, lote 3100	03° 06' 05,3"	59° 57' 14,3"	EP	x	
162	Bairro do Mauazinho, avenida Solimões, próximo a fábrica Masa de Amazônia	03° 06' 51,1"	59° 56' 54,6"	EP		
163	Bairro do Mauazinho, avenida Solimões	03° 06' 45,6"	59° 56' 15,1"	EP		
164	Bairro do Mauazinho, conjnto Jardim Mauá, rua 27	03° 06' 47,7"	59° 55' 42,3"	EP		
165	Bairro Ceasa, avenida Abiurana, BR- 319	03° 07' 27,8"	59° 56' 54,2"	EP		
166	Bairro Ceasa, avenida Abiurana, BR- 319	03° 07' 57,7"	59° 56' 30,7"	EP		
167	Bairro Distrito Industrial, Vila Buriti, próximo ao Comando Militar da Marinha	03° 08' 19,7"	59° 56' 46,6"	EP		
168	Bairro Distrito Industrial, Rua rio Quixito, próximo ao posto da Remam	03° 08' 10,6"	59° 57' 13,0"	EP		
169	Bairro Distrito Industrial, Rua rio Quixito	03° 08' 27,4"	59° 57' 11,9"	EP		
170	Bairro Distrito Industrial, rua Itaúba	03° 07' 41,6"	59° 58' 04,9"	EP		
171	15/ii/2008 - Cidade de Boa Vista do Ramos à 270 km da cidade de Manaus	02° 58' 10,0"	57° 35' 25,0"	EP		
22/ii/2008 - Estação Experimental de Sivicultura Tropical do INPA, Km 60-BR 174						
172	pastagem	02° 25' 16,2"	59° 52' 29,9"	EP		
173	pastagem	02° 25' 19,4"	59° 52' 32,7"	EP		
174	pastagem	02° 25' 25,8"	59° 52' 38,1"	EP		
175	pastagem	02° 25' 27,0"	59° 52' 39,1"	EP		
176	pastagem	02° 25' 27,6"	59° 52' 40,2"	EP		
177	pastagem	02° 25' 27,5"	59° 52' 22,7"	EP		
178	pastagem	02° 25' 28,5"	59° 52' 41,1"	EP		
179	pastagem	02° 25' 28,5"	59° 52' 41,0"	EP		

DATA -LOCALIZAÇÃO		LAT.	LON.	COL.	+	<i>Bti</i>
N	22/ii/2008 - Estação Experimental de Sivicultura Tropical do INPA, Km 60-BR 174					
180	pastagem	02° 25' 29,8"	59° 52' 42,0"	EP		
181	pastagem	02° 25' 30,9"	59° 52' 43,0"	EP		
182	pastagem	02° 25' 34,3"	59° 52' 45,4"	EP		
183	pastagem	02° 25' 38,3"	59° 52' 49,9"	EP		
184	capoeira	02° 25' 40,5"	59° 53' 14,3"	EP		
185	capoeira	02° 25' 38,9"	59° 53' 09,7"	EP		
186	capoeira	02° 25' 15,5"	59° 53' 05,1"	EP		
187	capoeira	02° 25' 23,0"	59° 53' 15,9"	EP		
188	capoeira	02° 25' 17,6"	59° 53' 05,7"	EP		
189	capoeira	02° 25' 14,9"	59° 53' 10,8"	EP		
190	capoeira	02° 25' 23,1"	59° 53' 22,4"	EP	x	
191	capoeira	02° 25' 17,6"	59° 53' 05,7"	SC	x	
192	capoeira	02° 25' 14,5"	59° 53' 09,5"	SC	x	
193	capoeira	02° 25' 23,5"	59° 53' 09,9"	SC	x	x
194	capoeira	02° 25' 42,0"	59° 53' 10,5"	SC	x	
195	capoeira	02° 25' 45,1"	59° 53' 20,9"	SC	x	
196	capoeira	02° 25' 42,3"	59° 53' 14,6"	SC	x	
197	capoeira	02° 25' 15,1"	59° 53' 19,7"	SC	x	
198	capoeira	02° 25' 41,7"	59° 53' 14,9"	SC	x	x
199	capoeira	02° 25' 41,1"	59° 53' 17,4"	SC	x	
200	capoeira	02° 25' 44,5"	59° 53' 25,1"	SC		