

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

***Plutella xylostella*: VARIABILIDADE POPULACIONAL E
SUSCETIBILIDADE A *Beauveria bassiana* E A
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

João Rafael De Conte Carvalho de Alencar

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

***Plutella xylostella*: VARIABILIDADE POPULACIONAL E
SUSCETIBILIDADE A *Beauveria bassiana* E A
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

João Rafael De Conte Carvalho de Alencar

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

A368p

Alencar, João Rafael De Conte Carvalho de

Plutella xylostella: variabilidade populacional e suscetibilidade a *Beauveria bassiana* e a nematoides entomopatogênicos / João Rafael De Conte Carvalho de Alencar.- Jaboticabal 2012
iv, 89 f. il. ; 28 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk

Co-orientador: Sergio Antonio De Bortoli

Banca examinadora: Antonio Carlos Busoli, Luís Garrigós Leite.

Bibliografia

1. Controle microbiano, 2. Populações, 3. Traça-das-crucíferas, 4. Fungo entomopatogênico, 5. Rhabditida . I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.7:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento de Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO RAFAEL DE CONTE CARVALHO DE ALENCAR – Nascido em 12 de Março de 1987, em São Paulo – São Paulo. Engenheiro Agrônomo pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), título obtido em Agosto de 2010. Estagiou no Laboratório de Entomologia no Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças, onde desenvolveu projetos de iniciação científica com bolsa do CNPq durante a graduação. Durante a sua graduação teve a oportunidade de participar de eventos na área de Entomologia agrícola, publicar trabalhos em eventos e periódicos. Foi então aprovado no Mestrado em Agronomia / Entomologia Agrícola pela Unesp - Campus de Jaboticabal, com início em Agosto de 2010 e término em Julho de 2012. Aprovado na mesma área e instituição para Doutorado com início em Agosto de 2012.

“O grande rio tem seu trajeto, antes do mar imenso.”

André Luiz

Aos meus amados pais Regina Maria De Conte Carvalho de Alencar e Celio Carvalho de Alencar, que dedicaram suas vidas ao sucesso de seus filhos, sendo o grande exemplo de conduta moral e afetiva.

À minha amada Marina Aparecida Viana, que com seu amor e dedicação tem sido minha base, inspiração e fonte de alegrias.

Dedico

Aos meus queridos irmãos Isabel De Conte Carvalho de Alencar e João Gabriel De Conte Carvalho de Alencar, que sempre abriram portas e auxiliaram incondicionalmente meus passos, além do convívio fraternal inesquecível.

Aos meus avós Maria Luiza De Conte (in memoriam), Amilcar De Conte (in memoriam), Lucília Carvalho de Alencar e João de Alencar, que são os responsáveis pela base sólida na educação.

Aos meus cunhados Felipe Bertholdi Fraga, Daniele Ferreira Mugarbi, Francisco José Viana, Cácia Tigre Pereira Viana, e aos meus sogros Luiz Viana Neto e Rita de Oliveira Viana, que hoje constituem nossa família, sempre com uma palavra amável a oferecer.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por criar a vida, a maior maravilha que existe.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista pela superior infraestrutura e oportunidade concedida.

Aos professores da Pós Graduação em Agronomia/Entomologia Agrícola, pelos conhecimentos passados e por serem responsáveis por mais um degrau alçado, em especial aos professores Drs. Antonio Carlos Busoli e Arlindo Leal Boiça Jr, pelos conselhos e ensinamentos além-aula.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, que são indispensáveis para o correto andamento de tantos trabalhos, em especial à Lígia Dias Tostes Fiorezzi, pelos tantos auxílios prestados, e a Iara Macedo e ao André Maurício Múscari pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela orientação durante a Graduação e o Mestrado, e ao Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli pela co-orientação durante o Mestrado.

Ao Prof.Dr. Sergio de Freitas (in memoriam) pelos grandes ensinamentos e valores morais transmitidos.

Aos Profs. Drs. Manoel Victor Franco Lemos e Janete Aparecida Desidério por auxiliar parte dos experimentos.

Ao Prof. Antonio Carlos Monteiro por ceder gentilmente material para a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudos.

À minha noiva Marina Aparecida Viana por tantas ajudas e companheirismo.

Ao grande Ulysses Rodrigues Vianna por ter sido um ótimo orientador e amigo acima de tudo.

A amiga e colega de pós-graduação Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa, pelo amizade e grande ajuda na dissertação.

Aos amigos dos tempos de graduação: Alan Azevedo de Almeida, Caio Cesar Queiroz Nogueira, Heitor Broetto Marin, Matheus Fonseca de Souza, Rafael Andrade, Rodolfo Teixeira, Rômulo Mazieiro e Rômulo Mora, pelos tempos inesquecíveis.

Aos novos amigos feitos durante a pós-graduação: Jacob Crosariol Neto, José Fernando Jurca, Míriam Kubota, Oniel Aguirre, Leandro Souza, Laís Santos, Diego Lopes, Diego Fraga, Jaqueline Maeda, Alessandra Otuka, Elizabeth Pedroso, Natalia Vieira, Milena Sato, Rogério Teixeira, Tatiana Ramos, Vanessa Paes, Andrea Varella, Juliana Nais, Marina Funichello e Nirelcio Pereira. Que tanto apoiaram e auxiliaram nessa caminhada.

A família Agostini, por ser tão amiga e atenciosa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização dessa dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura das Brassicaceas.....	3
2.2. <i>Plutella xylostella</i>	3
2.3. Controle Microbiano.....	6
2.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	7
2.3.2. Nematoides entomopatogênicos.....	8
2.4. Métodos Moleculares para diferenciação de populações.....	9
2.4.1. DNA mitocondrial.....	10
2.4.2 DNA genômico.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Obtenção e criação das populações de <i>Plutella xylostella</i>	13
3.2. Análise molecular das populações.....	15
3.2.1. Sequenciamento gene COI.....	16
3.2.2. Método ISSR-PCR.....	17
3.3. Testes de suscetibilidade.....	19

	Página
3.3.1 <i>Beauveria bassiana</i>	19
3.3.2 Nematoides entomopatogênicos.....	21
3.3.3. Bactérias simbiote de nematoides entomopatogênicos.....	24
3.4 Efeitos subletais.....	27
3.5 Consumo foliar.....	27
3.6. Delineamento experimental e análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Sequenciamento do gene COI.....	29
4.2. Método ISSR-PCR.....	34
4.3. Suscetibilidade de <i>Plutella xylostella</i> aos entomopatógenos.....	36
4.4. Produção de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e de juvenis infectivos de NEPs.....	48
4.5. Consumo foliar.....	50
4.6. Efeitos subletais.....	54
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68

***Plutella xylostella*: VARIABILIDADE POPULACIONAL E SUSCETIBILIDADE A *Beauveria bassiana* E A NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

RESUMO

O isolamento geográfico de populações de uma mesma espécie de inseto pode resultar em alterações fisiológicas, originando populações com suscetibilidade diferente às diversas táticas de controle. *Plutella xylostella*, a traça-das-crucíferas é uma praga cosmopolita específica das Brassicaceae, apresentando problemas de resistência à inseticidas químicos e biológicos. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência da variabilidade populacional da traça-das-crucíferas na eficiência das táticas de controle com micro-organismos entomopatogênicos. Foram utilizados os métodos de sequenciamento do gene COI e ISSR-PCR para aferir a variabilidade populacional entre quatro populações da praga, e estudou-se a suscetibilidade delas às táticas de controle com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (20 isolados), nematoides entomopatogênicos (quatro espécies) e bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (dez isolados), avaliando-se o consumo foliar, a multiplicação do entomopatógeno no hospedeiro e estudando os aspectos biológicos em busca de efeitos subletais. - Foram selecionados seis isolados de *B. bassiana* e as quatro espécies de nematoides, pois foram as mais virulentas à praga. As populações são distintas devido sua variabilidade e isso resulta em diferenças no desenvolvimento de insetos que sobrevivem a aplicação dos entomopatógenos, inclusive na virulência de *Steinernema brazilense* sobre a população de Jaboticabal. Foi constatada também a redução de consumo foliar nos tratamentos com os entomopatógenos.

Palavras-chave: traça-das-crucíferas; populações; controle microbiano, patogenicidade; virulência.

***Plutella xylostella*: POPULATIONAL VARIABILITY AND SUSCEPTIBILITY TO
Beauveria bassiana AND ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES**

SUMMARY

The geographical isolation of same species populations can result in physiological changes, resulting in populations with different susceptibility to various control tactics. *Plutella xylostella*, is a specific pest of Brassicaceae widely spread around the globe, presenting problems with chemical and biological insecticides resistance. The aim of this study was to determine the influence of Diamondback moth populational variability in the efficiency of control tactics with entomopathogenic microorganisms. The methods used were sequencing of the COI gene and ISSR-PCR to measure the population variability among four populations of the pest, and the study of their susceptibility to tactics control with the entomopathogenic fungus *B. bassiana* (twenty strains), entomopathogenic nematodes (four species) and symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes (ten strains), evaluating leaf consumption, the multiplication of the pathogen in the host and studying the biological aspects in search of sub lethal effects. Six isolates of *B. bassiana* and four species of nematodes were selected, as were the more virulent to the pest. The populations are distinct because due the genetic, variability and and that results in differences in the development of insects that survive the entomopathogens application, including the virulence of *Steinernema brazilense* on the population of Jaboticabal. It was also found to reduce leaf consumption in the entomopathogens treatments.

Key words: diamondback moth; populations; microbial control, pathogenicity; virulence

1. INTRODUÇÃO

As Brassicaceae pertencem a Família botânica que abrange um grande grupo de hortaliças que são consumidas diariamente pela humanidade ao redor do mundo (ANJUM et al., 2012).

Plutella xylostella (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), a traça-das-crucíferas, é uma praga específica das Brassicaceae (TALEKAR & SHELTON, 1993) que se encontra amplamente espalhada pelo globo devido seu comportamento cosmopolita e a ampla utilização destas espécies vegetais para o consumo humano (BADENEZ-PEREZ et al., 2006).

Os danos que esta praga causa podem ser diretos quando se alimentam de partes do vegetal que são comercializadas, causando grande prejuízo econômico, como é o caso de folhas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) e de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), ou ainda, pode ocasionar danos indiretos como quando a praga se alimenta da parte do vegetal que não é comercializado como o rabanete (*Raphanus sativus* L.) (GALLO et al, 2002).

O controle da traça-das-crucíferas geralmente é realizado com o uso de inseticidas químicos (CZEPAK et al, 2005). Para a couve, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apontou que esta cultura é a quinta colocada entre 20 onde foi verificado uso excessivo ou de produtos não registrados. Para esta cultura, 44,2% das amostras continham resíduos de agrotóxicos acima do permitido ou ingredientes ativos não registrados para a couve, onde 11 dos 31 encontrados são inseticidas (ANVISA, 2010). Perante a este grande uso a evolução de resistência desta praga a agrotóxicos no mundo é uma realidade há mais de uma década (SHELTON et al., 1993).

Constatado o problema mundial de resistência de *P. xylostella* com o controle químico, procurou-se o uso de alternativas biológicas para o seu controle, como parasitoides (TABONE et al., 2010) e predadores (ALMEIDA et al., 2009) e,

principalmente o uso da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (SILVA et al., 2012). Mas devido a grande utilização desta bactéria entomopatogênica para controlar a praga em questão, houve também a evolução da resistência de populações da praga à tecnologia de controle biológica supracitada (ZHAO et al., 1993; TABASHNIK, 1994; PEREZ & SHELTON, 1997; WRIGHT et al., 1997; CASTELO BRANCO et al., 2003).

Para reverter este quadro preocupante para a atividade agrícola e também para a saúde pública, o controle químico pode ser substituído total ou parcialmente por organismos entomopatogênicos como nematoides e fungos, com eficiência semelhante aos inseticidas convencionais e reduzido impacto ambiental (SALEM et al., 2007; ALVES et al., 2008; WRIGHT et al., 2010).

O isolamento geográfico de populações de uma mesma espécie de inseto pode resultar em alterações fisiológicas devido ao isolamento reprodutivo, originando populações com suscetibilidade diferente às diversas táticas de controle, o que implicaria na necessidade de elaboração de sistemas de manejo de acordo com a variabilidade populacional intraespecífica. Essa variação de resposta pode ocorrer mesmo para entomopatógenos conforme observado para populações de *P. xylostella* e *Spodoptera frugiperda* oriundas de países da América Latina, Europa e de diferentes estados brasileiros (GONZÁLES-CABRERA et al., 2001; POLANCZYK et al., 2005; MONNERAT et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi determinar se a variabilidade populacional da traça-das-crucíferas, afeta a virulência de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e nematoides entomopatogênicos assim como as bactérias simbiotes associadas a esses nematoides.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Brassicaceae

Brassicaceae é uma das maiores famílias botânicas de hortaliças com cerca de 400 gêneros e aproximadamente 4000 espécies (KOCH et al., 2001; JOHNSTON et al., 2005),

Dentre as diversas espécies, muitas são utilizadas para a alimentação na forma de folhas, inflorescências, hipocótilos e sementes, como respectivamente: couve e repolho, couve-flor (*B. oleracea* L. var. *botrytis*) e brócolis (*B. oleracea* L. var. *italica*), Rúcula (*Eruca sativa* Thell) e Mostarda (*B. juncae* L.). Além destas, existem na família várias outras espécies hortícolas e/ou oleaginosas tais como a couve chinesa (*B. pkinensis* L.), nabo (*B. rapa* L. var. *rapa*), rabanete, mostarda-de-folha (*B. juncea* L.) (FILGUEIRA, 2008).

Existem também espécies de importância medicinal, como o agrião (*Nasturtium officinalis* L.) que é utilizado como anti-inflamatório e cicatrizante (JACOBUS, 2006), e ainda espécies consideradas invasoras como o nabo em regiões mais frias por perdurar por mais de dois ciclos em estado vegetativo.

As Brassicaceae são de grande importância econômica e encontram-se amplamente cultivadas pelo mundo, um bom exemplo é a importância econômica da canola (*B. napus* L. var. *oleifera*), que é a oleaginosa com maior área plantada no mundo, outro exemplo é o repolho que é uma hortaliça folhosa com grande fonte de nutrientes e de alto valor econômico (FREITAS LUZ et al., 2002).

2.2. *Plutella xylostella*

A traça-das-crucíferas, *P. xylostella* é uma das pragas mais importantes de Brassicaceae no mundo (DIAS et al., 2004), devido aos sérios danos causados às plantas, ocasionando grandes perdas nos campos de produção (CASTELO

BRANCO & FRANÇA, 2001). Ataca todas as plantas deste grupo preferencialmente repolho, couve-flor e couve comum, (TALEKAR & SHELTON, 1993; CASTELO BRANCO et al., 2001; GALLO et al., 2002; SALEM et al., 2007; SARFRAZ et al., 2010).

Sua origem é atribuída a duas hipóteses ligadas a centro de origem de Brassicaceae, a primeira é de que a praga é originária da Europa da região do Mediterrâneo que é centro de origem de algumas Brassicaceae (HARCOURT 1954, TSUNODA 1980), por outro lado existem evidências de que a praga tenha origem na África do Sul devido a gama de hospedeiros nativos neste país e a ocorrência de vários parasitoides associados à traça-das-crucíferas (KFIR, 1998). Entretanto a realidade é que hoje esta praga se encontra em todos os continentes com exceção da Antártida.

É um inseto com ciclo reprodutivo rápido (Figura 1), em que a variação da temperatura é preponderante para o desenvolvimento do inseto, pois em condições mais quentes o ciclo pode ser de 12 dias. O número de gerações pode variar dependendo das condições climáticas e da disponibilidade de alimento, mas de forma geral ocorrem de cinco a dez gerações por ano em condições de campo, (CASTELO BRANCO & VILLAS BÔAS, 1997; DIAS et al., 2004). As fêmeas fazem as posturas na parte abaxial das folhas, e após a eclosão, as lagartas de primeiro instar perfuram as folhas se alimentando no mesófilo foliar, por cerca de dois a três dias. Logo em seguida, saem do interior da folha a partir do segundo instar e passam a alimentar-se da epiderme, causando injúrias generalizadas nas folhas e/ou inflorescências, inutilizando-as para o consumo. Ao completar o desenvolvimento, as larvas empupam no interior de um pequeno casulo de seda tecido geralmente na face abaxial das folhas (IMENES et al., 2002).

Existe uma relação direta entre o desenvolvimento fenológico da cultura e o aumento dos danos ocasionados por *P. xylostella*, os quais podem ser irreversíveis, sendo comum o controle preventivo com agrotóxicos no início do desenvolvimento da cultura (SILVA et al., 2003; SARFRAZ et al., 2006). Além

disso, áreas cultivadas ao longo do ano, com plantas de idades diferentes proporcionam à praga suprimento abundante e contínuo de alimento dificultando o controle desta espécie (IMENES et al., 2002).



Figura 1: Ciclo de vida da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella*. Fonte: (VIANA, 2012)

Esta praga está diretamente relacionada à redução de produção de Brassicaceas nos plantios comerciais em todo o mundo (DICKSON et al., 1990), sendo que seus danos causam o atraso no crescimento da planta, depreciação do produto no comércio e ainda a inviabilização do cultivo (MONNERAT et al., 2004).

O uso de inseticidas químicos é a tática mais empregada para o controle de *P. xylostella* (CASTELO BRANCO & MELO, 2002; DIAS et al., 2004). No entanto, o manejo em áreas que se baseiam somente nesta ferramenta de controle é falho e não apresenta bons resultados ao longo do tempo (CASTELO BRANCO et al., 2001). Atualmente visa-se a obtenção de medidas de controle tecnicamente mais

adequadas, economicamente satisfatórias e ecologicamente corretas como medidas com o emprego de produtos biológicos (THULER, 2006).

2.3. Controle microbiano

O controle microbiano de insetos é a utilização de microrganismos como ferramentas para supressão de populações de pragas, desenvolvendo patologia no hospedeiro. Esses organismos são conhecidos como entomopatógenos (ALVES, 1998a).

O controle microbiano de insetos se iniciou com as observações da epizootia de *Beauveria bassiana* sobre o bicho da seda, *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) a pouco mais de 130 anos, logo, não demorou muito para colocarem em prática o uso de fungos para o controle de pragas (STARNES et al., 1993).

Os principais micro-organismos entomopatogênicos são fungos, bactérias, vírus e nematoides entomopatogênicos, com muitos exemplos de sucesso em utilização comercial como *Metarhizium anisopliae* (Metchinikoff, 1879) Sorokin 1883 para o controle de cigarrinhas de pastagem e da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) (MARQUES, 1976), *B. thuringiensis* para lepidópteros desfolhadores em grandes culturas como o milho e algodão (MARTINS et al., 2007), nematoides para o controle de moscas-das-frutas (ALMEIDA et al., 2007) e, vírus da poliedrose nuclear (*Baculovirus anticarsia*) para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) (ALLEN & KNELL, 1977). Também existem outros organismos entomopatogênicos de menor expressão como protozoários, rickétsias, espiroplasmas e fitoplasmas, pois são menos estudados, mas com boas perspectivas de uso num futuro próximo (ALVES, 1998b).

Os micro-organismos entomopatogênicos são vantajosos no controle de pragas devido a especificidade e a seletividade, bem como a facilidade de

multiplicação e dispersão, a produção em meios artificiais e a ausência ou redução de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não-alvo (TANADA & KAYA, 1993).

2.3.1. *Beauveria bassiana*

Atualmente existem vários produtos a base de fungos entomopatogênicos que são comercializados no mundo e produzidos em diversos países, entretanto, estes produtos estão inseridos em uma fatia de mercado que representa somente 1% do mercado mundial de pesticidas, e, deste percentual, correspondem apenas a um quinto do total, sendo *B. bassiana* uma das principais espécies de fungos entomopatogênicos utilizadas no mundo (CPL BUSINESS CONSULTANTS, 2010). Além disso, os fungos entomopatogênicos apresentam grande crescimento de mercado, devido ao seu pequeno custo de produção, a eficiência de controle e por não apresentar risco ao homem e ao meio ambiente (ALVES & PEREIRA, 1998; LEITE, 2003).

Beauveria bassiana é um fungo generalista que é encontrado naturalmente no solo infectando artrópodes (ZIMMERMANN, 2007). Está inserido na Ordem dos Hypocreales e na família Clavicipitaceae (FERNANDES et al., 2006). É conhecido vulgarmente como o fungo da muscardine branca devido sua coloração que pode variar do branco até o amarelo claro.

A importância deste fungo no controle microbiano de insetos é desde a história da patologia de insetos, devido as observações feitas em relação da sua manifestação em criação de *B. mori*, até na proporção da sua utilização para o controle de diversos artrópodes como insetos e ácaros (FERRON, 1978).

O modo de ação do fungo da muscardine branca é através do contato, onde o fungo em contato com o tegumento do inseto e na presença de umidade e calor suficientes, emite o apressório, que é a estrutura de penetração que pode penetrar por poros naturais como espiráculos, ou ainda degradar o exoesqueleto, e por fim,

colonizar o inseto, crescer e se multiplicar. Outra maneira de ação é a ingestão de conídios, que são a estrutura reprodutiva de *B. bassiana*, e a colonização se iniciar de dentro para fora, o que é uma condição atípica (SHAH & PELL, 2003).

O grande potencial de controle deste fungo entomopatogênico está comprovado em vários trabalhos que exploram o uso em diversas ordens de insetos como Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (MEYLING & EINLENBERG, 2007).

2.3.2. Nematoides entomopatogênicos

Os Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, localizadas na Ordem Rhabditida. Os gêneros mais comuns são *Heterorhabditis* Poinar, 1976 e *Steinernema* Travassos, 1927. Estes nematoides são agentes etiológicos de patologias que muitas vezes desencadeiam na morte do inseto (VOSS et al., 2009).

Os NEPs possuem relação mutualística com bactérias do seu tubo digestivo, e estas quando regurgitadas, são as responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia, pois, estas bactérias degradam a hemolinfa e os tecidos do inseto, que serve de alimento para os NEPs. Os principais gêneros de bactérias simbiotes são *Xenorhabdus* (Thomas & Poinar, 1979) e *Photorhabdus* (BOEMARE et al., 1993) (OWUAMA, 2001).

Os nematoides entomopatogênicos passam por três fases de desenvolvimento, ovo, juvenil e adulto. Após eclodirem dos ovos, iniciam a fase de juvenil, sendo esta subdividida em quatro estádios, juvenil um (J1), juvenil dois (J2), juvenil três (J3) ou juvenil infectivo (JI) e, juvenil quatro (J4). Após a fase de juvenil os NEPs completam o ciclo tornando-se férteis, quando chegam na fase adulta. Os adultos de Steinernematidae são dioicos enquanto os de Heterorhabditidae são obrigatoriamente monoicos em sua primeira geração dentro

do hospedeiro, e dioicos nas demais gerações que possam se desenvolver dentro de um mesmo hospedeiro (KAYA & GAUGLER, 1993).

O JI é encontrado no solo quando abandona o hospedeiro quando o alimento já não é mais suficiente para o desenvolvimento de novos nematoides, os juvenis no terceiro estágio armazenam células da bactéria simbiote em seu interior e abandonam o cadáver (ALMENARA et al., 2010). Os JIs podem permanecer no solo à procura de um novo inseto hospedeiro por meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematoide envolvida (SMITH et al., 1992). Os JIs buscam o inseto e os localizam através de sinais químicos, como a presença de CO₂. A infecção ocorre pelas aberturas naturais do exoesqueleto do hospedeiro (boca, ânus ou espiráculos) ou mesmo através da perfuração no tegumento. No interior do inseto, migram para a hemocele e liberam na hemolinfa as bactérias simbiotes. Estas produzem toxinas que matam o hospedeiro dentro de 24 a 48 horas reiniciando o ciclo (LEITE, et al., 2006).

Para ambos os gêneros, o número de gerações dentro do cadáver do inseto varia de acordo com a quantidade de alimento disponível, comumente duas ou três gerações.

As bactérias simbiotes também tem potencial para serem utilizadas de forma isolada para o controle de pragas agrícolas, ou seja, sem a ação de NEPs como vetores (GOODRICH-BLAIR & CLARKE, 2007). Os estudos sobre NEPs tem focado a utilização destes agentes de controle microbiano em grande escala, ou seja, visando a comercialização destes agentes que são eficientes, porém, ainda de alto custo (FERRAZ et al., 2008)

2.4. Métodos moleculares para diferenciação de populações

Avanços na área de Biologia Molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas de caracterização molecular (ABDELNOOR et al., 2001). A biologia

molecular tem por finalidade de investigar a presença/ausência de informação genética, e através disso possibilitar a comparação da informação de diferentes amostras e poder concluir a respeito.

As ferramentas moleculares mais apropriadas para a detecção da variabilidade genética populacional são: a análise do DNA mitocondrial que apresenta herança uniparental materna, sem recombinações e com altas taxas evolutivas (CALCAGNOTTO et al., 2001); e DNA microssatélite que é altamente polimórfico e com unidades de repetição com 2-6 pares de base ao acaso (NAHUM, 2001)

2.4.1. DNA mitocondrial

O gene do citocromo C oxidase subunidade I (COI), tem sido considerada uma ferramenta útil na identificação de espécies animais. A sequência de um fragmento deste gene é chamada de barcoding, ou código de barras de DNA (HARRISON, 1989).

Através da análise deste gene que armazena o DNA mitocondrial, pode-se explorar a diversidade entre as sequências de DNA para identificar organismos (AVISE, et al., 1987).

As características fundamentais do gene COI são que seu genoma mitocondrial é amplamente distribuído entre os animais, tem alto número de cópias por célula, apresenta taxa de mutação diferente entre espécies, não sofre recombinação, tem uma herança predominantemente materna além de possuir baixo polimorfismo ancestral (BOORE, 1999).

Este sistema permite que um grande número de exemplares seja estudado de modo eficiente e identificar os que apresentam código de barra do DNA diferentes que poderiam ser indicativos de novas espécies, subespécies e populações (HEBERT et al., 2003)

Esse sistema permite dar novos rumos em pesquisas sobre biodiversidade, complementando várias outras iniciativas em curso para absorver os conhecimentos taxonômicos atuais (WILSON et al., 1985).

2.4.2. DNA genômico – marcadores ISSR

Os marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas localizadas num mesmo loco. Com eles é possível prever, mapear e caracterizar a informação molecular.

Com os conhecimentos moleculares em plena evolução, há cerca de 30 anos surgiram então diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA.

São vários os marcadores moleculares, e dentre eles os marcadores moleculares ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), representam uma das classes mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al. 1994; CAIXETA et al. 2006).

São facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo relativamente baixo. (WOLFE, 2005).

O princípio da técnica é baseado em reações em cadeia da polimerase - PCR (Polymerase chain reaction) e envolve ampliações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas (ZIETKIEWICZ, et al, 1994). As ampliações não requerem informação da sequência do genoma e conduz a multilocos e altos padrões polimórficos.

ISSR é uma técnica simples rápida e eficiente, pois os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pares de base de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade devido ao uso de primers longos na qual permite

um uso de alta temperatura de anelamento. (BORNET & BRANCHARD; 2001 REDY et al., 2002).

Os marcadores ISSR tem sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética a nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Devido à sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito empregado para estudar relações entre duas populações muito relacionadas (REDY et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e criação das populações de *Plutella xylostella*

Para o presente trabalho foram utilizadas quatro populações de *P. xylostella*:

População “Px” – data da coleta: 15 de janeiro de 2007 – coleta realizada em plantas de repolho na cidade de Recife-PE - 74 gerações em laboratório. População inicial: 143 espécimes adultos.

População “PA” – data da coleta: 22 de julho de 2008 – coleta realizada em plantas de repolho na cidade de Alegre-ES, área de cultivo com altitude de cerca de 250m em relação ao nível do mar, com temperaturas mais elevadas – 41 gerações em laboratório. População inicial: 160 espécimes adultos.

População “PC” – data da coleta: 19 de maio de 2008 – coleta realizada em plantas de repolho na cidade de Alegre-ES, área de cultivo com altitude de cerca de 830m em relação ao nível do mar, com temperaturas mais amenas – 44 gerações em laboratório. População inicial: 150 espécimes adultos.

População “PJ” – data da coleta: 5 de julho de 2010 – coleta realizada em plantas de repolho na cidade de Jaboticabal-SP - 10 gerações em laboratório. População inicial: 147 espécimes adultos.

Todas as populações foram coletadas em áreas sem relato de aplicação de inseticidas, e após, foram mantidas isoladas reprodutivamente, ou seja, sem a introdução de novos espécimes.

Os insetos foram criados no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos do Departamento de Fitossanidade da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP.

Após a emergência, os adultos eram liberados em gaiolas contendo um disco de folha de couve manteiga (*B. oleracea* var. *manteiga*) de oito cm de diâmetro, que era colocado sobre um disco de papel filtro de mesmo tamanho, este disco de papel filtro era levemente umedecido com água deionizada estéril. Os dois discos então eram dispostos sobre um copo plástico transparente com a abertura voltada para baixo, ficando a folha de couve elevada dentro da gaiola transparente onde ocorria a oviposição. No ápice do recipiente foi feita uma abertura de cerca de 2,3 cm de diâmetro. Este orifício era utilizado para a alimentação dos adultos com solução aquosa de mel a 10%, que era fornecida por embebição de uma esponja presa com uma pequena “trouxa” de tecido tipo voile nessa abertura. Em cada gaiola também foi feita uma abertura lateral, quadrada, coberta com tecido tipo voile para permitir troca de ar com o ambiente. Os discos retirados das gaiolas eram colocados em placas de Petri de mesmo tamanho até a eclosão das lagartas, quando estas eram transferidas para caixas plásticas com folhas de couve, repostas quando necessário, até que as larvas atingissem a fase pupal. As pupas então eram coletadas com o auxílio de pincel de finas cerdas e acondicionadas em tubos de ensaio vedados com filme plástico (PVC) com pequenos furos feitos com um estilete, cuja finalidade foi promover aeração no interior dos tubos (Figura 2).

As pupas então eram mantidas no tubo até a emergência dos adultos, quando o processo se repetia.

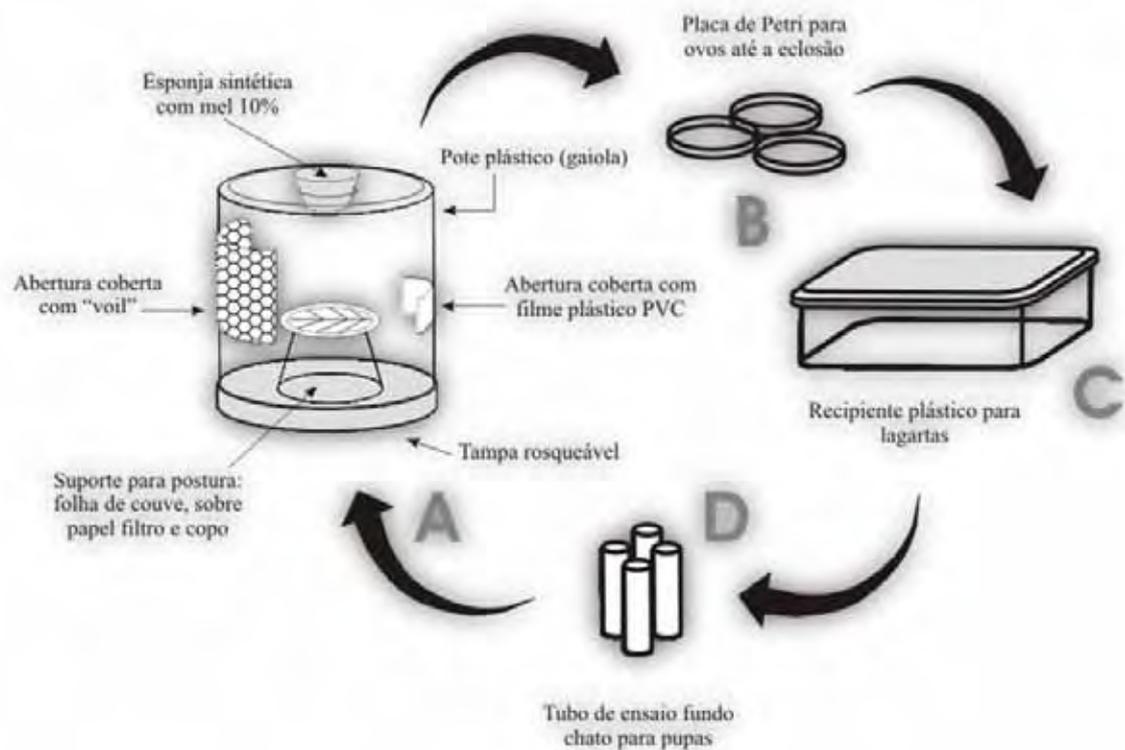


Figura 2: Criação de *Plutella xylostella* para utilização nos experimentos.
Fonte: THULER (2006).

A criação da traça das crucíferas foi conduzida em sala regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.2. Análise molecular das populações

Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros e no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, ambos localizados na UNESP/Jaboticabal.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega), adicionando 20 mg/ml Proteinase K.

Foram utilizados 20 insetos por população sendo cada população representada por dois abdomens de adultos de *P. xylostella*, que eram então incubados por 12 horas a 50 °C e adicionado a Proteinase K.

As proteínas e resíduos foram precipitados utilizando-se 200µL de solução saturada de NaCl e posteriormente centrifugadas a 1400 rpm por 30 minutos. O isopropanol foi eliminado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol, centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos a 2 °C, seco e ressuspensão em 100 µL de tampão TE (ROUX et al., 2007).

3.2.1. Amplificação e sequenciamento COI

Para a amplificação do gene COI foi utilizado par de iniciadores: PLU1 - 5'-AAATTTACAATTTATCGCTTAAATCTCAGCC-3' (Forward) e PLU2 - 5'-CCTCTTTCTTGTGATAATAATATGGAAATTATACC-3' (Reverse) (LI et al., 2006; YUKUHIRO et al., 2002). Esta região do COI é regularmente utilizada como um sistema global para animais em todo o mundo (HEBERT et al., 2003).

As reações de PCR foram realizadas num termociclador Eppendorf® modelo Mastercycler Gradient HX0128-00208, com desnaturação inicial durante 5 min a 95 ° C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 ° C, 45 s de anelamento a 53 ° C, e 1 min a 72 °C e uma extensão subsequente de 7 minutos a 72 ° C. para finalizar a extensão. Para confirmar amplificação de DNA por PCR, foi realizado eletroforese, utilizando 0,5 x tampão TAE em 1% de gel de agarose (LI et al., 2006).

O produto de PCR foi então purificado utilizando um kit de purificação PCR Wizard® SV Gel e PCR System Clean-up (Promega), seguindo os protocolos do fabricante, e posteriormente foi quantificado o DNA mitocondrial em

espectrofotometro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific - Uniscience) para padronização das amostras para o sequenciamento. Os produtos purificados do PCR foram sequenciados utilizando os mesmos iniciadores utilizados na PCR, utilizando o kit BigDye™ Terminator versão 3.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador genético ABI Prism™ 3100, com as mesmas condições na PCR. Após o sequenciamento, o fragmento foi submetido a várias lavagens com 75% de isopropanol, seguido por centrifugação (MORALES & FREITAS, 2010).

As sequencias puras foram editadas e alinhadas usando o programa, BioEdit v. 7.1.3.0 (HALL, 1999). A diversidade nucleotídica (Pi), diversidade haplotípica (Hd), número total de mutações Eta (η), número médio de nucleotídeo diferenças (k) e número de sítios polimórficos (em segregação) (S) foram calculados com o programa DnaSP v 5.10.01 para as amostras como um todo (ROZAS et al., 2003). O percentual médio de bases em todas as sequências de amostras de DNA foi estimado por meio do programa MEGA v.5.10 β 3 (TAMURA et al., 2007). A fim de estimar os níveis de distância genética, uma matriz de distâncias foi calculada através do modelo de Kimura 2-parâmetro (KIMURA, 1980), e o dendrograma foi obtido utilizando o método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987). Foi testada por 1.000 permutações aleatórias utilizando o MEGA v.4 (TAMURA et al., 2007) programa. O Arlequin 3.5.3.1 (SCHNEIDER et al., 2000) estimou se os dados eram significativos ou não pela análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992),

3.2.2. Método ISSR-PCR

A análise por ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat) foi realizada com sete iniciadores (Tabela 1). Para a reação foi utilizado o Kit “Wizard™ Genomic DNA Purification KIT ” (Promega) em termociclador Eppendorf® modelo Mastercycler Gradient HX0128-00208 nos ciclos: desnaturação inicial de 4 minutos

a 94 °C, 39 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 ou 58 °C e 2 minutos a 72 °C e última etapa de 10 minutos a 72 °C, seguindo de armazenamento a 4 °C (ROUX et al., 2007).

Tabela 1. Iniciadores a serem utilizados na diferenciação de populações de *Plutella xylostella* (Roux et al., 2007).

Iniciador	Sequência (5'→3')	Código	T de anelamento °C
PLU3 - CA	CACACACACACACA	(CA)7	47
PLU4 - CA+	CACACACACACACARY	(CA)7RY	50
PLU5 - +CA	RYCACACACACACACA	RY(CA)7	50
PLU6 - +ACA	BDBACAACAACAACAACA	BDB(ACA)5	50
PLU7 - ACA+	ACAACAACAACAACABDB	(ACA)5BDB	50
PLU8 - +GACA	WBGACAGACAGACAGACA	WB(GACA)4	58
PLU9 - GACA+	GACAGACAGACAGACAWB	(GACA)4WB	58

B = T, C ou G; D = A,T ou G; R = A ou G; W = A ou T; Y = C ou T.

Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo (0,05%) de acordo com. Amplificações controle eram realizadas para verificar possíveis contaminações no DNA e a quantificação do DNA foi feita com Nanodrop® 2000c (Thermo Scientific - Uniscience).

De acordo com o resultado das eletroforeses, estas foram transformadas em matrizes binárias de forma isolada e como um todo, para que então os resultados fossem interpretados em AMOVA realizada com o programa Arlequin pelos método clássico para verificar a significância dos dados (ROUX et al., 2007). Além disso dados de distância genética foram calculados assim como na análise do COI.

3.3. Testes de suscetibilidade

3.3.1. *Beauveria bassiana*

Os isolados de *B. bassiana* utilizados (Tabela 2) foram escolhidos do estoque do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP) da UNESP Jaboticabal. Os testes foram realizados no mesmo laboratório.

Os isolados foram repicados em placa de Petri em meio de cultura artificial BDA (Batata, Dextrose e Agar) + Levedura para produção de esporos (ME) (ALVES et al, 1998). O experimento foi dividido em duas etapas: teste de patogenicidade e teste de virulência.

Foram utilizadas seis repetições com 20 lagartas de segundo instar nos testes de patogenicidade a fim de selecionar os isolados eficientes. Já nos testes de virulência foram utilizadas cinco repetições com 10 lagartas de segundo instar cada. Em todos os testes os tratamentos controle foram compostos pela pulverização de água destilada e autoclavada mais o espalhante adesivo a 0,05% - Tween 80[®], com mesmo número de insetos e repetições. Para os testes de patogenicidade, foram obtidos os conídios através de raspagem das placas de multiplicação. Para isso foi utilizada uma alça raspadora, água deionizada estéril, um Becker e gaze estéril para filtragem a fim de se obter somente conídios da raspagem da placa. Logo após, os conídios eram contabilizados em câmara de Neubauer e determinado a concentração da suspensão mãe, para que em seguida fosse ajustado o volume para uma concentração de 1×10^8 conídios/mL adicionado do espalhante. A pulverização dos isolados foi feita utilizando Torre de Potter com pressão de 15 lb/in² e volume de 6 mL de suspensão de conídios, o que possibilitou uma deposição média de 1,80 mg/cm² de suspensão, de acordo com a recomendação da International Organization of Biological Control of

Noxious Animals and Plants (IOBC) (OVERMEER & VAN ZON 1982, HASSAN et al. 1985).

Tabela 2. Isolados de *B. bassiana* utilizados nos experimentos de *P. xylostella*.

Acesso	Laboratório de origem	Cidade
AM09	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
IBCB01	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB07	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB17	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB18	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB33	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB35	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB63	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB66	Instituto Biológico	Campinas - SP
IBCB87	Instituto Biológico	Campinas - SP
JAB01	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
JAB06	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
JAB07	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
JAB43	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
JAB44	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
JAB48	Laboratório de Microbiologia	Jaboticabal - SP
LCMAP01	Laboratório de Controle Microbiano	Jaboticabal - SP
LCMAP02	Laboratório de Controle Microbiano	Jaboticabal - SP
LCMAP03	Laboratório de Controle Microbiano	Jaboticabal - SP
LCMAP05	Laboratório de Controle Microbiano	Jaboticabal - SP

A pulverização foi efetuada sobre discos foliares de couve manteiga (*B. oleracea* var. *acephala* cv. manteiga), em suas duas faces, os discos mediam cerca de oito centímetros de diâmetro, e foi o alimento da traça-das-crucíferas. Antes de pulverizados, os discos eram imersos em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária) a um por cento durante cinco minutos, e enxaguados com água deionizada, em seguida, secos com papel toalha. As repetições eram colocadas em placas de Petri (9,5 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura). As suspensões de conídios sobre a face abaxial dos discos foliares de couve manteiga que ficaram

sobre papel filtro nas placas de Petri, e após a secagem da folha, lagartas foram transferidas para a face abaxial da folha pulverizada com o auxílio de um pincel de finas cerdas. Ao final dos processos, as placas foram tampadas e vedadas com filme plástico para evitar que as lagartas fugissem.

Para os testes de virulência, o procedimento foi idêntico ao de patogenicidade, porém as concentrações a serem utilizadas foram determinadas em testes pré-seletivos.

O número de conídios produzidos por cadáver foi avaliado após o teste de patogenicidade, para isso os cadáveres de *P. xylostella* foram individualmente lavados em água deionizada e autoclavada e a quantidade de conídios foi contabilizada em câmara de Neubauer. Foram constituídas 10 repetições por tratamento, sendo que a contabilização somente foi realizada após o décimo quinto dia garantindo a cessão da conidiogênese, dos cadáveres onde houve a confirmação da patologia em câmara úmida.

Os bioensaios com *B. bassiana* foram conduzidos em biocâmaras climatizadas regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.3.2. Nematoides entomopatogênicos

Quatro espécies de nematoides entomopatogênicos foram obtidos junto ao Centro Experimental do Instituto Biológico, (Campinas, SP) (Tabela 3). Para a multiplicação dos nematoides foi utilizado o hospedeiro alternativo *Galleria mellonella* (L., 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), e sua criação foi conduzida de acordo com a metodologia de Andaló et al. (2004), em dieta para desenvolvimento larval com a seguinte composição: farinha de trigo 200g, farelo de trigo 200g, leite em pó desnatado 400g, levedura de cerveja 120g, gérmen de trigo 200g, mel 240g, glicerina 130g e água destilada 20mL.

Tabela 3. Espécies de nematoides entomopatogênicos utilizadas nos trabalhos.

NEP¹	Laboratório de Origem	Cidade - Estado
<i>Heterorhabditis. amazonensis</i>	Instituto biológico	Campinas SP
<i>Heterorhabditis indica</i>	Instituto biológico	Campinas SP
<i>Steinernema brazilense</i>	Instituto biológico	Campinas SP
<i>Steinernema feltiae</i>	Instituto biológico	Campinas SP

¹Nematoide entomopatogênicos.

A dieta do hospedeiro alternativo então era misturada e colocada em potes plásticos forrados com folhas de papel. Desta forma o substrato poderia receber as posturas. Após o completo desenvolvimento larval as pupas então eram retiradas ao longo do desenvolvimento e transferidas para placas de Petri, onde ficavam até a emergência do adulto, devido . Os adultos então eram transferidos para tubos de PVC forrados com papel sulfite, contendo o mesmo tipo de papel em seu interior dobrado em “sanfona” para receber as posturas, estes tubos eram tapados com tecido do tipo voile na abertura superior e colocados sobre o fundo de uma placa de 15 cm de diâmetro correspondente a largura do tubo, que tinha aproximadamente 25 cm de altura. Completado o ciclo de criação as etapas se repetiam para que sempre houvesse larvas de *G. mellonella* para a multiplicação dos NEPs.

Para a multiplicação dos NEPs, eram selecionadas dez lagartas, de quinto instar e de tamanho aproximado e, posteriormente, colocadas em uma placa de Petri de nove cm de diâmetro com duas folhas de papel filtro no fundo, sendo neste inoculados dois mL da suspensão com os nematoides (ANDALÓ et al., 2004). Após a inoculação, as placas eram mantidas em câmara BOD por cerca de 48 a 60 horas, tempo que normalmente levava para ocorrer a morte das lagartas do hospedeiro e houvesse confirmado o sintoma da patologia, para então transferir as lagartas mortas para novas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com papel filtro

seco, e lá ficavam por cerca de 5 a 7 dias. Após esta fase era montada a armadilha de White, que consiste em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo em seu interior a tampa de uma placa de 9 cm virada para baixo, sobre esta foi posta uma folha de papel filtro cortada com diâmetro de 13,5 cm, onde foram colocadas as lagartas mortas por nematoides e cerca de 3 mL de água deionizada estéril no fundo da placa. As armadilhas foram colocadas em B.O.D. por um período de 3 a 7 dias, para então recolher o conteúdo de JI dispersos em água. Os juvenis mortos dos vivos foram separados pelo processo de decantação e filtragem. Para a filtragem foi utilizado uma peneira de malha 150 mesh. Após isso, os nematoides eram acondicionados em Erlenmeyers de 500 mL em água deionizada e autoclavada. Esta suspensão mãe permanecia em B.O.D. por um prazo máximo de 15 dias para a reinoculação de criação e por no máximo de 3 dias para a utilização em experimentos.

O ajuste de suspensões de NEPs para experimentos era feito utilizando-se uma alíquota de 1 ml da suspensão mãe, que era contabilizada em vidro de relógio com auxílio de uma lupa

No ensaio de patogenicidade com NEPs, foram considerados 5 tratamentos representados pelos 4 nematoides mais a testemunha. Para cada tratamento foram estabelecidas 6 repetições, e cada repetição representada por uma placa de Petri (9,5cm de diâmetro x 2,0cm de altura) contendo um disco (8 cm de diâmetro) de folha de couve (*B. oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga) infestada com 20 lagartas de 2º instar da praga. No fundo da placa foi colocado um círculo de papel filtro de mesmo tamanho, que era umedecido com água a fim de manter o disco foliar turgido. Os nematoides foram aplicados em suspensão aquosa com o auxílio de uma pipeta, adicionando-se em cada círculo de folha 0,5 mL da suspensão contendo uma dose equivalente a 200 JI/inseto. As placas foram seladas com filme PVC e acondicionadas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa com fotofase de 12 horas.

A avaliação foi realizada diariamente após a aplicação, com base na mortalidade dos insetos. Os insetos mortos foram transferidos para placas de Petri com papel filtro seco a fim de confirmar a mortalidade pelo desenvolvimento da patologia. Após 24 horas esses foram transferidos para armadilhas de White para permitir a coleta dos JI que deixaram o cadáver, para que se pudesse realizar a sua contagem e determinar o número de JI produzidos por cadáver. Foram constituídas 10 repetições por tratamento,

Para os testes de virulência foram realizados pré-testes nas mesmas condições dos ensaios de patogenicidade a fim de definir os pontos extremos para a análise da concentração letal, após isso, mais quatro pontos equidistantes dentro das concentrações extremas foram calculados.

Os ensaios com NEPs foram conduzidos em biocâmaras climatizadas reguladas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.3.3. Bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos

Foi estudado a suscetibilidade das populações da traça-das-crucíferas a dez isolados de bactérias simbiotes de NEPs (Tabela 4).

Para este bioensaio foram cedidos os isolados em meio NB (0,5% de peptona e 0,3% de extrato de carne), e neste mesmo meio eram repicados a medida que se fazia necessário.

A cultura de cada isolado era feita em Erlenmeyers de 100mL contendo a metade do volume de meio. Após a inoculação o meio era colocado em mesa agitadora horizontal a 26°C , e depois de 24 horas era cessada a agitação e utilizado.

As bactérias foram isoladas a partir da hemolinfa do hospedeiro infectado (KAYA & STOCK, 1997), conforme a metodologia descrita a seguir:

Tabela 4. Relação das bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos utilizadas.

Acesso	Espécie da bactéria simbionte	NEP¹ hospedeiro	Laboratório de Origem	Cidade - Estado
B1	<i>Xenorhabdus poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	Instituto Biológico	Campinas -SP
B2	<i>X. nematophila</i>	<i>Steinernema carpocapse</i>	Instituto Biológico	Campinas -SP
B5	<i>Photorhabdus luminescens akhurstii</i>	<i>Heterorhabditis indica</i>	Instituto Biológico	Campinas -SP
B6	<i>Xenorhabdus</i> sp. –	<i>Steinernema</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B9	<i>Xenorhabdus</i> sp. -	<i>Steinernema</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B24	<i>Photorhabdus</i> sp. –	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B27	<i>Xenorhabdus</i> sp. -	<i>Steinernema</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B28	<i>Xenorhabdus</i> sp. -	<i>Steinernema</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B38	<i>Xenorhabdus</i> sp. -	<i>Steinernema</i> sp.	Instituto Biológico	Campinas -SP
B47	<i>X. bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	Instituto Biológico	Campinas -SP

Foram colocadas 10 lagartas de ultimo instar de *G. Mellonella* em uma placa de Petri com papel filtro e inoculado com 100 juvenis infectivos para cada inseto. Após 12 a 48 horas, esterilizou-se superficialmente a larva de *Galleria mellonella* mergulhando a mesma em uma solução de hipoclorito de sódio (1%) e enxaguando 3 vezes seguidamente em água destilada, seguido de mergulho em água destilada. Rompeu-se o tegumento com pinça ou agulha estéril, tomando o cuidado para não romper o intestino, e foi plaqueado uma gota da hemolinfa sobre meio MacConkey, NBTA - Extrato de carne (0,3%) + Peptona (0,5%) + NaCl (0,8%) + ágar (1,5%) + cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (0,004%) + azul de bromotimol (0,0025%), ou nutriente ágar (AKHURST, 1980).

Caso não fosse encontrado contaminantes após o plaqueamento, transferiu-se a colônia (cor verde para *Heterorhabditis* e marrom escuro para *Steinernema*) para meio nutriente-ágar e incubou-se por 1 a 3 dias a 25°C no escuro.

Neste ensaio de patogenicidade os discos foliares de couve manteiga eram imersos no meio contendo a cultura bacteriana e agitado por um período de 10 segundos, sendo retirado e colocado para secar o excesso sobre um papel filtro. Logo após eram inoculadas 20 lagartas de segundo instar de *P. xylostella* na face abaxial da folha. Foram constituídas seis repetições por isolado

Para confirmar a mortalidade pelos isolados foi verificado a alteração de cor característica da patologia desencadeada por estes agentes de controle microbiano.

Estes ensaios com as bactérias simbiotes dos NEPs também foram conduzidos em biocâmaras climatizadas reguladas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.4. Efeitos Subletais

Com os sobreviventes aos testes de patogenicidade, foram avaliados alguns aspectos biológicos quando o número amostral foi de no mínimo doze indivíduos.

Os aspectos biológicos avaliados foram: peso de lagartas sobreviventes após cinco dias da aplicação dos agentes de controle, peso de pupas de macho e fêmea, razão sexual, número total de ovos (fecundidade) e viabilidade de ovos.

O peso de lagartas e pupas foram verificados em balança de precisão; a razão sexual foi estudada logo após a eclosão dos adultos (JUSTUS & MITCHELL, 1999), pela observação da morfologia das asas e das genitálias.

Para estudar o total de oviposição e a viabilidade de ovos foram montadas gaiolas com casais da praga, num total de seis casais por tratamento. Os ovos foram retirados diariamente e acondicionados em placas de Petri junto com o disco foliar de couve que serviu como substrato de oviposição, os quais foram contabilizados e avaliados quanto a viabilidade.

Os ensaios de efeitos subletais foram conduzidos em salas climatizadas reguladas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.5. Consumo Foliar

O consumo foliar foi aferido nos discos foliares de couve manteiga (*B. oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga) que foram oferecidos nos ensaios de patogenicidade.

A medição foi feita em cada repetição com o uso de um medidor de área foliar a laser (CI 203® – CID Incorporation). Os discos de oito centímetros de diâmetro eram colocados na mesa do aparelho e em seguida escaneados através da passada do leitor a laser em seu trilho, com isso era obtida a área antes do consumo. Após o consumo, era medido novamente o restante de cada disco ,e,

desta forma, calculou-se através da diferença a área consumida pelas lagartas de *P. xylostella*.

Os ensaios de efeitos subletais foram conduzidos em câmaras climatizada reguladas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas

3.6. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado.

Para os experimentos de patogenicidade e virulência, a mortalidade corrigida foi calculada em relação à testemunha pela fórmula de Abbott (1925). Para isso foi utilizada a mortalidade confirmada pela porcentagem de insetos mortos que apresentaram o desenvolvimento da patologia correspondente a cada agente de controle microbiano testado. No teste de patogenicidade os dados observados foram transformados por $\arcsin \sqrt{(x/100)}$, submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0,05$ e $0,01$) para comparação entre médias, o que forneceu os isolados que foram submetidos ao teste de virulência para estimar a concentração letal 50 (CL_{50}), que foi analisada com a utilização do programa Polo-Plus® (LeOra Software) pelo qual foi realizado a Análise de Probit, conforme Haddad (1998)

Os dados de produção de microrganismos em cadáveres de *P. xylostella*, aspectos biológicos e consumo foliar, foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 e 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sequenciamento do gene COI

Foram utilizados dez indivíduos para as populações PX, PC e PJ e nove indivíduos da população PA. O número menor de indivíduos em PA se deve a uma amostra perdida durante a purificação do DNA. Não inserções, exclusões ou códons de parada foram detectados nas análises, totalizando 776 pares de base.

Um fragmento de 815-pares de base (pb), foi utilizado em todas as análises dos 39 indivíduos que foram sequenciados, não havendo variação do comprimento. Em comparação aos dados obtidos por Li et al. (2006), foram utilizados 104 pares de base a mais. Provavelmente o número de bases codificadas a mais se deve ao aproveitamento da sequência cortada que teve boa qualidade de sequenciamento. Sendo a região codificada a mesma que a dos autores supracitados quando analisaram populações de *P. xylostella* do sudeste da China e da Coreia do Sul, sobrando pares de base tanto no sentido 5' quanto no sentido 3', sobrepondo o material sequenciado.

A composição média percentual de bases foi de 39,6% timina, 30,7% adenina, 14,9% de citosina e 14,8% de guanina, obedecendo a proporção de distribuição de bases em DNA mitocondrial de animais (BOORE, 1999). Globalmente, 43 sítios polimórficos (S) foram observados, definindo 19 haplótipos (Tabela 5), com uma diversidade geral (Hd) de $0,887 \pm 0,040$, a diversidade de nucleotídeos (Pi) foi de $0,00832 \pm 0,00125$, o número total de mutações (η) foi de 46 e o número médio de diferentes nucleotídeos (k) foi 6,458.

Os valores de diversidade geral (Hd) de cada população mostram que a população PA é a mais homogênea em sua constituição gênica mitocondrial, e ainda é a que apresenta menor diversidade de nucleotídeos (Tabela 6).

A distância genética foi calculada para as populações de forma total (e entre as populações (Tabela 7)), utilizando o modelo de dois parâmetros de

Kimura (KIMURA, 1980). Para as populações como um todo, o valor da distância genética foi de $0,008 \pm 0,002$ ($F_{ST} = 0,056$; $p = 0,04$), estando o valor dentro do esperado para a variação de DNA mitocondrial para insetos como constataram Brower. (1994) e Kim et al. (2001), mostrando pequena distância genética de forma global, e entre as populações a maior distância foi de 0,013, valor encontrado entre os indivíduos da população PX e da população PJ, que também são as populações mais distantes geograficamente, entretanto o valor da distância é pequeno.

Um dendrograma foi produzido utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) (Figura 3), onde foram testadas 1.000 permutações aleatórias utilizando “bootstrap”, como valores de nós basais. Através do dendrograma podemos observar que os indivíduos das populações PX e PA são os mais similares e que as populações PC e PJ são as mais diversas, no entanto, verificou-se que a diversidade do mtDNA não proporcionou um agrupamento homogêneo de acordo com a grande variabilidade de haplótipos. Morales & Freitas (2010) também verificaram que a diversidade gênica mitocondrial de indivíduos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) era grande, e que apesar de mostrar uma boa similaridade genética, não houve um padrão bem definido de dendrograma separando populações distintamente, uma vez que os indivíduos se misturam em diversos ramos.

A AMOVA para a distância genética foi significativa para a distância entre as populações PA e PC ($F_{ST} = 0,162$ e $p = 0,009$) (Tabela 7). Estas duas populações são provenientes de uma mesma localidade. Isto quer dizer que a distância geográfica não influenciou na formação de populações distintas, e sim outros fatores como temperatura, alimentação alternativa ou migração. A diferenciação das populações através da diversidade de mtDNA, das distâncias e do número de haplótipos encontrado é considerável, uma vez que o número amostral foi de 39 indivíduos, ou seja, mais da metade possui material

mitocondrial em segregação, o que pode ser encontrado em indivíduos que migram longas distâncias (CHAPMAN, et al., 2002).

Tabela 5. Lista de haplótipos, diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (Pi) das populações de *Plutella xylostella*.

Indivíduo	Posição						
	111222333	333445566	666777777	777777777	777777777	7777788	
	9034258023	5682346749	1248524520	7456890158	3467849017	8015840	
P1A_ {PX}	AATC-TTAAG	GAAAACAATA	GACCGAGGCC	AATACAA--T	TGTC-CAGTT	T-CGTTT	
P1B_ {PX}TTTTTGT..	-.---A.	AT.GTATAG.	.CT....	
P1C_ {PX}GAGA.CCTAC..AGK	.A....	
P1D_ {PX}	...A.A...	T...ACCAA.C.-AGG	AC...C.	
P1E_ {PX}-AG.	.C.....	
P1F_ {PX}-A.-AG.	.C.....	
P1G_ {PX}-A.-AG.	.C.....	
P1H_ {PX}	T...-T.	T.....-AG.	.C.....	
P1I_ {PX}	-...-T.-AG.	.C.....	
P1J_ {PX}T.-A.-AG.	.CT....	
P2A_ {PA}-A.-AG.	.C-T...	
P2B_ {PA}-A.-AG.	.C.....	
P2C_ {PA}	T.....-A.-AG.	.C.....	
P2D_ {PA}-A.-AG.	.C.....	
P2E_ {PA}-A.-AG.	.C.....	
P2F_ {PA}	AT.....-AG.	.C.....	
P2G_ {PA}-A.-AG.	.C.....	
P2H_ {PA}	T.....-A.-AG.	.C.....	
P2I_ {PA}T.-A.-AG.	.C.....	
P3A_ {PC}AT.-A.-AG.	.C.....	
P3B_ {PC}G.-A.-AG.	.C.....	
P3C_ {PC}T.-A.-AG.	.C.....	
P3D_ {PC}-A.-AG.	.C.....	
P3E_ {PC}	
P3F_ {PC}	...TA....CG	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P3G_ {PC}	...A....-A.-AG.	.C.....	
P3H_ {PC}	...T-...C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P3I_ {PC}	...AT...-A.-AG.	.C.....	
P3J_ {PC}C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P4A_ {PJ}	T.....-A.-AG.	.C.....	
P4B_ {PJ}	...-T.C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C-.G..	
P4C_ {PJ}	-...GCC.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C...A	
P4D_ {PJ}	-TAT-...C.	AGTTAGAATT	...T--A.	..C.-AG.	.C.....	
P4E_ {PJ}	...T-...-A.-AG.	.C.....	
P4F_ {PJ}C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P4G_ {PJ}C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P4H_ {PJ}	CG.....-A.-AG.	.C.....	
P4I_ {PJ}	...-T.C.	AGTTAG.ATT-A.	..C.-AG.	.C.....	
P4J_ {PJ}G.-A.-AG.	.C.....	

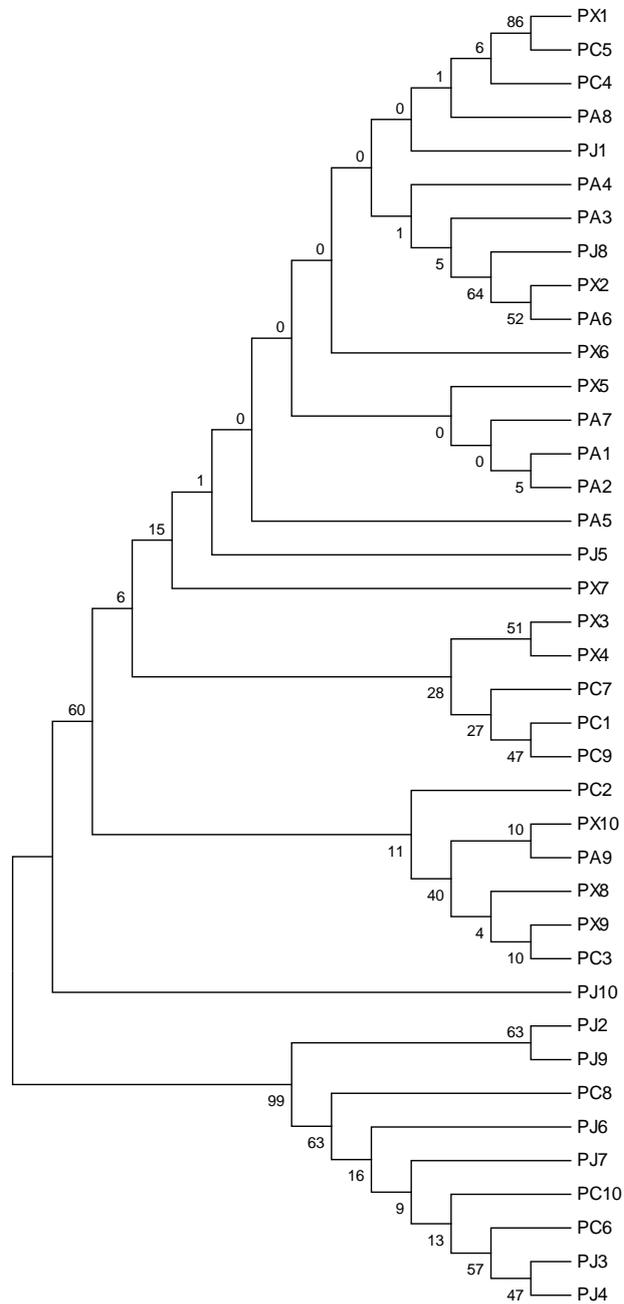


Figura 3. Dendrograma gerado a partir do método Neighbor-Joining com seqüências mitocondriais da oxidase do Citocromo I (COI) de populações da traça-das-crucíferas. Os números nos ramos correspondem aos valores de Bootstrap.

Tabela 6. Diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (Pi) e erro padrão das populações da traça das crucíferas.

População	PX	PA	PC	PJ
Hd	0,867 ± 0,085	0,583 ± 0,183	0,956 ± 0,059	0,956 ± 0,060
PI	0,116 ± 0,040	0,021 ± 0,008	0,158 ± 0,032	0,180 ± 0,025

Tabela 7. Distância média dentro e entre as populações da traça-das-crucíferas.

População	Dentro das Populações			
PX	0,006 ± 0,01*			
PA	0,001 ± 0,01*			
PC	0,009 ± 0,02*			
PJ	0,010 ± 0,02*			
	Entre as Populações			
	PX	PA	PC	PJ
PX	-	-	-	-
PA	0,004	-	-	-
PC	0,008	0,006*	-	-
PJ	0,013	0,011	0,010	-

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

P. xylostella tem o grande potencial biológico, podendo formar grandes grupos durante o ano (TALEKAR & SHELTON, 1993). Segundo Caprio & Tabashnik (1992) cerca de 8% de uma população da traça-das-crucíferas faz migração diariamente, sendo que a distância pode chegar a milhares de quilômetros em alguns dias (LORIMER, 1981, CHAPMAN et al. 2002). Portanto este fluxo gênico no DNA mitocondrial pode ser devido a grande taxa de reprodução e a capacidade migratória desta espécie (CHU, 1986; HONDA, 1990; HONDA et al., 1992; COULSON et al., 2002),

4.2. Método ISSR-PCR

Dos sete iniciadores testados somente um não marcou bandas (PLU 7), para confirmação os procedimentos foram repetidos por duas vezes. No entanto, foi possível utilizar os dados obtidos com as 39 amostras, sendo um total de dez amostras para PX, PC e PJ e 9 para PA, que foi perdida na extração do DNA.

Os seis iniciadores juntos marcaram um total de 48 bandas, número bem inferior ao encontrado por Roux et al. (2007), que encontraram 188 bandas, além disso, esses pesquisadores não conseguiram bandas com os iniciadores PLU 3, PLU 4 e PLU5, pois obtiveram apenas manchas que não foram consideradas, sendo que o mesmo efeito observado neste trabalho ocorreu somente no primer Plu7. Este fato pode ser devido a menor variabilidade genética encontrada neste trabalho em relação ao trabalho dos autores supracitados.

De acordo com a análise de variância molecular, as diferenças entre e dentro das populações foram significativas devido ao valor de $p= 0,0000$ (Tabela 8),

As variações entre as populações alcançaram o valor médio de 10,2%, enquanto dentro das populações o valor foi de aproximadamente 90%, o que demonstra que as diferenças genéticas de DNA genômico são relativamente notáveis e de acordo com a Tabela 9, pode-se notar que isso reflete em diferenças entre cada população de forma pareada e em sua própria diversidade.

Apesar das populações terem sido coletadas em áreas onde não havia sido empregado o uso de agrotóxicos, não podemos garantir que estas populações não entraram em contato com tais produtos que tem grande poder mutagênico sendo uma fonte de variação gênica muito grande (WEILL et al, 2004) devido aos relatos de migração a longas distâncias desta praga (CHAPMAN et al., 2002)

Tabela 8. Análise de Variância Molecular para as diferenças entre e dentro das populações pelo método de ISSR-PCR.

Fonte de Variação	G.L. ¹	Soma dos Quadrados	Componetes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre Populações ^a	3	33,56	0,61	10,2
Dentro das Populações ^b	34	183,02	5,38	89,8
Total	37	216,58	5,99	-
F_{ST}	0,102		p^{a, b}	0,00000

¹ Graus de liberdade;

Tabela 9. Proporção da diferença dentro e entre as populações pelo método ISSR-PCR.

População	Dentro das Populações			
PX	11,98 ± 0,009*			
PA	9,61 ± 0,001*			
PC	10,87 ± 0,09*			
PJ	10,44 ± 0,03*			
	Entre as Populações			
	PX	PA	PC	PJ
PX	-	-	-	-
PA	0,01 ± 0,009*	-	-	-
PC	0,08 ± 0,001*	0,07 ± 0,036*	-	-
PJ	0,15 ± 0,009*	0,12 ± 0,009*	0,1 ± 0,001*	-

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Como as populações são de origem tropical e permanecem em temperatura que permite desenvolver várias gerações ao ano, a continua segregação do DNA

genômico é resultante das diversas contribuições de diferentes insetos que contribuíram com informação genética diferente (GRANT & MACKAY, 1969)

4.3. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* aos entomopatógenos

As populações de *P. xylostella* mostram-se suscetíveis a todas as táticas de todos os entomopatógenos testados, entretanto, melhores resultados foram obtidos com o uso de fungos entomopatogênicos (Tabela 10).

Os resultados de patogenicidade com NEPs (Tabela 11) também foram promissores, no entanto nenhum NEP conseguiu ser tão eficiente quanto alguns isolados de *B. bassiana*.

Já os resultados de mortalidade da traça-das-crucíferas expostas as bactérias simbiotes de NEPs (Tabela 12), foram os resultados menos promissores, ainda mais por ter sido utilizado a cultura pura das bactérias nos discos foliares de couve.

A mortalidade com *B. bassiana* não evidenciou diferenças de resultados entre as populações, mas diferenciou bem entre os isolados testados, atingindo 100% de mortalidade pelos isolados AM09 e JAB 48, e ainda o teste de médias adicionou mais quatro isolados (IBCB18, IBCB66, JAB01e LCMAP03) ao grupo mais virulento para o microlepidóptero estudado. Estes seis isolados foram os selecionados entre os fungos entomopatogênicos estudados nos testes de virulência.

Silva et al. (2003) e Rondelli et al. (2011), também verificaram que isolados de *B. bassiana* foram patogênicos à *P. xylostella*, e apresentaram os mesmo sintomas de coloração de confirmação da patologia deste fungo entomopatogênicos, com uma alteração para coloração rósea e posterior produção de conídios, desenvolvendo o aspecto de massa pulverulenta.

Tabela 10. Mortalidade média corrigida das populações de *P. xylostella* quando aplicados isolados de *Beauveria bassiana* (média \pm erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
AM09	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	-	0,00
IBCB01	92,67 \pm 0,76 CDE	92,17 \pm 0,87 BC	93,17 \pm 0,70 BCD	93,67 \pm 0,80 B	0,67 ^{ns}	2,07
IBCB07	67,17 \pm 0,33 H	66,33 \pm 0,71 E	65,17 \pm 0,95 G	66,00 \pm 1,29 F	0,68 ^{ns}	3,72
IBCB17	92,67 \pm 0,88 CDE	92,50 \pm 0,99 BC	94,50 \pm 0,67 B	92,33 \pm 0,95 BC	1,30 ^{ns}	2,33
IBCB18	99,50 \pm 0,34 A	99,67 \pm 0,33 A	99,33 \pm 0,49 A	99,17 \pm 0,48 A	0,26 ^{ns}	1,03
IBCB33	89,67 \pm 1,15 DEF	91,67 \pm 0,92 BC	87,33 \pm 1,02 E	90,33 \pm 1,45 BCD	2,48 ^{ns}	3,14
IBCB35	94,67 \pm 0,61 BC	93,00 \pm 0,82 B	94,17 \pm 0,83 B	94,17 \pm 0,48 B	1,02 ^{ns}	1,83
IBCB63	90,17 \pm 1,22 DEF	90,50 \pm 1,65 BC	89,17 \pm 1,47 DE	89,17 \pm 0,54 CD	0,28 ^{ns}	3,52
IBCB66	99,86 \pm 0,17 A	100,00 \pm 0,00 A	99,50 \pm 0,50 A	99,83 \pm 0,17 A	0,58 ^{ns}	0,68
IBCB87	89,83 \pm 0,60 DEF	92,00 \pm 0,26 BC	89,67 \pm 0,80 CDE	91,67 \pm 0,71 BCD	3,71 ^{ns}	1,70
JAB01	99,50 \pm 1,39 A	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	99,67 \pm 0,21 A	0,85 ^{ns}	0,67
JAB06	55,00 \pm 1,39 I	54,17 \pm 1,35 F	55,83 \pm 0,95 H	54,17 \pm 1,25 G	0,41 ^{ns}	5,57
JAB07	93,67 \pm 0,33 CD	93,83 \pm 0,40 B	93,67 \pm 0,33 BC	93,83 \pm 0,33 B	0,08 ^{ns}	0,90
JAB43	88,20 \pm 1,01 F	88,50 \pm 0,96 C	89,17 \pm 1,30 DE	88,67 \pm 1,33 CD	1,32 ^{ns}	3,23
JAB44	75,67 \pm 1,09 G	76,67 \pm 0,80 D	75,67 \pm 0,92 F	76,17 \pm 1,17 E	0,23 ^{ns}	3,23
JAB48	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	100,00 \pm 0,00 A	-	0,00
LCMAP01	89,17 \pm 1,01 EF	88,50 \pm 1,34 C	87,83 \pm 1,19 E	87,67 \pm 1,26 D	0,32 ^{ns}	3,35
LCMAP02	37,83 \pm 0,65 J	36,00 \pm 0,82 G	36,83 \pm 0,75 I	37,67 \pm 0,42 H	1,56 ^{ns}	4,47
LCMAP03	98,67 \pm 0,61 AB	99,50 \pm 0,22 A	99,67 \pm 0,21 A	99,17 \pm 0,65 A	0,86 ^{ns}	1,17
LCMAP05	54,00 \pm 1,15 I	54,33 \pm 1,23 F	55,83 \pm 0,95 H	52,67 \pm 0,80 G	1,54 ^{ns}	4,73
F	472,96**	475,82**	488,20**	468,68**	-	-
C.V.(%)	2,37	2,42	2,35	2,43	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA - população 1 de Alegre, ES; PC - população 2 de Alegre; PJ - população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Os resultados de mortalidade de *P. xylostella* a NEPs (Tabela 11) foram similares aos encontrados por Schroer et al. (2005), Salem et al. (2007), Nyasani et al. (2007) e Maketon et al. (2011), com cerca de 80 a 100% de similaridade quando analisados os dados referentes a nematoides do gênero *Heterorhabditis* e *Steinernema* respectivamente. Estes resultados corroboram o potencial dos

nematoides entomopatogênicos para o controle da traça-das-crucíferas. A pequena variação dos nossos resultados com os destes autores pode ser devido as semelhança genéticas das populações da praga verificadas neste trabalho, como também a dos agentes de controle biológico utilizados.

Com exceção de *S. brazilense* que demonstrou diferença significativa na mortalidade entre as populações testadas, sendo mais efetiva para PJ e PX, os demais NEPs não demonstraram diferença entre os resultados em cada população. Já quando analisou-se o efeito causado entre nematoides em cada população, verificou-se que os nematoides do gênero *Heterorhabditis* causaram maior mortalidade em PX e PC, e não havendo diferença da ação dos NEPs na mortalidade de PA e PJ. Contudo, os valores de mortalidade foram promissores para o próximo teste onde estimou-se a virulência dos NEPs.

Tabela 11. Mortalidade média corrigida das populações de *P. xylostella* quando expostas a nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	75,00 \pm 5,16 A	70,83 \pm 9,17 A	75,00 \pm 4,08 A	79,17 \pm 5,07 A	0,30 ^{ns}	20,2
<i>H. indica</i>	73,33 \pm 4,22 A	69,17 \pm 4,73 A	70,00 \pm 4,28 A	72,50 \pm 4,43 A	0,20 ^{ns}	15,18
<i>S. brazilense</i>	65,00 \pm 3,42 Aab	63,33 \pm 4,22 Ab	63,33 \pm 4,22 Ab	80,83 \pm 4,36 Aa	4,37*	14,63
<i>S. feltiae</i>	54,17 \pm 3,00 B	52,50 \pm 3,35 B	53,33 \pm 3,80 B	65,00 \pm 3,65 B	2,87 ^{ns}	15,09
F	60,25**	24,90**	53,20**	60,69**	-	-
C.V. (%)	16,46	24,46	17,48	15,97	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Os dados observados para a mortalidade corrigida das bactérias simbiotes (Tabela 12) revelaram uma menor virulência destes agentes de controle. A aplicação de bactérias simbiotes teve resultados muito semelhantes entre si sendo a variação da mortalidade entre isolados de 38 a 42%, e só foi observado diferença entre o comportamento de populações com o isolado B28 (*Steinernema*

sp.) que teve maior eficiência de controle sobre a população PA, e menor eficiência em PC e PJ, no entanto as diferenças foram muito sutis. Somente na população PA os isolados das bactérias mostraram diferença no controle sendo mais eficiente com o isolado B27 (*Xenorhabdus* sp.) e menos eficiente com o isolado B38 (*Xenorhabdus* sp.), ambos isolados de *Steinernema* sp.

Tabela 12. Mortalidade média corrigida das populações de *P. xylostella* quando expostas às bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	41,33 \pm 0,61	41,17 \pm 0,87 AB	40,50 \pm 0,76	40,00 \pm 0,82	0,63 ^{ns}	4,65
<i>X. nematophilla</i>	39,83 \pm 0,75	40,33 \pm 0,80 AB	41,16 \pm 0,70	41,00 \pm 0,82	0,64 ^{ns}	4,64
<i>P. luminescens akhurstii</i>	40,83 \pm 0,54	40,00 \pm 0,82 AB	39,83 \pm 0,54	40,50 \pm 0,62	0,51 ^{ns}	3,89
<i>Xenorhabdus</i> sp.	40,50 \pm 0,56	41,00 \pm 0,52 AB	39,67 \pm 0,67	39,83 \pm 0,75	0,96 ^{ns}	3,84
<i>Xenorhabdus</i> sp.	39,33 \pm 0,61	40,17 \pm 0,60 AB	40,83 \pm 0,79	40,67 \pm 0,71	0,97 ^{ns}	4,17
<i>Photorhabdus</i> sp.	40,50 \pm 0,43	39,50 \pm 0,50 AB	40,67 \pm 0,67	41,17 \pm 0,75	1,36 ^{ns}	3,63
<i>Xenorhabdus</i> sp.	41,50 \pm 0,62	41,83 \pm 0,65 A	40,67 \pm 0,80	40,67 \pm 0,84	0,65 ^{ns}	4,38
<i>Xenorhabdus</i> sp.	41,17 \pm 0,40 ab	42,00 \pm 0,45 Aa	39,83 \pm 0,60 Ab	39,83 \pm 0,60 Ab	4,20*	3,13
<i>Xenorhabdus</i> sp.	40,67 \pm 0,92	38,67 \pm 0,33 B	40,17 \pm 0,54	40,50 \pm 0,76	1,82 ^{ns}	4,15
<i>X. bovienii</i>	42,17 \pm 0,54	39,67 \pm 0,80 AB	41,50 \pm 0,62	41,00 \pm 0,73	2,46 ^{ns}	4,06
F	1,77 ^{ns}	2,59*	0,80 ^{ns}	0,42 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	3,70	3,99	4,09	4,50	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Abdel-Razek (2003) encontrou valores de mortalidade com bactérias simbiotes de NEPs para a mesma praga entre 40 e 60%, entretanto, visando o controle de pupas. Tais dados reafirmam que o potencial de controle das bactérias simbiotes sem seus vetores não alcançou a mesma eficiência.

Por outro lado Lanjewar et al. (2008) e Mahar et al. (2008), conseguiram resultados melhores de mortalidade para *P. xylostella* somente com o uso de

isolados de *Photorhabdus luminescens*, isso mostra que existem isolados mais virulentos do que os testados neste trabalho, ou que as populações da praga testadas neste trabalho, não são tão suscetíveis a aplicação deste entomopatógeno de forma isolada.

Como esses últimos agentes de controle não alcançaram a faixa de 50% de controle, nenhum isolado foi selecionado para testes de virulência.

A estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) dos isolados de *B. bassiana* foi igual, tanto comparando os isolados entre si como quando comparado o efeito em cada população. Isto é devido a sobreposição do valor do intervalo de confiança a 95% (Tabelas 13 a 18). Portanto não houve diferença na virulência sobre as traças-crucíferas, com os isolados selecionados.

O valor da estimativa da CL₅₀ variou de 3,29x10⁵ conídio/mL a 1,36x10⁶ conídios/mL, sem diferença na virulência dos isolados entre eles nem entre as populações.

Tabela 13. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado AM09 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ²³
AM09	PX	3,92x10 ⁵ (1,15x10 ⁵ - 1,85x10 ⁶)	3	8,12
	PA	6,64x10 ⁵ (3,34x10 ⁵ - 1,76x10 ⁶)	3	1,65
	PC	3,29x10 ⁵ (8,91x10 ⁴ - 1,69x10 ⁶)	3	8,88
	PJ	7,26x10 ⁵ (3,48x10 ⁵ - 2,10x10 ⁶)	3	1,32

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 14. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado IBCB18 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ² ³
IBCB18	PX	8,93x10 ⁵ (4,28x10 ⁵ - 2,58x10 ⁶)	3	0,59
	PA	9,75x10 ⁵ (4,66x10 ⁵ - 2,84x10 ⁶)	3	0,50
	PC	4,41x10 ⁵ (1,13x10 ⁵ - 2,46x10 ⁶)	3	9,26
	PJ	9,51x10 ⁵ (4,69x10 ⁵ - 2,61x10 ⁶)	3	1,21

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 15. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ² ³
IBCB66	PX	1,04x10 ⁶ (4,59x10 ⁵ - 3,61x10 ⁶)	3	0,75
	PA	8,48x10 ⁵ (3,98x10 ⁵ - 2,54x10 ⁶)	3	0,25
	PC	9,95x10 ⁵ (4,52x10 ⁵ - 3,21x10 ⁶)	3	0,42
	PJ	9,18x10 ⁵ (4,22x10 ⁵ - 2,89x10 ⁶)	3	0,84

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 16. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado JAB01 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ² 3
JAB01	PX	9,95x10 ⁵ (4,72x10 ⁵ - 2,94x10 ⁶)	3	1,06
	PA	9,80x10 ⁵ (4,47x10 ⁵ - 3,13x10 ⁶)	3	1,99
	PC	9,07x10 ⁵ (4,09x10 ⁵ - 2,96x10 ⁶)	3	0,65
	PJ	1,31x10 ⁶ (5,27x10 ⁵ - 5,48x10 ⁶)	3	1,52

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 17. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado JAB48 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ² 3
JAB48	PX	8,24x10 ⁵ (3,41x10 ⁵ - 3,23x10 ⁶)	3	1,77
	PA	7,63x10 ⁵ (3,39x10 ⁵ - 2,58x10 ⁶)	3	0,40
	PC	6,77x10 ⁵ (3,13x10 ⁵ - 2,10x10 ⁶)	3	0,41
	PJ	6,06x10 ⁵ (2,93x10 ⁵ - 1,71x10 ⁶)	3	0,28

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 18. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) do isolado LCMAP03 de *Beauveria bassiana* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Fungo	População	CL ₅₀ (conídios/mL) (IC 95%) ¹	GL ²	χ ² ³
LCMAP03	PX	9,53x10 ⁵ (4,11x10 ⁵ - 3,43x10 ⁶)	3	0,73
	PA	7,80x10 ⁵ (3,63x10 ⁵ - 2,39x10 ⁶)	3	0,38
	PC	9,28x10 ⁵ (4,19x10 ⁵ - 3,03x10 ⁶)	3	0,57
	PJ	8,75x10 ⁵ (3,87x10 ⁵ - 2,98x10 ⁶)	3	0,92

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Os valores obtidos com a estimativa de CL₅₀ são similares aos valores de trabalhos onde também foi estudado este parâmetro, como em Silva et al., 2003 e Rondelli et al. (2011), ambos próximo a 100% de similaridade ,em *P. xylostella*, Almeida et al.(2005) com *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae). Esta semelhança de resultados, se deve a estabilidade das enzimas proteolíticas que apresentam os fungos entomopatogênicos (STÜMER et al, 2003), que muitas vezes dependem do meio de cultivo utilizado para se expressarem durante o crescimento (THIAGO & FURLANETO, 2003), sendo o meio BDA utilizado nos trabalhos.

Nos bioensaios de virulência dos NEPs (Tabelas 19 a 22), os nematoides do gênero *Heterorhabditis* foram mais virulentos do que os do gênero *Steinernema*, pois necessitaram de uma dose menor de JI para causar a mortalidade nas populações de *P. xylostella*.

Tabela 19. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) de *Heterorhabditis amazonensis* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Nematoide	População	CL ₅₀ (Juvenis infectivos/lagarta)	GL ²	χ ² 3 ³
		(IC 95%) ¹		
<i>H. amazonensis</i>	PX	151,97 (140,88 – 163,87)	3	13,29
	PA	158,12 (146,65 - 169,60)	3	15,68
	PC	151,79 (140,14 – 163,45)	3	14,11
	PJ	148,01 (136,88 – 159,14)	3	10,66

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 20. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) de *Heterorhabditis indica* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Nematoide	População	CL ₅₀ (Juvenis infectivos/lagarta)	GL ²	χ ² 3
		(IC 95%) ¹		
<i>H. indica</i>	PX	158,79 (147,67 – 170,07)	3	13,12
	PA	153,04 (141,25 – 164,84)	3	17,26
	PC	158,87 (147,05 – 170,70)	3	14,93
	PJ	150,98 (139,51 – 162,45)	3	19,63

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 21. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) de *Steinernema brazilense* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Nematoide	População	CL ₅₀ (Juvenis infectivos/lagarta)	GL ²	χ ²³
		(IC 95%) ¹		
<i>S. brazilense</i>	PX	191,17 (178,04 – 204,30)	3	6,68
	PA	190,88 (177,74 – 204,03)	3	10,17
	PC	190,96 (177,17 – 204,75)	3	9,31
	PJ	130,12 (124,33 – 136,43)	3	11,33

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

Tabela 22. Estimativa da concentração letal 50 (CL₅₀) de *Steinernema feltiae* sobre as populações de *Plutella xylostella*.

Nematoide	População	CL ₅₀ (Juvenis infectivos/lagarta)	GL ²	χ ²³
		(IC 95%) ¹		
<i>S. feltiae</i>	PX	209,28 (192,99 – 225,57)	3	9,65
	PA	168,21 (151,88 – 185,66)	3	7,14
	PC	209,69 (192,86 – 226,52)	3	11,13
	PJ	184,97 (172,02 – 197,91)	3	8,12

¹ Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade; ² número de graus de liberdade; ³ teste do Qui-quadrado (χ²).

As CL_{50} de *H. amazonensis*, *H. indica* e *S. feltiae* não diferenciam sobre as populações da traça-das-crucíferas testadas, pois se sobrepõem em seus os intervalos de confiança, possuindo a mesma resposta.

O estudo da CL_{50} de *S. brazilense* revelou que PJ é mais suscetível a esse nematoide, pois os intervalos de confiança a 95% evidenciam que existe diferença entre as outras populações testadas.

Bélair et al. (2003) e Salem et al. (2007), observaram valores inferiores de CL_{50} , entre 2 e 60 JI quando testaram a eficácia destes agentes de controle para *P. xylostella*, entretanto, eles utilizaram lagartas de 3º instar nos ensaios, o que talvez possibilitou aos NEPs maior facilidade de penetração, pois os orifícios naturais como os espiráculos são maiores em relação as lagartas de 2º instar, que foi o padrão utilizado, pois nesta fase, já é possível atingir a praga com este método de controle devido o imaturo deixar de ter hábito minador, passando a se alimentar externamente às folhas. Isso pode resultar em uma menor capacidade de penetração, ou seja, ter que aplicar um número maior de JI para que se controle a praga com maior eficácia dados um valor médio maior para as larvas que testamos. Entretanto, quando Salem et al. (2007) testaram em lagartas de 2º instar encontraram valores semelhantes aos dados obtidos nesta pesquisa.

As diferenças entre as populações não ficaram tão evidentes nos ensaios de virulência, muito provável devido à proximidade entre elas, apesar da significativa diferença de constituição genômica entre todas as populações e mitocondrial entre PA e PC. Isto pode implicar que a ação dos entomopatógenos está pouco ou nada ligado aos sítios que estão em segregação, ou seja, pode ser que os sítios de ação dos entomopatógenos testados não sofreram alteração com a diversificação do código genético da espécie de inseto estudada (ENKERLI & WIDMER, 2010).

Ainda pode ser que as toxinas produzidas pelos isolados de *B. bassiana* como beauvericina, bassianinae e oosporeína, (ARBOLEDA VALENCIA, 2011), podem ser produzidas em quantidades similares (SANTINI, et al. 2009), uma vez

que os intervalos de confiança oscilaram entre as populações de um mesmo isolado, entretanto foram iguais pelo fato da sobreposição dos intervalos de confiança. Isso talvez seja explicado pela possibilidade dos isolados serem geneticamente próximos ou iguais.

O mesmo pode ser considerado para as toxinas das bactérias que os NEPs testados possuem (KAYA & GAUGLER, 1993; SHARMA, et al., 2011)

A capacidade dos entomopatógenos produzirem suas toxinas influencia diretamente na virulência dos mesmos, o que pode gerar diferença na ação, como na quantidade de inoculo para o controle, e ainda, no tempo de ação (STÜMER et al., 2003), como observado com *S. brazilense* em PJ, que diferenciou nas demais populações.

Caso as proteínas sejam diferentes ou ainda produzidas em quantidades diferentes, elas possuam grande similaridade de sítios, ou ainda sejam sítios polimórficos que permitam a ligação de diversas toxinas. Na mesma linha de raciocínio a variação encontrada na estimativa de virulência com *S. brazilense* sobre PJ, leva a acreditar que existam mais sítios para as toxinas produzidas pela bactéria deste NEP.

Para sanar tais dúvidas, podem ser realizados trabalhos explorando análises moleculares sobre a presença/ausência de toxinas e de sítios para as mesmas no hospedeiro, inclusive sobre populações da mesma praga, o que sanaria a teoria de que estes locos não estão segregando, e de forma geral trazer maior elucidação a este comportamento de populações expostas a mesmos entomopatógenos e/ou agrotóxicos, tendo reações distintas ou não.

Contudo, o estudo da virulência destes agentes de controle microbiano vem mostrar o potencial infectivo dos mesmos, para próximos estudos, podendo talvez substituir produtos químicos, uma vez que as CL_{50} mostram valores quantitativos relevantes, e, possíveis de serem produzidos em uma concentração maior para alcançar taxas superiores a 90% de controle.

4.4. Produção de conídios de *Beauveria bassiana* e de juvenis infectivos de NEPs

A produção de conídios de *B. bassiana* em lagartas de *P. xylostella* (Tabela 23) variou de 10685,8 a 13434,11 conídios/lagarta, ocorrendo diferença apenas entre as populações PA e PC no tratamento com o isolado JAB07. Esta diferença pode ser devida as lagartas da população PA ser mais ricas em carboidratos e/ou proteínas, talvez devido uma predisposição genética, permitindo um melhor meio para o desenvolvimento na conidiogênese, e ainda este isolado ser mais sensível à concentração de nutrientes do meio.

Alexandre et al. (2006) verificaram que a produção de conídios de *B. bassiana* em *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1727) (Coleoptera: Tenebrionidae) foi influenciada pela temperatura e por agentes saprófitos, em temperaturas constantes não houve variação significativa na produção da estrutura reprodutiva do fungo, explicando a homogeneidade de resultados, já que a temperatura deste trabalho foi constante.

Sosá-Gómez & Alves (2000) relatam que a umidade também interfere diretamente na conidiogênese, e que níveis entre 90 a 100% de umidade são os mais eficientes para a produção de conídios de *B. bassiana*.

A quantidade de conídios produzida por cadáveres da traça-das-crucíferas é um dado inédito, mas, é bem menor do que o produzido, por exemplo, por *Nomureae rileyi* em *A. gemmatalis*, que é de aproximadamente $7,05 \times 10^8$ conídios/mg de lagarta (SUJII et al., 2002). No entanto, além de ser outra espécie de fungo e de hospedeiro utilizado, a diferença de tamanho entre uma praga e outra é grande, o que nos mostra que os resultados obtidos estão dentro do esperado.

A produção de juvenis infectivos em lagartas de *P. xylostella* (Tabela 24) é um dado que nunca foi aferido. Mas, em comparação ao hospedeiro alternativo *G.*

mellonella que produz cerca de 8.000 a 30.000 JI/lagarta (ACEVEDO et al., 2005), é muito inferior. Por outro lado, a traça-das-crucíferas é um inseto bem menor e com orifícios reduzidos para a entrada do agente de controle (GALLO et al., 2002), e por isso houve um número reduzido de JI nesta relação.

Tabela 23. Produção média de conídios de *Beauveria bassiana* em lagartas de *Plutella xylostella*.

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
AM09	12909,76 ± 514	12132,86 ± 508	12555,33 ± 713	11673,03 ± 400	0,58 ^{ns}	14,01
IBCB01	12547,14 ± 707	11400,26 ± 808	12641,71 ± 512	11753,02 ± 667	0,67 ^{ns}	15,01
IBCB07	12398,99 ± 723	11621,85 ± 624	12232,53 ± 521	12219,34 ± 581	0,25 ^{ns}	13,82
IBCB17	11563,29 ± 662	11872,01 ± 533	11997,7 ± 651	12244,39 ± 455	0,20 ^{ns}	13,18
IBCB18	12288,25 ± 322	12497,82 ± 462	12374,69 ± 891	12798,1 ± 942	0,10 ^{ns}	14,10
IBCB33	11787,55 ± 572	11080,46 ± 365	11642,22 ± 498	12163,63 ± 895	0,47 ^{ns}	13,80
IBCB35	11516,75 ± 545	11466,03 ± 668	12559,83 ± 540	11031,04 ± 590	1,07 ^{ns}	13,22
IBCB63	12740,30 ± 428	11325,86 ± 817	11559,72 ± 737	12205,32 ± 674	0,83 ^{ns}	14,38
IBCB66	11918,30 ± 545	11945,48 ± 670	11950,57 ± 681	12624,85 ± 697	0,32 ^{ns}	13,98
IBCB87	12859,80 ± 640	11891,53 ± 832	11790,84 ± 759	12123,23 ± 978	0,32 ^{ns}	17,16
JAB01	11039,04 ± 530	12854,52 ± 772	11956,53 ± 740	11331,89 ± 732	1,20 ^{ns}	15,21
JAB06	12608,68 ± 495	12075,55 ± 729	12343,37 ± 778	11471,89 ± 717	0,46 ^{ns}	14,50
JAB07	13347,51 ± 262 ab	13434,11 ± 454 a	11268,5 ± 636 b	11790,51 ± 627 ab	4,29*	10,40
JAB43	12919,07 ± 593	13254,43 ± 370	12542,06 ± 682	12326,18 ± 534	0,43 ^{ns}	11,72
JAB44	11497,50 ± 565	11298,01 ± 699	11296,7 ± 857	12879,04 ± 678	1,05 ^{ns}	15,52
JAB48	12668,43 ± 443	12725,80 ± 581	11446,19 ± 788	12344,97 ± 717	0,76 ^{ns}	13,36
LCMAP01	11186,84 ± 608	11838,84 ± 768	10685,80 ± 539	12041,34 ± 623	0,82 ^{ns}	14,70
LCMAP02	12569,18 ± 657	11273,3 ± 709	10278,53 ± 313	12052,66 ± 103	1,67 ^{ns}	16,36
LCMAP03	10862,43 ± 469	11557,36 ± 744	11892,9 ± 650	11081,75 ± 874	0,41 ^{ns}	15,66
LCMAP05	12062,45 ± 543	11176,38 ± 745	11990,34 ± 619	12884,88 ± 633	1,06 ^{ns}	13,78
F	0,96 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,86 ^{ns}	0,57 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	14,41	13,66	14,09	14,73	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboicabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Em *H. amazonensis* e *H. indica* foram produzidos em maior quantidade, isso ocorre por serem menores em relação aos nematoides do gênero *Steinernema* (GIOMETTI et al., 2011). E, devido a isso, ter maior potencial biológico, pois ocupam menos espaço e utilizam menor quantidade de substrato para se desenvolverem em iguais condições. A produção de juvenis não foi influenciada pela população da praga.

Tabela 24. Produção média de juvenis infectivos dos nematoides em lagartas das populações brasileiras de *P. xylostella* (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	322,20 \pm 9,39 A	324,50 \pm 11,07 A	321,10 \pm 8,48 A	326,80 \pm 10,87 A	0,11 ^{ns}	7,57
<i>H. indica</i>	324,40 \pm 11,05 A	321,10 \pm 10,56 A	327,10 \pm 8,27 A	316,80 \pm 15,14 A	0,25 ^{ns}	8,76
<i>S. brazilense</i>	237,90 \pm 10,12 B	237,20 \pm 14,04 B	235,90 \pm 11,59 B	236,80 \pm 13,17 B	0,01 ^{ns}	12,74
<i>S. feltiae</i>	243,50 \pm 12,86 B	241,60 \pm 14,08 B	243,00 \pm 11,44 B	237,60 \pm 10,08 B	0,08 ^{ns}	12,16
F	31,79**	24,61**	41,76**	25,73**	-	-
C.V. (%)	9,5	10,93	8,51	10,93	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

4.5. Consumo foliar

Os discos foliares de couve manteiga foram trocados a cada dia assim que perdiam a turgescência ou quando eram consumidos por inteiro.

O consumo foliar de couve manteiga por lagartas de *P. xylostella* (Tabela 25) apresentou-se bem diversificado de acordo com o isolado utilizado, e quando as lagartas não foram expostas (testemunha) observou-se diferenças populacionais.

De forma geral o consumo foliar obedeceu a proporção da mortalidade de lagartas, onde houve maior taxa de mortalidade ocasionada por isolados, houve

proporcional redução da área foliar consumida nos tratamentos. No entanto é notável destacar que o isolado JAB07 foi o responsável pelo menor consumo ocasionado nas folhas de couve, e no outro viés podemos afirmar que os isolados menos patogênicos foram responsáveis pela menor redução.

Já o consumo foliar de couve manteiga para as lagartas expostas aos NEPs (Tabela 26) foi fortemente influenciada, tanto pelas populações, quanto pelas espécies de nematoide, esses dados também são incipientes, porém, de acordo com este estudo, houve menor consumo onde aplicou-se *H. amazonensis* seguido de *H. indica*, *S. brasiliense* e *S. feltiae* e testemunha.

Ainda pode-se afirmar que o consumo foliar evidencia diferenças nas populações, devido as diferenças nas médias de consumo entre as populações sendo que PJ foi a mais afetada além de necessitar de menor quantidade de substrato para seu desenvolvimento.

O consumo foliar das lagartas expostas às bactérias simbiotes (Tabela 27) foi o menos afetado. Efeito esse decorrente da menor eficiência de controle. Entretanto, ao contrário dos isolados de *B. bassiana*, as bactérias geraram informações sobre a divergência de área foliar consumida por populações diferentes expostas a um mesmo isolado. Além disso, estes tratamentos também ocasionaram redução em relação ao tratamento controle.

Jesus et al. (2011), verificaram que a traça-das-crucíferas se alimenta menos quando se alimenta em plantas tratadas com inseticidas, o mesmo pode ser observado nos métodos biológicos testados, os quais também são eficientes. Carvalho (2008) verificou que a redução do consumo foliar também é consequência de ação deterrente dos produtos aplicados, além da mortalidade ocasionada pelos mesmos. Isto pode ser observado com os insetos que sobreviveram aos tratamentos, uma vez que esses possibilitaram redução do peso de lagartas (Tabelas 28 a 30).

Tabela 25. Consumo foliar médio de *Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga em cm² por populações de *P. xylostella* quando expostas à *Beauveria bassiana* (média ± erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
AM09	1,54 ± 0,21 FGH	1,66 ± 0,23 GHI	1,42 ± 0,24 G	1,45 ± 0,27 G	0,21 ^{ns}	3,41
IBCB01	3,77 ± 0,40 E	3,57 ± 0,32 F	3,44 ± 0,21 F	3,94 ± 0,20 F	0,57 ^{ns}	19,43
IBCB07	7,87 ± 0,19 D	8,10 ± 0,25 D	7,84 ± 0,20 D	7,86 ± 0,29 D	0,25 ^{ns}	7,54
IBCB17	3,71 ± 0,26 E	3,34 ± 0,21 FG	3,56 ± 0,29 F	3,68 ± 0,27 F	0,41 ^{ns}	17,83
IBCB18	1,39 ± 0,18 GH	1,45 ± 0,22 HI	1,40 ± 0,26 G	1,49 ± 0,19 G	0,04 ^{ns}	37,06
IBCB33	3,81 ± 0,38 E	3,59 ± 0,12 F	3,65 ± 0,34 F	3,88 ± 0,30 F	0,19 ^{ns}	19,87
IBCB35	4,19 ± 0,28 E	3,52 ± 0,26 FG	3,61 ± 0,40 F	4,02 ± 0,41 F	0,88 ^{ns}	21,87
IBCB63	3,44 ± 0,31 EF	4,05 ± 0,41 EF	3,79 ± 0,27 F	4,02 ± 0,27 F	0,78 ^{ns}	20,32
IBCB66	0,90 ± 0,13 H	0,91 ± 0,09 I	0,95 ± 0,09 G	1,03 ± 0,14 G	0,14 ^{ns}	35,40
IBCB87	3,19 ± 0,20 EFG	3,36 ± 0,23 FG	3,34 ± 0,25 F	3,37 ± 0,15 F	0,16 ^{ns}	15,67
JAB01	1,54 ± 0,23 FGH	1,39 ± 0,12 I	1,09 ± 0,15 G	1,51 ± 0,24 G	1,13 ^{ns}	33,80
JAB06	14,99 ± 0,33 C	14,57 ± 0,59 C	14,48 ± 0,22 C	15,05 ± 0,37 C	0,52 ^{ns}	6,67
JAB07	1,21 ± 0,19 H	1,05 ± 0,15 I	1,33 ± 0,21 G	1,32 ± 0,16 G	0,52 ^{ns}	35,76
JAB43	3,76 ± 0,42 E	3,81 ± 0,37 F	3,31 ± 0,35 F	3,61 ± 0,32 F	0,74 ^{ns}	24,33
JAB44	6,29 ± 0,46 D	5,92 ± 0,43 E	5,69 ± 0,40 E	6,14 ± 0,42 E	0,38 ^{ns}	17,44
JAB48	1,56 ± 0,21 FGH	1,27 ± 0,27 I	1,24 ± 0,27 G	1,45 ± 0,25 G	0,37 ^{ns}	44,62
LCMAP01	3,81 ± 0,17 E	3,33 ± 0,31 FGH	3,92 ± 0,29 EF	3,75 ± 0,25 F	0,98 ^{ns}	17,08
LCMAP02	21,43 ± 0,62 B	21,38 ± 0,67 B	21,64 ± 0,32 B	20,57 ± 0,37 B	0,83 ^{ns}	5,95
LCMAP03	1,42 ± 0,15 GH	1,27 ± 0,18 I	1,40 ± 0,18 G	1,55 ± 0,24 G	0,36 ^{ns}	32,93
LCMAP05	15,06 ± 0,67 C	15,65 ± 0,45 C	15,59 ± 0,43 C	15,94 ± 0,27 C	0,59 ^{ns}	7,52
Testemunha	32,59 ± 0,90 Aa	31,92 ± 0,78 Aa	30,16 ± 0,98 Aab	27,90 ± 0,61 Ab	6,40 ^{**}	6,63
F	447,79 ^{**}	480,53 ^{**}	489,12 ^{**}	574,95 ^{**}	-	-
C.V.(%)	14,20	13,89	13,55	11,70	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 26. Consumo foliar médio de *Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga em cm² por populações de *P. xylostella* quando expostas aos nematoides entomopatogênicos (média ± erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	11,15 ± 0,39 Ca	9,73 ± 0,57 Ca	7,64 ± 0,16 Db	5,74 ± 0,64 Cc	24,79**	13,64
<i>H. indica</i>	11,70 ± 0,27 Ca	10,28 ± 0,38 Cb	9,23 ± 0,22 CDb	7,54 ± 0,41 Cc	28,57**	8,29
<i>S. brazilense</i>	11,37 ± 0,18 Ca	12,24 ± 0,29 Ca	11,23 ± 0,55 Ca	5,46 ± 0,52 Cb	56,52**	10,05
<i>S. feltiae</i>	14,87 ± 0,19 Bab	15,85 ± 0,23 Ba	15,85 ± 0,48 Bb	15,85 ± 0,27 Bc	70,95**	5,6
Testemunha	30,55 ± 1,39 Aa	31,38 ± 1,21 Aa	28,82 ± 1,27 Aa	26,06 ± 0,68 Ab	4,03*	9,81
F	155,67**	194,21**	163,47**	270,12**	-	-
C.V. (%)	10,24	9,93	11,46	11,77	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 27. Consumo foliar médio de *Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga em cm² por populações de *P. xylostella* quando expostas à bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (média ± erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	20,83 ± 06 B	20,00 ± 0,26 B	20,67 ± 0,84 B	20,00 ± 0,58 BC	0,52 ^{ns}	7,29
<i>X. nematophilla</i>	22,67 ± 0,67 Ba	20,83 ± 0,54 Bab	21,83 ± 0,54 Bab	19,67 ± 0,95 BCb	3,45*	8,04
<i>P. luminescens akhurstii</i>	21,17 ± 0,83 B	22,67 ± 0,49 B	21,83 ± 0,54 B	20,33 ± 0,67 BC	2,34 ^{ns}	7,38
<i>Xenorhabdus</i> sp.	22,67 ± 0,80 B	21,50 ± 0,89 B	21,17 ± 0,91 B	19,67 ± 0,49 BC	2,44 ^{ns}	9,11
<i>Xenorhabdus</i> sp.	20,33 ± 0,49 Bab	22,00 ± 0,45 Ba	20,00 ± 0,52 Bab	19,5 ± 0,76 BCb	3,63*	6,81
<i>Photorhabdus</i> sp.	21,83 ± 0,87 B	21,17 ± 0,79 B	21,33 ± 0,92 B	19,17 ± 1,08 BC	1,62 ^{ns}	10,81
<i>Xenorhabdus</i> sp.	20,33 ± 0,61 Ba	21,5 ± 0,56 Ba	21,83 ± 0,79 Ba	17,00 ± 0,37 Cb	13,38**	7,33
<i>Xenorhabdus</i> sp.	21,83 ± 0,87 B	20,83 ± 0,31 B	20,83 ± 0,87 B	21,17 ± 0,60 B	0,45 ^{ns}	8,14
<i>Xenorhabdus</i> sp.	20,5V 0,76 Bab	22,17 ± 0,48 Ba	20,83 ± 0,75 Bab	18,00 ± 1,18 BCb	4,37*	10,01
<i>X. bovienii</i>	21,50 ± 0,34 B	21,17 ± 0,87 B	22,00 ± 0,58 B	20,33 ± 0,84 BC	1,02 ^{ns}	7,99
Testemunha	30,72 ± 1,61 Aab	31,22 ± 10,15 Aa	29,16 ± 1,30 Aab	26,23 ± 0,78 Ab	3,26*	10,39
F	12,56**	20,77**	9,30**	8,69**	-	-
C.V.(%)	9,15	7,36	9,03	9,65	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

4.6. Efeitos subletais

Os aspectos biológicos com *B. bassiana* foram mensurados apenas com os isolados que apresentaram número amostral igual ou maior a doze, fato que ocorreu somente em tratamentos com mortalidade reduzida.

O peso de lagartas sobreviventes após cinco dias da aplicação dos fungos entomopatogênicos (Tabela 28) demonstrou diferenças apenas entre os valores dos tratamentos controle em relação aos tratamentos com os isolados do fungo entomopatogênico, e, dentro do tratamento controle foi possível observar diferença no ganho de peso da população PC em relação as demais, que foram ao final desse período, mais pesadas que esta população.

Na Tabela 29, que trata sobre o mesmo parâmetro biológico, porém, com o uso de NEPs, também foi observado um ganho menor de peso pela população PC tratada com *S. feltiae* e na testemunha, além da redução do peso das lagartas em relação ao tratamento controle também ocorreu neste caso.

Já a análise deste aspecto com as bactérias simbiotes dos NEPs (Tabela 30), apenas demonstrou que a população PC realmente ganha menor quantidade de peso, pois, os isolados não causaram efeito algum, sendo os valores médios do peso de lagartas para cada isolado iguais aos da testemunha de cada população.

A diferença de ganho de peso da população PC parece estar ligada a conversão alimentar menor, ou seja, possuir menor eficiência de aproveitamento do substrato consumido, uma vez que o consumo foliar desta população com isolados de *B. bassiana* e alguns isolados de NEPs foi igual ao das outras populações. Ou ainda ser devido a um gasto energético naturalmente maior.

Jesus et al. (2011) obtiveram peso médio semelhante aos do tratamentos controle (cerca de 90% de similaridade) em ensaios com extratos vegetais, e portanto superior aos dos tratamentos com estes agentes de controle microbiano. Entretanto, Abro et al. (1993) encontraram valores entre 4,8 a 7,2 mg estudando o

efeito subletal de abamectina sobre a traça-das-crucíferas, valores divergentes destes trabalho, provavelmente devido a fonte alimentar utilizada, que foi a couve de Bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera* Zenk., cv. Winter Harvest), e também podemos aliar a diferença a populações diferentes da praga testada.

Tabela 28. Peso (mg) de lagartas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes após cinco dias da inoculação de isolados de *Beauveria bassiana* (média \pm erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
ICB07	3,69 \pm 0,03 B	3,67 \pm 0,02 B	3,66 \pm 0,03 B	3,63 \pm 0,03B	0,98 ^{ns}	2,42
JAB06	3,63 \pm 0,03 B	3,65 \pm 0,03 B	3,61 \pm 0,03 B	3,63 \pm 0,03B	0,32 ^{ns}	2,63
JAB44	3,61 \pm 0,03 B	3,66 \pm 0,03 B	3,66 \pm 0,02 B	3,63 \pm 0,04B	0,68 ^{ns}	2,57
LCMAP02	3,69 \pm 0,02 B	3,61 \pm 0,03 B	3,65 \pm 0,03 B	3,67 \pm 0,03B	1,45 ^{ns}	2,48
LCMAP05	3,61 \pm 0,03 B	3,69 \pm 0,02 B	3,66 \pm 0,02 B	3,62 \pm 0,02B	2,15 ^{ns}	2,15
Testemunha	4,10 \pm 0,04 Aa	4,14 \pm 0,04 Aa	3,91 \pm 0,08 Ab	4,10 \pm 0,03 Aa	19,69**	4,27
F	40,10**	42,27**	33,44**	35,84**	-	-
C.V.(%)	2,55	2,62	3,12	2,7200	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 29. Peso (mg) de lagartas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes após cinco dias da inoculação de nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
H. amazonensis	3,40 \pm 0,17 B	3,50 \pm 0,14 B	3,27 \pm 0,14 B	3,47 \pm 0,13 Ba	0,84 ^{ns}	10,32
H.indica	3,59 \pm 0,16 AB	3,41 \pm 0,18 B	3,26 \pm 0,14 B	3,40 \pm 0,09 B	1,41 ^{ns}	10,54
S. brazilense	3,68 \pm 0,12 AB	3,66 \pm 0,11 B	3,55 \pm 0,11 Ab	3,54 \pm 0,11 B	0,70 ^{ns}	7,56
S. feltiae	3,80 \pm 0,16 AB	3,71 \pm 0,13 Ba	3,39 \pm 0,09 Bb	3,72 \pm 0,14 Aba	3,16*	8,81
Testemunha	4,03 \pm 0,08 Aab	4,27 \pm 0,09 Aa	3,83 \pm 0,12 Ab	4,01 \pm 0,13 Aab	4,53**	6,65
F	4,60**	10,58**	6,29**	8,87**	-	-
C.V. (%)	9,37	8,79	8,66	8,12	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 30. Peso (mg) de lagartas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes após cinco dias da inoculação de isolados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	4,03 \pm 0,03 a	4,12 \pm 0,04 a	3,55 \pm 0,05 b	4,16 \pm 0,04 a	41,33**	3,37
<i>X. nematophilla</i>	4,12 \pm 0,03 a	4,01 \pm 0,04 a	3,64 \pm 0,08 b	4,11 \pm 0,04 a	21,22**	3,89
<i>P. luminescens akhurstii</i>	4,05 \pm 0,04 a	4,09 \pm 0,03 a	3,68 \pm 0,07 b	4,02 \pm 0,03 a	17,95**	3,61
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,05 \pm 0,03 a	4,08 \pm 0,03 a	3,74 \pm 0,04 b	4,08 \pm 0,03 a	22,77**	2,75
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,09 \pm 0,03 a	4,13 \pm 0,04 a	3,61 \pm 0,05 b	4,11 \pm 0,03 a	42,22**	3,05
<i>Photorhabdus</i> sp.	4,15 \pm 0,03 a	4,16 \pm 0,03 a	3,64 \pm 0,07 b	4,09 \pm 0,04 a	29,67**	3,60
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,06 \pm 0,04 a	4,09 \pm 0,03 a	3,64 \pm 0,07 b	4,10 \pm 0,03 a	24,83**	3,56
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,11 \pm 0,03 a	4,01 \pm 0,03 a	3,70 \pm 0,06 b	4,07 \pm 0,03 a	18,19**	3,47
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,07 \pm 0,04 a	4,09 \pm 0,05 a	3,56 \pm 0,06 b	4,12 \pm 0,04 a	31,88**	3,81
<i>X. bovienii</i>	4,08 \pm 0,03 a	4,13 \pm 0,03 a	3,71 \pm 0,05 b	4,08 \pm 0,04 a	25,86**	3,01
Testemunha	4,09 \pm 0,03 a	4,11 \pm 0,04 a	3,68 \pm 0,07 b	4,11 \pm 0,04 a	21,52**	3,65
F	0,96 ^{ns}	1,77 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,63 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	2,64	2,69	5,40	2,77	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboatão. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

O peso de pupas de machos dos tratamentos com os entomopatogênicos (Tabelas 31, a 33) geraram poucas diferenças. Com o isolado JAB44 de *B. bassiana* houve diferença entre o peso de PX (menos pesados) em relação a PA.

Quando analisado os dados dos NEPs verifica-se que em PX *H.indica* reduziu o peso em relação ao tratamento controle. Já para os tratamentos com as bactérias não geraram diferenças.

Os dados calculados para este parâmetro corroboram com a informação publicada por Chagas Filho et al. (2010) ao estudar a biologia da traça-das-crucíferas em diferentes cultivares de couve-flor, para os dados que não foram negativamente afetados, e com Torres (2004), que verificou a redução de peso de

pupas aplicando extratos aquosos de nim (*Azadirachta indica*) e pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) sobre a traça-das-crucíferas, o que mostra que estes agentes de controle também afetam a biologia da praga em questão assim como plantas inseticidas..

Tabela 31. Peso (mg) de pupas de machos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação de isolados de *Beauveria bassiana* (média \pm erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
IBCB07	4,85 \pm 0,06	4,79 \pm 0,05	4,69 \pm 0,03	4,80 \pm 0,06	1,78 ^{ns}	3,38
JAB06	4,78 \pm 0,07	4,72 \pm 0,05	4,79 \pm 0,06	4,82 \pm 0,06	0,54 ^{ns}	3,80
JAB44	4,68 \pm 0,03 b	4,88 \pm 0,05 a	4,77 \pm 0,06 ab	4,72 \pm 0,06 ab	2,87*	3,38
LCMAP02	4,68 \pm 0,03	4,80 \pm 0,05	4,82 \pm 0,04	4,76 \pm 0,04	1,94 ^{ns}	2,84
LCMAP05	4,84 \pm 0,06	4,76 \pm 0,05	4,81 \pm 0,05	4,76 \pm 0,06	0,93 ^{ns}	3,50
Testemunha	4,70 \pm 0,05	4,88 \pm 0,05	4,77 \pm 0,04	4,76 \pm 0,06	2,32 ^{ns}	3,20
F	2,47 ^{ns}	1,82 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,44 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	3,37	3,34	3,18	3,55	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 32. Peso (mg) de pupas de machos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação dos nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	4,31 \pm 0,20 AB	4,46 \pm 0,21	4,27 \pm 0,21	4,33 \pm 0,19	0,27 ^{ns}	11,4
<i>H.indica</i>	4,28 \pm 0,13 B	4,39 \pm 0,15	4,19 \pm 0,11	4,40 \pm 0,13	0,92 ^{ns}	7,56
<i>S. brazilense</i>	4,39 \pm 0,15 AB	4,41 \pm 0,08	4,30 \pm 0,15	4,42 \pm 0,16	0,26 ^{ns}	7,72
<i>S. feltiae</i>	4,41 \pm 0,12 AB	4,47 \pm 0,18	4,31 \pm 0,12	4,43 \pm 0,14	0,39 ^{ns}	7,81
Testemunha	4,73 \pm 0,09 A	4,77 \pm 0,09	4,57 \pm 0,14	4,72 \pm 0,10	1,13 ^{ns}	5,54
F	2,66*	1,76 ^{ns}	1,47 ^{ns}	1,79 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	7,86	8,17	8,62	7,96	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 33. Peso (mg) de pupas de machos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação das bactérias simbiotes dos nematoides entomopatogênicas (média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	4,82 \pm 0,04	4,71 \pm 0,05	4,71 \pm 0,05	4,75 \pm 0,04	1,38 ^{ns}	3,10
<i>X. nematophilla</i>	4,74 \pm 0,04	4,68 \pm 0,04	4,72 \pm 0,04	4,77 \pm 0,05	0,79 ^{ns}	2,91
<i>P. luminescens akhurstii</i>	4,81 \pm 0,04	4,69 \pm 0,04	4,71 \pm 0,05	4,73 \pm 0,04	1,61 ^{ns}	2,82
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,73 \pm 0,05	4,73 \pm 0,05	4,70 \pm 0,05	4,77 \pm 0,04	0,32 ^{ns}	3,23
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,75 \pm 0,04	4,75 \pm 0,05	4,77 \pm 0,05	4,80 \pm 0,04	0,26 ^{ns}	3,06
<i>Photorhabdus</i> sp.	4,79 \pm 0,05	4,78 \pm 0,05	4,85 \pm 0,04	4,78 \pm 0,05	0,56 ^{ns}	3,23
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,78 \pm 0,03	4,70 \pm 0,05	4,73 \pm 0,04	4,72 \pm 0,04	0,64 ^{ns}	2,79
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,76 \pm 0,05	4,76 \pm 0,04	4,66 \pm 0,04	4,71 \pm 0,04	1,06 ^{ns}	2,97
<i>Xenorhabdus</i> sp.	4,77 \pm 0,05	4,81 \pm 0,05	4,70 \pm 0,05	4,72 \pm 0,03	1,34 ^{ns}	2,94
<i>X. bovienii</i>	4,81 \pm 0,05	4,70 \pm 0,04	4,71 \pm 0,05	4,73 \pm 0,03	1,46 ^{ns}	2,75
Testemunha	4,75 \pm 0,07	4,79 \pm 0,06	4,70 \pm 0,09	4,75 \pm 0,06	0,26 ^{ns}	4,74
F	0,44 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,12 ^{ns}	0,40 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	3,08	3,23	3,49	2,96	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

O peso de pupas de fêmeas (Tabelas 34 a 36) da praga em estudo indica que somente no tratamento com *H. indica* mostrou que as populações PA e PC tiveram respostas diferentes, onde PC forneceu pupas fêmeas com menor peso.

Os parâmetros envolvendo pesagem mostram que apesar de haver alguns casos onde há a redução de peso durante a fase de larva, os sobreviventes conseguem alcançar peso suficiente para empuparem.

De Bortoli et al., (2012), ao estudarem o efeito de subdosagens de *B. thuringiensis*, verificaram que alguns isolados evidenciaram uma pressão de seleção que selecionou indivíduos com menor peso assim como neste trabalho. Estes fatos demonstram que há um custo de adaptação a condição de sobrevivência sobre a exposição ao entomopatógeno. Salienta-se que em alguns

casos apesar das diferenças na fase larval não se manter quando os insetos empuparam, foi notado que estes indivíduos necessitaram de um período maior para saírem da fase imatura.

Tabela 34. Peso (mg) de pupas de fêmeas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação de isolados de *Beauveria bassiana* (média \pm erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
IBCB07	5,04 \pm 0,06	5,02 \pm 0,05	5,11 \pm 0,04	5,01 \pm 0,05	0,83 ^{ns}	3,37
JAB06	5,01 \pm 0,05	5,04 \pm 0,05	5,09 \pm 0,05	5,08 \pm 0,04	0,60 ^{ns}	2,97
JAB44	5,08 \pm 0,04	5,01 \pm 0,04	5,05 \pm 0,04	5,12 \pm 0,03	1,48 ^{ns}	2,36
LCMAP02	5,01 \pm 0,05	5,08 \pm 0,03	5,04 \pm 0,05	5,03 \pm 0,05	0,41 ^{ns}	2,85
LCMAP05	4,96 \pm 0,05	5,05 \pm 0,05	4,99 \pm 0,05	5,03 \pm 0,05	0,61 ^{ns}	3,05
Testemunha	5,04 \pm 0,05	5,07 \pm 0,08	4,98 \pm 0,05	5,04 \pm 0,06	0,39 ^{ns}	3,81
F	0,68 ^{ns}	0,26 ^{ns}	1,24 ^{ns}	0,79 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	3,08	3,33	3,04	2,95	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 35. Peso (mg) de pupas de fêmeas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação dos nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
H. amazonensis	4,90 \pm 0,09	4,94 \pm 0,09	4,77 \pm 0,13	4,95 \pm 0,08	1,14 ^{ns}	5,00
H.indica	4,93 \pm 0,09 ab	5,06 \pm 0,08 a	4,7 \pm 0,16 b	4,99 \pm 0,13 ab	2,92*	5,86
S. brazilense	4,94 \pm 0,16	5,05 \pm 0,07	4,80 \pm 0,14	4,96 \pm 0,09	1,24 ^{ns}	5,94
S. feltiae	4,96 \pm 0,08	4,97 \pm 0,11	4,84 \pm 0,08	4,95 \pm 0,08	0,79 ^{ns}	4,35
Testemunha	5,03 \pm 0,06	5,20 \pm 0,11	4,96 \pm 0,08	5,09 \pm 0,07	2,45 ^{ns}	4,04
F	0,37 ^{ns}	1,92 ^{ns}	1,05 ^{ns}	0,70 ^{ns}	-	-
C.V. (%)	5,05	4,57	6,17	4,45	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 36. Peso (mg) de pupas de fêmeas das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes a inoculação das bactérias simbiotes dos nematoides entomopatogênicas (média ± erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	5,00 ± 0,04	5,08 ± 0,05	5,05 ± 0,05	5,03 ± 0,04	0,46 ^{ns}	2,80
<i>X. nematophilla</i>	5,03 ± 0,05	5,14 ± 0,05	5,03 ± 0,05	5,01 ± 0,05	1,56 ^{ns}	3,00
<i>P. luminescens akhurstii</i>	5,09 ± 0,04	5,10 ± 0,04	5,05 ± 0,05	4,95 ± 0,05	2,40 ^{ns}	2,91
<i>Xenorhabdus</i> sp.	5,01 ± 0,05	5,04 ± 0,06	4,99 ± 0,05	5,03 ± 0,05	0,16 ^{ns}	3,24
<i>Xenorhabdus</i> sp.	5,03 ± 0,04	5,02 ± 0,04	5,06 ± 0,05	5,12 ± 0,05	0,89 ^{ns}	2,95
<i>Photorhabdus</i> sp.	5,07 ± 0,05	5,10 ± 0,03	5,04 ± 0,06	4,99 ± 0,05	1,17 ^{ns}	2,91
<i>Xenorhabdus</i> sp.	5,01 ± 0,06	5,00 ± 0,03	5,08 ± 0,04	5,05 ± 0,05	0,57 ^{ns}	2,98
<i>Xenorhabdus</i> sp.	5,11 ± 0,05	5,04 ± 0,04	5,10 ± 0,05	5,08 ± 0,05	0,36 ^{ns}	2,86
<i>Xenorhabdus</i> sp.	5,09 ± 0,04	5,06 ± 0,04	5,11 ± 0,04	5,11 ± 0,05	0,36 ^{ns}	2,59
<i>X. bovienii</i>	5,03 ± 0,05	5,05 ± 0,05	5,00 ± 0,03	5,05 ± 0,05	0,25 ^{ns}	2,73
Testemunha	5,01 ± 0,05	5,14 ± 0,08	5,02 ± 0,06	5,06 ± 0,05	0,96 ^{ns}	3,78
F	0,65 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,59 ^{ns}	1,16 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	2,92	3,02	3,03	2,98	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

A razão sexual das populações (Tabelas 37 a 39) foi influenciada nos tratamentos com *B. bassiana* e com NEPs, que tiveram maior proporção de machos em relação à testemunha. A testemunha da população PC dos nematoides entomopatogênicos para este parâmetro teve a densidade de fêmeas menor em relação a população PJ.

Chagas Filho et al. (2010) avaliando a biologia de *P. xylostella*, obtiveram valor semelhante aos encontrados com os tratamento controle (valores maiores que 90% de similaridade), o que demonstra que os sobreviventes ao tratamentos com *B. bassiana* e NEPs apresentaram custo de adaptação à pressão de seleção, que influenciou no ganho de peso das lagartas e refletiu no peso de pupas.

Tabela 37. Razão sexual das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com isolados de *Beauveria bassiana* (média \pm erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
IBCB07	0,57 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,94 ^{ns}	2,99
JAB06	0,56 \pm 0,01 B	0,55 \pm 0,01 B	0,55 \pm 0,01 B	0,57 \pm 0,01 B	1,03 ^{ns}	2,89
JAB44	0,56 \pm 0,01 B	0,55 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,54 \pm 0,01 B	1,03 ^{ns}	3,41
LCMAP02	0,55 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,55 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	0,36 ^{ns}	3,19
LCMAP05	0,56 \pm 0,01 B	0,55 \pm 0,01 B	0,54 \pm 0,01 B	0,56 \pm 0,01 B	1,07 ^{ns}	2,97
Testemunha	0,63 \pm 0,01 A	0,64 \pm 0,01 A	0,63 \pm 0,01 A	0,64 \pm 0,01 A	0,27 ^{ns}	6,18
F	21,42**	21,65**	27,74**	20,40**	-	-
C.V.(%)	3,59	4,22	3,47	4,42	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 38. Razão sexual das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	0,51 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,02 B	0,50 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,02 B	0,36 ^{ns}	8,17
<i>H.indica</i>	0,51 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,01 B	0,50 \pm 0,02 B	0,50 \pm 0,02 B	0,27 ^{ns}	9,33
<i>S. brazilense</i>	0,50 \pm 0,02 B	0,50 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,02 B	0,05 ^{ns}	9,55
<i>S. feltiae</i>	0,52 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,02 B	0,49 \pm 0,02 B	0,51 \pm 0,01 B	1,11 ^{ns}	7,62
Testemunha	0,60 \pm 0,01 Aab	0,63 \pm 0,02 Aab	0,57 \pm 0,02 Ab	0,64 \pm 0,03 Aa	3,58*	8,48
F	9,82**	14,64**	5,16**	1422**	-	-
C.V. (%)	7,73	8,29	9,35	9,22	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Já os valores relativos as bactérias simbiotes apresentam-se sem alteração em relação aos tratamentos controle, e, mostram que a menor virulência destes agentes não implicou em alterações neste aspecto biológico. Viana et al. (2009) testou o efeito de isolados de *B. thuringiensis* em *P. xylostella* e também verificou uma redução da razão sexual de insetos sobreviventes. Entretanto a

redução observada por estes autores foi menor que a deste trabalho. O que mostra um melhor potencial de efeito subletal por *B. bassiana* e NEPs neste trabalho.

Tabela 39. Razão sexual das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com isolados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos(média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	0,62 \pm 0,02	0,61 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,63 \pm 0,01	0,23 ^{ns}	8,83
<i>X. nematophilla</i>	0,63 \pm 0,01	0,62 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	0,75 ^{ns}	8,62
<i>P. luminescens akhurstii</i>	0,62 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,33 ^{ns}	8,96
<i>Xenorhabdus</i> sp.	0,62 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,72 ^{ns}	9,63
<i>Xenorhabdus</i> sp.	0,61 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02	0,62 \pm 0,01	0,66 \pm 0,02	1,36 ^{ns}	9,18
<i>Photorhabdus</i> sp.	0,64 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,68 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	1,09 ^{ns}	10,22
<i>Xenorhabdus</i> sp.	0,64 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,61 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,49 ^{ns}	10,45
<i>Xenorhabdus</i> sp.	0,63 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,60 \pm 0,01	2,18 ^{ns}	8,46
<i>Xenorhabdus</i> sp.	0,63 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,67 ^{ns}	9,96
<i>X. bovienii</i>	0,62 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02	0,61 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02	0,31 ^{ns}	10,59
Testemunha	0,62 \pm 0,01	0,64 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01	0,63 \pm 0,02	0,26 ^{ns}	7,32
F	0,31 ^{ns}	0,63 ^{ns}	1,40 ^{ns}	0,84 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	9,38	9,18	8,96	9,56	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

A fecundidade (Tabela 40 a 42) foi diferente entre os tratamentos com os entomopatogênicos e as respectivas testemunhas, além de ocorrer diferença nas populações de *P. xylostella* para o tratamento com *S. brazilense*, a diferença ocorreu entre a população PC que teve menor fecundidade em relação às populações PX e PA.

Os valores da fecundidade dos tratamentos controle estão de acordo com os valores obtidos por Boiça Junior et al. (2011). Abro et al.(1993) também encontraram redução da fecundidade da traça-das-crucíferas quando exposta a praga a abamectina, o que nos mostra o grande potencial de controle de B. dos agentes de controle microbiano testados neste trabalho, que causou efeito similar

(acima de 90 %) e até mesmo melhor que alguns produtos testados pelos autores citados anteriormente.

Tabela 40. Fecundidade das populações brasileiras de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com *Beauveria bassiana* (média ± erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
IBCB07	165,50 ± 6,76 B	156,50 ± 7,31 B	163,33 ± 8,58 B	164,33 ± 7,84 B	0,28 ^{ns}	11,54
JAB06	164,00 ± 5,81 B	160,00 ± 7,78 B	163,83 ± 6,14 B	165,00 ± 6,85 B	0,11 ^{ns}	10,04
JAB44	155,16 ± 5,11 B	162,67 ± 5,74 B	158,00 ± 8,68 B	153,83 ± 7,28 B	0,33 ^{ns}	10,65
LCMAP02	161,00 ± 3,97 B	155,00 ± 4,84 B	156,17 ± 7,36 B	168,33 ± 6,23 B	1,11 ^{ns}	8,79
LCMAP05	160,67 ± 6,88 B	159,00 ± 6,72 B	158,50 ± 3,91 B	155,33 ± 6,68 B	0,13 ^{ns}	9,54
Testemunha	201,00 ± 4,10 A	202,16 ± 4,93 A	204,00 ± 2,22 A	200,67 ± 3,22 A	0,16 ^{ns}	4,55
F	8,91**	8,08**	7,65**	6,82**	-	-
C.V.(%)	8,12	9,33	9,66	9,51	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 41. Fecundidade das populações brasileiras de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com nematoides entomopatogênicos (média ± erro padrão).

NEP/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	150,33 ± 9,26 B	149,67 ± 4,84 B	128,50 ± 4,04 B	149,67 ± 4,55 B	3,13 ^{ns}	10,25
<i>H.indica</i>	146,17 ± 4,11 B	148,33 ± 3,81 B	132,50 ± 4,12 B	152,00 ± 8,32 B	2,46 ^{ns}	9,18
<i>S. brazilense</i>	157,33 ± 7,95 Ba	160,67 ± 4,95 Ba	133,33 ± 3,23 Bb	151,83 ± 3,11 Bab	5,51**	8,43
<i>S. feltiae</i>	156,17 ± 9,09 B	157,17 ± 7,82 B	133,50 ± 2,96 B	151,33 ± 4,89 B	2,74 ^{ns}	10,88
Testemunha	195,50 ± 6,72 A	210,50 ± 7,92 A	186,33 ± 5,26 A	193,50 ± 3,73 A	2,76 ^{ns}	7,62
F	6,64**	17,86**	37,10**	13,03**	-	-
C.V. (%)	11,65	9,05	6,87	8,05	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

A viabilidade dos ovos (Tabelas 43 a 45) resultantes de adultos da traça-das-crucíferas gerados sob condição de pressão de seleção pelos agentes de controle microbiano testados neste trabalho, mostram diferenças entre as populações da praga em questão, como observado entre os isolados de *B. bassiana*, que propiciaram a redução da viabilidade de ovos de PC em relação as demais populações.

Tabela 42. Fecundidade das populações brasileiras de *Plutella xylostella* sobreviventes aos tratamentos com bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F.	C.V. (%)
<i>X. poinarii</i>	160,67 \pm 6,59 B	162,00 \pm 8,54 B	151,17 \pm 7,58 B	161,50 \pm 7,72 B	0,45ns	11,78
<i>X. nematophilla</i>	167,00 \pm 5,79 AB	152,67 \pm 1,98 B	154,50 \pm 8,04 B	155,17 \pm 5,24 B	1,32ns	8,86
<i>P. luminescens akhurstii</i>	149,83 \pm 6,03 B	162,33 \pm 7,21 B	148,83 \pm 6,27 B	155,17 \pm 5,25 B	0,75ns	11,95
<i>Xenorhabdus</i> sp.	169,17 \pm 9,00 AB	160,17 \pm 9,57 B	158,50 \pm 7,11 B	155,17 \pm 5,26 AB	0,32ns	12,65
<i>Xenorhabdus</i> sp.	163,83 \pm 6,50 B	162,17 \pm 8,55 B	167,67 \pm 6,10 B	155,17 \pm 5,27 AB	0,22ns	10,50
<i>Photorhabdus</i> sp.	148,33 \pm 5,34 B	166,50 \pm 6,17 B	162,50 \pm 5,57 B	155,17 \pm 5,28 AB	2,45ns	8,56
<i>Xenorhabdus</i> sp.	164,83 \pm 7,60 B	156,67 \pm 9,20 B	157,66 \pm 4,56 B	155,17 \pm 5,29 B	0,34ns	10,00
<i>Xenorhabdus</i> sp.	168,67 \pm 5,64 AB	154,67 \pm 9,17 B	159,00 \pm 8,81 B	155,17 \pm 5,30 B	0,99ns	12,10
<i>Xenorhabdus</i> sp.	155,33 \pm 10,10 B	159,33 \pm 9,59 B	154,00 \pm 3,47 B	155,17 \pm 5,31 B	0,26ns	13,21
<i>X. bovienii</i>	158,00 \pm 7,17 B	161,67 \pm 7,46 B	151,50 \pm 7,76 B	155,17 \pm 5,32 B	0,35ns	11,98
Testemunha	199,67 \pm 4,25 A	203,50 \pm 4,09 A	202,33 \pm 2,89 A	155,17 \pm 5,33 A	0,80ns	4,26
F	3,97**	3,12**	5,27**	155,17 \pm 5,34	-	-
C.V.(%)	10,32	11,63	9,85	155,17 \pm 5,35	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Entre os tratamentos com NEPs foi possível observar que *H. amazonensis*, *H. indica* e *S. brasilense* também mostraram uma maior ação na redução da viabilidade de PC, entretanto, para *H. amazonensis* *S. brasilense*, a diferença só ocorreu em relação a PA. Enquanto para *H. indica* a diferença da viabilidade foi em relação a PX e PA.

As bactérias simbiotes não alteraram os parâmetros de viabilidade, efeito que pode ser correlacionado com sua menor virulência à populações da praga.

Tabela 43. Viabilidade dos ovos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes *Beauveria bassiana* (média ± erro padrão).

Fungo/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
IBCB07	87,17 ± 1,19 Ba	88,00 ± 0,58 Ba	75,50 ± 0,76 Ab	85,83 ± 0,54 Ba	51,32**	2,36
JAB06	86,33 ± 0,99 Ba	87,33 ± 1,05 Ba	73,17 ± 0,98 Ab	87,33 ± 1,15 Ba	44,08**	3,06
JAB44	86,83 ± 1,35 Ba	86,50 ± 1,06 Ba	75,00 ± 1,29 Ab	86,33 ± 1,12 Ba	22,83**	3,54
LCMAP02	86,50 ± 0,92 Ba	87,33 ± 1,12 Ba	74,00 ± 1,21 Ab	86,00 ± 1,03 Ba	34,63**	3,16
LCMAP05	85,83 ± 1,01 Ba	86,67 ± 0,88 Ba	72,83 ± 0,95 Ab	85,83 ± 1,01 Ba	47,46**	2,86
TEST	96,46 ± 0,34 A	96,73 ± 0,81A	94,93 ± 0,69 A	95,47 ± 0,96 A	0,58 ^{ns}	1,88
F	16,03**	17,79**	79,75**	14,74**	-	-
C.V.(%)	2,83	2,58	3,16	2,76	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 44. Viabilidade dos ovos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes com nematoides entomopatogênicos (média ± erro padrão).

Pop./NEPs	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>H. amazonensis</i>	82,67 ± 2,23 Bab	89,37 ± 3,04 a	77,32 ± 1,67 Bb	85,71 ± 2,54 ABab	4,43*	7,08
<i>H.indica</i>	83,40 ± 2,47 Ba	88,51 ± 1,98 a	74,12 ± 1,23 Bb	82,84 ± 3,05 Bab	6,82**	6,81
<i>S. brazilense</i>	83,46 ± 2,92 Bab	90,77 ± 1,99 a	78,57 ± 1,77 Bb	85,32 ± 1,21 ABab	5,93**	6,00
<i>S. feltiae</i>	84,79 ± 3,93 AB	89,22 ± 2,13	77,87 ± 3,68 B	84,69 ± 1,72 B	2,41 ^{ns}	8,78
Testemunha	95,06 ± 0,65 A	93,32 ± 1,13	94,26 ± 0,99 A	93,37 ± 1,27 A	0,64 ^{ns}	2,70
F	3,80*	0,78 ^{ns}	14,24**	3,77*	-	-
C.V. (%)	7,59	5,82	6,39	5,92	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Houve redução da viabilidade de ovos em relação a testemunha tanto para os tratamentos com *B. bassiana* como para os NEPs, com exceção de PA tratada com os NEPs.

Tabela 45. Viabilidade dos ovos das populações de *Plutella xylostella* sobreviventes com bactérias simbiotas de nematoides entomopatogênicos (média \pm erro padrão).

Bactéria/População	PX	PA	PC	PJ	F	C.V.(%)
<i>X. poinarii</i>	91,75 \pm 1,69	91,08 \pm 1,7 6	92,33 \pm 1,82	93,08 \pm 1,36	0,26 ^{ns}	4,43
<i>X. nematophilla</i>	94,58 \pm 0,80	88,83 \pm 1,64	90,00 \pm 2,34	90,17 \pm 1,70	2,19 ^{ns}	4,61
<i>P. luminescens akhurstii</i>	90,83 \pm 1,35	90,50 \pm 1,95	92,23 \pm 1,33	90,20 \pm 1,80	0,30 ^{ns}	4,39
<i>Xenorhabdus</i> sp.	91,33 \pm 1,87	89,67 \pm 0,88	91,42 \pm 2,08	92,72 \pm 1,37	0,58 ^{ns}	4,34
<i>Xenorhabdus</i> sp.	91,75 \pm 1,95	90,83 \pm 1,33	91,83 \pm 1,99	91,17 \pm 1,56	0,07 ^{ns}	4,63
<i>Photorhabdus</i> sp.	90,83 \pm 1,66	91,47 \pm 1,07	92,17 \pm 1,70	92,4 \pm 1,17	0,25 ^{ns}	3,82
<i>Xenorhabdus</i> sp.	91,33 \pm 1,52	91,50 \pm 1,26	94,33 \pm 1,09	89,83 \pm 2,01	1,55 ^{ns}	4,03
<i>Xenorhabdus</i> sp.	91,58 \pm 1,97	90,83 \pm 1,82	87,67 \pm 0,99	91,83 \pm 1,35	1,48 ^{ns}	4,27
<i>Xenorhabdus</i> sp.	91,18 \pm 2,01	90,70 \pm 1,75	90,33 \pm 1,82	87,33 \pm 0,76	1,07 ^{ns}	4,52
<i>X. bovienii</i>	89,92 \pm 1,69	90,75 \pm 1,72	93,00 \pm 1,93	91,42 \pm 1,88	0,52 ^{ns}	4,85
Testemunha	95,73 \pm 0,46	95,82 \pm 1,05	95,26 \pm 0,88	94,37 \pm 1,06	0,54 ^{ns}	2,31
F	1,12 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,49 ^{ns}	1,62 ^{ns}	-	-
C.V.(%)	4,30	4,08	4,52	4,02	-	-

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem ao nível de 5 ou 1 % de significância de acordo com o teste de Tukey. PX - população de Recife, PE; PA – população 1 de Alegre, ES; PC – população 2 de Alegre; PJ – população de Jaboticabal. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

De Bortoli et al. (2006), também verificaram que a viabilidade dos ovos pode ser influenciada quando aplicados lufenuron e azadiractina para controlar *P. xylostella*. Este efeito pode ser devido a um efeito transovariano de toxinas dos entomopatogênicos, ou mesmo ser resultado do custo de adaptação das fêmeas, e ocasionar uma produção de ovos menos nutridos e imperfeitos.

5. CONCLUSÕES

Os métodos moleculares de sequenciamento do gene COI e ISSR-PCR foram eficientes e conclusivos para o estudo das diversidade populacional de *P. xylostella*.

A variabilidade populacional entre as populações de *P. xylostella* testadas existe, pois, o estudo do DNA mitocondrial e genômico, demonstrou significância entre as distâncias genéticas.

A variabilidade entre as populações influenciou nos testes de suscetibilidade com os entomopatógenos testados, confirmando que as populações testadas não podem ser consideradas uma única população..

A traça das crucíferas de forma geral forma mais suscetíveis a isolados de *B. bassiana*, seguido pelos tratamentos com NEPs, e, por fim, menos suscetíveis às bactérias simbiotes dos nematoides, nas condições experimentais testadas.

Os cadáveres de *P. xylostella* servem como meio para a reprodução de *B. bassiana* e NEPs.

B. bassiana e NEPs apresentaram-se virulentos às populações da traça-das-crucíferas

Os isolados AM09, IBCB18, IBCB66, JAB01, JAB48 e LCMAP03 de *B. bassiana* e os nematoides entomopatogênicos *H. amoazonensis*, *H. indica*, *S. brasilense* e *S. feltiae*, tem potencial para serem avaliados em condições de campo no manejo da traça-das-crucíferas.

A população PJ foi mais suscetível à *S. brasilense*, devido a maior virulência que acomete esta população.

O estudo dos efeitos subletais através dos aspectos biológicos evidenciam as diferenças das populações da praga, além de elucidar o efeito indireto à exposição dos agentes de controle microbiano testados.

6. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.18, p.265-266, 1925.
- ABDELNOOR, R. V.; DIAS, V. P.; VELOSO, J. F; MARIN, S. R. R., KIIHL, R.A. de S. Caracterização molecular de populações do nematóide-de-cisto-da soja com diferentes índices de parasitismo na cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p.1-11, 2001.
- ABDEL-RAZEK, A. S. Pathogenic effects of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L). **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.76: p.108-111, 2003.
- ABRO, G. H; CORBITT, T. S.; CHRISTIE, P. T.; WRIGHT, D. J. Sub-lethal effect of abamectin on *Plutella xylostella* L. and *Spodoptera littoralis* boisduval larvae. **Crop Protection**, Guilford, v.12, p.39-44, 1993
- ACEVEDO, J. P. M.; MOINO JR., A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINKI, C; CARVALHO, F. A. Patogenicidade, multiplicação e biologia de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditia) provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.29, n.1, p.25-30, 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Brasília: ANVISA. 2010. 22p.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes

Neoplectama and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 121, p. 303-309, 1980.

ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Efeito da temperatura e substrato sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e sua relação no controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 75-82, 2006.

ALLEN, G. E. ; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. **The Florida Entomologist**, Florida, v.60, p.233-240, 1977.

ALMEIDA J. E. M.; FILHO, A. B.; OLIVEIRA, F. C.; RAGA A., - Pathogenicity of the entomopathogenic fungi and nematode on medfly *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae).- **Bio-Assay**, Piracicaba, v. 2, n. 7, p.1-7, 2007.

ALMEIDA, M. F.; BARROS, R, GONDIM JR., M.G.C.; FREITAS, S.; BEZERRA, A. L. Biology of *Ceraeochrysa claveri* (Navas) (Neuroptera: Chrysopidae) preying on *Plutella xylostella*(L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência. Rural**, Santa Maria, v.39, p.313–318, 2009.

ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 6, p. 1-6, 2010.

ALVES, S. B. Microrganismos associados a insetos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998b, p. 75-96.

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano vantagens e desvantagens In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998a, p. 21-39.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR., ALVES, L. F. A. TÉCNICAS DE LABORATÓRIO. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 637-711.-

ALVES, S. B.; LOPES, R. B; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.69-110.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-869..

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos pra a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.181-187, 2004.

ANJUM, N. A.; GILL, S. S.; AHMAD, I.; PACHECO, M.; DUARTE, A. C.; UMAR, S.; KHAN, N. A.; PEREIRA, M. E. The plant family Brassicaceae: An introduction. In: ANJUM, N. A.; AHMAD, I.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; UMAR, S.; KHAN, N. A. **The plant family Brassicaceae**, London: Springer, 2012, p. 1-33.

ARBOLEDA VALENCIA, J. W. **Metabólitos de origem fúngica : aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGE, J. E. L.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. **18**, p. 489-522, 1987

BADENES-PEREZ, F. R., NAULT, B. A.; SHELTON, A. M. Dynamics of diamondback moth oviposition in the presence of a highly preferred non-suitable host. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht v. 120 p. 23-31, 2006.

BAE, J. S.; KIM, I.; KIM, S. R.; JIN, B. R.; SOHN, H. D. Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 36, p. 451–457, 2001.

BÉLAIR, G.; FOURNIER, Y.; DAUPHINAIS, N. Efficacy of steinernematid against three pests of crucifers in Quebec **Journal of Nematology**, College Park, v. 35, p. 259–265, 2003

BOIÇA JUNIOR, A. L.; TAGLIARI, S. R. A; PITTA, R. M.; JESUS, F. G.; BRAZ, L. T. influência de genótipos de couve (*Brassica oleracea* L. var. acephala) na biologia de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.4, p.710-717, 2011.

BOORE J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, p.1767–1780, 1999.

BORNET, B; BRANCHARD, M.. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 19, p. 209-215, 2001.

BROWER, A. V. Z. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 3, p. 159-174, 1994.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**, Viçosa: EDITORA UFV, p. 9-78. 2006.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, p. 245–247, 2001.

CAPRIO M. A.; TABASHNIK B. E. Allozymes used to estimate gene flow among populations of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in Hawaii. **Environmental Entomology**, College Park, v. 21, p. 808–815, 1992

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H. Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. **Pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 85-89.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; MEDEIROS, M. A.; LEAL, J. G. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.60-63, 2001.

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.; MELO, C. A. de. Resistência a abamectin e cartap em populações de traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 541-543, 2002.

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BÔAS, G. L. Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*– Artrópodes de importância econômica. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, Brasília, n. 4, p. 1-3, 1997.

CHAGAS FILHO, N. R.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; ALONSO, T. F. Biologia de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivares de couve-flor. **Neotropical Entomology**. 39: 253-259, 2010.

CHAPMAN, J. W.; REYNOLDS, D. R.; SMITH, A. D.; RILEY, J. R.; PEDGLEY, D. E.; WOIWOD, I. P. High altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the U.K.: A study using radar, aerial netting, and ground trapping. **Ecological Entomology**, London, v. 27, p. 641–650, 2002.

CHU, Y. I. The migration of the diamondback moth. Diamondback moth management. In: **Proceedings of the First International Workshop**. Tainan, Taiwan, p. 77–81, 1986.

COULSON, S. J.; HODKINSON, I. D.; WEBB, N. R.; MIKKOLA, J. A. Aerial colonizations of high Arctic islands by invertebrates: Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) as a potential indicator species. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 8, p. 327–334, 2002.

CPL BUSINESS CONSULTANTS. **The 2010 worldwide biopesticides market summary**. Walingford: CAB International Centre. 2010. 39p.

CZEPAK, C.; FERNANDES, P. M.; SANTANA, H. G.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, C. de L. Eficiência de inseticidas para o controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) na cultura do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p.129-131, 2005.

DE BORTOLI, S. A.; THULER, R. T.; LOPES, B. S. Efeito de lufenuron e azadiractina sobre adultos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.53-58 , 2006.

DE BORTOLI, S. A.; VACARI, A. M.; MAGALHÃES, G. O.; DIBELLI, W.; DE BORTOLI, C. P.; ALVES, M. P. SUBDOSAGENS DE *Bacillus thuringiensis* EM *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE). **Revista Catinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 50-57, 2012.

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.

ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 17-37, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992

FERNANDES, E. K. K. FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P.. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, n. 4, p. 324-332, 2006.

FERRAZ, L. C. C. B.; LEITE, L. G.; LOPES, R. B., MOINO JR.; A.; DOLINSKI, C. Utilização de nematóides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (ed). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. FEALQ, Piracicaba, 2008, p. 171-202.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 23, p. 409-442, 1978.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p

FREITAS LUZ, F. J.; SABOYA, R. C. C.; SILVA PEREIRA, P. R. V. O cultivo do repolho em Roraima. **Comunicado Técnico da Embrapa Roraima**, Boa Vista, n. 7, 17 p., 2002.

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

GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARRES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA FILHO, A.; DELL'ACQUA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus Levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, Campinas, v.70, n.1, p.81-86, 2011.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; 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, p. 4610–4613, 2001.

Goodrich-Blair, H.; Clarke, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 64, p. 260–268, 2007.

GRANT, P. R., MACKAY, R. J. Ecological segregation of systemically related stream insects. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 47, p. 691-694, 1969.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 91-98, 1999.

HARCOURT, D. G. **The biology and ecology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis*, Curtis, in eastern Ontario.** 1954. 107f. Tese (PhD em Ciência) - Cornell University, Ithaca, 1954.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.4, p. 6-11, 1989

HASSAN SA. Standard methods to test side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WRPS Working Group of pesticides and beneficial organisms. **EPPO Bulletin**, London, v. 15, p. 214-255, 1985.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 270: p. 313–321, 2003.

HONDA, K., 1990. Hibernation and migration of diamondback moth in northern Japan, Diamondback Moth and Other Crucifer Pests. In: **Proceedings of the Second International Workshop**, Tainan, Taiwan, pp. 43–50.

HONDA, K.; MIYAHARA, Y.; KEGASAWA, K. Seasonal abundance and the possibility of spring immigration of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae), in Morioka City, northern Japan. **Applied Entomology And Zoology**, Tokyo, v. 27, p. 517–525, 1992.

IMENES, S. D. L.; CAMPOS, T. B. de ; RODRIGUES NETTO, S. M.; BERGMANN, E. C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2002.

JACOBUS, D. **Avaliação da toxicidade oral aguda e em doses repetidas do xarope contendo os extratos de *Roripa nasturtium* Rusby (Agrião), *Musa* spp. (Bananeira), *Ficus carica* Linné (Figueira), *Tagetes minuta* Linné (Chinchilia) e mel de abelhas em ratos e ratas Wistar**. 2006. 67f Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Farmacologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

JESUS, F. G.; PAIVA, L. A.; GONÇALVES, V. C.; MARQUES, M. A.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Efeito de plantas inseticidas no comportamento e biologia de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.279-285, 2011.

JOHNSTON. J. S.; PEPPER, A. E.; HALL, A. E.; CHEN, Z. J.; HODNETT, G.; DRABEK, J.; LOPEZ, R.; PRICE, H. J. Evolution of genome size in Brassicaceae. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 229–235, 2005.

JUSTUS, K.A.; B.K. MITCHELL. Reproductive morphology, copulation, and interpopulational variation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **International Journal of Insect. Morphology and Embryology**, v.28, p.231-244, 1999.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.) **Manual of techniques in insect pathology. Biological Techniques Series**. San Diego, London: Academic Press, p. 281-324, 1997.

KFIR, R. Origin of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 91, p. 164-167, 1998.

KIM, J.G.; KIM, I.; BAE, J. S.; JIN, B. R.; KIM, K. Y.; KIM, S. E.; CHOI, Y. C.; CHOI, J. Y.; LEE, K. Y.; SOHN, H. D.; NOH, S. K. Genetic subdivision of the firefly, *Luciola lateralis* (Coleoptera: Lampyridae), in Korea detected by mitochondrial COI gene sequences. **Korean Journal of Genetics**, Seoul, v. 23, p. 203–219, 2001.

KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-200.

KOCH, M.; HAUBOLD, B.; MITCHELL-OLDS, T. Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *Chs* sequences. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, p. 534-544, 2001.

LANJEWAR, S. B.; MUSADIQQ, M.; RAO, N. G. V.; DHUMALE, U. M. Toxicity of *Photorhabdus luminescens* against Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Journal of Plant Disease Science**, Deli, v. 3, n. 1, p. 77-80, 2008.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug

Mahanarva fimbriolata (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M; ALVES, S.B. (Ed.). **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003.

LI, J. H.; ZHAO, F.; CHOI, Y. S.; KIM, I.; SOHN, H. D. JIN, B. R. Genetic variation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 103, p. 605–611, 2006

LORIMER, R. I. Lepidoptera immigrant to Orkney in 1980. **Proceedings and Transactions of the British Entomology and Natural History Society**, London, v. 14, p. 108-109, 1981.

MAHAR, A. N.; JAN, N. D.; MAHAR, G. M.; MAHAR, A. Q. Control of insects with entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* and its toxic secretions. **International Journal of Agriculture and Biology**, Islamabad, v. 10, p. 52–56. 2008.

MAKETON, M; SOMSOOK, V.; RATTANAKORN, P.; HOTAKA, D. Pathogenicity and culture of a *Heterorhabditis indica* isolate from Thailand. **Nematropica**, v.41, n.1, p.52-61, 2011.

MARQUES, E. J. **Biologia e avaliação de danos da cigarrinha-da-folha *Mahanarva posticata* (Stal 1855) (Hom., Cercopidae) em cana de açúcar (*Saccharum* spp)**. 1976. 91f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, Orlando, v. 40, n. 1, p. 65-6, 2007.

MEYLING, N.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.

MONNERAT, R. G. ; LEAL-BERTIOLI, S.; BERTIOLI, D.; BUTT, T. ; BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* por susceptibilidade a *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, 2004

MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P.; ORDUZ, S.; BENITENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M. D.; IBARRA, J.; BRAVO, A. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7029-7035, 2006.

MORALES, A. C.; FREITAS, S. Haplotype characterization of the COI mitochondrial gene in *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) from different environments in Jaboticabal, state of São Paulo, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 7, n. 4, p. 1115-1121, 2010.

NAHUM, L. A. Evolução dos Genomas. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos., 2001, p. 82-96.

NYASANI, J.; KIMENJU, J. W.; OLUBAYO, F. M.; WILSON, M. J. Potential of using entomopathogenic nematodes in the management of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae) in Kenya. **African Crop Science Conference Proceedings**, v.8, p. 1063-1066, 2007

OVERMEER, W. P. J; VAN ZON, A. Q. A standardized method for testing the side effect of pesticides on the predaceous mite, *Amblyseius potentillae* (Acari: Phytoseiidae). *Entomophaga*, Paris, v. 27, p. 357-364, 1982.

OWUAMA, C. I. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 505-515. 2001.

PÉREZ, C. J.; SHELTON, A. M.. Managing diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to foliar applications of *Bacillus thuringiensis*: testing strategies in field cages. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, n. 6p. 1462-1470, 1997

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, Jalandhar, v. 1, n. 1, p. 114-124, 2005.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, n. 128, p. 9-17, 2002.

RONDELLI, V.M.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; MARQUES, E.J.; STURM, G.M.; TIBURCIO, M.O. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.212-214, 2011

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.43, p.240–250, 2007.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 2496-2497. 2003.

SAITOU, N.; NEI, M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 3, p. 406-425 1987.

SALEM, S.A.; ABDEL-RAHMAN, H.A.; ZEBITZ, C.P.W.; SALEH, M.M.E.; ALI, F.I.; EL-KHOLY, M.Y. Evaluation of entomopathogenic nematodes in controlling some pests. **Journal of Applied Sciences Research**, Ma'an, v.4, n.3, p.323-328, 2007.

SANTINI, A.; FERRACANE, R.; MECA, G.; RITIENI, A. Overview of analytical methods for beauvericin and fusaproliferin in food matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, p. 1253–1260, n. 5, 2009

SARFRAZ, M.; DOSDALL, L. M.; KEDDIE, B. A. Diamondback moth-host plant interactions: Implications for pest management. **Crop Protection**, Guildford, v. 25, n. 7, p. 625-639, 2006.

SARFRAZ, R. M.; DOSDALL, L. M.; KEDDIE B. A. Performance of the specialist herbivore *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on Brassicaceae and non-Brassicaceae species. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 142, n. 1, p. 24-35, 2010.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin: A software for population genetic data analysis **Genetics and Biometry Laboratory**. Geneva:University of Geneva, 2000, 174p.

SCHROER, S., SULISTYANTO, D., EHLERS, R.U. Control of *Plutella xylostella* using polymer-formulated *Steinernema carpocapsae* and *Bacillus thuringiensis* in cabbage fields. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.129, n.4, p.198-204, 2005.

SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.61, p.413-423, 2003.

SHARMA, M. P.; SHARMA, A. N.; HUSSAINI, S. S. Entomopathogenic nematodes, a potential biopesticide: mass production and commercialisation status – a mini review. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 44, n. 9, p. 855-870, 2011.

SHELTON, A. M.; WYMAN, J. A., CUSHING, N. L., APFELBECK, K; DENNEHY, T. J.; MAHR, S. E. R.; EIGENBRODE, S. D. Insecticide resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in North America. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 11–19, 1993.

SILVA, M. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; MARQUES, E. J.; SILVA, L. M.; BARROS, R.; LIMA FILHO, J. V. M.; SILVA, S. M. F. A. *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 583-599, 2012

SILVA, V. C. A.; BARROS, R. MARQUES, E. J.; TORRES, J. B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32: p.653-658, 2003.

SMITH, K. A.; MILLER, R. W.; SIMSER, D. H. **Entomopathogenic Nematode Bibliography: Heterorhabditidae and Steinernematidae Nematodes**. Fayetteville: Southern Cooperative Series Bulletin, 1992, 81 p

SOSA-GÓMEZ, D. R.; ALVES, S. B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 515-521, 2000.

STARNES, R. L.; LIU, C. L.; MARRONE, P. G. History, Use and Future of Microbial Insecticides. **American Entomologist**, Lanham, v. 39, n. 2, p. 83-91, 1993.

STÜMER, A. T.; ITO, E. T.; PEREIRA, G. V.; MIYAGUI, D. T. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* Stability of proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Unopar Científica**, Londrina, v.5, n. 1. P.85-88, 2003.

SUJII, E. R.; TIGANO, M. S.; SOSA-GOMEZ, D. R. Simulação do impacto do fungo *Nomuraea rileyi* em populações da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa. Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 1551-1558, 2002.

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

TABONE, E.; BARDON, C.; DESNEUX, N.; WAJNBERG, E. Parasitism of different *Trichogramma* species and strains on *Plutella xylostella* L. on greenhouse cauliflower. **Journal of Pest Science**, Holdings, v. 83, p. 251– 256, 2010.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*., Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599. 2007

TANADA, Y.; KAYA, H. K. 1. **Insect Pathology**. San Diego: Academic Press.:1993, 666 p.

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.

TIAGO, P. V.; FURLANETO, M. C. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 2, n. 1, p. 40-51, 2003.

TORRES, A. L. **Efeito associado de cultivares de repolho *Brassica oleracea* Var. *Capitata* e extratos aquosos de espécies vegetais na biologia de *Plutella xylostella* (L., 1758) e no parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912)**. 2004. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

TSUNODA, S. Eco-physiology of wild and cultivated forms in Brassica and allied genera, p. 109-132. In: TSUNODA, S.; HINATA, K.; GOMEZ-CAMPO, C. (ed). **Brassica Crops and Wild Allies: Biology and Breeding**: Tokyo: Japanese Scientific Society, p. 109-120, 1980.

VIANA, C. L. T. P.; DE BORTOLI, S. A.; THULER, R. T.; GOULART, R. M.; THULER, A. M. G.; 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, n. 1, p. 22-31, 2009.

VIANA, M. A. **Performance de *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 e *T. exiguum* pinto & platner, 1978 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de populações de *Plutella xylostella* (linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) sob ação de *Bacillus thuringiensis* berliner, 1915 (Bacillales: Bacillaceae)** 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

VOSS, M. V.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2009, 44 p.

WEILL, M.; MALCOM, C.; CHANDRE, F. MOGUENSEN, K.; BERTHOMIEU, A.; MARQUINE, M.; RAYMOND, M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, p. 1–7, 2004.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELMBYCHOWSKI, K. M.; HIGUSHI, R. G.; PALUMBI, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M.. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of Linnean Society**, London, v. 26, p. 375-400, 1985

WOLFE, A. D. **ISSR techniques for evolutionary biology**. Methods in Enzimology, Pasadena, v. 395, p. 134-144, 2005.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.;VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego,v.103, p.186-189, 2010.

WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ J. A change in a single midgut receptor in *Plutella xylostella* is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63: 1814–1819, 1997.

YUKUHIRO, K.; SEZUTSU, H.; ITOH, M.; SHIMIZU, K.; BANNO, Y. Significant Levels of Sequence Divergence and Gene Rearrangements have Occurred Between the Mitochondrial Genomes of the Wild Mulberry Silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated Silkmoth, *Bombyx mori*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 8, p: 1385-1389, 2002.

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, n. 1, p.11-12, 1993.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.