

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DE GERAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E DE RADIAÇÃO
NO DESEMPENHO DE ISOLADOS DE
Bacillus thuringiensis BERLINER**

Cácia Leila Tigre Pereira Viana

Engenheira Agrônoma

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DE GERAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E DE RADIAÇÃO
NO DESEMPENHO DE ISOLADOS DE
Bacillus thuringiensis BERLINER**

Cácia Leila Tigre Pereira Viana

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola).

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Dezembro de 2010

V614i Viana, Cácia Leila Tigre Pereira
Influência de gerações de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) e de radiação no desempenho de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner / Cácia Leila Tigre Pereira Viana. – – Jaboticabal, 2010
IV, 89 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Sergio Antonio De Bortoli

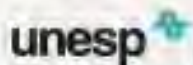
Co-orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Sergio Antonio De Bortoli, Geraldo Andrade de Carvalho, Luis Garrigós Leite, Janete Aparecida Desidério, Ricardo Antônio Polanczyk.

Bibliografia

1. Traça-das-crucíferas. 2. Entomopatógeno-radiação. 3. *Plutella xylostella*-resistência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.786



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFLUÊNCIA DE GERAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E DE RADIAÇÃO NO DESEMPENHO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

AUTORA: CÁCIA LEILA TIGRE PEREIRA VIANA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biol Aplicada A Agrop / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE

Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico / Campinas/SP

Profa. Dra. GERALDO ANDRADE DE CARVALHO

Departamento de Entomologia / Universidade Federal de Lavras

Data da realização: 16 de dezembro de 2010.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CÁCIA LEILA TIGRE PEREIRA VIANA – Nascida em Mucurici - ES, em 08 de setembro de 1980. Técnica Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Alegre - ES, título obtido em 1998. Engenheira Agrônoma pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), título obtido em outubro de 2004. Estágio no Laboratório de Entomologia e iniciação científica com bolsa do CNPq durante a graduação. Mestre em Agronomia / Entomologia Agrícola pela Unesp - Campus de Jaboticabal, com título obtido em fevereiro de 2007. Doutoranda em Agronomia / Entomologia Agrícola pela Unesp - Campus de Jaboticabal, com início em março de 2007 e término em dezembro de 2010.

Confiança.....DEUS....

*Tu que habitas sob a proteção do Altíssimo,
e vive à sombra do Onipotente, dize ao Senhor:*

*“Sois meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus,
eu confio em ti”*

(SL. 90 (91), 1-2)

*...oh minha SENHORA...oh minha MÃE: eu me
ofereço inteiramente a vós e em prova de minha
devoção para convosco ...sempre vos consagro os
meus olhos, os meus ouvidos e minha
boca....porque assim sou vossa incomparável MÃE
guardai-me e defendei-me...como coisa e
propriedade vossa...amém!!!*

....TU ÉS O MEU AMANHECER.....

*Ao Francisco, Dé, Xico.....enfim, meu
esposo, amigo, companheiro, sonhador, brincalhão, sorridente e
as vezes muito SÉRIO....mais é assim que sempre estive ao meu
lado....lhe agradeço por tudo...em especial pela nossa
amizade.....e que saiba esta vitória é NOSSA....VOCÊ SEMPRE
ME OLHOU..às vezes..não entendia minhas idéias... mas aceitava
sem questionar....porque às vezes fui muito oculta e omissa...mais
sempre soube entender...OBRIGADA!!!!*

*Aos meus pais, Lindaura e Enedino
que, mesmo tão distantes, mas perto pelo amor,
sempre me apoiaram e, antes de tudo, souberam me
preparar para o mundo...EU AMO VOCÊS! MUITO!!!!*

DEDICO

os meus irmãos, obrigada pelo incentivo e pelo amor incondicional....

*Aos meus queridos sogros, Sr. Luiz e a Dona Rita,
e à cunhada Marina e ao meu noivo João Rafael, pelo apoio, atenção, incentivo. E
mais do que nunca, atualmente, pelos conselhos....*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela confiança que depositou em mim durante todo este trabalho. Muito obrigado Senhor por ser sempre a minha fortaleza e luz.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, pela confiança em mim depositada para realizar este trabalho. Muito obrigada pela paciência, compreensão, e em especial por tantos ensinamentos, principalmente o amor pela profissão.

Ao amigo e co-orientador, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo apoio, disponibilidade e principalmente pelo fornecimento do material biológico e toda estrutura do LGBBA para realização desta pesquisa. Obrigada pela confiança e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À instituição Unesp - Campus de Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

Ao Professor Dr. Dirceu Pratissoli do CCA - UFES (Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo), pela orientação em trabalhos e preparação para o mundo da pesquisa durante a graduação.

Aos amigos do LBCI (Laboratório de Biologia e Criação de Insetos) pela atenção durante as fases experimentais e principalmente pela convivência de trabalho.

Aos amigos do LGBBA (Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada) pela convivência tão agradável e em especial pela ajuda e o aprendizado na área de microbiologia básica e aplicada que vocês me concederam.

Ao Professor Dr. Antônio Sérgio Ferraudó, Dr. Newton La Scala Júnior e Dr. José Carlos Barbosa pela disponibilidade para realização das análises estatísticas e por toda atenção dispensada.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade / Entomologia Agrícola, que sempre estiveram à disposição para ajudar.

Aos professores da UNESP-Campus de Jaboticabal e em especial aos da Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, pela amizade e ensinamentos prestados.

Aos alunos da pós-graduação em Entomologia Agrícola, tanto de mestrado como de doutorado, pela amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO	PAG
RESUMO	ii
SUMMARY	iii
 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	 1
 CAPÍTULO 2 – SUSCETIBILIDADE DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) A ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER.	 12
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
REFERÊNCIAS	26
 CAPÍTULO 3 – <i>Plutella xylostella</i> : CRIAÇÃO, BIOLOGIA E COMPORTAMENTO SOB PRESSÃO DE SELEÇÃO COM <i>Bacillus thuringiensis</i>	 30
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS	66
 CAPÍTULO 4 – EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO	 69
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

**INFLUÊNCIA DE GERAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) e de RADIAÇÃO NO DESEMPENHO DE
ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER**

RESUMO – O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) da FCAV - Unesp com objetivo geral de estudar influência de gerações de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) e de radiação no desempenho de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner. A linhagem e os isolados foram provenientes do estoque do Laboratório de Biologia de Bactéria e Biotecnologia Aplicada da FCAV - Unesp. A concentração de esporo-cristal para iniciar a metodologia de pressão de seleção foi determinada pela análise de probit, sendo o valor de 6×10^6 esporos/mL. Esta população foi submetida a bioensaios com diferentes concentrações da linhagem HD-1, do isolado T08.024 e do produto comercial Agree® (*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* e proteína cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*) em várias gerações da seleção. Paralelamente, avaliou-se a suscetibilidade de lagartas de *P. xylostella* da criação mantida no LBCI a diferentes isolados patogênicos e com potencial de virulência. Também se realizou um estudo sobre ação da radiação ultravioleta na patogenicidade do isolado T08.024 por diferentes intervalos de exposição a radiação em laboratório e em campo. A metodologia de pressão de seleção foi estabelecida a partir da oitava geração onde se obteve mais que 50% de sobrevivência. Da geração 8 em diante passou-se a pulverizar concentrações mais altas desta linhagem, de acordo com o padrão de mortalidade apresentado em cada bioensaio na geração anterior. A viabilidade larval foi significativamente influenciada pelos tratamentos dentro das gerações. Entre gerações houve redução na mortalidade para o tratamento HD-1 na concentração de 3×10^8 esporos/mL. O padrão de suscetibilidade da criação estoque do LBCI foi alto (100% de mortalidade) para todas as concentrações testadas para 8 isolados desta bactéria. A radiação ultravioleta não influiu sobre a patogenicidade do isolado T08.024, tanto em laboratório como em campo.

Palavras-Chave: Traça-das-crucíferas; entomopatógeno, resistência de inseto, radiação.

INFLUENCE OF GENERATIONS OF *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and RADIATION ON THE PERFORMANCE OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER STRAINS

SUMMARY – This work was conducted at the Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) of FCAV - Unesp (LBCI), with the general objective of studying the influence of generations of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and the radiation performance of *Bacillus thuringiensis* Berliner. The strain and the isolates were from the Laboratório de Biologia de Bactéria e Biotecnologia Aplicada da FCAV-Unesp stock. The concentration of spore-crystal to the method of selection pressure was determined by probit analysis, and the value used was 6×10^6 spores / mL. This population was subjected to bioassays using different concentrations of HD-1 strain, Agree® and of T08.024 strain on several generations of selection. In parallel, it was evaluated the susceptibility of larvae of *P. xylostella* maintained in the LBCI different to pathogenic isolates and virulence potential. Also it was conducted a study in verify he action of ultraviolet radiation on the isolate T08.024 pathogenicity for different intervals of exposure to radiation in laboratory and field. The methodology of selection pressure was established from the eight generation where was obtained more than 50% of survival. From generation eight began the spray higher concentrations of HD-1 strain, according to the standard mortality presented in each test in the previous generation. The larval survival was significantly influenced by treatments within the generations. Between generations, mortality has been reduced to the HD-1 treatment at a concentration of 3×10^8 spores / mL. The susceptibility of LBCI standard population was high (100% mortality) for all concentrations tested to the eight strains. Ultraviolet radiation did not affect the pathogenicity of the T08.024 strain.

Keywords: Diamondback moth, insect pathogen, insect resistance, radiation.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ocorrência mundial da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), tem se caracterizado como fator determinante na redução da produção de repolho (DICKSON et al., 1990). No Brasil, esta praga é constatada praticamente durante todo o ano (CASTELO BRANCO & GUIMARÃES, 1990; BARROS et al., 1993; MELO et al., 1994; LOGES, 1996). MUSSURY et al. (2002) relataram que *P. xylostella* tem sido também considerada uma das principais pragas em plantios de canola, causando danos desde a fase vegetativa até ao final do florescimento, destruindo, muitas vezes, a haste floral. No Brasil, foi constatada também sua ocorrência em canola do início de agosto até o final de setembro (DOMICIANO & SANTOS, 1996).

O método de controle mais utilizado nos campos produtores de crucíferas ainda é o químico, por ser considerado prático, rápido e eficiente na redução populacional da traça-das-crucíferas (TALEKAR & SHELTON, 1993; DIAS et al., 2004).

Apesar da eficiência do método de controle químico, a utilização inadequada dessa tática associado ao potencial biótico deste inseto proporciona condições favoráveis para seleção de indivíduos resistentes nas populações da traça-das-crucíferas, dificultando o manejo. Este inseto é definido por muitos autores como uma espécie com maior número de casos de resistência (GEORGHIOU & LAGUNES-TEJADA, 1991; THULER, 2006). GEORGHIOU & LAGUNES-TEJADA (1991) relataram que em 1989 já eram conhecidos cerca de 50 inseticidas químicos aos quais *P. xylostella* apresentava resistência, sendo que no Brasil essa resistência a inseticidas foi constatada por CASTELO BRANCO & GATEHOUSE (1997), também em relação a diferentes princípios ativos. Esta traça tornou-se alvo de pesquisas por todo o país, visando a obtenção de medidas de controle tecnicamente mais adequadas, economicamente satisfatórias e ecologicamente corretas (THULER, 2006).

O Brasil, a China e a Rússia tem buscado aprimorar e desenvolver programas de controle biológico, com ênfase na utilização de microrganismos. Com o avanço das

pesquisas, muitos entomopatógenos têm sido estudados, originando com isso vários produtos formulados, promovendo maior utilização do controle microbiano de pragas. Muitos patógenos apresentam grande seletividade e especificidade, o que permite manter o equilíbrio biológico. Além disso, este é um tipo de controle que é mais duradouro e de fácil aplicação, não tóxico para o homem e outros animais, sendo que os alimentos tratados com esses produtos podem dar maior retorno financeiro. Dessa forma, os entomopatógenos oferecem grande vantagem em relação ao controle químico de largo espectro (ALVES, 1998).

O uso da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é uma alternativa eficaz e racional para evitar os danos causados por *P. xylostella* (MONNERAT et al., 1999; CASTELO BRANCO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2005). Este agente tem sido usado para controle de insetos-praga das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (MONNERAT & BRAVO, 2000; MEDEIROS et al., 2005), sendo que diversos trabalhos relatam o uso desta bactéria para controle da traça-das-crucíferas, pelo fato dela produzir toxinas Cry que são extremamente tóxicas aos insetos (CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002; DIAS et al., 2004; MONNERAT et al., 2004; SAYYED et al., 2004; KHAN et al., 2005).

Os cristais de *B. thuringiensis* isoladamente não tem ação tóxica, sendo considerados pró-toxinas. É necessário sua dissolução em meio alcalino para haver a liberação e atuação das toxinas nos insetos. Isto explica porque somente os insetos de pH alcalino são suscetíveis (HABIB & ANDRADE, 1998). Os cristais desta bactéria, ao serem ingeridos pelas larvas dos insetos suscetíveis, sofrem ação do pH intestinal e de proteases que solubilizam o cristal e ativam as toxinas (proteínas Cry). As toxinas se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino médio das larvas, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana e ocasionam a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocela do inseto. Em consequência, a larva deixa de se alimentar, torna-se imóvel e morre por inanição ou septicemia (KNOWLES, 1994; COPPING & MENN, 2000; PRAÇA et al., 2004).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* são determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que possui, ou seja, cada toxina é codificada por genes *cry* (ARANTES et al., 2002). Até o momento foram sequenciados mais de 550 genes *cry*, os quais são responsáveis por codificar as proteínas Cry (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/; atualizado em 13 de setembro de 2010). Muitas linhagens de *B. thuringiensis* possuem um único gene *cry*, enquanto outras podem apresentar complexas combinações de genes (BRAVO et al., 1998).

Apesar das vantagens, os insetos podem apresentar mecanismos de defesa contra os entomopatógenos, uma vez que precisam superar uma barreira mecânica para conseguir a colonização, haja vista que, até passar por ela, podem sofrer ação de hemócitos e mecanismos bioquímicos e fisiológicos produzidos pelos insetos. Devido a esta situação, é fundamental a adoção de um manejo de resistência de forma preventiva, antes que as falhas do programa sejam detectadas (OMOTO & ALVES, 1998).

Para se ter sucesso com a utilização de patógenos como inseticida microbiano é necessário conhecer alguns fatores, tais como: temperatura, umidade, luminosidade e pH, sendo estes de difícil controle, enquanto outros são de manejo mais fácil, como o uso de linhagens adequadas, concentração, pureza do inóculo, formulação e época de aplicação (ALVES et al., 1998). Mesmo com grandes avanços nesse tipo de controle, pouca ênfase tem sido dada às pesquisas de desenvolvimento de máquinas e tecnologias, sabendo-se que o tipo de equipamento a ser utilizado na aplicação não pode causar ação indesejável sobre as estruturas do patógeno (SMITH & BOUSE, 1981).

Os produtos contendo toxinas específicas para lepidópteros são os mais encontrados no mercado, pois a maioria dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* usados para controlar pragas agrícolas são formulados com a linhagem HD-1, da subespécie *kurstaki*, que tem alta toxicidade e amplo espectro de ação. O produto Dipel[®], formulado com esta linhagem, tem grande destaque no mercado mundial, com eficiência para 170 lepidópteros-praga (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). O uso de

bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* com sucesso no mundo contribuiu para o início da substituição ou redução dos inseticidas convencionais em diversas áreas e o incentivo para novas pesquisas sobre a utilização desta bactéria na agricultura (van FRANKENHUYZEN, 1993).

Plutella xylostella foi o primeiro inseto para o qual foram relatadas populações de campo com altos níveis de resistência em respostas a tratamentos comerciais com *B. thuringiensis* (TABASHNIK et al., 1997; HERRERO et al., 2001). Casos de resistência da traça foram detectados pela primeira vez no Havaí, mas, também, em outros países já foram verificadas populações resistentes, a exemplo do Japão, USA, Tailândia, Honduras, Malásia, Brasil, México, Filipinas e Nicarágua (ZHAO et al., 1993; TABASHNIK, 1994; PEREZ & SHELTON, 1997; WRIGHT et al., 1997).

A resistência à bactéria pode estar relacionada a diversos fatores, como por exemplo, ao modo de ação das toxinas, sendo que algumas hipóteses podem ser consideradas, como a mudança na conformação dos receptores, pH intestinal menos alcalino impedindo a solubilização do cristal, proteases intestinais incapazes de digerir ou ativar as δ -endotoxinas ou então muito eficazes, que poderiam digerir totalmente a pró-toxina, e também a hipersensibilidade dos indivíduos-alvo (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Muitos isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e atualmente diversos estudos de laboratório no mundo se destinam à descoberta de isolados que possuam novas e eficientes toxinas no controle de pragas (MONNERAT & BRAVO, 2000), principalmente para contornar os problemas resultantes do manejo inadequado advindo do excesso de aplicações de bioinseticidas (MAXWELL et al., 2006). A variabilidade genética existente entre estes diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas como a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia).

O uso do bioinseticida à base de *B. thuringiensis*, em combinação com outras táticas de manejo, pode resultar numa ótima estratégia para contornar o problema da resistência, como por exemplo o uso de áreas de refúgio, rotação de culturas, emprego de inimigos naturais associados com as δ -endotoxinas, ou então associá-las com

produtos químicos dentro de uma filosofia de manejo integrado de pragas (van RIE & FERRÉ, 2000; MEDEIROS, 2004). Diante das dificuldades de controle desta praga, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de pressão de seleção sobre lagartas de *P. xylostella* por meio da linhagem HD-1 de *B. thuringiensis*, com finalidade de estudar a performance biológica desta população; bem como determinar a viabilidade de isolados patogênicos de *B. thuringiensis* sob ação da radiação ultravioleta e a partir destes isolados avaliar o padrão de suscetibilidade da população estoque do laboratório.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B.. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163p.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R.M.; ALMEIDA, J. E. M.; LARANJEIRO, A.J. Equipamentos para aplicação de inseticidas microbianos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p.269-288.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS BOAS, L. A.; VILAS BOAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria**. Caxias do sul: EDUCS, 2002, p. 269-294.
- BARROS, R.; ALBERT-JÚNIOR, I. B.; OLIVEIRA, A. J.; SOUZA, A. C. F., LOGES, V. Controle químico da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.3, p.463-469, 1993.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVERUS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.4965-4972, 1998.
- CASTELO BRANCO, M.; AMARAL, P. S. T. Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 410-415, 2002.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. T. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 549-552, 2003.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A. G. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n.1, p. 75-79, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A. L. Controle da traça-das-crucíferas em repolho: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 24-25, 1990.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 56, p. 651-676, 2000.

DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004.

DICKSON, M. H.; SHELTON, A. M.; EIGENBRODE, S. D.; VAMOSY, M. L.; MORA, M. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. **Hortscience**, Alexandria, v. 25, n. 12, p. 1643-1646, 1990.

DOMICIANO, N.L.; SANTOS, B. Pragas da canola: bases preliminares para manejo no Paraná. **Boletim Técnico**, IAPAR, Londrina, n. 35, p. 1-16, 1996.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJADA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome: AGPP/MISC/91-1. 318p. 1991.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HERRERO, S. S.; FERRÉ, J. M.; ESCRICHE, B. Mannose phosphate isomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to

Bacillus thuringiensis toxins in Lepidoptera species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 979-981, 2001.

KHAN, M. F. R.; RIFFIN, P.; CARNER, G. R.; GORSUCH, C. S. Susceptibility of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from collard fields in South Carolina to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Agriculture Urban and Entomology**, Sidney, v. 22, n. 1, p. 19-26, 2005.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, New York, v.24, n.8, p.275-308, 1994.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5°C resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

LOGES, V. **Danos causados pela traça das crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) em cultivares de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* (L.) e efeito sobre populações da praga e do parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912), em condições de campo.** 1996. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.

MAXWELL, E. M.; FADAMIRO, H. Y.; MCLAUGHLIN, J. R. Suppression of *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* in cole crops with attracticide formulations. **Journal of Economic Entomology**, Auburn, v. 99, n. 4, p. 6-17, 2006.

MEDEIROS, P. T. **Estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle biológico da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*.** 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2004.

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A.C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de

Bacillus thuringiensis efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

MELO, P.E.; CASTELO BRANCO, M.; MADEIRA, N.R. Avaliação de genótipos de repolho para a resistência à traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 19-24, 1994.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p.163-2000.

MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 607-609, 2004.

MONNERAT, R. G.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAICAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, New York, v.39, p.159-162, 1999.

MUSSURY, R. M.; FERNANDES, W. D.; SCALON, S. P. Q. População de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) e *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 associada a *Brassica napus* L. em função de dois métodos de captura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 993-998, 2002.

OMOTO, C.; ALVES, S. B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p.55-76.

PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. **Journal of Economic Entomology**, Auburn, v. 90, p. 87-93, 1997.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, 2004.

SAYYED, A. H.; RAYMOND, B.; IBIZA-PALACIOS, S.; ESCRICHE, B.; WRIGHT, D. J. Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 12, p. 7010-7017, 2004.

SMITH, D. B.; BOUSE, L. F. Machinery and factors that affect the application of pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases**. New York: Academic Press, 1981. p.635-653.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D. G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 94, p. 1640-1644, 1997.

TALEKAR, N. S.; SHELTON, A. M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p.275- 301, 1993.

THULER, R. T. *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): **táticas para o manejo integrado em brássicas**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide***: theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p. 1-35.

VAN RIE, J.; FERRÉ, J.M. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Eds.). **Entomopathogenic Bacteria**. Hingham: Kluwer Academic Publications, 2000. p. 219-237.

WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. M. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v. 63, n. 5, p.1814-1819, 1997.

ZHAO, J. Z.; ZHU, G. R.; ZHU, Z. L.; WANG, W. Z. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in China. **Resistance Pest Management**, Lansing, v. 5, p.11-12, 1993.

CAPÍTULO 2 – Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) a isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner.

INTRODUÇÃO

As diferentes espécies da família Brassicaceae são cultivadas por pequenos e médios agricultores que têm sérios problemas fitossanitários, entre o quais o ataque de insetos, principalmente, lepidópteros como *Ascia monuste orseis* (L.) (Lepidoptera: Pieridae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (GODIN & BOIVIN, 1998). *P. xylostella* é considerada a principal praga devido ao seu dano, podendo inviabilizar o produto para o comércio. A dificuldade de controle desta praga pode estar relacionada com a sobreposição de gerações, disponibilidade de hospedeiros simultaneamente nas áreas (brássicas cultivadas e espécies nativas), ciclo rápido e o mais importante, o aparecimento de populações resistentes ao manejo inadequado das táticas de controle (KUMARASWAMIA et al., 2001; KWON et al., 2004).

Formulações a base de *Bacillus thuringiensis* têm sido uma tática promissora para controle de lepidópteros-praga em diversas culturas de importância agrícola, incluindo *P. xylostella* em brássicas (MEDEIROS et al., 2006; HECKEL et al., 2007). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva que produz cristais protéicos durante a esporulação, que ao serem ingeridos por insetos suscetíveis são solubilizados no mesêntero, liberando proteínas chamadas δ -endotoxinas. Estas proteínas são ativadas por proteinases do mesêntero, atravessam a membrana peritrófica e interagem com receptores específicos situados no epitélio do intestino médio, provocando formação de poros iônicos na membrana das células epiteliais e rompimento dessas células. As larvas intoxicadas cessam a alimentação 2-3 horas após a ingestão das toxinas e por fim morrem por falta de absorção de nutrientes ou septicemia causada por bactérias da própria flora intestinal do inseto (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; VIANA et al., 2009).

O potencial de controle de produtos a base dessa bactéria tem proporcionado uma série de estudos com isolados provenientes de vários locais geográficos, com finalidade de se encontrar perfis genéticos diversificados em relação às toxinas sintetizadas por eles, a fim de possibilitar alternativas de toxicidade na elaboração de formulações. Para *P. xylostella* foi relatado casos de resistência a produtos com linhagens deste entomopatógeno (HECKEL et al., 2007). Para tanto, muitos bioensaios são realizados com populações mantidas em laboratório por muitas gerações, as quais podem apresentar resposta biológica que venha comprometer a patogenicidade dos isolados. Assim, este trabalho teve como objetivo observar o comportamento de suscetibilidade da população de *P. xylostella* mantida por mais de 100 gerações em laboratório, frente a uma série de isolados com patogenicidade comprovada para lepidópteros-praga em bioensaios e em análises moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP) em Jaboticabal, sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Para experimentação, utilizaram-se lagartas de segundo ínstar de *P. xylostella* com 100 gerações oriundas da criação do LBCI / FCAV-UNESP. Os isolados de *B. thuringiensis* utilizados nos bioensaios foram provenientes do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV-UNESP (LGBBA), os quais foram: E1, 49.19A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140, T08024, E26, E22 e T07. Os isolados selecionados para este estudo foram caracterizados molecularmente como específicos para lepidópteros e descritos por VIANA (2007).

1) Linhagens e isolados de *B. thuringiensis*

A linhagem padrão (Lepidoptera-específico) utilizada como controle positivo foi *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 obtida do “*Bacillus* Genetic Stock Center”, do Departamento de Bioquímica do Colégio de Ciências Biológicas da Ohio State University.

Foram 10 isolados de *B. thuringiensis* obtidos do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos pertencentes à coleção do LGBBA, sendo que parte é da coleção do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos de Piracicaba, SP, e da coleção do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo de Sete Lagoas, MG. Estes isolados foram estocados em fitas de papel-filtro, que foram impregnadas com suspensões de esporos e acondicionadas em tubos plásticos com capacidade para 1mL, mantidas a 10°C em câmara climatizada. Para evitar contaminação do estoque em papel, a condução do experimento foi iniciada a partir de um estoque em água, ou seja, uma fita de papel impregnada com esporos foi imersa em água estéril e armazenada sob as condições anteriores.

2) Criação e manutenção de *P. xylostella*

A criação consistiu na transferência dos adultos recém-emergidos para gaiolas plásticas circulares transparentes, medindo 12 cm de diâmetro por 15 cm de altura, com abertura lateral coberta com tecido “voil”, contendo na parte superior esponjas embebidas com solução de mel a 10% para alimentação dos adultos.

No interior das gaiolas foram colocados discos de folha de couve, como substrato para oviposição, sobre discos de papel-filtro, previamente umedecidos, dispostos na parte superior de copos plásticos transparentes. Estes discos de couve foram trocados diariamente e acondicionados em placas plásticas (8 cm de diâmetro) durante 3 dias até a eclosão das lagartas. Após a eclosão, os discos foram transferidos para recipientes plásticos medindo 25 cm de comprimento x 15 cm de largura x 12 cm de altura. Três dias após a eclosão das larvas foi feita a primeira substituição dos discos de folhas de couve, sendo que as posteriores foram realizadas diariamente até que se atingisse a fase de pupa. As pupas foram coletadas e acondicionadas em tubos de vidro de fundo chato (8,5 cm de altura x 2,4 cm de diâmetro) até a emergência dos adultos. Esse procedimento foi repetido continuamente para assegurar a criação e multiplicação da praga durante a realização da pesquisa.

A couve utilizada na criação foi cv. Manteiga, plantada na área experimental da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, com solo corrigido segundo a necessidade de plantio, sendo realizada uma adubação de cobertura, com sulfato de amônio aos 20 dias após o transplante. As plantas foram constantemente irrigadas durante os períodos de estiagem, de acordo com o aspecto visual das folhas.

O procedimento da criação e manutenção da traça está ilustrado nas Figuras 1 e 2.

3) Bioensaio

Para o preparo da suspensão esporo/cristal os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura Ágar-Nutrente e incubados a 30°C,

durante 5 dias, para permitir completa esporulação e liberação de cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido com auxílio de alça de platina para tubo Falcon contendo 10 mL de água autoclavada e 0,005% de Tween 20[®] (estabilizador de emulsão; solúvel e dispersível em água). A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex e a partir desta foram feitas duas suspensões seriadas para contagem de esporos em câmara de Neubauer para padronização das concentrações: 9×10^1 , 9×10^2 , 9×10^3 , 9×10^4 , $(1,5; 6; 8 \text{ e } 9) \times 10^5$, $(1,5; 2; 3; 4,5; 6; 7,5 \text{ e } 9) \times 10^6$, $(1,5; 2; 3; 4; 4,5; 6; 7,5; 9) \times 10^7$ e $(1,5 \text{ e } 3) \times 10^8$ esporos/mL.

As concentrações utilizadas foram baseadas na patogenicidade dos isolados a partir da concentração de 3×10^8 esporos/mL (VIANA, 2007), e também em pré-testes no laboratório, para determinar a variação entre as concentrações.

Para cada concentração dos isolados, em 3 discos de folha de couve com diâmetro de 8 cm aplicou-se um volume de 0,5 mL da suspensão por face do disco, além de uma pulverização de 0,50 mL de água com Tween como testemunha. A aplicação foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25lbf/pol², sob capela de exaustão, a uma distância de 20 cm do alvo (disco foliar). Os discos secos em condição ambiente foram colocados individualmente em placas de Petri sobre papel filtro levemente umedecido com água. Sobre cada disco foliar foram colocadas 15 lagartas de *P. xylostella* de segundo ínstar, para alimentação.

Os bioensaios foram representados por 26 concentrações por isolado (totalizando 260, sendo 10 isolados para 26 concentrações). Para cada tratamento utilizou-se 3 repetições, contendo 45 lagartas.

A avaliação da mortalidade larval foi iniciada com 24 horas após o confinamento nas placas, até a mortalidade total ou formação de pupas.

A suscetibilidade das lagartas foi determinada com base nos dados da mortalidade larval. Entretanto, para os isolados que proporcionaram perfis de mortalidade variados realizou-se o cálculo da CL₅₀, por meio da análise de PROBIT (FINNEY, 1971), utilizando o programa POLO-PC.

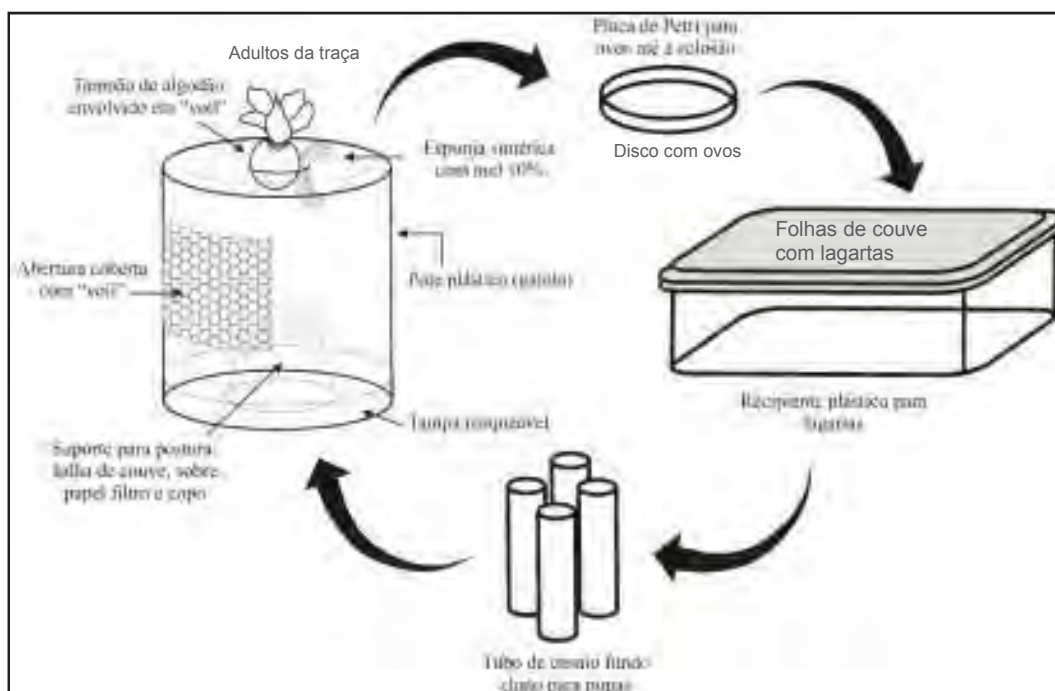


Figura 1. Esquema da metodologia de criação da traça-das-crucíferas adaptada para o Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da UNESP-Jaboticabal (THULER, 2009).

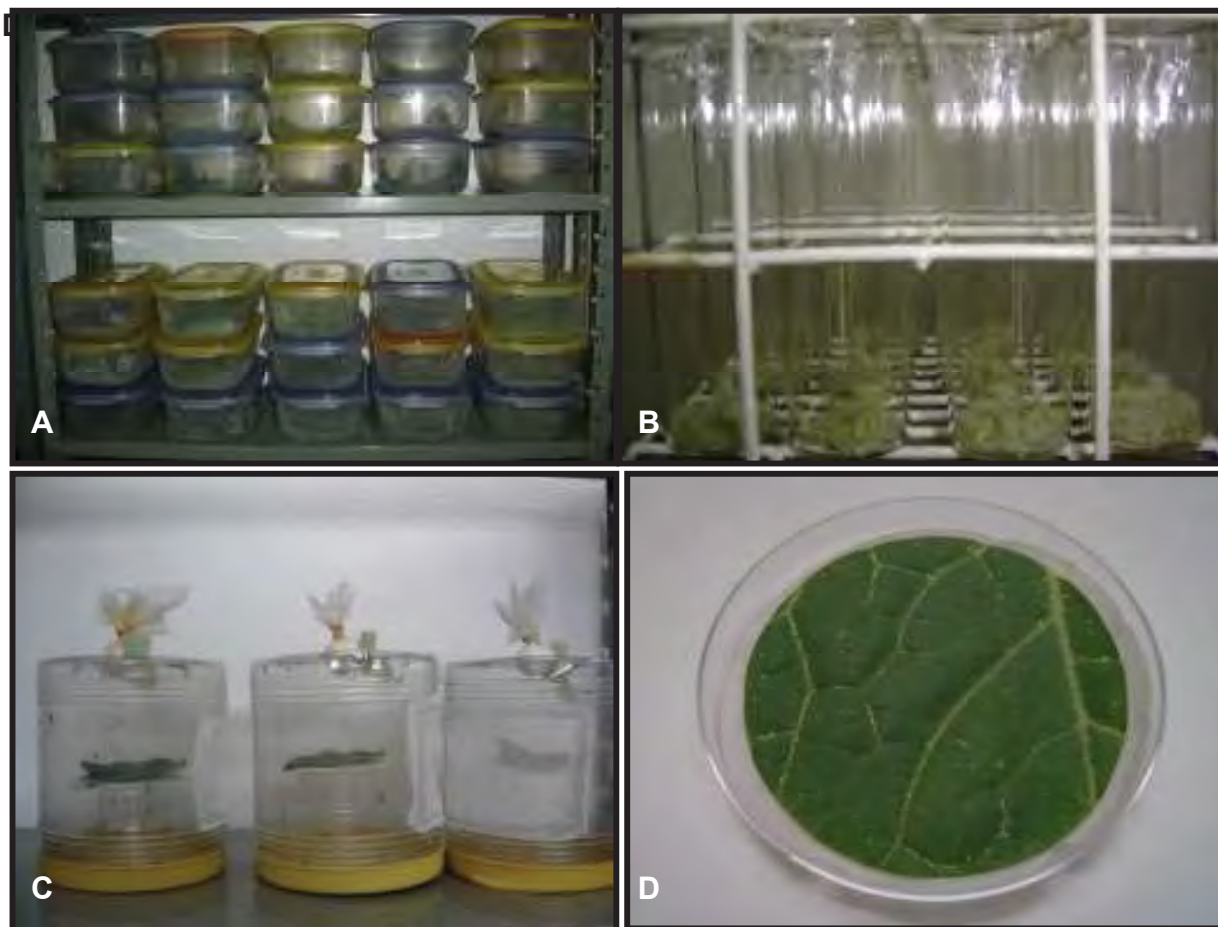


Figura 2. Recipientes utilizados na manutenção da criação de *Plutella xylostella* em laboratório. A) Recipiente com lagartas; B) Recipiente com pupas; C) Recipiente com adultos; D) Recipiente com ovos (THULER, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *P. xylostella* oriundas da criação em laboratório com média de 100 gerações apresentaram um padrão de suscetibilidade muito elevado para as concentrações avaliadas em todos os isolados (Tabela 1). Dentre os isolados avaliados, 7 causaram 100% de mortalidade das lagartas, sendo que apenas o isolado T08.024 apresentou resultado que permitiu análise de CL_{50} (Tabela 2 e Figura 3).

A virulência não pôde ser estimada para 6 isolados devido a alta toxicidade para esta população de *P. xylostella*, os quais constituem fontes promissoras na elaboração de inseticidas biológicos. O efeito tóxico do complexo esporo-cristal desse material pode ser decorrente da ação conjunta das proteínas, como Cry, Cyt, Vip e Exo, uma vez que, elas podem estar sendo expressas ao mesmo tempo, como também pode ocorrer efeito antagônico, em que uma proteína não é produzida em detrimento de outra (DUMA, 2009).

A variação da eficiência dos isolados pode ser explicada por uma série de fatores ligados ao modo de ação desta bactéria, principalmente pela ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo este fator determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (POLANCZKY & ALVES, 2003). A eficácia também depende da presença de outras toxinas como a Vip, Cyt e outras exotoxinas que podem influenciar na toxicidade dos isolados, uma vez que os bioensaios foram conduzidos com suspensão esporo-cristal. A ação de outras toxinas que podem compor o perfil gênico dos isolados também pode influenciar o potencial dos mesmos, de forma positiva ou negativa, porque algumas destas toxinas apenas são sintetizadas na fase vegetativa da multiplicação bacteriana (LEE et al., 2003; COSTA, 2009).

O valor não significativo de χ^2 ($p < 0,05$) possibilitou o ajuste da CL_{50} $2,7 \times 10^6$ esporos/mL para o isolado T08.024 (Tabela 2). O ajuste por meio do valor não significativo apresentado pela análise de qui-quadrado mostra que os valores de mortalidade apresentam dependência em relação ao incremento da concentração.

A mortalidade larval ocasionada pelo isolado T08.024 foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações, ou seja, aumentaram com o incremento

da concentração. Este isolado de *B. thuringiensis* apresentou um perfil genético muito variado quanto à produção de proteínas, descrito nos trabalhos de VIANA (2007) e VIANA et al. (2009), onde foram discutidos os possíveis genes que podem estar associados ao efeito letal deste isolado em lagartas de *P. xylostella*, sendo eles: *cry1Aa*; *cry1Ca*; *cry1Fa*; *cry1Ab*; *cry1Ae*; *cry1Bd* e *cry1Ac*. Os genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* compõem o perfil molecular da formulação comercial Dipel[®], e eles têm efeito tóxico sobre *P. xylostella* (LEZ-CABRERA et al., 2001), assim como em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) (BRIGHENTI et al., 2005). Entretanto, em literatura foi demonstrado que determinadas populações da traça-das-crucíferas apresentam resistência às toxinas dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac*; e que há a possibilidade desta resistência ser de caráter dominante (SAYYED et al., 2005; GONG et al., 2010). A variação na suscetibilidade das toxinas de *B. thuringiensis* tem relação direta com o manejo da cultura, ou seja, com os tratamentos fitossanitários, restos de cultivos associado a sobreposição de gerações, cultivo de várias espécies de brássicas, dentre outros fatores.

As toxinas Cry1 (A, B, C, D, E, F, G, G, H, I, J, K); Cry7B e 8D; Cry9ABC; Cry15A, Cry22A, Cry32A, Cry51A; Cry1Ac, Cry1E e Cry2 são relacionados na literatura com potencial de controle para lepidópteros-praga (van FRANKENHUYZEN, 2009). Entretanto, o gene *cry2* não foi caracterizado para estes isolados, o que implica em necessidade de estudos moleculares para detecção do mesmo, sendo que o gene *cry2* também pode estar contribuindo para a toxicidade. Assim, estudos envolvendo as toxinas Vip, Cyt e beta e alfa-Exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases também são necessários para diagnosticar com precisão a procedência desta toxicidade, como relatado por DE MAAGD et al. (2001).

A constituição molecular de T08.024 como apresentado pela análise de PCR, é extremamente diversificada em termos de patogenicidade (VIANA et al., 2009). Sendo assim, é fundamental conhecer este perfil genético em condições de expressão gênica, a fim de possibilitar uma afirmação mais consistente da potencialidade do agente entomopatogênico, em relação à composição de proteínas tóxicas. BRAVO et al. (1998) relataram que o gene *cry1* é frequentemente encontrado nas coleções desta

bactéria no mundo, assim como no trabalho de WANG et al. (2007) que estudaram a distribuição destes genes na China e concluíram que *cry1C*, *cry1A* e *cry1D* apresentam altos índices de frequência. A literatura mostra que as proteínas resultantes dos genes *cry1B* e *cry1C* são muito estudadas com o objetivo de engenharia genética, pois são tóxicas a muitas pragas de grande importância econômica, assim como de difícil controle (VALICENTE et al., 2000).

Atualmente, os objetivos gerais das pesquisas têm envolvido a busca por novas toxinas com potencial de controle, bem como resgatar o efeito conjunto de duas ou mais em um isolado ou outro veiculador, podendo vir a ser uma excelente forma de contornar esta capacidade do inseto-praga (DUMA, 2009). Outras pesquisas focam engenharia genética, utilizando estas toxinas, como aquela apresentada pelo isolado T08.024, para serem incorporadas no genoma de variedades altamente produtivas, a fim de minimizar problemas de resistência, bem como redução de custos com outras formas de controle (GONG et al., 2010).

Os isolados 49.30A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140 e E1 nas menores concentrações (9×10^4) causaram efeito letal sobre as lagartas de *P. xylostella*, demonstrando a potencialidade das toxinas que devem estar sendo expressas. O perfil genético destes também foi relatado por VIANA (2007), sendo eles muito variados, assim como os apresentados pelo isolado T08.024; dentre as proteínas encontram-se CryB, CryC, CryE e CryF. Estas proteínas são alvo de pesquisas de levantamento de novos isolados patogênicos a insetos-praga, assim como estudos de caracterização molecular para elaboração de novos formulados (MELATTI, 2008). O complexo de proteínas dos isolados que não ajustaram a CL_{50} , bem como para o que ajustou, pode estar agindo de forma sinérgica, incrementando o efeito do isolado.

Os isolados estudados fazem parte de um banco que apresenta uma constituição genética muito importante para a traça-das-crucíferas, o que implica também na necessidade de estudos com outras pragas da mesma ordem. A possibilidade destes isolados expressarem a proteína Cry1C pode favorecer muitos estudos moleculares de inserção do domínio III da Cry1C em proteínas com menor toxicidade, como Cry1Ab,

Cry1Ac, Cry1Ea e Cry1Ba, tornando-as mais tóxicas para diferentes insetos-alvo (DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2004).

A partir da menor concentração também foi realizado um teste com suspensões seriadas, sendo 9×10^3 , 9×10^2 e 9×10 esporos/mL, porém o resultado foi o mais inesperado, também causando 100% de mortalidade. Assim, este grupo de isolados apresenta um perfil gênico muito complexo, sendo que para comprovar esta virulência faz-se necessário bioensaios com suspensão à base de esporos, e outra apenas com proteínas. Para tanto, poderá correlacionar a toxicidade com a constituição da suspensão e esta poderá ser quantificada em mg/mL, haja vista que a medida esporos/mL é muito relativa, podendo influenciar os estudos de virulências (SANTOS JR., 2009).

Os isolados E26, E22 e T07 não causaram mortalidade das lagartas de *P. xylostella*, mesmo sendo caracterizados molecularmente para lepidoptera. Nos bioensaios não apresentaram condição de toxicidade, provavelmente porque os genes identificados pela PCR no trabalho de VIANA (2007) não expressaram as proteínas. Estes bioensaios foram repetidos em triplicata para averiguar possíveis problemas decorrentes de contaminação por manuseio, ou até mesmo fatores abióticos como falta de temperatura no período da esporulação, todavia, os resultados sempre foram os mesmos.

Assim, *P. xylostella* apresentou alta suscetibilidade aos isolados 49.19A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140 e E1, os quais não possibilitaram ajuste da CL_{50} pela análise de χ^2 . Tais isolados, devido à alta toxicidade observada são os mais promissores para o controle de *P. xylostella* bem como para o desenvolvimento de novos inseticidas biológicos. É relevante estudos de caracterização das proteínas destes isolados, como também pesquisa sobre expressão gênica, espectro de ação e especificidade, o que permitirá a disponibilização freqüente de novas versões gênicas mais eficazes, mais específicas e com vantagens ainda maiores sobre as práticas convencionais de controle.

O isolado T08.024 que possibilitou o ajuste da CL_{50} 2×10^6 esporos/mL, sendo valor não significativo de χ^2 ($p < 0,05$), também apresenta potencial de controle para

esta praga, porém devem ser conduzidos estudos de expressão, bem como sua avaliação em condições de campo em locais de ocorrência frequente desta praga, objetivando confirmar a patogenicidade mesmo exposto aos fatores ambientais.

Tabela 1. Suscetibilidade de lagartas de *Plutella xylostella* com 100 gerações em laboratório por meio da mortalidade (%) causada por isolados de *Bacillus thuringiensis* que não ajustaram a curva concentração-resposta na análise de χ^2 .

Concentração (esporo/mL)	Mortalidade (%) de lagartas de <i>P. xylostella</i> causada por isolados de <i>B. thuringiensis</i>					
	E1	49.30A	E2	1.7L	T3A.259	T3A.140
9x10	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9x10 ²	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9x10 ³	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9x10 ⁴	93,33	64,44	55,55	91,11	86,66	86,66
1,5x10 ⁵	93,33	64,44	55,55	91,11	100,00	97,77
6x10 ⁵	88,88	64,44	66,66	91,11	100,00	97,77
8x10 ⁵	88,88	55,55	66,66	91,11	100,00	97,77
9x10 ⁵	100,00	100,00	100,00	95,55	100,00	100,00
1,5x10 ⁶	100,00	82,22	55,55	100,00	100,00	100,00
2x10 ⁶	100,00	91,11	68,88	100,00	100,00	100,00
3x10 ⁶	100,00	91,11	75,55	100,00	100,00	100,00
4,5x10 ⁶	100,00	91,11	97,77	100,00	100,00	100,00
6x10 ⁶	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
7,5x10 ⁶	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9x10 ⁶	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,5x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4,5x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
7,5x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9x10 ⁷	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,5x10 ⁸	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3x10 ⁸	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

n=45 (número de insetos testados em cada concentração).

Tabela 2. Inclinação (média $\pm$ erro padrão) da curva, qui-quadrado (χ^2), graus-liberdade, CL₅₀ ($\pm$ Intervalo de Confiança) e probabilidade (P) da curva concentração-mortalidade larval de *Plutella xylostella*.

Tratamento	Inclinação ($\pm$ EP)	χ^2	GL	¹ CL ₅₀ (IC 95%)	P
T08.024	1,96203 $\pm$ 0,1767	6,546 ^{ns}	10	2,7*10 ⁶ (0,0076-0,0107)	0,65

¹CL₅₀ – esporos/ml; ns – não significativo
ns=não significativo; CL=concentração letal

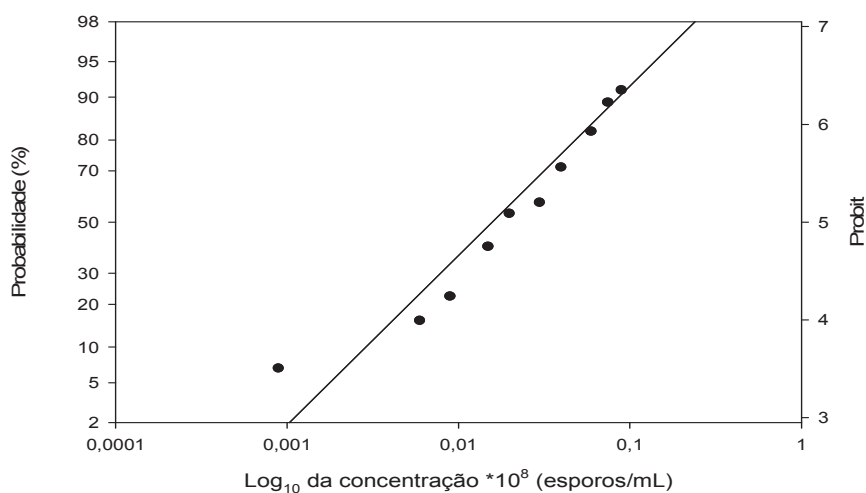


Figura 3. Curva de concentração-resposta do isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para lagartas de *Plutella xylostella*.

REFERÊNCIAS

- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVERUS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.4965-4972, 1998.
- BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; BRIGHENTI, C. R. G. Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, p.60-68, 2005.
- COSTA, J. R. V. **Predição in vitro da atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner e efeito sinérgico no controle de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. 2009. 93f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE N. How *Bacillus thuringiensis* has involved specific toxins to colonize the insect world. **TREND in genetics**, Feng Chen, v.17, p.193-199, 2001.
- DUMA, V. F. **Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2009. 140f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: University Press. 205 p, 1971.
- GODIN, C.; BOIVIN, G. Lepidopterous pests of Brassica crops and their parasitoids in southwestern Quebec. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 1157-1165, 1998.

GONG, Y.; CHONGLI, W.; YIHUA, Y.; SHUWEN, W.; YIDONG, W. Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.104, p.90–96, 2010.

GUIDELLI-THULER, A. M.; LEMOS, M. V. R.; THULER, R. T.; ABREU, I. Monitoring the expression of the sigma35 and cry2AB genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 403-409, 2009.

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; BAXTER, S. W.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B. E.; The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, p. 192-197, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. p. 339.

KUMARASWAMIA, N. S.; MARUYAMAB, T.; KURABEA, S.; KISHIMOTOA, T.; MITSUIA, T.; HORIA, H. Lipids of brush border membrane vesiclesžBBMV/from *Plutella xylostella* resistant and susceptible to Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vancouver, v.129, p.173-183, 2001.

KWON, D. H.; CHOI, B. R.; PARK, H. M.; LEE, S. H.; MIYATA, T.; CLARK, J. M.; LEE SH. Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 80, p. 21-30, 2004.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.4648–4657, 2003.

LEZ-CABRERA, J. G.; HERRERO, S.; SAYYED, A. H.; ESCRICHE, B.; LIU, Y. B.; MEYER, S. K.; WRIGHT, D. J.; TABASHNIK, B. E.; FERRÉ, J. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.10, p. 4610-4613, 2001.

MEDEIROS, P. T.; SONE, E.H.; SOARES, C. M. S.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, p.245-248, 2006.

MELATTI, V. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montecillo, v. 7, p. 1-10, 2003.

SANTOS JR., H. J. G. **Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp. (Westwood) (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae)**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SAYYED, A. H.; GATSI, R.; IBIZA-PALACIOS, M. S.; ESCRICHE, B.; WRIGHT, D. J.; CRICKMORE, N. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n.11, p. 6863-6869, 2005.

THULER, R. T. ***Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): táticas para o manejo integrado em brássicas**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

THULER, R. T. **Criação de *Plutella xylostella***. In: DE BORTOLI, S. A. (Ed.). **Criação de insetos: da base à biofábrica**. Jaboticabal: FCAV, 2009. Parte 2, p. 58-68.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E.

Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, p. 47-153, 2000.

van FRANKENHUYZEN, k. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.101, p. 1-16, 2009.

VIANA, C. L. T. P. **Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner efetivos em lagartas de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VIANA, C. L. T. P.; GOULART, R. M.; DE BORTOLI, S.A.; THULER, A. M. G.; THULER, R. T.; LEMOS, M. V. F.; FERRAUDO, A. S. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica**, Jaboticabal, v. 37, p. 22-31, 2009.

WANG, L.; LI, X-F.; ZHANG, J.; ZHAO, J-Z.; WU, Q-J.; XU, B.; ZHANG, Y-J. Monitoring of resistance for the diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ba toxins and a Bt commercial formulation. **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 441–446, 2007.

CAPÍTULO 3 – *Plutella xylostella*: criação, biologia e comportamento sob pressão de seleção com *Bacillus thuringiensis*

INTRODUÇÃO

A ocorrência mundial da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), tem se caracterizado como fator determinante na redução da produção de repolho (DICKSON et al., 1990). No Brasil, esta praga é constatada praticamente durante todo o ano (BARROS et al., 1993; LOGES, 1996). MUSSURY et al. (2002) relataram que *P. xylostella* tem sido também considerada uma das principais pragas em plantios de canola, desde a fase vegetativa até o final do florescimento, destruindo, muitas vezes, a haste floral. No Brasil foi constatada também sua ocorrência em canola a partir do início de agosto até o final de setembro (DOMICIANO & SANTOS, 1996).

O método de controle mais utilizado nos campos produtores de crucíferas ainda é o químico, por ser considerado prático, rápido e eficiente na redução populacional dessa praga (DIAS et al., 2004). Apesar da eficiência do método de controle químico, a utilização inadequada dessa tática vem ocasionando o aparecimento de populações da traça-das-crucíferas resistentes aos inseticidas (THULER, 2006). Para minimizar esse problema, uma das alternativas empregadas é o controle biológico por meio da aplicação de inseticidas à base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt).

Os resultados de controle obtidos inicialmente com esta bactéria tornaram frequente sua utilização; no entanto, a maioria dos produtos encontrados no mercado, são formulados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que expressa as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac. Isto significa que as ligações das toxinas com o epitélio, no intestino do inseto, ocorrem através dos mesmos receptores de membrana, facilitando o aparecimento de populações resistentes, o que já vem sendo relatado (TANG et al., 1996). *P. xylostella* foi o primeiro inseto para o qual observaram-se populações de

campo com altos níveis de resistência em respostas a tratamentos comerciais com *B. thuringiensis* (HERRERO et al., 2001).

A resistência à bactéria pode estar relacionada a diversos fatores, como por exemplo, ao modo de ação das toxinas, sendo que algumas hipóteses podem ser consideradas, como a mudança na conformação dos receptores, pH intestinal menos alcalino impedindo a solubilização do cristal, proteases intestinais incapazes de digerir ou ativar as δ -endotoxinas ou então muito eficazes, que poderiam digerir totalmente a protoxina, e também a hipersensibilidade dos indivíduos-alvo (MONNERAT & BRAVO, 2000). Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o desempenho da traça-das-crucíferas sob pressão de seleção da linhagem HD-1 de *B. thuringiensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP) em Jaboticabal, sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Os insetos utilizados para iniciar a criação de *P. xylostella* sob pressão de seleção à *B. thuringiensis* foram provenientes da criação do LBCI / FCAV-UNESP. Já os isolados e a linhagem padrão HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foram oriundos do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV-UNESP (LGBBA).

Criação de *P. xylostella* sob pressão de seleção à linhagem padrão HD-1 de *B. thuringiensis*

A metodologia padrão utilizada na criação de *P. xylostella* no LBCI foi alterada quanto à qualidade da couve, sendo esta tratada com uma CL_{50} da linhagem HD-1 de *B. thuringiensis*. A concentração de 6×10^6 esporos/mL da suspensão desta linhagem foi determinada em lagartas de segundo-terceiro instar da população da traça suscetível mantida no LBCI (Tabela 1). Esta suspensão esporo/cristal foi preparada a partir da inoculação da bactéria em placas de Petri com meio de cultura Ágar-Nutriente e incubados a 30°C , durante 5 dias, para permitir assim completa esporulação e liberação de cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon contendo 10 mL de água autoclavada e 0,05% de Tweem 20[®]. A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex e a partir desta foi feita duas suspensões seriadas para contagem de esporos em câmara de NeuBauer para padronização da concentração de 6×10^6 esporos/mL.

Na manutenção da criação utilizaram-se folhas de couve sem tratamento com bactéria para as lagartas recém eclodidas até o segundo ínstar. As lagartas de terceiro

ínstar alimentavam-se de folhas tratadas com a CL₅₀ da linhagem padrão HD-1. As folhas foram pulverizadas com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25lbf/pol², sob capela de exaustão. Após a secagem, por duas horas, em condição ambiente, as folhas foram expostas as lagartas de terceiro ínstar para alimentação em recipientes iguais ao da criação padrão. O confinamento destas lagartas em contato com o substrato tratado foi de 48 horas, pois a partir deste tempo parte das lagartas passavam para o estágio de pupa e parte estava morta.

A etapa do ciclo biológico que corresponde a fase pupal e a manutenção das gaiolas de adultos foi semelhante à realizada na criação padrão do LBCI.

Os insetos que emergiram da primeira geração que teve contato com a bactéria já representavam uma próxima geração, a qual foi chamada de segunda geração sob pressão de seleção, e assim sucessivamente. Então, para cada geração seguinte fornecia folhas de couve pulverizadas com a CL₅₀ da linhagem HD-1 (Tabela 1).

A criação de *P. xylostella* sob pressão apresentou um maior número de indivíduos sobreviventes a partir da oitava geração. Assim, da primeira à sétima geração a CL₅₀ de 6×10^6 esporos/mL foi mantida. A partir da décima, a concentração utilizada foi variável em função do comportamento e da mortalidade das lagartas. Como em cada ciclo da criação era possível obter insetos jovens de diferentes idades, foi pertinente variar as concentrações da bactéria. Para as primeiras lagartas de terceiro ínstar oriundas da primeira postura da geração forneciam-se folhas com uma concentração mais elevada de espora-cristal. Entretanto, caso esta concentração não causasse 100% de mortalidade a mesma seria mantida para a próxima remessa de lagartas de terceiro ínstar da mesma geração. Por outro lado, se a mortalidade fosse elevada (100%), então retornava-se para a CL₅₀ de 6×10^6 esporos/mL.

A variação da concentração dependia do comportamento da lagarta, porque além do contato com o substrato tratado com maior concentração, também observava-se que as mesmas se alimentavam ou se distanciavam da folha para as extremidades do recipiente e ali permaneciam até formar a pupa. Mesmo assim, alguma prova foi realizada no substrato, o qual apresentava pontuações de alimentação.

A concentração utilizada nas gerações posteriores à vigésima foi superior à CL₉₀ determinada junto da CL₅₀, sendo de $1,5 \times 10^7$ esporos/mL. Na trigésima terceira geração foi possível pulverizar $1,5 \times 10^8$ esporos/mL.

Experimento – Bioensaio para avaliar a biologia e comportamento de *P. xylostella* sob pressão de seleção com *B. thuringiensis*

A partir da oitava geração iniciaram-se os bioensaios com concentrações mais elevadas da linhagem HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, como também com o isolado T08.024 de *B. thuringiensis*, e o produto comercial Agree[®], que apresenta em sua constituição o *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* e também proteína cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

O preparo da suspensão esporo/cristal da linhagem padrão e do isolado foi semelhante o protocolo descrito no item Criação de *P. xylostella* sob pressão de seleção à linhagem padrão HD-1 de *B. thuringiensis* deste capítulo. As concentrações do produto comercial foram as mesmas recomendadas para controle deste inseto em cultivos de brássicas. Os tratamentos utilizados nas diferentes gerações de *P. xylostella* sob pressão de seleção estão descritos na Tabela 2.

Para realização dos bioensaios foi utilizado folhas de couve da variedade Manteiga, pulverizadas com as concentrações dos respectivos tratamentos. A pulverização foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25lbf/pol², sob capela de exaustão. Após a secagem, por duas horas, em condição ambiente, as folhas foram expostas as lagartas de terceiro ínstar em recipientes plásticos como utilizado na criação, sendo um total de 100 lagartas/tratamento.

As características biológicas, como mortalidade larval, viabilidade larval e pupal, duração larval e pupal, peso de pupas e razão sexual, foram avaliadas na oitava, décima, décima segunda, décima terceira e na décima quarta geração. Para a décima quinta, décima sexta, décima sétima, vigésima, vigésima nona, trigésima e trigésima terceira geração avaliaram-se a mortalidade larval com 72 horas para diferentes

concentrações, porque nestas gerações pode-se observar que a mortalidade variava entre 10-15% sob a pulverização da pressão de seleção nas respectivas concentrações apresentadas na Tabela 2. Para estas gerações a concentração da linhagem HD-1 que foi utilizada na pressão de seleção não causava mortalidade (Tabela 1).

As concentrações para determinar a CL_{50} da população suscetível foram 9×10^4 ; (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0) $\times 10^5$; (4,5; 6,0; 9,0) $\times 10^6$; $1,5 \times 10^7$ esporos/mL, e para trigésima terceira geração da população sob pressão de seleção foram (0,06; 0,15; 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,8; 1,2; 3,0; 4,0; 5,0; 7,00; 8,0 e 9,0) $\times 10^8$ esporos/mL.

Além destes testes para avaliar a pressão de seleção, também foi realizado um experimento com objetivo de avaliar por quantas gerações a população poderia apresentar aspectos de suscetibilidade, que se iniciou a partir da décima quinta, sendo a geração que demonstrou maior número de sobreviventes. Para constituir a nova população, um lote de dois mil indivíduos foi separado da geração 15. A partir da primeira geração desta população as lagartas de segundo-terceiro ínstar não se alimentavam de folhas tratadas com a bactéria. Em cada geração realizou-se ensaios para verificar a mortalidade mediante três concentrações da linhagem HD-1, as quais foram: 0,0 (testemunha-água); 9×10^7 (CL_{90} para linhagem HD-1) e 3×10^8 (concentração utilizada para teste de patogenicidade) esporos/mL. Estes bioensaios foram conduzidos com intuito de se observar a suscetibilidade deste inseto, desde o momento que o mesmo seria submetido a uma metodologia de criação igual à manutenção da criação estoque do laboratório.

É importante ressaltar que os bioensaios inicialmente foram em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, entretanto a mortalidade foi muita alta, quando comparada com os bioensaios conduzidos nos próprios recipientes plásticos usados na criação. Em cada recipiente foi manipulado 100 lagartas para cada concentração a ser testada de cada fonte de *B. thuringiensis* (Figura 1).

Os dados referentes às características biológicas foram submetidos à análise de variância, para posteriormente realizar a comparação de médias pelo teste de Tukey com probabilidade de 0,05%, em caso de significância; posteriormente foram apresentados em gráficos. Para estes dados também se realizou uma análise no

esquema fatorial, concentrações por diferentes gerações. Ambas as análises foram realizadas no programa SAS versão 9.0. Para determinadas concentrações e gerações foi realizada uma análise exploratória do tipo multivariada de agrupamento e componentes principais, com objetivo de interpretar a interação dos tratamentos em diferentes gerações. Os dados de mortalidade referentes aos insetos separados para analisar a suscetibilidade a partir da geração 15 também foram apresentados em gráficos, mediante a análise univariada.

Os dados referentes às concentrações letais na população suscetível e na população sensibilizada por pressão de seleção foram submetidos à análise de probit (FINNEY, 1971) pelo programa computacional Polo PC. Os gráficos foram elaborados por meio do programa SigmaPlot versão 9.

Tabela 1. Inclinação (média $\pm$ erro padrão) da curva, qui-quadrado (χ^2), graus-liberdade, CL₅₀ e probabilidade da curva concentração-mortalidade larval de *Plutella xylostella* para linhagem padrão de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamento	Inclinação ($\pm$ EP)	χ^2	GL	¹ CL ₅₀ (IC 95%)	P
Linhagem - HD-1	2,62 $\pm$ 0,3331	1,89 ^{ns}	7	6X10 ⁶ (0,098-0,27)	0,65

¹CL₅₀ – esporos/mL. IC= intervalo de confiança; P= probabilidade

Tabela 2. Tratamentos com *Bacillus thuringiensis* utilizados nos bioensaios nas diferentes gerações de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção.

OITAVA GERAÇÃO	
Tratamentos	Concentrações (esporo-cristal/mL)
HD-1	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$
TO8.024	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
Agree	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$
DÉCIMA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$
TO8.024	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$
Agree	3×10^8
	6×10^6
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$

Continuação...

DÉCIMA SEGUNDA GERAÇÃO	
Tratamento	Concentrações (esporo-cristal/mL)
HD-1, TO8.024 e Agree	3×10^8
	6×10^8
	$2,7 \times 10^7$
DÉCIMA TERCEIRA GERAÇÃO	
HD-1, TO8.024 e Agree	$2,7 \times 10^7$
DÉCIMA QUARTA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	$2,7 \times 10^7$
TO8.024 e Agree	$2,7 \times 10^7$
DÉCIMA QUINTA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	$2,7 \times 10^7$
DÉCIMA SÉTIMA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	$4,5 \times 10^7$
TO8.024	$4,5 \times 10^7$
Agree	$2,7 \times 10^7$
VIGÉSIMA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	$4,5 \times 10^7$
TO8.024 e Agree	$4,5 \times 10^7$
Agree	$2,7 \times 10^7$
VIGÉSIMA NONA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8 E 9×10^7
TRIGÉSIMA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
TRIGÉSIMA TERCEIRA E TRIGÉSIMA QUARTA GERAÇÃO	
HD-1	3×10^8
	$1,5 \times 10^8$

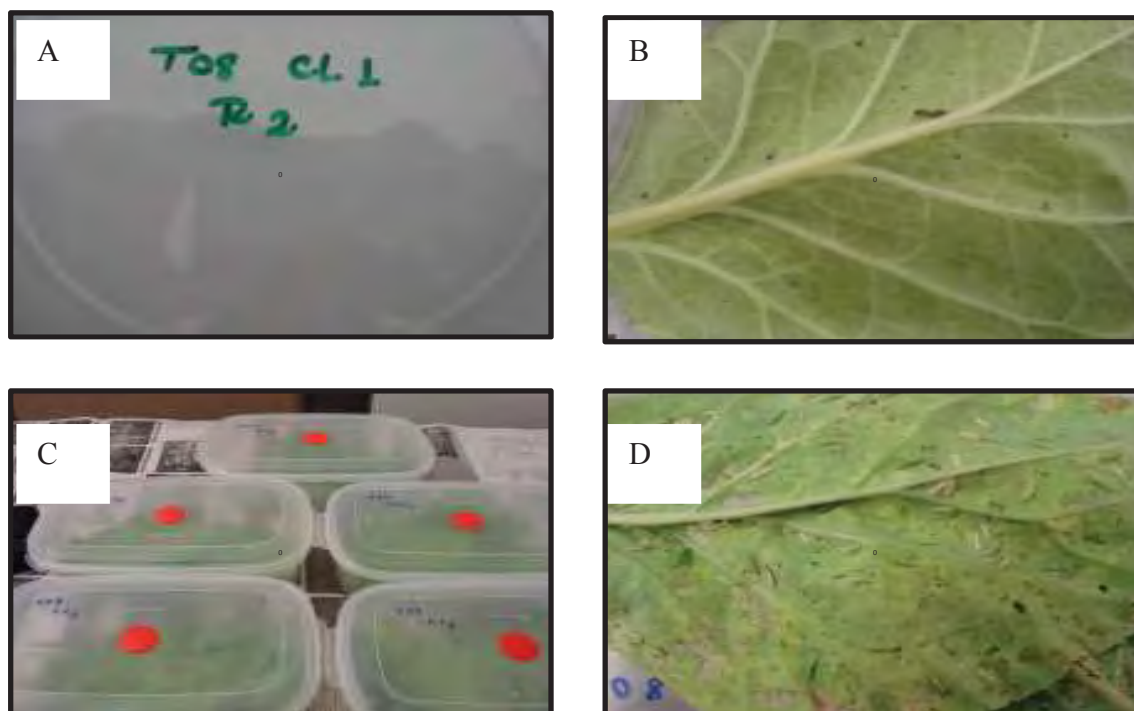


Figura 1. Recipientes para acondicionar a couve tratada para alimentação das lagartas de *Plutella xylostella* da população com pressão de seleção da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis*. A e B) Lagartas mortas (100%) em Placas de Petri com discos de couve tratados T08.024 na concentração de 3×10^8 esporos/mL; C e D) Recipientes plástico com folhas de couve tratadas com concentração de 3×10^8 esporos/mL, demonstrando que não houve mortalidade de 100% das lagartas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade observada para a concentração de 3×10^8 esporos/mL foi semelhante nas gerações 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 17 e 20, diferenciando da 29, que proporcionou mortalidade média de 47%. Esta mortalidade também diferiu da testemunha, que apresentou mortalidade natural igual a zero (Tabela 3). Fato este observado na maioria das gerações em que a pulverização foi água com espalhante adesivo, constituindo as testemunhas. A geração 20 como testemunha apresentou mortalidade média de 46,80%, diferindo das demais testemunhas como também do tratamento pulverizado com bactéria (Tabela 3), sendo que esta mortalidade é atribuída à condição de estresse dos insetos sob seleção.

A análise fatorial (Tabela 3) realizada entre as gerações e as concentrações 0,0 e 3×10^8 esporos/mL mostraram claramente que as gerações da população sob pressão de seleção com *B. thuringiensis* apresentaram mortalidade baixa ao ser comparada com o tratamento com a concentração 3×10^8 esporos/mL. Com esta análise foi possível visualizar que o inseto apresentava condições de sobrevivência diferenciada entre as gerações, independente da testemunha não receber pulverização com a bactéria, a qual foi composta por lagartas oriundas de uma geração que havia sido tratada com o *B. thuringiensis*, ou seja, estas lagartas provavelmente não são totalmente isentas da bactéria quando se compara com população totalmente suscetível. No geral, a mortalidade foi reduzida em relação à oitava geração, principalmente para a concentração de 3×10^8 esporos/mL, o que pode ser explicado pela condição biológica do inseto que está sob uma determinada seleção genética por vários ciclos de vida (Tabela 3). É importante ressaltar que a análise fatorial foi realizada apenas com estas duas concentrações, uma vez que as concentrações relacionadas no material e métodos não foram testadas na maioria das gerações, devido ao comportamento dos insetos. Nas concentrações abaixo de 3×10^8 esporos/mL não se observava efeito negativo, sendo que os mesmos apresentavam aspecto visual e comportamental semelhante ao da criação com pressão de seleção. No entanto, para as características biológicas avaliou-se uma série de concentrações, as quais não

foram as mesmas entre as gerações devido ao comportamento dos insetos; em concentração muito baixa, em determinada geração, não se observava efeito negativo, sendo que os mesmos apresentavam aspecto visual e comportamental semelhante aos da criação sob pressão de seleção.

Tabela 3. Mortalidade (%) de lagartas de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção a linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis* em esquema fatorial 2x2 (gerações do inseto x concentrações).

Concentrações (esporos/mL)	Gerações de <i>Plutella xylostella</i> sob pressão de seleção à bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>									
	8	10	11	12	14	15	16	17	20	29
0,00 ¹	16,66Ab	21,66Ab	0,00Ab	10,40Ab	1,40Ab	27,40Ab	18,40Ab	13,40Ab	46,80Aa	0,00Ab
3X10 ⁸	50,00Ba	80,00Ba	66,00Ba	100,00Ba	82,10Ba	64,20Ba	56,00Aa	66,40Ba	61,00Ba	47,00Bb

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

1-Testemunha= água com espalhante adesivo.

Os parâmetros peso pupal, duração larval, viabilidade e duração pupal foram submetidos à análise fatorial, interagindo a concentração de 3x10⁸ esporos/mL com a testemunha (água com espalhante) (Tabela 4). Nesta análise pode observar que a duração larval foi muito influenciada pelos tratamentos, pois o maior período ocorreu com lagartas da geração 8 (9,75 dias) diferindo-se das gerações 10, 11, e 12. Ao ser comparado com a testemunha da mesma geração, também se observou diferença significativa, com uma menor duração (7,58 dias) (Tabela 4). Dentro das gerações para o tratamento sem esporos/mL, verificou-se que a geração 14 apresentou maior período larval (9,12 dias). Entretanto, as lagartas que tiveram maior duração não apresentaram maior peso pupal, porque permaneceram em contato com o substrato alimentar tratado com bactéria, porem, não consumiram para acumular massa corpórea na fase de pupa (Figura 2).

A análise de componentes principais proporcionou uma visão ampla do comportamento das características biológicas em relação a este dois tratamentos. Por esta análise, a duração larval da oitava geração, que foi uma das maiores para a concentração de 3x10⁸ esporos/mL, ficou no extremo do quadrante direito do gráfico,

distanciando-se totalmente das demais características biológicas. Este mesmo tratamento apresentou peso pupal reduzido (4,0 mg), fato este observado para geração 14, em que o peso foi em média de 3,6 mg. Provavelmente, neste tratamento as lagartas não se alimentaram o necessário para acumular reservas nutritivas para a fase de pupa (Figura 2). As outras características biológicas, como a viabilidade, peso e duração pupal, viabilidade larval e a razão sexual, apresentaram comportamento semelhante em relação aos tratamentos, se posicionando no lado oposto ao da duração larval, parâmetro este que mais foi afetado. Apenas, para enfatizar, os números 1, 3, 5 e 7 se referem à testemunha e, em especial o 5, está muito próximo do vetor peso pupal, sendo este tratamento a geração 11 testemunha com média de peso pupal 6,11 mg, valor muito maior ao apresentado pela gerações 8 e 14 (Figura 2).

Tabela 4. Médias das características biológicas de lagartas de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção a linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis* em esquema fatorial 2x2 (gerações do inseto x concentrações).

Concentrações (esporos/mL)	Gerações de <i>Plutella xylostella</i> sob pressão de seleção à bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>				
	8	10	11	12	14
Peso pupal (mg)					
0,00	4,75Aa	4,93Aa	6,108Aa	5,8Aa	5,14Aa
3X10⁸	3,45Aa	5,46Aa	5,14Aa	0,00Bb	3,66Aa
Duração larval (dias)					
0,00	7,58Ab	8,30Ab	8,00Ab	8,00Ab	9,12Aa
3X10⁸	9,75Ba	8,25Ab	8,00Ab	0,00Bc	8,94Aa
Viabilidade pupal (%)					
0,00	81,77a	92,45a	91,11a	85,12a	86,40 ^a
3X10⁸	37,50a	100,00b	83,34ab	0,00c	55,80 ^a
Duração pupal (dias)					
0,00	3,60Aa	3,25Aa	4,03Aa	3,57Aa	3,20Aa
3X10⁸	3,90Aad	3,38Aad	4,00Ad	0,00Bc	3,20Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

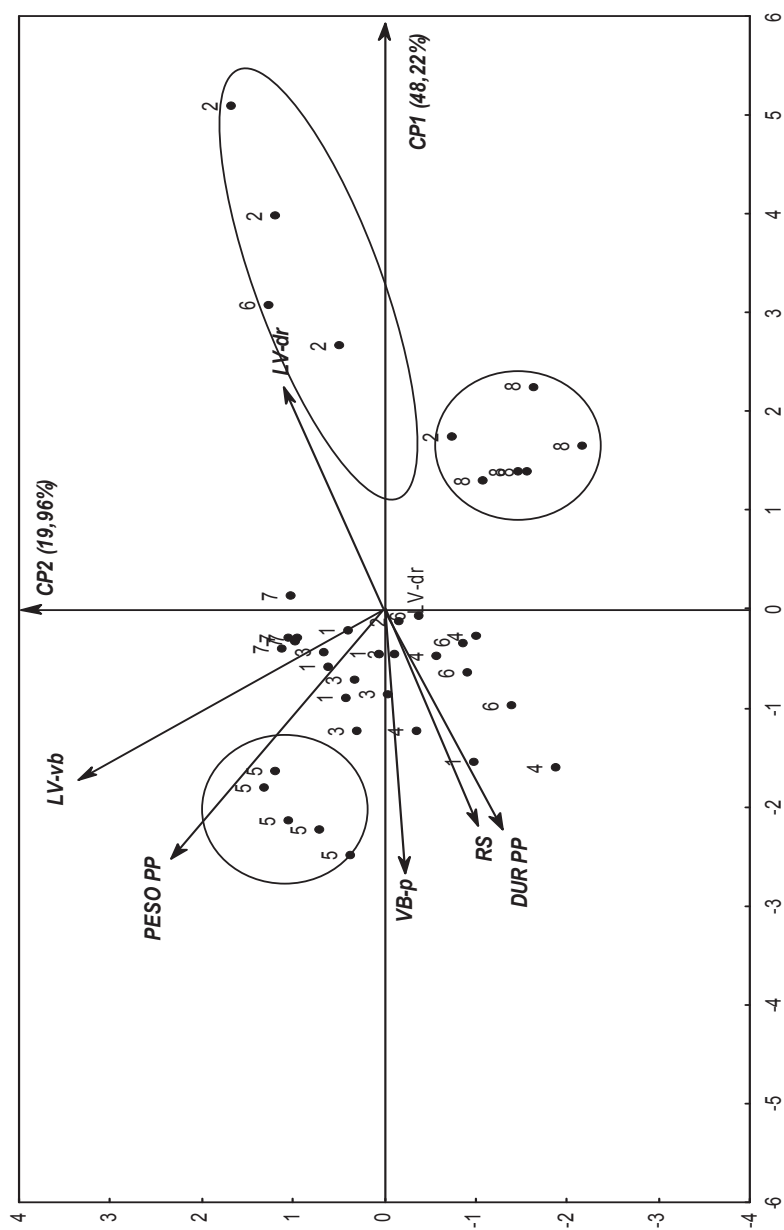
n=100 (número total de insetos para cada tratamento).

A análise exploratória do tipo componentes principais foi uma ferramenta fundamental para mostrar como os aspectos biológicos das gerações sob pressão de seleção se interagiram. Esta interação elucida a hipótese de que esta população, provavelmente, tenha alguma alteração fisiológica, condição relatada nos trabalhos realizados por LEE et al. (1995).

O dendrograma, resultado da análise de agrupamento, relacionou outras concentrações nas diferentes gerações, a partir do parâmetro mortalidade larval, com base nos dados da Tabela 5 (Figura 3). Esta análise também foi usada como ferramenta para demonstrar a variação que ocorre na biologia do inseto em diferentes gerações e quando são expostas às concentrações variadas, inclusive variando o perfil gênico do *B. thuringiensis*. O isolado T08, nas duas concentrações, ficou no grupo três juntamente com a concentração de 9×10^7 esporos/mL da linhagem HD-1 (Figura 3). Este grupo manteve-se a maior distância euclidiana do grupo um, onde se encontram a testemunha e o tratamento com concentração $2,7 \times 10^7$ esporos/mL da linhagem HD-1 (Figura 3). O isolado T08 apresentou um potencial inseticida muito variado o que pode está diretamente relacionado com a expressão dos genes responsáveis pela síntese das mesmas proteínas da linhagem HD-1 (VIANA et al., 2009). Dessa forma esta complexidade gênica pode estar relacionada com o comportamento de mortalidade entre as gerações. Este grupo reuniu os tratamentos ao longo das gerações que apresentaram perfil de mortalidade semelhante, ou seja, seriam iguais em análise univariada (Figura 3).

O grupo 2 reuniu não somente concentrações da linhagem HD-1 como também do produto comercial Agree®, sendo que o comportamento de mortalidade entre as gerações foi muito semelhante, apresentando como média geral 76,00% (Tabela 5). São tratamentos diferentes com concentrações variadas, porém, o perfil de mortalidade ocasionado por eles nas gerações foi muito próximo, sendo alta a mortalidade nas primeiras gerações com redução significativa nas últimas, devido elas apresentarem biologia alterada pelas sucessivas pulverizações para se efetivar a pressão de seleção refletida nos tratamentos de cada grupo (Figura 3).

O importante deste dendrograma é observar que o comportamento da mortalidade foi o fator responsável pelas distâncias euclidianas, refletindo as alterações biológicas e comportamentais de cada geração da *P. xylostella* sob pressão de seleção com *B. thuringiensis*, e que esta seleção não ocorre de forma logarítima ou em progressão geométrica, respondendo o inseto diferenciadamente às pressões (Tabela 5). Além de estar sob constante pulverização da bactéria, os indivíduos também estão expostos as variações climáticas, uma vez que, mesmo em ambiente de laboratório, com o máximo de controle, há influência da condição externa; outro fator que também influencia é a manipulação da população, pois insetos tratados são “doentes”, ou melhor, “sensíveis” em relação à população suscetível (Figura 3).



*CP1 e 2 – Componentes Principais. VB- p= Viabilidade Pupal; LV-vb=Viabilidade Larval; LV-dr = Duração Larval; DUR PP= Duração Pupal; RS= Razão Sexual; PESO PP= Peso de Pupas; Números (1, 3, 5, 7)=testemunhas nas gerações 8, 10, 11, 14 na concentração de 0,0 esporos/mL; e os Números (2, 4, 6 e 8) = tratamento com HD-1 na concentração de 3×10^8 esporos/mL para as gerações 8, 10, 11, 14.

Figura 2. Distribuição dos tratamentos (bactéria x concentração x gerações e testemunha x concentrações) mediante a análise de componentes principais de agrupamento, de acordo com as características biológicas avaliadas para *Plutella xylostella* sob pressão de seleção com a linhagem padrão HD-1 de *B. thuringiensis*.

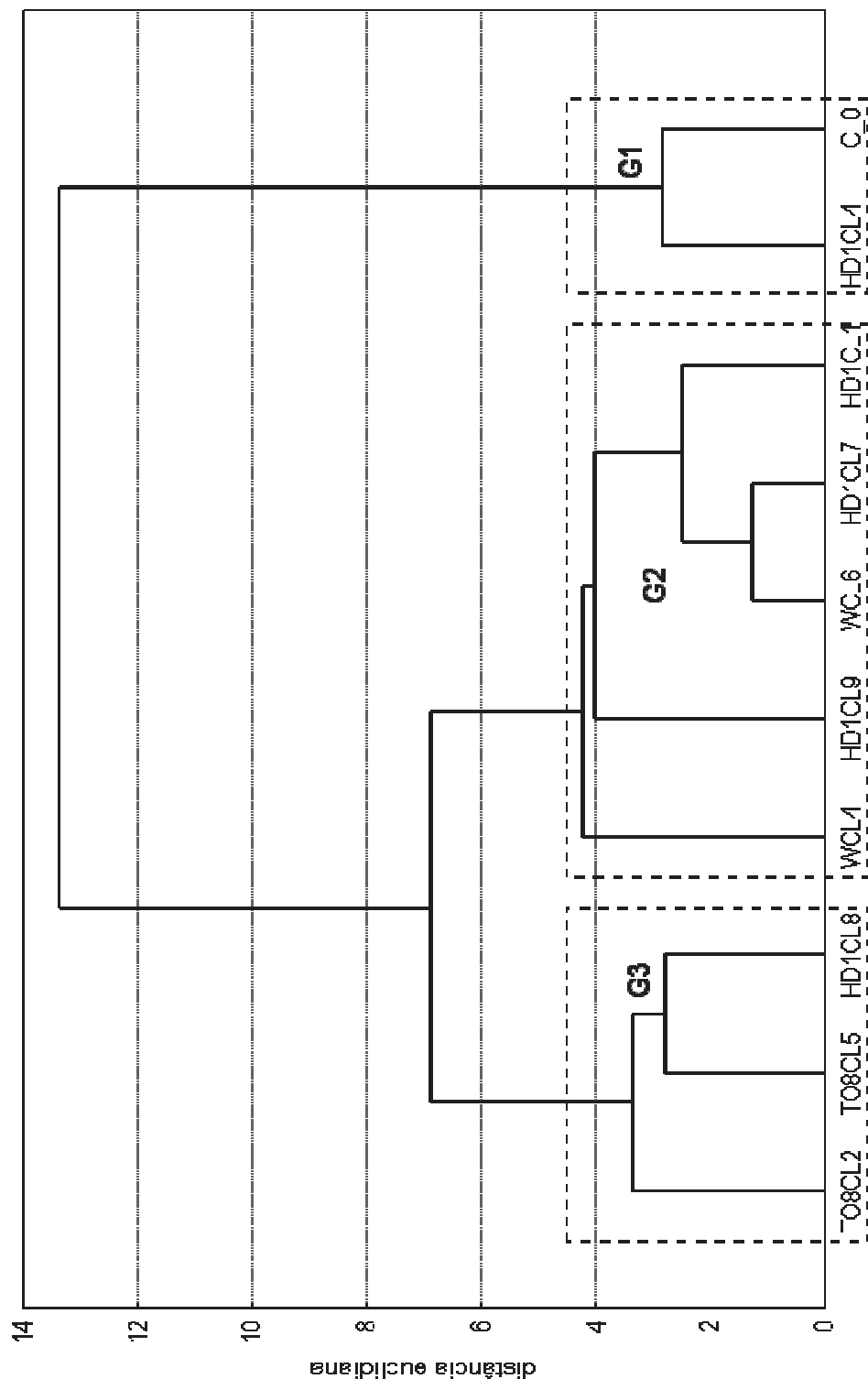


Figura 3. Dendrograma resultante da análise multivariada mostrando a estrutura de grupos de mortalidade em função das concentrações com e sem bactéria para lagartas de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção a linhagem padrão HD-1 de *B. thuringiensis*. C_0= testemunha com água mais espalhante adesivo; HD1CL 1= 3×10^8 , HD1CL 4= $2,7 \times 10^7$, HD1CL 7= $4,5 \times 10^7$, HD1CL 8= 9×10^7 e HD1CL 9= $1,5 \times 10^8$, T08.024CL2= 6×10^6 , T08.024CL5= 7×10^7 , WCL4= $4,5 \times 10^7$, WCL6= 9×10^7 esporos/mL. T08.024= isolado de *B. thuringiensis*, HD1= linhagem padrão de *B. thuringiensis*, W= produto comercial Agree®.

Tabela 5. Média de mortalidade (%) de lagartas de *Plutella xylostella* em diferentes gerações com pressão de seleção da linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis*, quando alimentadas com folhas de couve tratadas com as diferentes concentrações da bactéria.

Concentração	8	10	12	13	14	15	16	17	20	29	30	33	Média
(esporos/mL)													(%)
C_0	16,67	21,66	10,40	11,80	15,00	27,40	18,40	13,40	46,80	5,00	5,00	4,00	16,30
HD1CL1	60,00	58,33	100,00	98,00	82,16	64,20	56,00	66,40	61,00	47,00	45,00	51,00	65,76
HD1CL4	48,67	36,67	26,00	24,20	62,40	8,20	7,00	6,00	7,00	5,00	5,60	10,90	20,64
HD1CL7	100,00	100,00	100,00	100,00	78,00	76,00	80,00	70,00	67,60	60,00	55,00	48,00	77,88
HD1CL8	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	87,00	79,00	63,00	46,00	10,20	16,00	8,00	67,43
HD1CL9	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	97,00	95,00	82,33	86,45	12,60	89,45
TO8CL2	84,67	33,33	100,00	66,67	65,00	43,56	45,00	31,00	24,56	17,80	15,00	17,00	45,30
TO8CL5	100,00	100,00	100,00	100,00	86,00	62,00	17,40	29,80	62,40	38,00	23,34	14,00	61,08
WCL4	100,00	20,00	100,00	44,00	68,90	49,00	56,00	69,40	94,00	84,00	62,67	56,00	67,00
WCL6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	93,00	62,00	72,00	60,00	58,90	62,33	51,10	79,84

***Legenda:** C_0= testemunha com água mais espalhante adesivo; HD1CL 1= 3×10^8 , HD1CL 4= $2,7 \times 10^7$, HD1CL 7= $4,5 \times 10^7$, HD1CL 8= 9×10^7 e HD1CL 9= $1,5 \times 10^8$ esporos/mL, T08.024CL2= 6×10^6 , T08.024CL5= 7×10^7 , WCL4= $4,5 \times 10^7$, WCL6= 9×10^7 . T08.024= Isolado de *B. thuringiensis*, HD1= Linhagem padrão de *B. thuringiensis*, W= produto comercial Agree®.

As características biológicas foram submetidas à análise univariada para cada geração, onde os tratamentos foram as diferentes concentrações do isolado T08.024, da linhagem HD-1 e do produto comercial Agree[®]. É importante ressaltar que estes parâmetros foram avaliados para as gerações 8, 10, 12, 13 e 14. De modo geral a viabilidade larval das gerações 8, 10, 12 e 14 foi influenciada pelas concentrações das diferentes fontes de *B. thuringiensis* (Figura 4, 5, 6, 7 e 8). Entretanto, a geração 8 não apresentou diferença para as concentrações $2,7 \times 10^7$; 6×10^6 e 3×10^8 esporos/mL de HD-1, proporcionando o mesmo número de lagartas vivas até a formação de pupas (Figura 4). Entretanto, nas demais gerações a viabilidade larval para concentração de 3×10^8 esporos/mL foi reduzida em relação a geração 8 (Figuras 8, 9 e 10). Na geração 10 a concentração de $6,7 \times 10^8$ esporos/mL proporcionou viabilidade larval próxima de 40%, sendo esta concentração relativamente alta para linhagem HD-1 como a utilizada no produto comercial Dipel[®] (Figura 5). Assim, a sobrevivência elevada para esta concentração provavelmente é resposta da seleção de indivíduos com característica de resistência na população com 10 gerações de pressão de seleção. Inclusive nesta geração este parâmetro foi significativamente igual entre a testemunha e as concentrações $2,7 \times 10^7$, 6×10^6 e 3×10^8 esporos/mL da linhagem HD-1 (Figura 5).

As concentrações $2,7 \times 10^7$ e 6×10^8 esporos/mL de Agree[®] para viabilidade larval na geração 10 foram semelhantes à testemunha (Figura 5). Na composição do produto existem proteínas que também compõem a linhagem HD-1, podendo a similaridade estar relacionada com a sensibilidade dos insetos a tais proteínas; a variedade *aizawai* pode ocasionar a morte das lagartas de forma diferenciada, uma vez que apresenta proteínas com diferentes sítios de ação no intestino médio dos insetos. No entanto, os indivíduos desta população estão demonstrando que suporta este modo de ação, da mesma forma que responde aos tratamentos com a linhagem HD (Figura 5).

A viabilidade para geração 12 foi igual entre testemunha e linhagem HD-1, também houve semelhança entre o isolado T08.024 e a var. *aizawai* (Figura 6); apresentando perfis genéticos bem variados. A concentração de 3×10^8 esporos/mL proporcionou menos de 50% de viabilidade larval, como ilustrado na Figura 8-C, entretanto, a mortalidade da testemunha foi próxima de 100%, o que leva a concluir que

esta geração apresentou maior suscetibilidade a este tratamento. Na concentração de $2,7 \times 10^7$ esporos/mL que foi utilizada na pulverização para se obter a pressão de seleção desta geração, também ocasionou menos de 20% de lagartas vivas (Figura 6). Este fato é fundamental para relatar como o comportamento do inseto é variável em relação a cada geração, pois como comentado para a geração anterior, apresentou altos valores de viabilidade para estas concentrações. Dessa forma a sensibilidade desta população pode ser considerada particular de cada geração, pelo menos até a geração 14, a qual apresentou maior porcentagem de lagartas vivas para concentração de 3×10^8 esporos/mL (Figura 7).

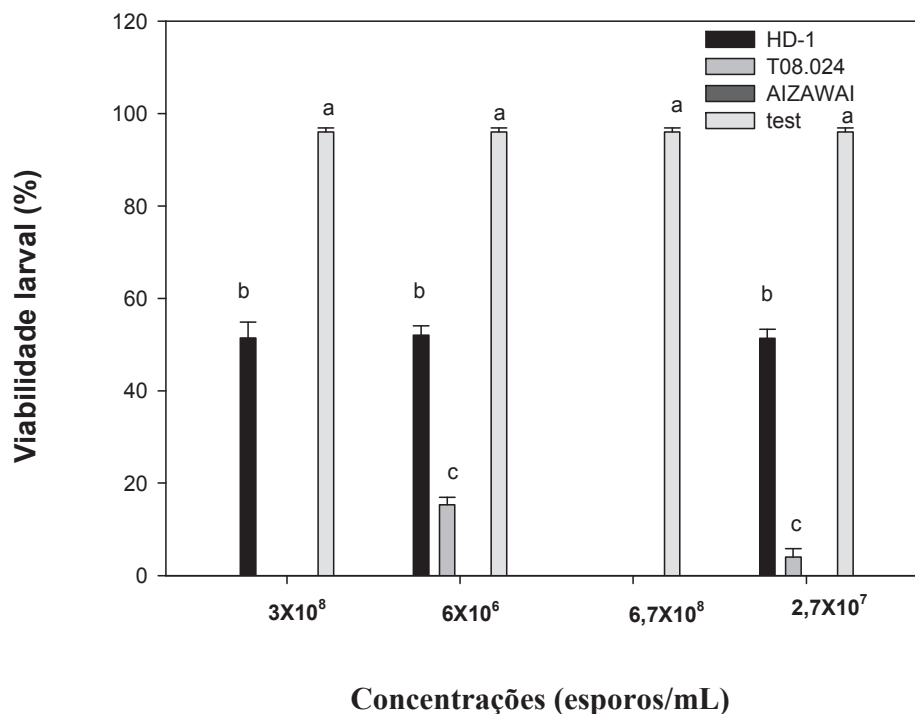


Figura 4. Viabilidade larval ($\pm$ EP) de lagartas da oitava geração de *Plutella xylostella* com pressão de seleção da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* expostas a diferentes concentrações desta bactéria. TEST= lagartas da população sob seleção de resistência que se alimentaram de folhas de couve não pulverizadas com a bactéria; HD-1= linhagem padrão de *B. thuringiensis*; T08= isolado desta bactéria, Aizawai = produto comercial Agree[®].

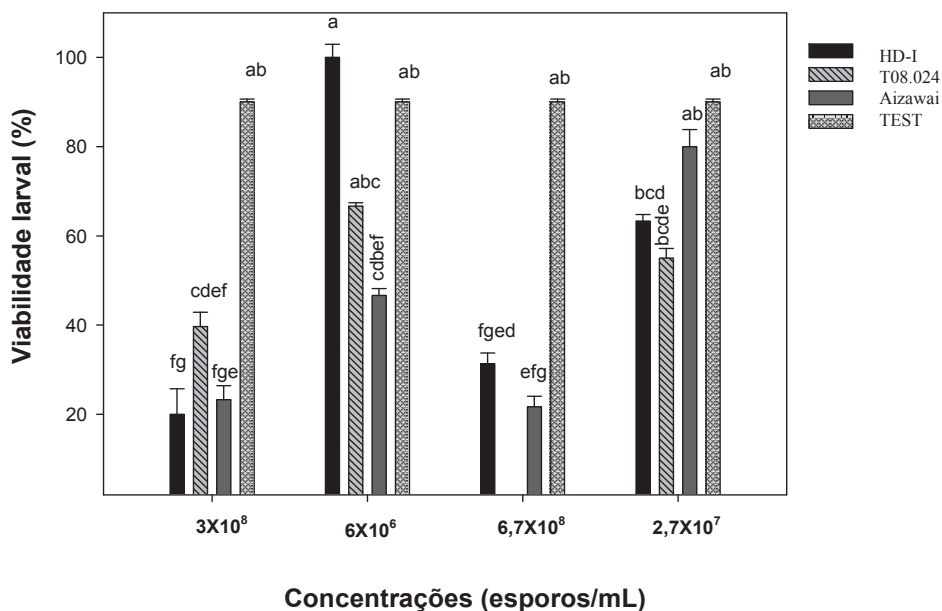


Figura 5. Viabilidade larval ($\pm$ EP) de lagartas da décima geração de *Plutella xylostella* com pressão de seleção da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* expostas a diferentes concentrações desta bactéria. TEST= lagartas da população sob seleção de resistência que se alimentaram de folhas de couve não pulverizadas com a bactéria; HD-1= linhagem padrão de *B. thuringiensis*; T08= isolado desta bactéria, Col 8 = Aizawai = produto comercial Agree®.

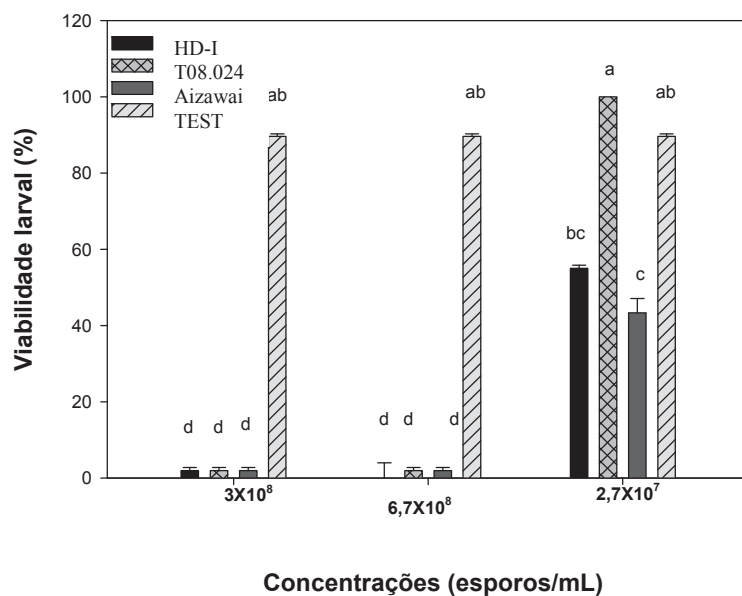


Figura 6. Viabilidade larval ($\pm$ EP) de lagartas da décima segunda geração de *Plutella xylostella* com pressão de seleção da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* expostas a diferentes concentrações desta bactéria. TEST= lagartas da população sob seleção de resistência que se alimentaram de folhas de couve não pulverizadas com a bactéria; HD-1= linhagem padrão de *B. thuringiensis*; T08= isolado desta bactéria, Aizawai= produto comercial Agree®.

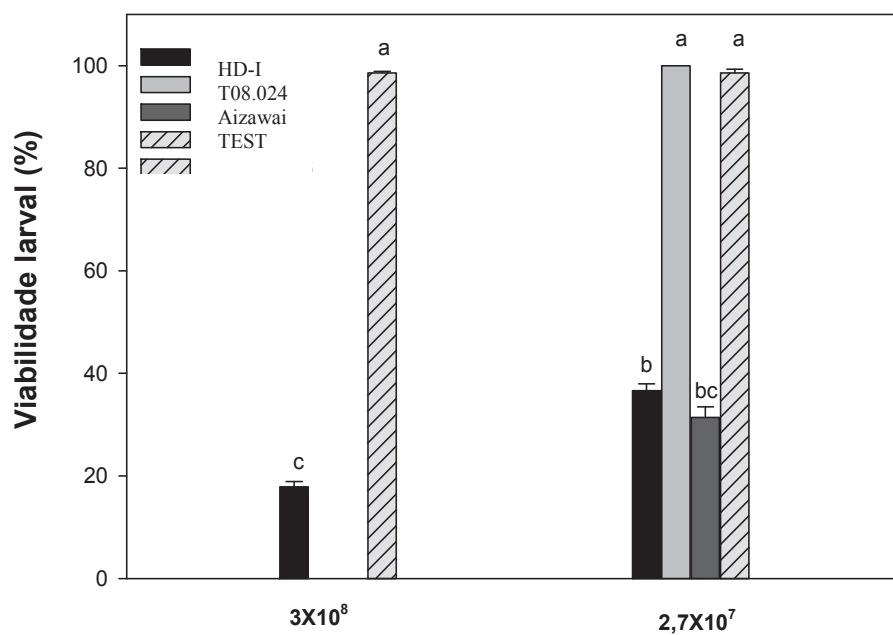


Figura 7. Viabilidade larval ($\pm$ EP) de lagartas da décima quarta geração de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção a linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* expostas a diferentes concentrações desta bactéria. TEST= lagartas da população sob seleção de resistência que alimentaram-se de folhas de couve não pulverizadas com a bactéria; HD-1= linhagem padrão de *B. thuringiensis*; T08= isolado desta bactéria, Aizawai= produto comercial Agree®.

A testemunha da geração 11 apresentou mortalidade zero para a concentração de 3×10^8 esporos/mL, o que não ocorreu para a testemunha composta por lagartas suscetíveis da criação estoque do laboratório, como está ilustrado na Figura 8. As lagartas apresentaram um aspecto verde claro brilhante, como se não fossem oriundas de gerações anteriores tratadas com a bactéria, as quais estão representadas de forma ilustrativa na Figura 8-E. Estas constatações também são observadas para os tratamentos com isolado T08, o Agree[®] e com a linhagem padrão HD-1, que além de proporcionarem maior número de lagartas vivas após se alimentarem dos referidos tratamentos, foi possível observar a formação de pupas. Este resultado está ilustrado na Figura 9.

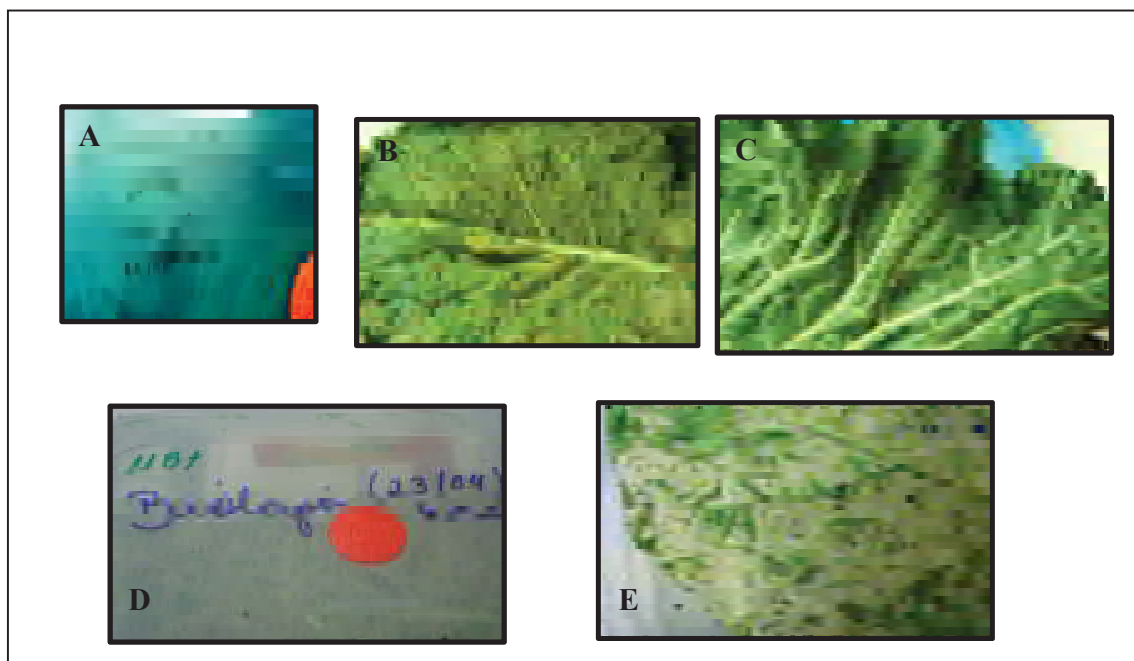


Figura 8. Imagens ilustrativas da comparação do bioensaio com lagartas da população suscetível após se alimentarem de folhas tratadas com a concentração de $3,0 \times 10^8$ esporos/mL (A, B e C) e com lagartas com onze gerações de pressão de seleção com a linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* (D e E). As imagens A e D referem-se ao tratamento que esta apresentado nas demais imagens.

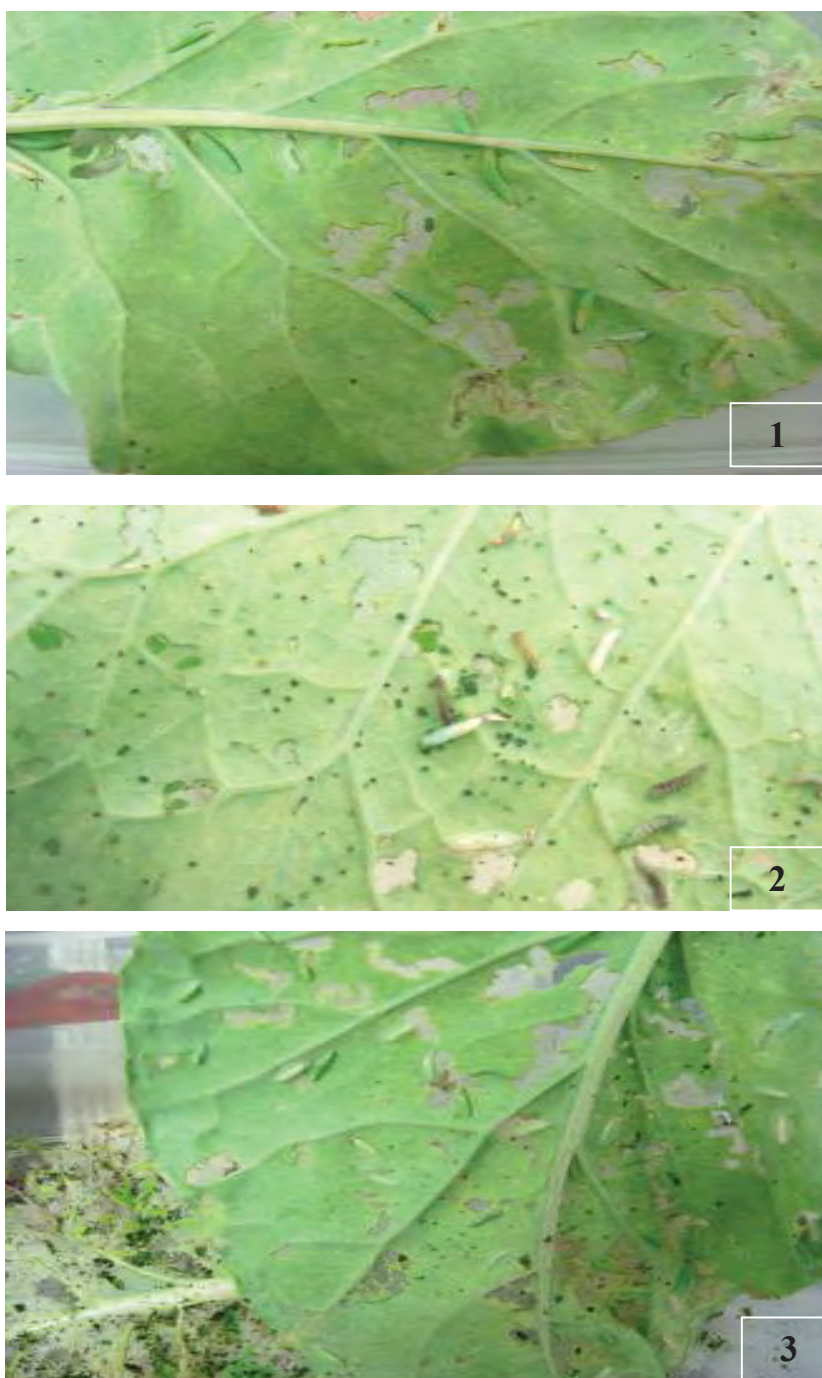


Figura 9. Imagens ilustrativas de lagartas de *Plutella xylostella* com onze gerações de pressão de seleção com a linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* alimentadas com folhas de couve tratadas com diferentes concentrações de *B. thuringiensis*. Tratamentos T08 = isolado de *B. thuringiensis* na concentração de 6×10^8 , Agree® = produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* na concentração de 3×10^8 esporos/mL, HD-1 = linhagem padrão de *B. thuringiensis* concentração de 3×10^8 esporos/mL.

Os bioensaios com intuito de observar a suscetibilidade da população composta por insetos oriundos da geração 15 demonstraram que o perfil de suscetibilidade pode ser observado mais rapidamente que a característica de resistência, pois com seis gerações a população denominada como suscetível, a partir da sensibilização pela pressão de seleção, apresentou um perfil de suscetibilidade total aos tratamentos com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (linhagem padrão HD-1) como ilustrado na Figura 10. As imagens referentes aos bioensaios mostraram claramente como as lagartas variaram o aspecto visual entre as gerações mediante a concentração 3×10^8 esporos/mL, sendo que a geração 3 e 4 apresentaram grande número de pupas (Figura 10-A). Entretanto na geração 6 a mortalidade foi de 100%, tal fato está ilustrado pela Figura 10-C, onde mostra as lagartas mortas e o tecido vegetal das folhas praticamente sem danos causados pela alimentação. Bioensaios foram conduzidos até a nona geração, porém sempre com mortalidade de 100%, para as concentrações testadas, inviabilizando a manutenção da população, porque a mesma apresentava-se altamente suscetível, igualando-se à população estoque do laboratório.



Figura 10. Imagens ilustrativas de lagartas de *Plutella xylostella* em condições de suscetibilidade a partir da décima quinta geração sob pressão de seleção, as quais se alimentavam de folhas tratadas com concentração de $3,0 \times 10^8$ esporos/mL da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis*. A) geração 3 de suscetibilidade; B) geração 4 de suscetibilidade; C) geração 6 de suscetibilidade.

A vigésima geração após sucessivas aplicações de *B. thuringiensis* apresentou indícios de resistência, devido à redução na mortalidade. Dessa forma, há possibilidade de uma variação no organismo do inseto, haja vista, que sob frequente pressão de seleção, expõe o indivíduo à constantes mudanças, o que pode vir a caracterizar uma resistência a ação entomopatogênica desta bactéria (Figura 11).

Dessa forma, as gerações estudadas apresentaram perfil variado quanto aos tratamentos com a bactéria *B. thuringiensis* (Figura 11); provavelmente esta variação pode estar associada a um complexo de fatores, como: condição biológica de cada indivíduo da população em cada geração, em que no momento da cópula pode ser transferida a informação genética responsável pela característica de menor suscetibilidade à ação da bactéria.

A porcentagem de mortalidade depende muito da condição em que o inseto se encontra, pois na geração 11 ocorreu alta viabilidade larval, e na geração 12 foi o oposto; outro fator também comentado, o manuseio da população associado às variações que ocorrem na temperatura e umidade, que existe, apesar do controle em laboratório o inseto demonstra por meio de variações no ciclo biológico às variações externas; também se pode considerar um fator, ou melhor, talvez seja o mais questionado, a suspensão esporo mais cristal da linhagem HD-1, que cada vez que é preparada pode conter enzimas, proteínas, resíduos de meio e outras fontes que podem influenciar a pressão e na suscetibilidade de cada geração; os tratamentos utilizados nas diferentes concentrações também apresentam perfil gênico extremamente variado.

Assim, são vários fatores que podem influenciar o padrão de resistência, ou seja, a sensibilidade do inseto à suspensão bacteriana, pois com base nestes dados biológicos não se tem uma comprovação real do parâmetro resistência. Entretanto, pode está ocorrendo uma pressão de seleção nesta população a partir do comportamento da mortalidade desde a primeira geração até a geração 33 (Figura 11).

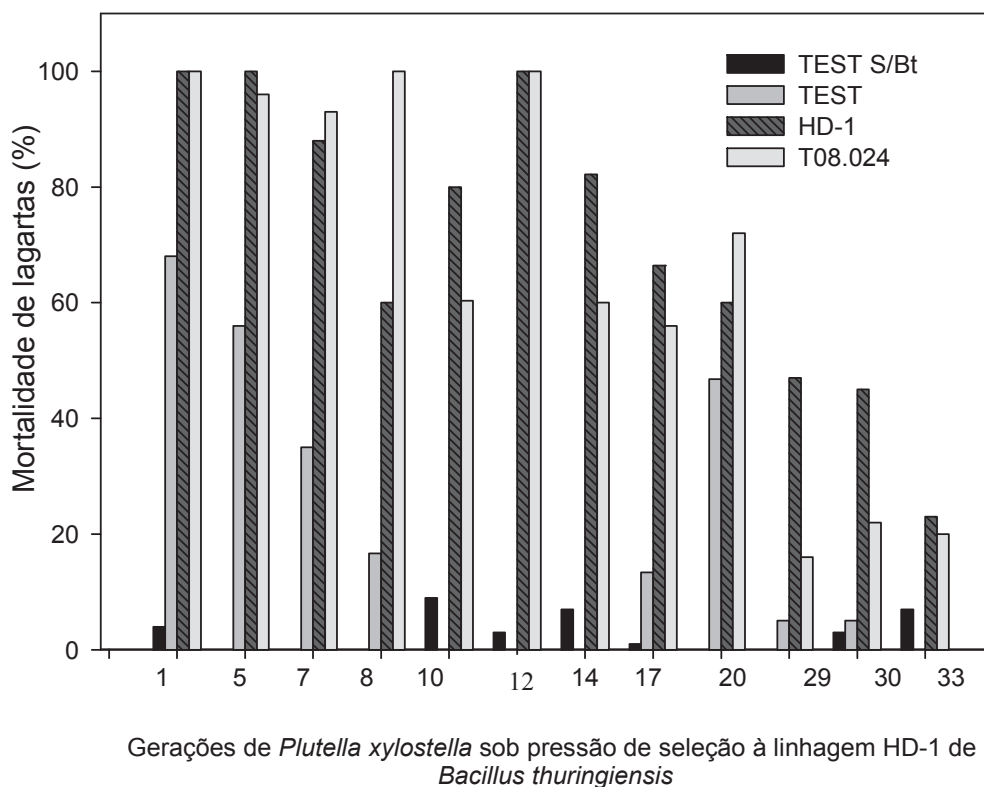


Figura 11. Médias de mortalidade de lagartas de gerações de *Plutella xylostella* sob pressão de seleção a linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* expostas a diferentes tratamentos: TEST= lagartas da população suscetível; TEST S/Bt= lagartas da população sob seleção de resistência; HD-1= linhagem padrão de *B. thuringiensis* var *kurstaki*; T08= isolado desta bactéria. Tratamentos com HD-1 e T08 foram com a concentração de 3×10^8 esporos/mL.

A geração 33 foi utilizada como padrão para realizar o cálculo estimativa da CL_{50} pelo programa probit e também para a população suscetível do laboratório (a estoque), para comparar quantas vezes a população sob pressão de seleção apresenta resistência em relação à estoque. A concentração que causa 100% de mortalidade da suscetível é de $1,5 \times 10^8$ esporos/mL (Tabela 5 e Figuras 12, 13 e 14). A concentração letal determinada na geração 33 proporcionou uma razão de resistência de 250 vezes, ou seja, a razão entre a CL_{50} da resistente nesta geração pela CL_{50} da suscetível demonstrou que a população possivelmente esta 250 vezes mais sensibilizada quanto a resistência a linhagem HD-1 (Figuras 12, 13 e 14).

A partir desta geração se faz necessário a análise molecular dos insetos, inclusive análise da membrana do trato intestinal por meio da técnica BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"), para comprovar as variações nos sítios receptores do epitélio intestinal. Por outro lado, é importante fazer análise da suspensão utilizada nas pulverizações da pressão de seleção, com a finalidade de se conhecer um pouco mais das substâncias envolvidas no processo de seleção. Sendo assim, ensaios de campo diante das condições climáticas reais e estudos com outros isolados e também produtos a base de entomopatógenos para constatar a resposta destes insetos a outros fatores são fundamentais para embasar ainda mais a discussão deste trabalho. Inclusive fazer pesquisa com retro cruzamentos e observar o padrão da resistência em gerações futuras.

Estudar a origem da resistência dos insetos, no caso específico da *P. xylostella*, que apresenta com facilidade indivíduos com esta característica em diferentes cultivos do mundo, tem sido alvo de diversos grupos de pesquisadores. Alguns defendem mecanismo de resistência do tipo cruzada e recessiva (refere-se aos alelos dos genes envolvidos). Outros questionam e estudam a possibilidade de ocorrência da modificação da toxina junto ao gene receptor no trato digestivo do inseto. Estas condições foram exploradas por trabalhos para proteína Cry1A, onde a resistência do inseto pode ocorrer em níveis altos e de forma recessiva, tanto para uma como para várias formas da toxina. Porém, a resistência cruzada para toxina Cry1C em relação ao receptor da toxina Cry1A na membrana do intestino do corpo do inseto pode não

acontecer, ou se ocorrer, será muito pequena. Contudo, esta afirmação foi diagnosticada em populações do Hawaí, USA, e para dois países asiáticos, em que é comum o “locus”, ou seja, o receptor no trato digestivo do inseto é igual para estas duas proteínas (TABASHNIK et al., 1998; ZHAO et al., 2003; BAXTER et al., 2005). Entretanto, como a resistência à toxina Cry1Ac ainda é muito questionada devido aos mecanismos de ação, há autores que defendem outro fator que pode influenciar o mecanismo de resistência a esta toxina, a modificação da proteína encontrada nos genes receptores (BAXTER et al., 2008).

Portanto, da mesma forma que a resistência é difícil de ser selecionada em laboratório, também é extremamente complexo os estudos para diagnosticar a procedência genética da mesma. Como já foi relatado, vários fatores estão envolvidos nesta complexidade, por exemplo, o modo de ação das toxinas, sendo que algumas hipóteses podem ser consideradas, como a mudança na conformação dos receptores, pH intestinal menos alcalino impedindo a solubilização do cristal, proteases intestinais incapazes de digerir ou ativar as δ -endotoxinas ou então muito eficazes, que poderiam digerir totalmente a protoxina, e também a hipersensibilidade dos indivíduos-alvo (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Assim, o estudo da pressão de seleção de lagartas de *P. xylostella* em laboratório sob ação da linhagem HD-1 de *B. thuringiensis* constituiu um passo fundamental para agilizar resultados moleculares dos mecanismos de resistência, no sentido de elaborar táticas de controle que possam variar as toxinas desta bactéria que não apresentem o mesmo mecanismo de ação. Uma vez que, estudos desta natureza a partir de insetos com característica de resistência oriundos de plantios comerciais em que se praticam indiscriminadamente as táticas de controle podem constituir um passo mais longo, ou seja, influenciar no tempo para as respostas moleculares. Pois ao coletar insetos com esta característica e em quantidade para multiplicar em laboratório também representa outro fator limitante. Por isso que desenvolver metodologias em laboratório para pressão de seleção de determinado inseto torna-se essencial em estudos de manejo de resistência de insetos. Dessa forma esta pesquisa proporcionou

bases metodológicas para estudos com outros insetos que apresentam problemas de resistência em campo.

Tabela 5. Valores da inclinação (média $\pm$ erro padrão) da curva, qui-quadrado (χ^2), graus-liberdade (GL), CL₅₀ e probabilidade da curva concentração-mortalidade (P) larval de *Plutella xylostella* suscetível e *P. xylostella* com 33 gerações sob pressão de seleção a linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis*.

TRATAMENTO	Inclinação ($\pm$ EP)	χ^2	GL	¹ CL ₅₀ (IC 95%)	P	1 C L
SUSCETÍVEL ²	1,1717 $\pm$ 0,1185	2,46 ^{ns}	6	7X10 ⁵ (0,001-0,1700)	0,61	5
RESISTENTE ³	1,07 $\pm$ 0,9906	8,21 ^{ns}	8	1,2X10 ⁸ (0,031-0,40)	0,59	0 —
RAZÃO DE RESISTÊNCIA				250x		e
(CL50_R/CL50_S)						s

poros/mL, ns – não significativo; ² = lagartas suscetíveis e ³ = lagartas resistentes, ou seja, sob pressão de seleção com *B. thuringiensis* por 33 gerações.

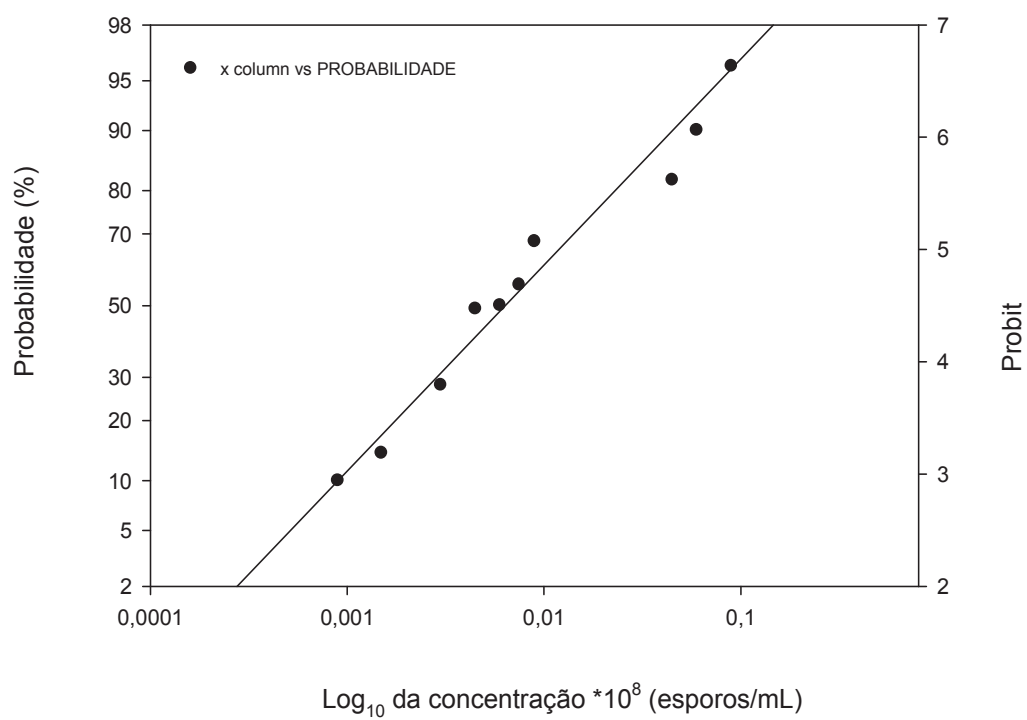


Figura 12. Curva de concentração-resposta da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para lagartas suscetíveis de *Plutella xylostella*.

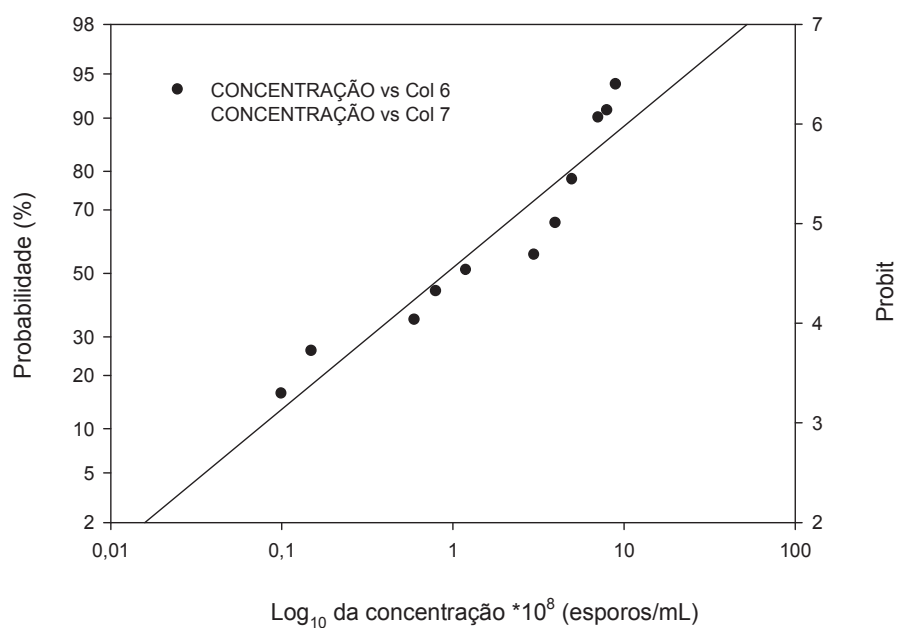


Figura 13. Curva de concentração-resposta da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para lagartas de *Plutella xylostella* com 33 gerações sob pressão de seleção.

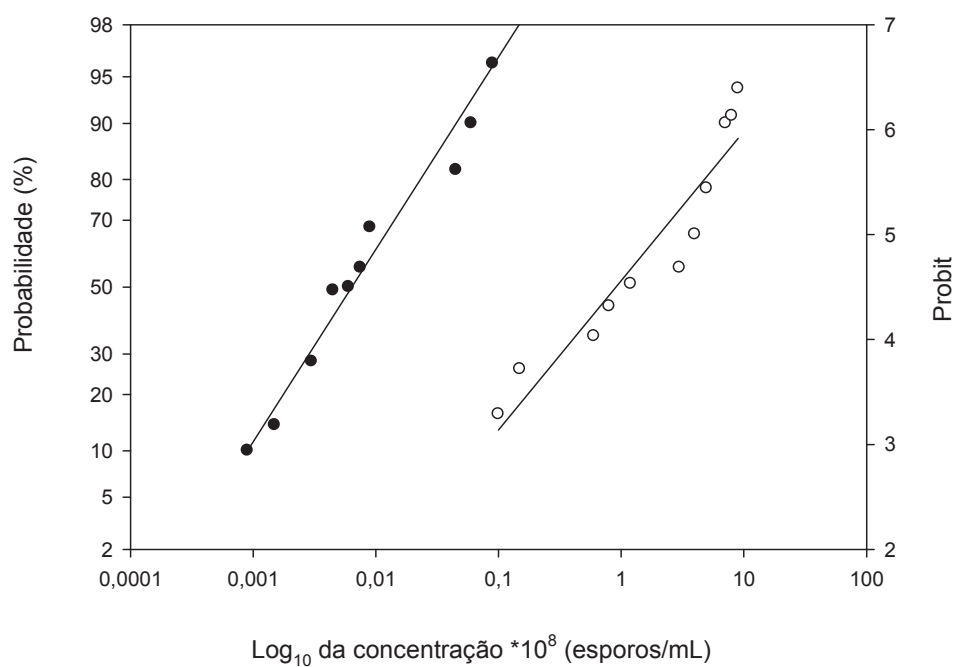


Figura 14. Curvas de concentração-resposta da linhagem HD-1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para lagartas de *Plutella xylostella* suscetíveis e com 33 gerações sob pressão de seleção.

REFERÊNCIAS

- BARROS, R.; ALBERT-JÚNIOR, I. B.; OLIVEIRA, A. J.; SOUZA, A. C. F., LOGES, V. Controle químico da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), em repolho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.3, p.463-469, 1993.
- BAXTER, S.; ZHAO, J., GAHAN, L.; SHELTON, A.; TABASHNIK, B.; HECKEL, D.; Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. **Insect of Molecula Biology**, Nanjing, v.14, p.327–334, 2005.
- BAXTER, S.; ZHAO, J.; SHELTON A.; VOGEL H.; HECKELD. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.38, p. 125–135, 2008.
- DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004.
- DICKSON, M. H.; SHELTON, A. M.; EIGENBRODE, S. D.; VAMOSY, M. L.; MORA, M. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. **Hortscience**, Alexandria, v. 25, n. 12, p. 1643-1646, 1990.
- DOMICIANO, N.L.; SANTOS, B. Pragas da canola: bases preliminares para manejo no Paraná. **Boletim Técnico**, IAPAR, n. 35, p. 1-16, 1996.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 205 p.
- HERRERO, S. S.; FERRÉ, J.M.; ESCRICHE, B. Mannose phosphate isomerase izoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to

Bacillus thuringiensis toxins in Lepidoptera species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 979-981, 2001.

LEE, M. K.; RAJAMOHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D. H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied Environmental Microbiology**, Birmingham, v.61, p. 3836-3842, 1995.

LOGES, V. **Danos causados pela traça das crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) em cultivares de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* (L.) e efeito sobre populações da praga e do parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912), em condições de campo.** 1996. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p.163-2000.

MUSSURY, R. M.; FERNANDES, W. D.; SCALON, S. P. Q. População de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) e *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758, associada a *Brassica napus* L. em função de dois métodos de captura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 993-998, 2002.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y.-B.; MALVAR, T.; HECKEL, D. G.; MASSON, L.; FERRE', J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? **Philosophical Transactions of the Royal Society - Biological Sciences**, London, v. 353, n. 1376, p. 1751-1756, 1998.

TANG, J. D; SHELTON, A. M.; VAN RIE, J.; DE ROECK, S.; MOAR, W.J.; ROUSH, R.T.; PEFEROEN, M. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to

resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p. 564-569, 1996.

THULER, R. T. ***Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): táticas para o manejo integrado em brássicas**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

VIANA, C. L. T. P.; GOULART, R. M.; DE BORTOLI, S.A.; THULER, A. M. G.; THULER, R. T.; LEMOS, M. V. F.; FERRAUDO, S. A. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica**, Jaboticabal, v. 37, p. 22-31, 2009.

ZHAO, J.; CAO, J.; LI, Y. X.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, 1493–1497, 2003.

CAPÍTULO 4 – Efeito da radiação ultravioleta sobre *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório e campo

INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis Berliner é uma bactéria com eficiência de controle comprovada para pragas de diferentes ordens; entretanto, tem sido relatado seleção de populações resistentes em todo o mundo, principalmente para a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), observado por PEREZ & SHELTON (1997), WRIGHT et al. (1997) em populações nos USA (Florida, Hawaii e New York), América Central (Costa Rica, Guatemala, Honduras e Nicarágua) e Ásia (Japão, Malásia). No Brasil, CASTELO BRANCO et al. (2003) observaram resistência da praga em populações provenientes de ambientes em que se usava o *B. thuringiensis* como método de controle, e também para regiões onde não se aplicava de forma contínua esse bioinseticida.

O critério que tem se buscado no manejo da resistência para os diferentes insetos-praga que apresentam com facilidade esta variação genética, é o controle com formulações à base de *B. thuringiensis* associado a outras táticas de controle (MAXWELL et al., 2006). Entretanto, o uso destas formulações pode ficar comprometido pela ação da luz solar, em especial da radiação ultravioleta (UV) do espectro. A persistência dos produtos microbianos no campo é altamente influenciada por este fator abiótico. Esta radiação atua sobre os ácidos nucleicos dos organismos, alterando-os ou mesmo inativando-os, impedindo o processo de multiplicação do patógeno, alterando a eficiência de controle (ALVES & LECUONA, 1998).

A radiação pode atuar de forma estimulante, neutra ou prejudicial aos patógenos. A influência é relativa, dependendo do microrganismo envolvido, da fase de desenvolvimento, da natureza e quantidade de radiação à qual é exposto. *B. thuringiensis* apresenta, em ordem decrescente, maior estabilidade à exposição quando comparado com alguns fungos e vírus (ALVES & LECUONA, 1998).

Os microrganismos esporulantes são mais resistentes ao efeito deletério dos raios UV, assim como os fungos produtores de conídios. Estes microrganismos apresentam em sua constituição genes com a capacidade de sintetizar substâncias que lhes conferem esta resistência. Na maioria das vezes a substância envolvida é a melanina (CHEN et al., 2004).

A espécie *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* tem a capacidade de produzir esta substância, entretanto, tal característica não está em todas as espécies, ou ainda não foi identificado a expressão pelas linhagens utilizadas nos produtos biológicos (CHEN et al., 2004). Uma das maiores preocupações no processo de formulação é definir qual o fotoprotetor adequado, que não causa influência sobre a patogenicidade do agente, uma vez que o microrganismo não tem como escapar da incidência dos raios sobre a folhagem do vegetal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da radiação ultravioleta sobre o isolado T08.024 de *B. thuringiensis* associado ao controle da traça-das-crucíferas, uma vez que este isolado apresentou potencial de controle para *P.xylostella* no trabalho realizado por VIANA et al. (2009).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da FCAV-Unesp, em sala climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. O isolado T08.024 foi proveniente do estoque do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), da mesma instituição. Os insetos utilizados foram da criação do LBCI.

Para o preparo da suspensão esporo/cristal, o isolado foi cultivado em placas de Petri com meio de cultura Ágar-Nutriente “NA” (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Ágar 15g/L) e incubados a 30°C , durante 5 dias. Após este período, o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon contendo 10 mL de água Milli-Q autoclavada e 0,05% de Tween 20[®] (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex e a partir desta foram feitas duas suspensões seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A suspensão seriada 10^{-2} foi utilizada para contagem de esporos em câmara de NeuBauer para posterior padronização da concentração $2,7\times 10^6$ esporos/mL a ser utilizada no bioensaio.

Após o preparo da suspensão trabalho, realizou-se a pulverização sobre discos foliares, sendo 5 discos de couve com diâmetro de 8 cm por tratamento, os quais foram representados pelos diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta. Foi pulverizado um volume de 0,5 mL da suspensão trabalho por face do disco e esta foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3, com pressão operacional de 25lbf/pol², sob capela de exaustão. Também realizou-se uma pulverização com água mais espalhante adesivo (Tween[®] 20) como testemunha. Após a secagem sobre bancada, por 30 minutos a 25°C , os discos foram colocados sobre algodão umedecido com água destilada para evitar o ressecamento do tecido vegetal (Figura 1) e sob a radiação ultravioleta emitida pela lâmpada da marca Spectroline[®] que emite ondas de 290 a 390 nm, ou seja, UVA (Ultravioleta de alta intensidade) a UVB (Ultravioleta de baixa

intensidade). O comprimento de ondas de 390 nm faz com que a lâmpada emita uma intensidade de 192 e 490 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$ em 30 e 14 cm de distância vertical, respectivamente (Figura 2). O outro comprimento de ondas, 290 nm, permite a emissão de 14 e 32 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$ para as mesmas alturas em sequência (Figura 2). Os períodos de exposição à radiação foram de 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 600 e 720 minutos, sob duas distâncias verticais, 30 e 14 cm. Também foi realizado uma exposição de 720 min para disco não pulverizado com bactéria e uma outra sem exposição a radiação, porém tratado ou não com bactéria. Ao término de cada período, os discos foram acondicionados em placas de Petri, sobre papel filtro umedecido com água destilada. Sobre cada disco foliar colocaram-se 12 lagartas de *P. xylostella* de segundo-terceiro ínstares para alimentação. A primeira avaliação de mortalidade larval foi com 24 horas, devido ao modo de ação da bactéria, e as demais diariamente até a formação de pupas.

O experimento de laboratório foi composto por 20 tratamentos, sendo os períodos de exposição nas diferentes alturas e comprimentos de ondas. Para cada tratamento utilizou-se 12 lagartas de *P. xylostella*.

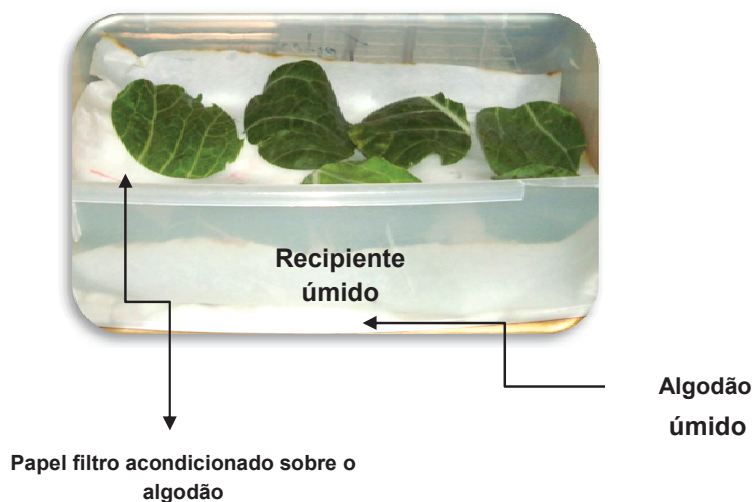


Figura 1. Recipiente com algodão úmido para acondicionar os discos de couve para exposição à radiação ultravioleta.

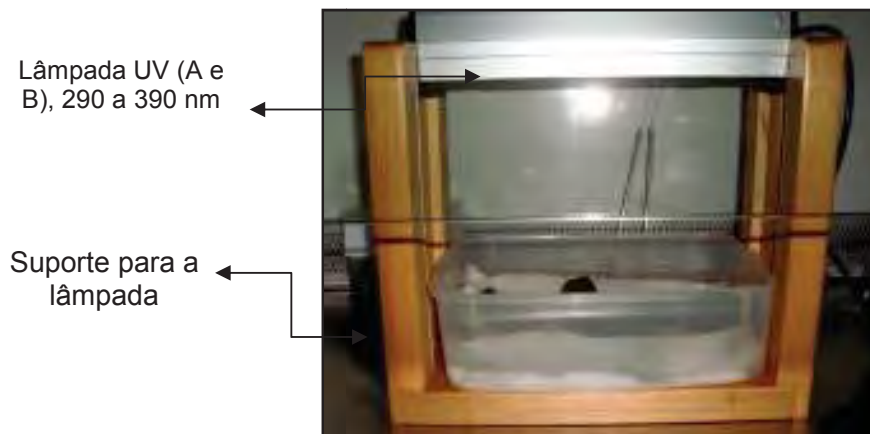


Figura 2. Suporte para lâmpada UV com emissão de ondas de 290 a 390 nm.



Figura 3. Aparelho usado para medir a intensidade da radiação no laboratório e no campo.

O experimento de campo foi realizado em plantas de couve (variedade manteiga) e em repolho roxo (Red Jewel da Sacala). A suspensão foi preparada da mesma forma como citada anteriormente para os bioensaios de laboratório, assim como a CL_{50} usada ($2,7 \times 10^6$ esporos/mL). A aplicação (10 mL/folha) foi realizada com um pulverizador com capacidade de 5 litros da marca Guarani, sendo bico cônico com jato direcionado sobre as folhas da planta. Cada folha após ser pulverizada foi identificada com o período respectivo da energia que seria acumulada. Para tanto utilizaram-se os mesmos de laboratório, sendo com 15, 30 e 45 min e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas de exposição. Também foram feitas leituras às 10 horas da manhã e às 16 horas. A medição foi feita com o sensor do aparelho sobre a folha respeitando inclusive a inclinação da mesma. Após completar o período de exposição, a folha foi retirada e levada para o laboratório para cortar os discos e oferecer para as lagartas se alimentarem (100 lagartas/tratamento). Os discos foram acondicionados em placas, como foi para o bioensaio de laboratório. A medição foi realizada a cada 30 minutos para todos os períodos, diferente do laboratório em que esta foi constante, porque a fonte da radiação foi uma lâmpada e no campo foi o sol. A obtenção da intensidade da radiação foi pelo aparelho da marca Instruterm, modelo MRU-201 UV LIGHT METER - 290 nm- 390nm (UVA-UVB) (Figura 3), para os experimentos de laboratório e de campo.

No campo também foram feitos testes com a suspensão do isolado preparada com e sem espalhante adesivo, durante 12 horas de exposição em folhas de plantas de couve manteiga.

O experimento de campo foi estabelecido em delineamento inteiramente ao acaso, composto por 12 tratamentos, sendo cada um referente ao período de exposição à radiação, constituído de 100 lagartas/tratamento. Estes tratamentos também foram avaliados com 24 e 48 horas de radiação solar em plantio de couve var. Manteiga. Para o repolho roxo, realizou-se apenas com 12 horas de exposição.

O mês do experimento no campo foi maio de 2009, que apresentou como temperatura média $20,7^{\circ}\text{C}$; umidade relativa de 75,9% e 26,6mm de precipitação (4 dias de chuva no mês). Estes dados são da Estação Agroclimática da FCAV-UNESP de Jaboticabal, SP (Estação Agroclimática da FCAV-UNESP, Jaboticabal).

Aos dados de mortalidade (%) de lagartas de *P. xylostella* foi aplicada a análise de regressão pelo programa O-Ring. Como resultado, as médias foram apresentadas em gráficos seguindo o modelo proposto pela análise. Para demonstrar o hábito de fitofagia das lagartas foram realizadas imagens ilustrativas do experimento por meio de fotografias com auxílio de uma câmera digital Sony 7.2 Mega Pixels.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas que se alimentaram de folha exposta à radiação, independente da distância, porém sem estar tratada com a bactéria (testemunha), apresentaram mortalidade significativamente inferior, em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). Esta mortalidade pode estar relacionada com a condição em que os discos se apresentaram posterior à radiação, os quais ficaram com aspecto necrosado, sem brilho, com coloração marrom e ressecados (pouca turgidez). Apesar de que, a maioria das lagartas (>80%) alimentaram-se dos mesmos, provavelmente a energia acumulada decorrente da exposição não alterou as características relacionadas à palatabilidade do substrato alimentar, mesmo ocorrendo mortalidade (Figura 4-I), haja vista que a mortalidade nestes tratamentos foram diferentes da testemunha representada pelas lagartas que se alimentaram do vegetal sem radiação e sem bactéria, e também do tratamento com bactéria, porém sem radiação (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de energia acumulada (joules/cm²) e da mortalidade (±EP) (%) de lagartas de *Plutella xylostella* alimentadas com discos de folha de couve expostos ou não à radiação ultravioleta, bem como tratados e não tratados com o isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamentos	Energia acumulada da	
	radiação ultravioleta (Joules/cm ²)	Mortalidade (%)
12 horas a 192µwats/ cm ²	8.294.400	13,33±0,96a
12 horas a 490 µwats/ cm ²	21.168.000	12,93 ±0,58a
12 horas a 14 µwats/ cm ²	604.800	11,87±0,49a
12 horas a 32 µwats/ cm ²	1.382.400	10,00±0,59a
0,00 ¹	0,00	100,00±0,00b
0,00 ²	0,00	0,00±0,00c
CV (%)		32%

¹ = Tratamento testemunha com lagartas que se alimentaram de discos de couve com bactéria;

² =Testemunha com lagartas que se alimentaram de discos de couve sem bactéria e sem radiação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 0,05 % de probabilidade.

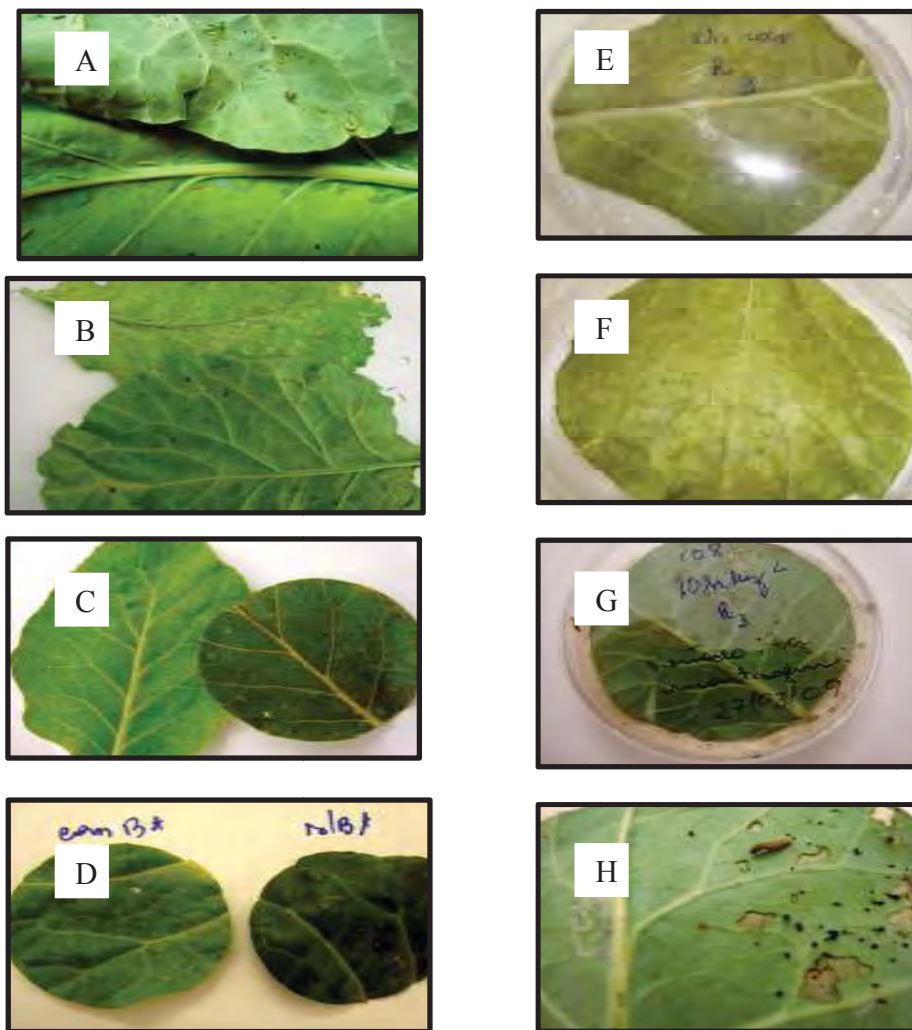


Figura 4. Folhas e discos de couve que foram tratados ou não com *Bacillus thuringiensis* e radiação em laboratório, assim como das lagartas de *Plutella xylostella*. A e B = folha superior (1) tratada com bactéria e radiação e folha inferior (2) folha sadia como testemunha; C= Folha a esquerda sem exposição à radiação e a direita o disco tratado com radiação por 12 horas; D= discos da esquerda tratado com bactéria e radiação e o da direita tratado somente com radiação; E, F, G e H= discos do experimento com radiação emitida pela lâmpada de 32 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$.

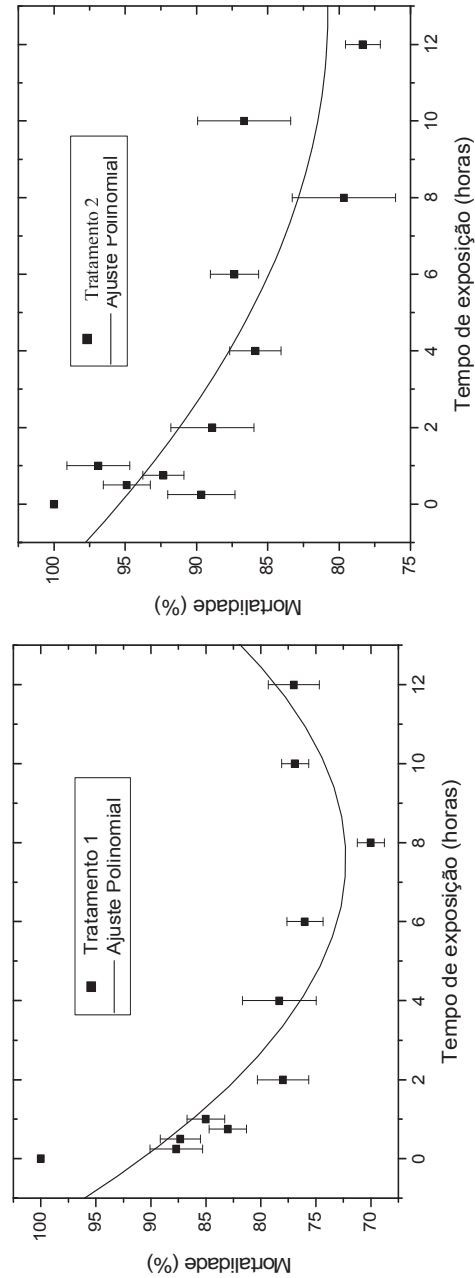
A mortalidade das lagartas após se alimentarem dos discos tratados com a radiação sob as diferentes alturas proporcionou um ajuste polinomial quadrático, nos diferentes períodos de exposição (Figuras 5 e 6). Os tratamentos 1 e 2 referem-se a altura de 30 e 15 cm, respectivamente, para a energia acumulada nos períodos de exposição, sendo de 192 e 490 $\mu\text{wats}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Figura 5). Nestes tratamentos o coeficiente de determinação foi relativamente alto, em média 75%, demonstrando que os dados se ajustaram bem ao modelo de regressão. A mortalidade foi maior (80-100%) nas primeiras horas de exposição, no entanto, com o decorrer da exposição manteve acima de 70%. Este resultado mostra que a energia acumulada, bem como o efeito imediato nos primeiros 15 min de exposição, não influenciaram a virulência do isolado T08.024, na CL_{50} de $1,3 \times 10^7$ esporos/mL.

Os tratamentos 3 e 4, que referem-se a altura de 30 e 15 cm para as exposições de 32 e 14 $\mu\text{wats}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Figura 6) respectivamente, proporcionaram um mesmo modelo de ajuste, sendo que a mortalidade apresentou comportamento mais variado, principalmente para o terceiro, em que o R^2 foi de 52,6% (Figura 6). Também é possível observar que as médias de mortalidade ficaram acima de 40%, ao contrário dos tratamentos 1 (altura de 30 cm da radiação de 192 $\mu\text{wats}/\text{cm}^2/\text{h}$) e 2 (altura de 15 cm da radiação de e 490). Este resultado pode ser explicado pela energia acumulada nos tratamentos 3 (altura de 30 cm da radiação de 32 $\mu\text{wats}/\text{cm}^2/\text{h}$) e 4 (altura de 15 cm da radiação de 14 $\mu\text{wats}/\text{cm}^2/\text{h}$), onde a radiação foi emitida pela lâmpada de 290 nm, sendo ondas mais curtas, porém, com maior capacidade de penetração no tecido vegetal. Os discos sob esta energia acumulada ficaram mais necrosados, ao serem comparados com os demais tratamentos (Figuras 4, 5 e 6).

A mortalidade ter sido menor (média de 40%) nos tratamentos 3 e 4, comportou-se como a dose usada, a CL_{50} , ou seja, pulverizou-se uma concentração capaz de afetar 50% da amostra estudada, com a média de mortalidade ficando dentro do limiar esperado. Por outro lado, os tecidos vegetais dos discos foliares ficaram necrosados, o que pode ter influenciado a alimentação das lagartas. Entretanto, não se pode afirmar que a redução da mortalidade foi causada pela degradação da proteína

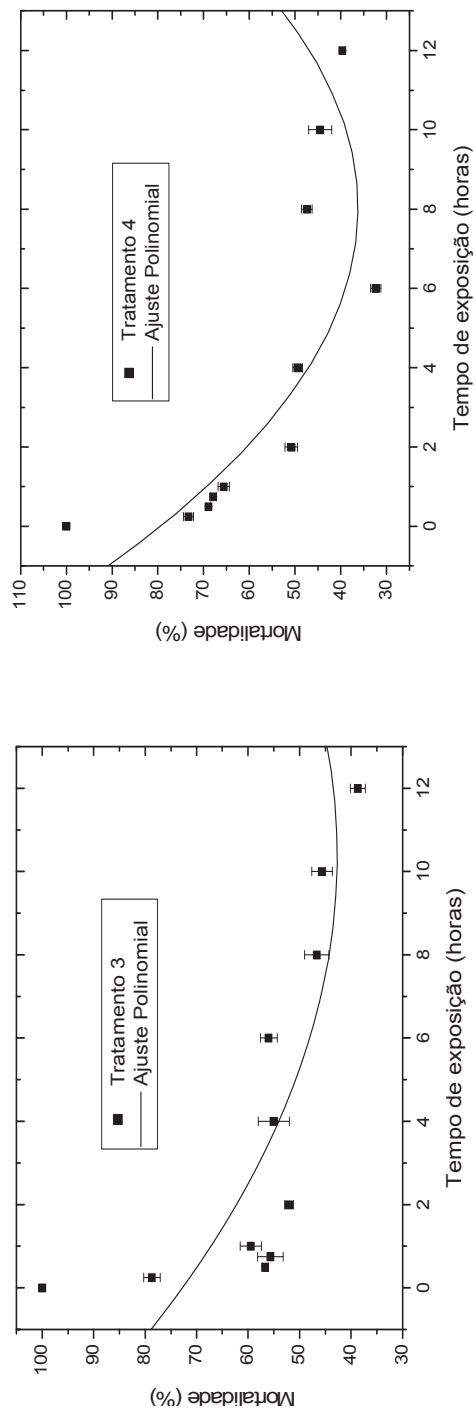
cristal do isolado e/ou pela condição do disco foliar. A testemunha representada por discos sem bactéria, que ficaram expostos por 12 horas nesta radiação, causou uma mortalidade média de 10,50%, e os dados não foram corrigidos para realização da análise de regressão. Isto dá base para mostrar que os tratamentos 3 e 4 podem ter seus valores de mortalidade reduzidos em até 10%, contudo uma mortalidade ainda alta, demonstrando que os cristais ou demais proteínas ou substâncias existentes na suspensão estão contribuindo para a mortalidade.

A análise aplicada aos dados de mortalidade para todos os tratamentos em função da energia acumulada demonstrou que as maiores mortalidades ocorreram nas primeiras horas de acúmulo, sendo que durante os períodos de exposição o comportamento da mesma variou, porém, sempre acima de 40% (Figura 7). Esta análise comprovou mais uma vez a precisão do modelo quadrático aos tratamentos, sendo que alguns pontos de mortalidade acima de 70% foram apresentados pelos tratamentos 1 e 2, os quais nesta figura ficaram agrupados na parte superior do gráfico. O outro grupo, de menores mortalidades, formou a maioria dos pontos no gráfico, estando ajustados às primeiras horas de energia acumulada, demonstrando que ao passar o período de acúmulo alguma influência da energia sobre o vegetal pode ter contribuído para a formação de tais grupos. Esta análise, considerando a mortalidade total dos tratamentos, pode demonstrar que o isolado T08.024 apresenta baixa sensibilidade ao acúmulo de energia, causando a virulência esperada sobre os insetos.



Tratamentos	Parâmetros do ajuste polinomial quadrático			
	A	B1	B2 ²	R ² P
Tratamento 1	90,79±2,24	-4,899±1,24	0,32±0,109	76,20 0,0032
Tratamento 2	95,41± 1,97	-2,8±1,10	0,08±0,096	78,88 0,005

Figura 5. Curvas de mortalidade de lagartas de *Plutella xylostella* alimentadas com discos de couve tratados e não tratados com o isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis* e expostos à radiação ultravioleta emitida pela lâmpada da marca Spectroline® com intensidade de 192 e 490 μwatts/cm², sob duas distâncias verticais (30 e 15 cm, respectivamente), em condição de laboratório.



Tratamentos	Parâmetros do ajuste polinomial quadrático			
	A	B1	B2²	R² P
Tratamento 3	72,74±6,24	-5,79±3,24	0,28±0,32	52,60 0,05
Tratamento 4	79,40± 5,22	-10,76±2,90	0,67±0,25	77,68 0,002

Figura 6. Curvas de mortalidade de lagartas de *Plutella xylostella* após se alimentarem de discos de couve tratados e não tratados com o isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis* e expostos a radiação ultravioleta emitida pela lâmpada da marca Spectroline® com intensidade de 32 e 14 µwats/cm², sob duas distâncias verticais (30 e 15 cm, respectivamente) em condição de laboratório.

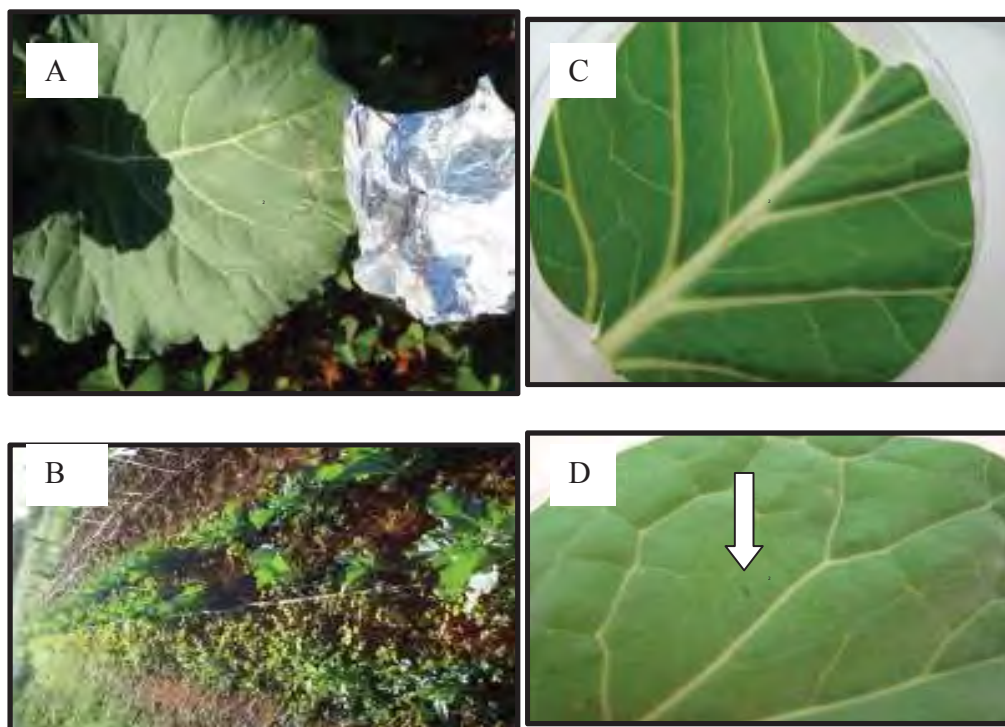


Figura 9. Experimento de campo com aplicação da suspensão do isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis* em plantas de couve Manteiga para avaliar o efeito da radiação ultravioleta solar por diferentes períodos e posteriormente fornecer para a alimentação de lagartas de *Plutella xylostella*. A) folha de couve pulverizada e identificada com o período que ficaria exposto a radiação; B) Canteiro de couve; C) Lagartas acondicionadas sobre o disco foliar de couve recém retirado do campo tratado com bactéria e radiação; D) Lagartas mortas, após se alimentarem dos discos.

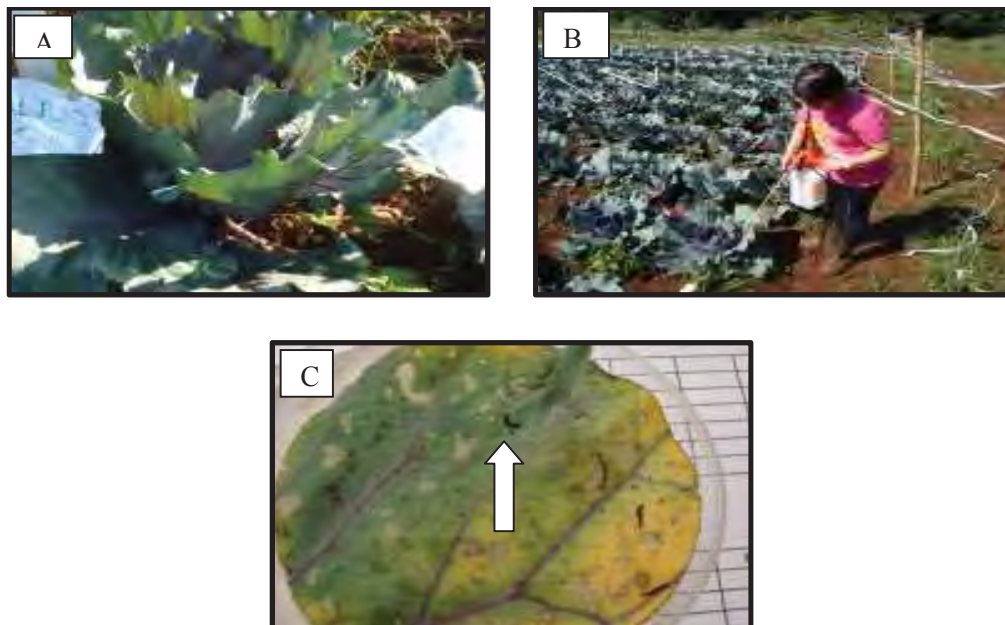


Figura 10. Experimento de campo com aplicação da suspensão do isolado T08.024 de *Bacillus thuringiensis* em plantas de repolho roxo (Red Jewel) para avaliar o efeito da radiação ultravioleta solar por diferentes períodos e posteriormente fornecer para a alimentação de lagartas de *Plutella xylostella*. A) folha de repolho pulverizada e identificada com o período que ficaria exposta a radiação; B) Canteiro de repolho e a pulverização; C) Lagartas mortas após se alimentarem dos discos.

A análise de regressão para os três dias de experimento de campo com medição da radiação ultravioleta proporcionou um ajuste linear. Portanto, o perfil da energia acumulada nos diferentes dias foi praticamente igual, demonstrando que intensidade da radiação apresentou um comportamento padrão de luz solar, com variações ao longo de 12 horas dia (Figura 11).

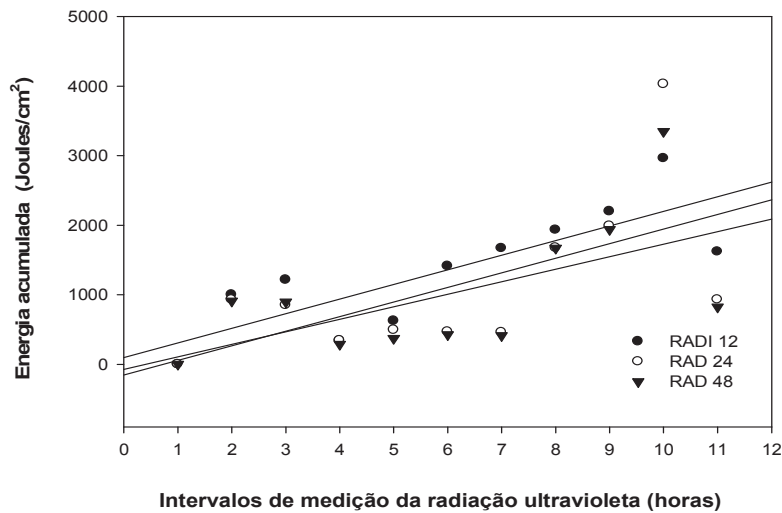


Figura11. Curva de regressão com ajuste linear para energia acumulada emitida pela radiação solar por 12, 24 e 48 horas.

A patogenicidade do isolado T08.024 pode estar relacionada com algo semelhante ao existente no isolado L-7601 de *Bacillus thuringiensis* var *dendrolimus* em sintetizar melanina sob condição de estresse abiótico (radiação ultravioleta), apesar de serem espécies diferentes.

O isolado T08.024 de *B. thuringiensis* que pertence ao banco de isolados do Laboratório de Bactérias e Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, demonstra ser mais virulento para controle para lepidópteros-praga, bem como um importante fonte de estudos envolvidos nos processos de desenvolvimento de formulações. Por outro lado, também se faz necessário estudo sobre sua constituição proteica, para averiguar a presença da melanina, utilizando técnicas de biologia molecular, como também de cromatografia de suspensão. Se este isolado não sintetizar melanina, a autoproteção à radiação poderá estar associada à camada polissacarídica do esporo, ou à presença de maior quantidade protéica nesta

membrana, ou até mesmo pela presença de outras substâncias desconhecidas na suspensão utilizada no bioensaio.

O experimento de campo com a suspensão com e sem espalhante adesivo também proporcionou 100% de mortalidade, assim, o espalhante não influenciou na exposição a radiação, de forma a interferir na degradação da proteína.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B.; LECUONA, R. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 98-169, 1998.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A; AMARAL, P. S. T. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 549-552, 2003.
- CHEN, Y.; DENG, Y.; WANG, J.; C. A. I. J.; GAIXIN, R. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetic Applied Microbiology**, Tokyo, v.50, p. 183–188, 2004.
- ESTAÇÃO AGROCLIMÁTICA DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS DA FCAV-Unesp**, Jaboticabal, SP. Disponível em: http://www.exatas.fcav.unesp.br/estacao/est_tab_meteor_01_02.htm. Acessado em 20 de Junho de 2010.
- FARIA, R. O. **Análise de polissacarídeos e tirosinase de *Lentinula boryana* (Berk & Mont) Pegler: um macrofungo com potencial biotecnológico**. 2008, 149f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- MAXWELL, E. M; FADAMIRO, H. Y.; MCLAUGHLIN, J. R. Suppression of *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* in cole crops with attracticide formulations. **Journal of Economic Entomology**, Auburn v. 99, n. 4, p. 6-17, 2006.
- PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. **Journal of Economic Entomology**, Auburn, v.90, p. 87-93, 1997.
- RUAN, L; Y. U. Z.; FANG, B.; H. E. W.; WANG, Y.; SHEN, P. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high

temperature induction. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 286–289, 2004.

VIANA, C. L. T. P.; GOULART, R. M.; DE BORTOLI, S. A.; THULER, A. M.G.; THULER, R. T.; LEMOS, M. V. F.; FERRAUDO, S. A. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p.22-31, 2009.

WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. M. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p.1814-1819, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implantação do Manejo Integrado de Pragas (MIP), como uma utilização conjunta de diversas táticas de controle de insetos nocivos e que se preconize de forma evitar problemas com resistência dos insetos a estas táticas, tem sido muito discutido nas diversas fontes bibliográficas. No entanto, as práticas têm sido um pouco diferentes da filosofia do MIP. Dessa forma, esta pesquisa determinou como objetivo geral estudar o desempenho da *Plutella xylostella*, por ser considerada praga-chave e de difícil controle, devido a falta de planejamento agrícola com intuito de explorar comercialmente as espécies de brássicas. Com a escassez deste planejamento, o inseto atinge altos níveis populacionais nas áreas de cultivo, inviabilizando as táticas de controle, assim como o conjunto das mesmas. O agricultor busca recuperar pelo menos parte da produção, e por isto pulveriza diferentes produtos para controle de insetos, os quais podem ser registrados ou não, como também usam doses não recomendadas.

Portanto, esta pesquisa apresentou inicialmente um estudo de suscetibilidade deste inseto a diferentes concentrações de isolados de *Bacillus thuringiensis* que apresentam perfil gênico comprovado para controle de lepidópteros praga. Para tanto, *P. xylostella* foi suscetível aos isolados em doses relativamente baixas, oriundas de suspensão esporo com cristal, como também apenas cristal, constituindo assim excelentes fontes de bactéria para serem estudadas em trabalhos de elaboração de formulados, como também em estudos de expressão gênica para serem empregados na engenharia genética. Até o momento, alguns estudos têm sido conduzidos com esse objetivo, ou seja, do desenvolvimento de brássicas transgênicas, que expressem genes que sintetizam tais proteínas tóxicas a lepidópteros-praga. Provavelmente a aceitação do mercado consumidor de hortaliças poderá questionar as implicações ao organismo humano, bem semelhante às questões já discutidas para culturas anuais, como soja, milho e outras. Entretanto, estas implicações poderão ter peso diferenciado quando se falar em aplicações excessivas de sintéticos para conter os danos causados pelas pragas-chave em brássicas. Vale ressaltar que esta inconveniência não somente ocorre

em grandes plantios, mas também em hortas, onde a fiscalização do uso de produtos químicos, registrados ou não, praticamente não ocorre. Então, fica a questão de se avaliar a agressividade ao homem, entre consumir uma brássica transgênica ou uma com resíduos de produtos químicos?

Baseado no fato deste inseto apresentar tantos problemas no campo, é que esta pesquisa preconizou o conhecimento desta resistência, para isso um dos objetivos foi estudar este fator em laboratório. Assim, foi possível constatar que *P. xylostella* apresentou perfil de resistência a diferentes fontes de *B. thuringiensis* a partir de 15 gerações sob pressão de seleção. Com 33 gerações apresentou uma razão de resistência igual a 250 vezes. Realmente, o que está ocorrendo no campo em relação a resistência, é possível observar claramente em laboratório, haja vista, que em cultivos ocorrem o problema de sobreposição de gerações, fato este que implica ainda mais na velocidade desta resistência.

Outro resultado desta pesquisa que favorece o controle deste inseto foi com radiação ultravioleta, em laboratório e campo, sobre o isolado T08.024. Constatou-se que o mesmo não apresentou sensibilidade a energia acumulada emitida pela radiação ultravioleta (UVA e UVB), causando praticamente 100% de mortalidade da praga.

O potencial de controle dos isolados, linhagem e produto comercial de *B. thuringiensis*, mesmo sob condição de estresse, proporcionaram expressivos resultados, que remontam ao papel do MIP como estratégia eficaz para manutenção da biodiversidade.

Os resultados positivos no controle de *P. xylostella* só reafirmam o importante papel de pesquisas como essa, na busca de produtos alimentícios seguros, livres de resíduos danosos ao homem, uma vez que a praga em questão é estudada por pesquisadores de todo o mundo, merecendo destaque mundial através de grupos de pesquisa e “workshops” específicos para tratar do avanço em seu controle.