

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL INSETICIDA DAS PROTEÍNAS Cry1Ca E  
Cry2Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER PARA  
POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA:  
PLUTELLIDAE) EM LABORATÓRIO**

**Camila Pires Cardoso  
Bióloga**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL INSETICIDA DAS PROTEÍNAS Cry1Ca E  
Cry2Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER PARA  
POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA:  
PLUTELLIDAE) EM LABORATÓRIO**

**Camila Pires Cardoso**

**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)**

**2019**

C268p

Cardoso, Camila Pires

Potencial inseticida das proteínas Cry1Ca e Cry2Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner para populações de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em laboratório. / Camila Pires Cardoso. -- Jaboticabal, 2019

51 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Sergio Antonio De Bortoli

1. Concentração Letal (CL50). 2. efeitos subletais. 3. traça-das-crucíferas. 4. resistência. 5. toxina Cry. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL INSETICIDA DAS PROTEÍNAS Cry1Ca E Cry2Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER PARA POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) EM LABORATÓRIO

**AUTORA: CAMILA PIRES CARDOSO**

**ORIENTADOR: SERGIO ANTONIO DE BORTOLI**

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

Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR  
Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dra. VALÉRIA LUCAS DE LAURENTIS  
Centro Universitário-UNIRP / São José do Rio Preto/SP

Jaboticabal, 22 de maio de 2019

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CAMILA PIRES CARDOSO** - Nascida em 08 de junho de 1993, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. É bióloga graduada pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP, em dezembro de 2016. As atividades de pesquisa em entomologia iniciaram-se no estágio supervisionado realizado no Laboratório de Sistemática e Bioecologia de Parasitoides e Predadores da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Ribeirão Preto, SP, com a supervisão da Pesquisadora Dr<sup>a</sup> Rogéria Inês Rosa Lara e do Pesquisador Dr. Nelson Wanderley Perito, entre agosto de 2014 e agosto de 2015. Posteriormente foi realizado o Trabalho de Conclusão de Curso no Laboratório de Zoologia, com a orientação da Profa. Dra. Márcia Aparecida Prévide, no Centro Universitário Barão de Mauá, entre janeiro e novembro de 2016. Em março de 2017 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal, no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos com a orientação do Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de Março de 2017 a Março de 2019. Durante o período do mestrado teve a oportunidade de participar de eventos científicos com a apresentação 09 (nove) resumos simples, 01 (um) capítulo de livro, 02 (duas) palestras e 02 (duas) organizações de eventos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

**José de Alencar**

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, João Batista Cardoso e Maria Luiza Pires Cardoso, pela educação, apoio e investimentos feitos a mim, além do amor dedicado.

Aos meus avós, José Francisco Cardoso (*in memoriam*) e Odete Modesto Cardoso pelo carinho, amor incondicional e por estarem presentes quando necessitei.

À minha irmã Jéssica Pires Cardoso pelo amor, conselhos e paciência dedicada a mim.

Ao meu irmão Leonardo Pires Cardoso pelo amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e por ter permitido chegar até aqui.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal e ao Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo da Costa Ferreira e doutorando Cícero Antonio Mariano dos Santos por terem me recebido em seu laboratório e auxiliado na condução do experimento.

À equipe do LBCI (Amanda Aparecida Fernandes Lemes, Caroline Placidi De Bortoli, Caio César Truzi, Gilmar da Silva Nunes, Giovani Smaniotto, Gustavo de Oliveira Magalhães, Isabela Cristina de Oliveira Pimenta, Matheus Moreira Dantas Pinto, Natalia Fernanda Vieira, Nathália Alves dos Santos, Paula Sayuri Taguti, Rafael Ferreira dos Santos e Thamiris Porto Sipriano Nascimento), por terem contribuído de alguma forma para o meu trabalho.

Agradeço em especial aos colegas Amanda, Caio, Isabela, Gilmar, Natalia e Thamiris, por terem me ajudado diretamente na condução do meu trabalho, além de terem aguentado comigo todo estresse que resultou em muitos choros. Sou e serei eternamente grata por ter vocês do meu lado nesses momentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade, pela convivência e auxílio.

A todos meus colegas de pós-graduação, em especial Amanda Aparecida Fernandes Lemes, Bárbara Rodrigues Junqueira, Caio Cesar Truzi, Cíntia de Melo Gomes, Cícero Antonio Mariano dos Santos, Diandro Barilli, Fabrício Oliveira Fernandes, Gilmar da Silva Nunes, Maiara Alexandre Cruz, Natalia Fernanda Vieira, Jeruska Azevedo Moreira Brenha, Thaís do Prado, Tamires de Souza Marion e Thamiris Porto Sipriano Nascimento, por toparem tudo comigo e se tornarem minha família em Jaboticabal. As horas vagas não seriam tão boas sem vocês.



Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho, por toda ajuda, paciência e amizade construída.

Aos meus pais e meus irmãos por sempre acreditarem no meu potencial e não me deixar desacreditar em mim; ao investimento feito desde sempre, e por me incentivarem sempre que preciso.

À minha família pelo companheirismo e carinho incondicional.

À melhor pessoa que o mestrado poderia me apresentar, Victor Hugo de Farias Guedes, agradeço por ser companheiro, amigo e por dedicar tanto carinho a mim durante esse tempo, mesmo sem obrigação nenhuma abdicou de muito tempo para me ajudar a conduzir os experimentos nos finais de semana.

À minhas amigas, Ana Cristina Coppede, July Seabra, Mariane Helena da Silva, Mirna Dalponte, Talita Amanda Giampietro e Tharinne Pedreschi, por terem paciência durante minha ausência nesses dois anos, guardo vocês no meu coração com muito carinho.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Brassicáceas: aspectos gerais .....	3
2.2. <i>Plutella xylostella</i> .....	4
2.2.1. Ocorrência e distribuição.....	4
2.2.2. Aspectos morfológicos e biológicos .....	5
2.2.3. Danos e prejuízos .....	6
2.2.4. Controle.....	7
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
2.3.1. Histórico .....	8
2.3.2. Aspectos gerais.....	9
2.3.3. As toxinas e a atividade inseticida.....	10
2.3.4. $\delta$ -endotoxina.....	10
2.3.5. Modo de ação .....	11
2.3.6. Causas da resistência em lepidópteros.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1. Obtenção e criação dos insetos.....	14
3.2. Obtenção das toxinas .....	16
3.3. Bioensaios com <i>Plutella xylostella</i> e toxinas Bt .....	16
3.3.1. Teste de mortalidade.....	16
3.3.2. Testes para estimativa da Concentração Letal 50 (CL <sub>50</sub> ).....	17
3.3.3. Efeitos subletais .....	18
3.3.4. Análise estatística .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Bioensaios de mortalidade.....	21
4.2. Estimativa de Concentração Letal 50 (CL <sub>50</sub> ).....	23
4.3. Efeitos subletais de Cry1Ca em <i>Plutella xylostella</i> .....	25
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Mortalidade (%) de lagartas de segundo ínstar das populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a toxina Cry1Ca de <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	21
Tabela 2. Mortalidade (%) de lagartas de segundo ínstar das populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a toxina Cry2Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
Tabela 3. Resultados das estimativas de concentrações letais da toxina Cry1Ca de <i>Bacillus thuringiensis</i> para três populações de <i>Plutella xylostella</i> . ....	25
Tabela 4. Sobrevivência larval de populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	27
Tabela 5. Sobrevivência pupal de populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	27
Tabela 6. Período pupal de populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	28
Tabela 7. Peso de pupas de populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	29
Tabela 8. Longevidade de machos (dias) de <i>Plutella xylostella</i> com lagartas submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	30
Tabela 9. Longevidade de fêmeas (dias) de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	31
Tabela 10. Fecundidade de fêmeas de populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.....	32

Tabela 11. Resultados da tabela de vida de fertilidade para populações de <i>Plutella xylostella</i> submetidas a concentrações subletais da toxina Cry1Ca de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	35
---	----

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1. Esquema da metodologia utilizada para criação de <i>Plutella xylostella</i> (Thuler, 2009). .....	15
Figura 2. Modelo para sítios de ligação de proteínas Cry em <i>Plutella xylostella</i> (Ferré e van Rie, 2002). .....	24

**POTENCIAL INSETICIDA DAS PROTEÍNAS Cry1Ca E Cry2Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER PARA POPULAÇÕES DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) EM LABORATÓRIO**

**RESUMO** - O cultivo intensivo de Brassicaceae favorece o aparecimento de algumas pragas como *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), a traça-das-crucíferas, cujos danos podem comprometer seriamente a produção. Esse inseto-praga pode ser controlado tanto com inseticidas sintéticos, como com biológicos, sendo, no entanto, usualmente utilizados os sintéticos em seu combate. A traça-das-crucíferas foi a primeira espécie de inseto a ser constatada resistência a inseticidas biológicos, com o uso indiscriminado de inseticidas sintéticos para o seu controle contribuindo também para a seleção de indivíduos tolerantes ou resistentes, além de causar a mortalidade de organismos não alvos. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade inseticida e os efeitos subletais de duas toxinas lepidóptero-ativas de *Bacillus thuringiensis*, Cry1Ca e Cry2Ac, em três populações de traças-das-crucíferas, sendo uma delas suscetível (PC) e duas consideradas resistentes (Bt e NO-QA) a toxinas de *B. thuringiensis*, em condições de laboratório. Foram realizados bioensaios de suscetibilidade com as três populações e as toxinas Cry1Ca e Cry2Ac, estimando-se a concentração letal (CL<sub>50</sub>) e os seus efeitos subletais. A toxina Cry2Ac não causou mortalidade nas lagartas das três populações, então os testes subletais foram realizados apenas com a toxina Cry1Ca que provocou mortalidade. Os parâmetros biológicos avaliados foram: período e peso pupal, sobrevivência larval e pupal, longevidade de machos e de fêmeas e fecundidade. As populações apresentaram suscetibilidades para a toxina Cry1Ca, com comportamentos estatisticamente semelhantes, apresentando valores para CL<sub>50</sub> de 0,10 µg/mL, 0,09 µg/mL e 0,13 µg/mL para Bt, NO-QA e PC, respectivamente. A sobrevivência larval foi menor nas três populações quando submetidas a CL<sub>25</sub> de Cry1Ca, enquanto o período pupal diminuiu para a população PC com a CL<sub>25</sub> e aumentou para Bt e NO-QA. As fêmeas da população PC apresentaram aumento na longevidade como efeito da CL<sub>25</sub>, enquanto que para Bt e NO-QA não houve alteração. Os machos das populações PC e Bt tiveram aumento da longevidade na CL<sub>25</sub>, sendo que a NO-QA não apresentou diferença. Em relação à fecundidade de fêmeas, peso de pupas e sobrevivência pupal as concentrações testadas não mostraram interferência. Quanto aos parâmetros de tabela de vida de fertilidade, a população Bt apresentou menores valores médios para a taxa líquida de reprodução (R<sub>0</sub>), taxa intrínseca de crescimento (r<sub>m</sub>) e taxa finita de crescimento (λ), bem como no tempo médio de uma geração (T). A população NO-QA apresentou menores valores para R<sub>0</sub> e r<sub>m</sub>, sendo que a PC não mostrou efeito negativo nos parâmetros da tabela de vida com aplicação de Cry1Ca. Assim, pode-se concluir que a toxina Cry1Ca mostrou-se eficaz contra *P. xylostella*, com suas concentrações subletais influenciando negativamente nas características biológicas do inseto, enquanto a Cry2Ac não apresentou efeito para as três populações.

**Palavras-chave:** Concentração Letal (CL<sub>50</sub>), efeitos subletais, traça-das-crucíferas, resistência, toxina Cry, suscetibilidade, virulência.

**INSECTICIDAL POTENTIAL OF Cry1Ca AND Cry2Ac PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER TO *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) POPULATIONS UNDER LABORATORY.**

**ABSTRACT** - Intensive brassics cultivation favors appearing of some pests as *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), diamondback moth (DBM), whose damage can seriously compromise production. This insect-pest can be controlled either synthetic insecticides as biological insecticides, but synthetics are usually used to combat. Diamondback moth was the first insect species to be verified resistance to biological insecticides, with indiscriminate use of synthetic insecticides for its control, also contributing to selection of tolerant or resistant individuals, as well as causing mortality on non-target organisms. Therefore, the objective of this work was to evaluate insecticide activity and sublethal effects of two lepidopteran-active toxins of *Bacillus thuringiensis*, Cry1Ca and Cry2Ac, on three DBM populations, one of them susceptible (PC) and two considered as resistant (Bt and NO-QA) to *B. thuringiensis* toxins under laboratory conditions. Susceptibility bioassays were performed on the three populations and toxins Cry1Ca and Cry2Ac, estimating lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and its sublethal effects. Cry2Ac toxin did not cause mortality on the caterpillars from the three populations, so the sublethal tests were performed only with Cry1Ca toxin. The biological parameters evaluated were: pupal period and weight, caterpillar and pupal survival, male and female longevity and fecundity. The populations showed susceptibilities to Cry1Ca toxin, with statistically equal behaviors, presenting LC<sub>50</sub> values of 0.10 µg/mL, 0.09 µg/mL and 0.13 µg/mL to Bt, NO-QA and PC, respectively. Larval survival was lower on the three populations when submitted to CL<sub>25</sub> of Cry1Ca, while pupal period decreased to the PC population with CL<sub>25</sub> and increased to Bt and NO-QA. Females of PC population had an increase on longevity as a result of LC<sub>25</sub> effect, whereas to Bt and NO-QA there was no change. Males from PC and Bt populations had increase of longevity on LC<sub>25</sub>, and NO-QA showed no difference. Regarding females fecundity, pupal weight and survival, concentrations tested showed no interference. Regarding fertility life table parameters, Bt population had lower mean values to net reproductive rate (R<sub>0</sub>), intrinsic growth rate (r<sub>m</sub>) and finite growth rate (λ), as well as the mean time of a generation (T). NO-QA population presented lower values to R<sub>0</sub> and r<sub>m</sub>, PC did not show negative effect on the life table parameters to Cry1Ca application. Thus, it can be concluded that Cry1Ca toxin proved effective against *P. xylostella*, with its sublethal concentrations influencing negatively on the insect biological features, whereas Cry2Ac had no effect to the three populations.

**Keywords:** Lethal Concentration (LC<sub>50</sub>), sublethal effects, diamondback moth (DBM), resistance, virulence.

## 1. INTRODUÇÃO

Na cultura das brássicas, o micro lepidóptero *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), a traça-das-crucíferas, é a principal praga em praticamente todas as regiões do mundo em função dos prejuízos causados (Marchioro e Foerster, 2011; Santos et al., 2011). Os danos provocados por essa praga estão associados às lagartas que vivem preferencialmente na parte inferior das folhas, consumindo a área foliar, deixando as mesmas com aspecto rendilhado (Vacari, 2009).

Os inseticidas sintéticos ainda são os mais utilizados no manejo da traça-das-crucíferas, com o seu uso indiscriminado favorecendo a seleção de indivíduos tolerantes ou resistentes, bem como causando mortalidade de organismos não-alvo (Sayyed et al., 2008; Guedes e Cutler, 2013; França et al., 2017). Segundo dados da “Arthropod Pesticide Resistance Database” - APRD, *P. xylostella* desenvolveu resistência a aproximadamente 95 compostos (químicos e biológicos), com diferentes modos de ação, como piretroides, indoxacarbe e alguns produtos à base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) (APRD, 2019).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, há 23 produtos registrados e autorizados no mercado brasileiro à base de *B. thuringiensis* e para *P. xylostella* são autorizados 13 produtos, sendo eles: Able® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Sipcam Nichino Brasil S.A., Uberaba/MG), Agree® (*B. thuringiensis* var. *aizawai* GC-91, Bio Controle - Métodos de Controle de Pragas Ltda, Indaiatuba/SP), Bac-Control {WP®, Max EC® e Max WP®} (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Vectorcontrol - Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Vinhedo/SP), Bactur WP® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Milenia Agrociências S.A., Londrina/PR), Dipel {WG® e WP®} (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda, São Paulo/SP), Helymax {EC® e WP®} (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Ballagro Agro Tecnologia Ltda., Bom Jesus dos Perdões/SP), Thuricide® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Bio Controle - Métodos de Controle de Pragas Ltda, Indaiatuba/SP), Xentari® (*B. thuringiensis* var. *aizawai*, Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda, São Paulo/SP), Winner Max EC®



(*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Vectorcontrol Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Vinhedo/SP) (MAPA/AGROFIT, 2019).

A traça-das-crucíferas foi o primeiro inseto no qual foi constatada resistência em campo às toxinas Cry de *B. thuringiensis*, mais especificamente ao produto formulado Dipel®, que contém as toxinas Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry2A, Cry2B e VIP3a na sua formulação (Tabashnik et al., 1990). Apesar disso, os inseticidas à base de *B. thuringiensis* estão cada vez mais sendo utilizados como alternativa aos químicos.

A bactéria Bt, durante a fase de esporulação sintetiza proteínas tóxicas na forma de cristais denominados  $\delta$ -endotoxinas, também conhecidas como toxinas Cry, sendo elas classificadas em 75 grupos primários, das quais Cry1 e Cry2 são ativas para Lepidoptera (Höfte e Whiteley, 1989; Kees, 2009).

A ativação das proteínas é feita em sítios específicos para cada hospedeiro, se tornando, assim, altamente seletivas (Bravo et al., 2011; Jurat-Fuentes e Jackson, 2012; Jisha et al., 2013).

Em razão dos relatos de populações resistentes à produtos formulados em campo e a alta capacidade migratória, é necessário elaborar novas táticas para o controle de *P. xylostella*. Neste sentido, a grande gama de toxinas Cry disponíveis para testes de toxicidade se torna uma solução para evitar e solucionar o problema de resistência a novos produtos à base de *B. thuringiensis*.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade inseticida de duas toxinas, Cry1Ca e Cry2Ac, para três populações da traças-das-crucíferas, tratando-se de uma suscetível e duas resistentes a toxinas de *B. thuringiensis*, em condições de laboratório.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Brassicáceas: aspectos gerais

A família Brassicaceae, ordem Brassicales, também conhecida por Cruciferae, compreende grande diversidade de espécies e é economicamente importante em todo mundo (Nikolov et al., 2019; Samec e Salopek-Sondi, 2019). Essa família contém espécies de planta com diversas utilizações, como para fins culinários e medicinais (Samec e Salopek-Sondi, 2019), sendo o consumo humano normalmente feito na forma fresca (“in natura”) e em forma de óleos ou condimentos.

Um dos principais gêneros dessa família é *Brassica*, contendo espécies com sementes oleaginosas (canola e mostarda) e vegetais (brócolis {*Brassica oleracea* L. var. *italica*}, couve {*Brassica oleracea* L. var. *acephala*}, repolho {*Brassica oleracea* L. var. *capitata*} e couve-flor {*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*} (Chen et al., 2011). Algumas espécies são muito utilizadas, uma vez que são totalmente comestíveis, desde as sementes até as inflorescências, sendo elas repolho, couve-flor, couve e brócolis e nabo (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Outras, não menos importantes, são utilizadas como condimentos: mostarda-negra (*Brassica nigra* L.) e mostarda-castanha (*Brassica juncea* L. Czern.) (Samec e Salopek-Sondi, 2019).

Evidências científicas mostram que o consumo desses vegetais tem papel preventivo para algumas doenças humanas, estando relacionados especialmente com a prevenção de alguns tipos de câncer. Ainda em fase de estudos, existem fortes evidências de que as crucíferas apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, gastroprotetora e antiobesidade (Samec e Salopek-Sondi, 2019).

O Brasil se destaca pelo consumo de repolho (Silva et al., 2011), com cultivo em todo território nacional. No estado de São Paulo a produção em área no ano de 2018 chegou a aproximadamente 7.620 hectares (IEA, 2018), destacando-se em áreas próximas de capitais e regiões serranas, com produção preferencialmente por pequenos e médios agricultores (Filgueira, 2008; Silva et al., 2011).

Dentre os fatores limitantes para a produção de brássicas, destaca-se a ocorrência de insetos-praga. Existem várias espécies que podem ser encontradas causando prejuízos como os pulgões *Brevicoryne brassicae* (L., 1758) (Hemiptera:

Aphididae) (pulgão da couve) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) (pulgão verde); mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae); e os lepidópteros desfolhadores como *P. xylostella* (traça-das-crucíferas) e *Ascia monuste orseis* (Godart, 1818) (Lepidoptera: Pieridae) (curuquerê-da-couve), sendo a traça-das-crucíferas considerada a mais destrutiva para as brassicáceas, particularmente para o repolho (Talekar e Shelton, 1993).

## **2.2. *Plutella xylostella***

### **2.2.1. Ocorrência e distribuição**

As brássicas têm como centro de origem a região do Mediterrâneo, provavelmente o mesmo local de origem da *P. xylostella* (Frost, 1949), apesar da existência de várias afirmações da ocorrência do inseto onde quer que existam seus hospedeiros, sendo considerado o lepidóptero de mais ampla distribuição mundial (Talekar e Shelton, 1993; Cheng et al., 2008). Porém, segundo Zalucki e Furlong (2011), a distribuição global recente de *P. xylostella* é limitada, tendo os autores desenvolvido e validado um modelo bioclimático que indica onde a traça-das-crucíferas está presente, incluindo os locais onde a presença é sazonal e onde é anual. Nesse modelo foram introduzidos fatores limitantes como teor pluviométrico e temperatura, que são fatores abióticos que podem impedir o crescimento populacional do inseto. Esses autores ressaltam também a importância de se conhecer os inimigos naturais da praga presentes no agroecossistema trabalhado.

Nas regiões tropicais e subtropicais as gerações da praga são contínuas, enquanto no extremo norte e sul o alcance dessa espécie é sazonal devido às baixas temperaturas, mas há que se considerar também o alcance devido à migração regular (Zalucki e Furlong, 2011; Castelo Branco e França, 2015). O mesmo ocorrendo em regiões temperadas, nas quais a população diminui no inverno (Talekar e Shelton, 1993; Chapman et al., 2002).

*Plutella xylostella* tem grande capacidade migratória, com os adultos, denominados “wind-borne”, podendo se deslocar por longas distâncias, chegando a voar 1000 km por dia, com média 400-500 km por noite, infestando culturas em outras

regiões, países e continentes (Talekar e Shelton, 1993; Chapman et al., 2002; Capinera, 2015). Estágios imaturos da praga também podem ser levados em material vegetal infestado, ocupando novas áreas.

### **2.2.2. Aspectos morfológicos e biológicos**

A traça-das-crucíferas é caracterizada por apresentar ciclo de desenvolvimento curto, com média de 16 dias, fator que acarreta crescimento populacional muito grande e rápido nas plantações de brássicas (Budhi et al., 2017).

O ciclo biológico dessa praga é muito dependente da temperatura, fato esse que determina variação em seu desenvolvimento nas diferentes localidades de ocorrência, provocando alteração no número de gerações por ano (Dias et al., 2004; Li et al., 2016). Em locais com temperaturas mais baixas ou amenas o ciclo do inseto normalmente é mais longo, sendo em regiões tropicais bem mais curto (Chuan e Lim, 1977; De Bortoli et al., 2013). Estudos em laboratório demonstraram que as características biológicas dessa praga também podem variar com o cultivar em que o inseto se criou (Golizadeh et al., 2009)

A fêmea tem alta capacidade de oviposição, colocando até 350 ovos durante o seu ciclo de vida. A oviposição é feita preferencialmente na parte abaxial das folhas, geralmente acompanhando as nervuras, e com ovos isolados ou agrupados, com o pico de oviposição ocorrendo nos três primeiros dias da longevidade das fêmeas (Vacari, 2009). Os ovos são pequenos, com menos de um milímetro em seu maior diâmetro, ovais e com coloração amarela, tornando-se escuros pouco antes da eclosão (Medeiros et al., 2003; Vacari, 2009)

Quando recém-eclodidas, as lagartas têm hábito minador, se alimentando do parênquima foliar, passando, do segundo ínstar em diante, a se alimentarem da epiderme (Imenes et al., 2002). As lagartas apresentam coloração que varia de acordo com a alimentação (De Bortoli et al., 2011), sendo inicialmente esbranquiçada e passando a esverdeada com o decorrer do desenvolvimento larval. A cápsula cefálica da lagarta apresenta coloração variável de acordo com os seus ínstars. Nos dois primeiros ínstars a coloração é normalmente preta, sendo nos demais marrom esverdeada. Ao longo do corpo as lagartas apresentam pequenas setas (Moriuti,

1986); passam por quatro ínstares, quando então ocorre a confecção de um casulo pupal (Monnerat, 1995). O período larval médio é de 10 dias (Vacari, 2009).

As lagartas em estágio pré-pupal constroem um delicado casulo com fios de seda, geralmente na parte abaxial das folhas. Terminada a construção do casulo ocorre a pupação, que é muito facilmente identificada na planta. A coloração das pupas muda com o decorrer do tempo, ficando marrom na medida do desenvolvimento, com o inseto passando nessa fase por dois a quatro dias (Vacari, 2009; Philips et al., 2014; Capinera, 2015).

Os adultos iniciam o processo de acasalamento assim que emergem, apresentando coloração marrom acastanhado, com tamanho corporal de aproximadamente 9 mm de comprimento e envergadura de 10-14 mm. A cabeça é coberta por escamas eretas e de coloração castanha, com antenas longas e do tipo filiforme. Quando o adulto está em repouso são formadas 3 ou 4 manchas prateadas em forma de diamantes, sendo visível no dorso do inseto, de onde surgiu a designação popular na língua inglesa de “diamondback moth” (Moriuti, 1986).

O dimorfismo sexual pode ser constatado no abdômen dos adultos, com o dos machos apresentando uma fenda no último segmento, e o das fêmeas duas manchas circulares (Vacari, 2009).

### **2.2.3. Danos e prejuízos**

*Plutella xylostella* é conhecida pela voracidade em que se alimenta de brássicas (Talekar e Shelton, 1993), sendo que, apesar de ser um inseto de porte pequeno, tem alto potencial reprodutivo, o que provoca a ocorrência de elevadas densidades populacionais nas culturas, concorrendo para significativas reduções de área foliar das plantas durante a alimentação das lagartas, sendo preservadas apenas as nervuras das folhas (Celestino et al., 2015).

Esse inseto-praga é um dos mais destrutivos para as brássicas no mundo, podendo causar perdas de até 90% na produção (Talekar e Shelton, 1993; Castelo Branco et al., 2001; Villas Bôas et al., 2004; Cheng et al., 2008; Zalucki et al., 2012; Furlong et al., 2013). Os danos causados vão desde a depreciação qualitativa e quantitativa do produto colhido, até mesmo a morte da planta, sendo também bastante

significativo nas mudas e durante a formação de “cabeça” de repolho, brócolis e couve-flor (Capinera, 2015).

#### 2.2.4. Controle

Grandes esforços têm sido feitos para se desenvolver táticas eficientes de controle que possam ser incorporadas aos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) para a traça-das-crucíferas (Furlong et al., 2008; Grzywacz et al., 2010). Porém, na maioria das culturas atacadas por essa praga o uso do controle químico é o que predomina, com a justificativa de o mesmo apresentar ação rápida e de ser de aplicação fácil e prática (Talekar e Shelton, 1993; Grzywacz et al., 2010; Zalucki et al., 2012). A produção das diferentes brassicáceas durante todo o ano, ininterruptamente, dificulta o controle da praga, uma vez que plantas das diferentes espécies e idades na mesma área de produção proporcionam abundância de alimento para a praga, provocando superposição de gerações (Imenes et al., 2002).

A prática do uso de inseticidas é mais frequente em países tropicais, com aplicações que ocorrem normalmente 1 a 2 vezes por semana (Mazlan e Mumford, 2005), o que tem provocado efeitos bastante negativos, como a seleção de populações de pragas resistentes e contaminação ambiental, além de eliminar muitos indivíduos não alvo, particularmente inimigos naturais (Furlong et al., 2004; Li et al., 2012). Além disso, essa é uma prática muito onerosa, com gastos em 2012 que atingiram aproximadamente US\$1,4 bilhões, com aumento no prejuízo para US\$2,7 bilhões quando são acrescentadas as perdas de rendimento (Zalucki et al., 2012).

*Plutella xylostella* é uma das pragas que recebeu e tem recebido grande destaque pelo aumento populacional devido à resistência ao uso excessivo de produtos químicos, desde a introdução desses compostos no final da década de 1940, bem como por ser a primeira espécie de inseto a desenvolver resistência em campo à *B. thuringiensis* (Talekar e Shelton, 1993).

Essa espécie desenvolveu resistência em campo para as principais classes de inseticidas (Furlong et al., 2013) e, segundo dados da “Arthropod Pesticide Resistance Database” - APRD, *P. xylostella* é resistente a aproximadamente 91 compostos

(químicos e biológicos), com diferentes modos de ação, como piretroides e indoxacarbe, além de alguns produtos à base *B. thuringiensis* (APRD, 2018).

Portanto, alternativas ao controle químico de *P. xylostella* estão sendo apresentadas e utilizadas nos últimos anos, com a possibilidade de uso também de alguns inimigos naturais, abrangendo parasitoides, predadores e microrganismos entomopatogênicos (Sarfraz et al., 2005). O emprego de feromônio sexual (Michereff et al., 2000; Gallo, et al., 2002), culturas armadilhas (Badenes-Perez et al., 2004; Shelton e Badenes-Perez, 2006), culturas de cobertura (Broad et al., 2008), variedades resistentes (Badenes-Perez et al., 2011; Boiça Júnior et al., 2011) e de extratos naturais de plantas (Charleston et al., 2006; Liu et al., 2006) também têm sido trabalhados com o objetivo de combater populações da traça-das-crucíferas.

Dentre as alternativas citadas, a utilização de entomopatógenos parece ser a mais viável, especialmente devido ao baixo impacto ambiental e a inimigos naturais, com *B. thuringiensis* recebendo destaque especial (Polanczyk e Alves 2003; De Bortoli et al., 2017a).

### **2.3. *Bacillus thuringiensis***

#### **2.3.1. Histórico**

No grupo dos entomopatógenos, o gênero *Bacillus* (família Bacillaceae) tem sido o mais utilizado para o controle de pragas, com *B. thuringiensis* (Bt) recebendo a maior evidencia pelo seu alto potencial inseticida, sendo atualmente o mais utilizado em todo o mundo (Lacey et al., 2015).

No ano de 1902, o Bt foi descoberto pelo pesquisador japonês Ishiwatta, isolado de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Posteriormente, em 1911, na província de Thuringia-Alemanha, Berliner reisolou a bactéria de lagartas de *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae), originando o nome atual (De Barjac e Bonnefoi, 1968). Os primeiros testes realizados utilizando Bt para controle de lepidópteros-praga foram na Europa, entre as décadas de 1920 e 1930, em lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) (van Frankenhuyzen, 1993).

### 2.3.2. Aspectos gerais

*Bacillus thuringiensis* está presente em uma grande variedade de ambientes, como: solo, produtos armazenados, plantas, flores, insetos mortos, entre outros, podendo permanecer por muitos anos em forma latente até que condições ideais para seu desenvolvimento surjam (Bravo et al., 1998; Raymond, 2017).

A bactéria Bt é em forma de bastonete, esporulante, gram-positiva e aeróbica, podendo também ser anaeróbica em temperatura variando de 10 a 45 °C (Praça et al., 2007); apresenta célula vegetativa de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento, geralmente móvel por meio de flagelos, que são importantes na virulência, uma vez que são capazes de se ligar às células dos insetos (Zhang et al., 1995). Os esporos têm forma elipsoidal, mas também podem ser cilíndricos, apresentando cristais de proteína, característica principal para diferenciá-lo das demais espécies do gênero; esse conjunto apresenta toxicidade para mais de 300 espécies de insetos e ácaros (Rabinovitch et al., 2017).

Essa bactéria pode apresentar duas principais fases no ciclo de desenvolvimento: de esporulação e de crescimento vegetativo. A fase denominada de esporulação consiste na diferenciação da bactéria em esporos, e estes, em condições favoráveis, crescem e podem germinar e iniciar o crescimento vegetativo. Na fase de crescimento vegetativo a bactéria se multiplica por bipartição (Monnerat e Praça, 2006).

Sua atividade entomopatogênica está estritamente ligada a presença inclusões proteicas cristalinas, que durante a fase de esporulação sintetiza proteínas tóxicas na forma de cristais, conhecidas como toxinas Cry, e as toxinas Cyt (Bravo et al., 1998; Monnerat e Bravo, 2000). As toxinas Cry e Cyt são usualmente pertencentes ao grupo de toxinas formadoras de poros (TFP) (Bravo et al., 2007).



### 2.3.3. As toxinas e a atividade inseticida

Os cristais presentes na bactéria são compostos de proteínas denominadas de  $\delta$ -endotoxinas ou toxinas/proteínas Cry. São altamente específicas e seletivas a diferentes ordens de insetos, podendo sofrer alteração na quantidade e qualidade de acordo com a cepa bacteriana (Bravo et al., 2011; Jurat-Fuentes e Jackson, 2012). Em cada inclusão proteica cristalina pode estar presente uma ou mais toxinas Cry, com cada uma delas contendo um gene específico (Li et al., 1991).

*Bacillus thuringiensis* não produz exclusivamente as  $\delta$ -endotoxinas, mas também  $\alpha$ -exotoxinas, que são altamente tóxicas a insetos, e pode apresentar riscos a ratos e outros vertebrados;  $\beta$ -exotoxinas que também são altamente tóxicas para alguns insetos e vertebrados; e as proteínas inseticidas vegetativas (VIPs), com espectro de ação maior a insetos-praga quando comparado a algumas proteínas Cry, principalmente para imaturos de lepidópteros (Praça et al., 2007).

### 2.3.4. $\delta$ -endotoxina

*Bacillus thuringiensis* é conhecido, então, por produzir proteínas inseticidas como  $\delta$ -endotoxina ou toxinas Cry e Cyt. As  $\delta$ -endotoxinas, sendo importantes por apresentarem toxicidade para formas imaturas de insetos considerados pragas agrícolas e vetores de doenças humanas e de outros animais, como lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros (Habib e Andrade, 1998; Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007).

Os cristais não são necessariamente formados apenas por uma  $\delta$ -endotoxina, existindo casos em que pode haver cinco a seis toxinas. As toxinas de Bt podem ser encontradas com diferentes formas: bipiramidal, piramidal, cuboide esférica e retangular, sendo os cristais bipiramidais os mais encontrados. O peso molecular das  $\delta$ -endotoxinas pode variar de 13,6 a 142 kDa, que se tornam tóxicas após a ingestão pelo inseto-alvo (Habib e Andrade, 1998; Fiuza, 2009)

Atualmente, na classificação das toxinas Cry existem cerca de 75 grupos, organizados em diferentes subgrupos, enquanto que para as toxinas Cyt são apenas três grupos, sendo que esses números aumentam a cada ano, de acordo com as

novas tecnologias de identificação que vêm sendo aplicadas (Adang et al., 2014; Crickmore et al., 2018).

Além das toxinas Cry, Bt também é capaz de sintetizar proteínas Cyt, que “in vitro” têm atividade citolítica e “in vivo” especificidade por dípteros (Höfte e Whitheley, 1989). Elas também são capazes de afetar as células do intestino dos insetos, podendo com isso aumentar a atividade inseticida das toxinas Cry (Soberón et al., 2013).

### **2.3.5. Modo de ação**

Os estudos sobre o modo de ação das toxinas Cry têm sido caracterizados principalmente em lepidópteros, e a virulência causada pelas bactérias entomopatogênicas relacionada com as proteínas inseticidas, devido suas altas taxas de letalidade (Bravo et al., 2007; De Bortoli e Jurat-Fuentes, 2019).

Os insetos ingerem as proteínas inseticidas que são dissolvidas no ambiente alcalino do intestino, sendo as protoxinas inativas solubilizadas (Bravo et al., 2005). A ativação da proteína inseticida se dá pela ação de proteases intestinais, onde um peptídeo N-terminal e a metade do C-terminal são removidos (Bravo et al., 2007). A toxina ativada se liga a receptores específicos presentes nas células epiteliais do intestino médio (de Maagd et al., 2001; Bravo et al., 2005; De Bortoli e Jurat-Fuentes, 2019). Após a ligação nos receptores específicos, a toxina se insere na membrana plasmática, sendo internalizadas ou formando poros, causando desequilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular, provocando a lise (morte) celular. Esses poros servem de abertura para as bactérias terem acesso à hemolinfa do inseto, que é o ambiente propício para sua proliferação e assim causar a morte por septicemia (Bravo et al., 2007; De Bortoli e Jurat-Fuentes, 2019).

Os sintomas de intoxicação nos insetos se manifestam pela paralisação da alimentação, regurgitação, paralisia total, septicemia e morte, normalmente com início após 48 horas da ingestão (Gupta et al., 1985; Bravo et al., 1992; Monnerat e Bravo, 2000).

### 2.3.6. Causas da resistência em lepidópteros

A resistência a toxinas de *B. thuringiensis* em lepidópteros-praga está relacionada a alterações nas etapas do modo de ação da proteína inseticida. Várias espécies de lepidópteros mostraram a capacidade de desenvolver resistência a toxinas Bt, com McGaughey (1985) publicando o primeiro trabalho sobre resistência de insetos a Bt. Desde então, vários outros relacionaram a capacidade dos insetos evoluírem para resistência a Bt (Tabashnik, 1994; Schnepf et al., 1998; van Rie e Ferré, 2002).

A traça-das-crucíferas se destacava até o trabalho de Tabashnik et al. (1996) como a única espécie a apresentar resistência a produtos à base de Bt no campo. No entanto, a evolução da resistência em culturas Bt está cada vez mais rápida, sendo no ano de 2005 registrados 3 casos, enquanto no ano seguinte ocorreu um aumento aproximado de 81%. Os lepidópteros que desenvolveram resistência a culturas Bt foram: *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), *S. frugiperda*, *Striacosta albicosta* (Smith, 1888) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Pectinophora gossypiella* Saund, 1844 (Lepidoptera: Gelechiidae) (Tabashnik e Carriere, 2017). A resistência nas variedades Bt evoluiu mais rapidamente em comparação a produtos Bt aplicados em campo, pois nas formulações há presença de várias toxinas Cry e outros fatores de virulência, como a presença de esporos bacterianos, enquanto nas variedades Bt, normalmente, as toxinas são únicas (De Bortoli e Jurat-Fuentes, 2019).

Ferré e van Rie (2002) relataram três mecanismos bioquímicos diferentes de resistência a Bt, processamento proteolítico de protoxinas, o reparo melhorado de células do intestino médio danificadas e a modificação do sítio de ligação da proteína Cry. Apesar dos dois primeiros mecanismos levarem à resistência, eles geralmente resultam em níveis comparativamente mais baixos em relação a maioria dos casos que estão relacionados com a redução da ligação de pelo menos uma das toxinas Cry.

A modificação no sítio de ligação resulta em resistência para formulados de Bt ou proteínas Cry e, quando ocorre forte resistência cruzada, normalmente ela está estritamente ligada apenas às proteínas Cry que compartilham os sítios de ligação.

Sendo assim, é de suma importância a utilização dos modelos de sítios de ligação de proteínas Cry fornecidos por alguns autores, para se saber quais proteínas podem ser combinadas visando retardar a evolução da resistência (Ferré e van Rie, 2002; Jakka et al., 2015).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) do Departamento de Fitossanidade - FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP. As populações foram mantidas em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C), umidade relativa ( $70 \pm 10$  %) e fotoperíodo (12L : 12E), sendo todos os bioensaios também realizados nessas condições.

#### 3.1. Obtenção e criação dos insetos

Para a condução dos experimentos foram utilizadas três populações de *P. xylostella*, uma suscetível e duas resistentes às toxinas de *B. thuringiensis* HD-1. A população suscetível (PC) foi coletada no dia 19 de maio de 2008 em plantas de repolho em uma área de cultivo convencional, na cidade de Alegre (ES), e apresentava cerca de 175 gerações no laboratório em 01 setembro de 2018. A população denominada Bt é originária da população PC e selecionada a cada geração com a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry2A, Cry2B e VIP3a) (Masson et al., 1989; Tabashnik et al., 1994) (Lepidoptera-específico) (De Bortoli, 2018), com cerca de 165 gerações em 01 de setembro de 2018. Também foi utilizada a população denominada NO-QA, oriunda da Alemanha, coletada há 13-15 anos, com cerca de 155 gerações no laboratório em 01 de setembro de 2018, sendo selecionada com Cry1Ac.

Para a criação dos insetos foi utilizada a metodologia descrita por Thuler (2009), adaptada por De Bortoli et al. (2017b) (Figura 1). O substrato para alimentação e oviposição de *P. xylostella* foi couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*, cv. Manteiga), cultivada em área experimental da FCAV-UNESP (campo e casa de vegetação).

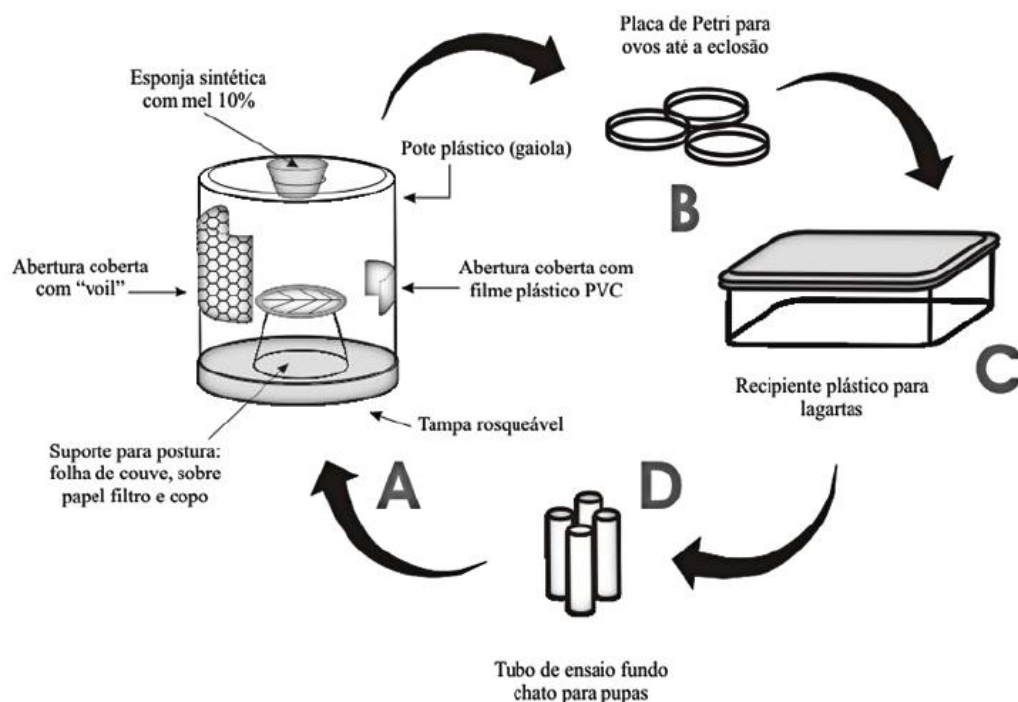


Figura 1. Esquema da metodologia utilizada para criação de *Plutella xylostella* (Thuler, 2009).

Adultos recém-emergidos foram transferidos para gaiolas plásticas circulares transparentes, medindo 13 cm de diâmetro x 15 cm de altura, com uma abertura lateral de 10 cm x 5 cm, coberta por tecido tipo "voile" para melhor aeração interna, e uma outra de 10 cm x 2 cm, fechada com filme plástico PVC, para manuseio interno. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10%, embebida em um pedaço de espuma preso na parte superior da gaiola.

No interior das gaiolas foram colocados discos de folha de couve de 8 cm de diâmetro, como substrato para a oviposição, assentados sobre discos de papel filtro de 9 cm de diâmetro (umedecidos com água); como suporte para os discos foi utilizado um copo plástico descartável em posição invertida. Os discos (couve e papel) foram trocados diariamente, sendo os de couve com os ovos acondicionados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) até a eclosão das lagartas. Após a eclosão, os discos com as lagartas foram transferidos para recipientes plásticos (27 cm x 17 cm x 8 cm) contendo folhas de couve para a alimentação larval. A troca das folhas do recipiente foi feita diariamente até que os insetos atingissem a fase pupal.

Após a formação das pupas, elas foram coletadas com o auxílio de pincel ou pinça e acondicionadas em tubos de vidro de fundo chato (8,5 cm x 2,4 cm) vedados com filme plástico de PVC contendo pequenos furos para melhorar a aeração interna, sendo colocadas de 20 a 30 pupas por tubo.

### **3.2. Obtenção das toxinas**

Foram utilizadas duas  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, Cry1Ca e Cry2Ac, na forma inativa de protoxinas, cedidas pelo Dr. Neil Crickmore da “University of Sussex”, Brighton, Inglaterra. As toxinas estavam com a concentração de 1 mg/mL para Cry1Ca e 3 mg/mL para Cry2Ac.

### **3.3. Bioensaios com *Plutella xylostella* e toxinas Bt**

#### **3.3.1. Teste de mortalidade**

Para a condução dos bioensaios, discos de folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Manteiga) de 8 cm de diâmetro foram mergulhados em 30 mL das suspensões das toxinas Cry1Ca e Cry2Ac (em água deionizada autoclavada com 50  $\mu$ g/mL Triton-X100<sup>®</sup>), por 30 segundos, sendo a testemunha tratada apenas com a solução de água deionizada autoclavada e 50  $\mu$ g/mL Triton-X100<sup>®</sup>. Após a secagem, em condição ambiente e por 30 minutos, os discos foram colocados individualmente em placas de Petri (9,5 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura) sobre papel filtro umedecido com água deionizada. Foram colocadas sobre os discos foliares 10 lagartas de segundo ínstar de *P. xylostella*, sendo cada disco considerado uma repetição e observadas seis repetições por tratamento, com o processo repetido para as três populações de *P. xylostella* (PC, Bt e NO-QA).

Para os testes serem efetuados foram feitas diluições das toxinas para as seguintes concentrações: 0,003  $\mu$ g/mL, 0,005  $\mu$ g/mL, 0,008  $\mu$ g/mL, 0,01  $\mu$ g/mL, 0,03  $\mu$ g/mL, 0,05  $\mu$ g/mL, 0,5  $\mu$ g/mL e 1,0  $\mu$ g/mL para a toxina Cry1Ca testadas nas populações PC, Bt e NO-QA, enquanto que com a toxina Cry2Ac foram utilizadas as

concentrações: 0,003 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para PC, e 0,003 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 3,0 µg/mL para Bt e NO-QA.

As placas foram envolvidas com filme plástico de PVC e mantidas em sala climatizada com temperatura, umidade relativa e fotoperíodo controlados. Após três, cinco e sete dias foram realizadas as avaliações registrando-se o número de lagartas mortas em cada tratamento. Foram consideradas mortas aquelas lagartas que não se moveram quando tocadas com um pincel de cerdas finas.

### 3.3.2. Testes para estimativa da Concentração Letal 50 (CL<sub>50</sub>)

A proteína Cry1Ca de *B. thuringiensis*, que foi ativa para as três populações de *P. xylostella*, foi incluída em bioensaios para a estimativa da Concentração Letal média (CL<sub>50</sub>).

A amplitude das concentrações testadas foi pré-estabelecida em ensaios preliminares. Foram utilizadas 5 concentrações variando de 1,0 a 0,005 µg/mL para a população PC, enquanto que para as populações Bt e NO-QA foram 6 concentrações variando 1,0 a 0,003 µg/mL, com 6 repetições, sendo cada placa contendo 10 lagartas de segundo ínstar uma repetição, totalizando 60 insetos por concentração, em cada população.

Repetindo o que foi descrito para os testes de mortalidade, os discos de couve foram mergulhados em 30 mL das suspensões por 30 segundos e a testemunha em solução de água deionizada autoclavada e 50 µg/mL Triton-X100<sup>®</sup>. Após a secagem em condição ambiente, o que aconteceu em cerca de 30 minutos, os discos foram colocados individualmente em placas de Petri (9,5 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura) contendo papel filtro umedecido com água deionizada. Foram adicionadas sobre o cada disco foliar 10 lagartas de segundo ínstar de *P. xylostella*, o que se repetiu para as três populações e com cada uma das concentrações da toxina.

A mortalidade das lagartas foi avaliada após 3 e 5 dias após aplicação das concentrações da toxina, sendo considerado os valores da primeira avaliação devido à similaridade com a segunda. A lagarta morta foi caracterizada como aquela com total imobilidade quando tocada com um pincel de cerdas finas. A correção da taxa de mortalidade não foi necessária devido à baixa mortalidade na testemunha ( $\leq 10\%$ ).



Após definido os valores da  $CL_{50}$  foi possível também fazer o cálculo da razão de resistência, que é dado pela divisão da  $CL_{50}$  da população teste pela  $CL_{50}$  da população suscetível, com ambas mantidas nas mesmas condições (Tabashnik et al., 2009), sendo que por esse parâmetro é possível evidenciar a diminuição da suscetibilidade de uma população (Tabashnik, 1994).

### 3.3.3. Efeitos subletais

Para a condução dos estudos sobre os efeitos subletais com a toxina Cry1Ca em lagartas de *P. xylostella*, foram utilizadas as concentrações que correspondem a  $CL_{15}$  e  $CL_{25}$  (Bt= 0,01  $\mu\text{g/mL}$  e 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; NO-QA e PC= 0,02  $\mu\text{g/mL}$  e 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ), pois estas propiciaram indivíduos em número suficiente para conduzir os testes, além de uma testemunha com o disco de folha de couve mergulhado em água deionizada autoclavada e 50  $\mu\text{g/mL}$  Triton-X100®. Os bioensaios foram conduzidos de acordo com a descrição no item 3.3.1.

Lagartas foram colocadas individualmente em placas de doze poços, contendo discos de folha com 4  $\text{cm}^2$  de área, com os discos sendo trocados de acordo com o consumo das lagartas e qualidade das folhas. Nesse período foram avaliados a duração e a sobrevivência desde o segundo ínstar larval até a formação das pupas. Após a formação das pupas, elas foram transferidas para placa Elisa® e mantidas uma em cada poço, até a emergência dos adultos. Nesse período foi registrado o peso de pupas, duração pupal e sobrevivência de pupas. Os adultos emergidos foram separados por sexo, determinando-se a razão sexual, e acondicionados em casais, um por recipiente plástico transparente de 1.800 mL (gaiola), para cópula e oviposição, tendo esses recipientes a mesma estrutura descrita para as gaiolas de postura da criação. Diariamente foi oferecido disco de couve de 6 cm de diâmetro para realização das posturas e solução de mel a 10% para alimentação dos adultos. As posturas coletadas nos discos foliares foram contabilizadas até o término do período de oviposição. Nesse período foi registrado o número de ovos por fêmea e a longevidade de machos e de fêmeas. Para analisar a viabilidade dos ovos, 100 por tratamento foram amostrados aleatoriamente durante os três primeiros dias de oviposição e colados em papel quadriculado (8 cm x 8 cm) com o auxílio de um pincel

fino (um por quadrado) e assentados sobre papel filtro umedecido com água deionizada, com o conjunto disposto no interior de placas de Petri (9,5 cm de diâmetro × 2,0 cm de altura) para incubação. As avaliações dos efeitos subletais foram realizadas até a morte dos adultos. Cada recipiente foi considerado uma repetição, sendo observadas 10 repetições por tratamento.

Para a construção de tabelas de vida de fertilidade foram avaliadas as durações dos períodos de ovo, larva, pupa e fase adulta, bem como a sobrevivência em cada fase de desenvolvimento, além da razão sexual nos tratamentos em cada população. Os parâmetros de crescimento populacional calculados foram:  $R_0$  = taxa líquida de reprodução ou taxa de aumento populacional a cada geração;  $r_m$  = taxa intrínseca de crescimento ou capacidade inata de aumento;  $\lambda$  = taxa finita de crescimento definida pelo número de vezes que a população se multiplica por unidade de tempo; e  $T$  = duração média de uma geração. Também foi determinado o tempo necessário para a população dobrar em número de indivíduos (TD), segundo o método de Krebs (1994). Os parâmetros foram calculados de acordo com metodologia citada por Silveira Neto et al. (1976).

#### **3.3.4. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Nos testes de mortalidade, os principais efeitos das concentrações, das populações e suas interações foram analisados usando o General Linear Model (GLM). Os dados obtidos também foram submetidos aos testes de normalidade (teste de Kolmogorov) e de homogeneidade da variância (teste de Bartlett) e, sempre que necessário, transformados, para atender os requisitos da análise de variância (ANOVA). Em seguida, os dados foram submetidos à ANOVA, e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas empregando-se o software SAS (SAS Institute, 2015).

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de regressão de Probit (Finney, 1971) e obtidos os valores de Concentração Letal média ( $CL_{50}$ ) utilizando-se o software SAS (SAS Institute, 2015). Diferenças entre os valores

de  $CL_{50}$  foram consideradas significativas quando 95% do limite de confiança de um tratamento não se sobrepôs ao limite de confiança de outro tratamento.

Os parâmetros populacionais de tabela de vida de fertilidade foram estimados de acordo com o procedimento descrito por Maia et al. (2000), utilizando-se o software SAS (SAS Institute, 2015) que emprega o método Jackknife para estimar os parâmetros, intervalos de confiança e permitir a comparação entre os tratamentos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Bioensaios de mortalidade

A toxina Cry1Ca de *B. thuringiensis* provocou alta mortalidade nas três populações de *P. xylostella* nas concentrações de 0,5µg/mL e 1,0µg/mL, variando de 70,0% a 95,0%. As menores concentrações, 0,003 µg/mL e 0,005 µg/mL, provocaram mortalidades entre 3,3% e 15,0% (PC:  $F_{45, 8} = 53,03$ ;  $P = <0,0001$ ; Bt:  $F_{45, 8} = 37,91$ ;  $P = <0,0001$ ; NO-QA:  $F_{22, 8} = 35,20$ ;  $P = <0,0001$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade (%) de lagartas de segundo ínstar das populações de *Plutella xylostella* submetidas a toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*.

Concentrações (µg/mL)	Populações		
	Bt	NO-QA	PC
Controle	6,7 ± 3,33 d <sup>1</sup>	10,0 ± 2,88 c	6,6 ± 3,33 d
0,003	8,3 ± 4,01 d	5,0 ± 3,41 c	5,0 ± 3,41 d
0,005	15,0 ± 4,28 d	3,3 ± 3,33 c	5,0 ± 3,41 d
0,008	11,7 ± 1,66 d	5,0 ± 2,88 c	6,7 ± 3,33 d
0,01	16,7 ± 3,33 d	7,5 ± 4,79 c	10,0 ± 5,16 cd
0,03	25 ± 5,00 cd	- <sup>2</sup>	25,0 ± 5,00 c
0,05	36,7 ± 6,66 c	55,0 ± 25,00 b	21,7 ± 6,00 cd
0,5	70,0 ± 8,94 b	85,0 ± 5,00 a	71,7 ± 4,77 b
1,0	93,3 ± 3,33 a	95,0 ± 5,00 a	93,3 ± 3,33 a

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey. <sup>2</sup> Concentração não utilizada para o teste.

Por outro lado, utilizando-se a toxina Cry2Ac, também de *B. thuringiensis*, em concentrações que variaram de 0,003 ug/mL a 3,0 ug/mL, foram obtidas mortalidades estatisticamente iguais ao controle nas três populações, sendo PC ( $F_{5, 30} = 1,28$ ;  $P = 0,2979$ ), Bt ( $F_{5, 21} = 0,22$ ;  $P = 0,9500$ ) e NO-QA ( $F_{5, 21} = 0,25$ ;  $P = 0,9370$ ), ineficientes, portanto, para o controle de *P. xylostella* (Tabela 2).

A maioria dos produtos formulados à base de Bt utilizados para o controle de *P. xylostella* são misturas de cristais e esporos de duas variedades principais, *B. thuringinensis* var. *kurstaki* (Btk) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Bta) (Dilawari et al., 1996). No caso do Btk, as toxinas presentes são Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A e Cry2B, com a toxina Cry2 apresentando toxicidade para lepidópteros, segundo Dilawari et al. (1996) e van Frankenhuyzen (2009), o que não foi verificado neste

trabalho para traça-das-crucíferas, corroborando com testes realizados por Kees (2009).

Os receptores das toxinas Cry1 e Cry2 são específicos nas células apicais do intestino médio do inseto-alvo (López-Pazos et al., 2010), com a especificidade ligada ao processamento e estabilidade das toxinas, o que poderia explicar a inatividade da toxina Cry2 para *P. xylostella*. As toxinas Cry apresentam processos proteolíticos de tamanhos diferentes, com a Cry2 significativamente menor do que Cry1, sendo 72kDa e ~135kDa, respectivamente (Morse et al., 2001). A protoxina produz um núcleo ativo de toxina com ~55-60 kDa de tamanho, e essa produção, se estável, determina a especificidade da toxina (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017). Em testes feitos associando-se Coleoptera e Cry3 (toxina com tamanho semelhante a Cry2), houve o processamento lento da mesma sugerindo baixa atividade e, quando a toxina foi modificada com introdução de um sítio de quimotripsina/catepsina G, ocorreu aumento significativo na toxicidade (Walters et al., 2008). Alterações na atividade proteolítica no intestino do inseto podem causar baixa atividade da proteína Cry, uma das razões que levam à suscetibilidade e resistência reduzida em lepidópteros (Zalunin et al., 2015).

Vários estudos mostram que essas proteínas não compartilham o mesmo sítio de ligação para diversos lepidópteros-praga, como: *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), *Marasmia patnalis* Bradley, 1981 (Lepidoptera: Crambidae), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Karim e Dean, 2000; Karim et al., 2000; Ibargutxi et al., 2008; Figueiredo et al., 2019), com Monnerat et al. (1999) citando que Cry2Aa é a menos eficiente em relação a Cry1A, Cry1C e Cry1D para controle de traça-das-crucíferas, sendo necessários 54,515 µg/ml para matar 50% da população.

Tabela 2. Mortalidade (%) de lagartas de segundo ínstar das populações de *Plutella xylostella* submetidas a toxina Cry2Ac de *Bacillus thuringiensis*.

Concentrações (ug/mL)	Populações		
	Bt	NO-QA	PC
Controle	8,3 ± 3,07 a <sup>1</sup>	10,0 ± 5,16 a	8,3 ± 4,01 a
0,003	7,5 ± 4,79 a	7,5 ± 4,79 a	8,3 ± 3,07 a
0,01	- <sup>2</sup>	-	5,0 ± 2,27 a
0,05	12,5 ± 2,50 a	5,0 ± 2,89 a	8,3 ± 4,01 a
0,5	9,0 ± 6,00 a	8,0 ± 3,74 a	16,7 ± 3,33 a
1,0	9,5 ± 4,11 a	10,0 ± 7,07 a	10,0 ± 3,65 a
3,0	12,5 ± 4,79 a	12,5 ± 4,79 a	-

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey. <sup>2</sup> Concentração não utilizada para o teste.

#### 4.2. Estimativa de Concentração Letal 50 (CL<sub>50</sub>)

A toxina Cry1Ca foi selecionada para o teste de estimativa de concentração letal por ter provocado mortalidade acima de 80% nas três populações de *P. xylostella*, na concentração de 1,0 ug/mL, apresentando valores semelhantes de CL<sub>50</sub> para as três populações (Bt = 0,10 µg/mL, NO-QA = 0,09 µg/mL e PC = 0,13 µg/mL) (Tabela 1). Foram consideradas semelhantes, uma vez que a semelhança é indicada pela sobreposição dos intervalos de confiança dos valores de CL<sub>50</sub> a 95%, o que aconteceu neste trabalho.

A razão de resistência (RR) apresentou valores inferiores a 2,0 nas três populações, sendo 1,00 para NO-QA, 1,11 para Bt e 1,50 para PC (Tabela 3).

É possível comparar o efeito de toxinas em populações de insetos utilizando-se os valores de CL<sub>50</sub> da concentração-diagnóstico, que vem a ser aquela que causa alta mortalidade na população suscetível e pouca ou nenhuma na resistente, possibilitando, assim, detectar indivíduos resistentes dentro de uma população (Roush e Miller, 1986). Segundo esses autores, o aumento nos valores de CL<sub>50</sub> indica o crescimento na quantidade de indivíduos resistentes em uma população, assim, o monitoramento com a concentração diagnóstica tem o poder de detectar antecipadamente a ocorrência de resistência. Altos valores de razão de resistência evidenciam a possibilidade de resistência de uma população, e valores maiores que 10 estão propensos à diminuição da suscetibilidade (Tabashnik, 1994). Ademais, diretrizes de monitoramento de resistência a inseticidas para *P. xylostella* em

brássicas citam que populações são consideradas suscetíveis quando apresentam valor de  $RR \leq 5$ , sendo considerado de alta resistência com valores de  $RR > 100$  (Wang et al., 2018). Em função dessas afirmativas, pode-se inferir a suscetibilidade das populações testadas neste trabalho a Cry1Ca (Tabela 3).

Tabashnik et al. (1994) demonstraram que resistência a Cry1Ac na população NO-QA de *P. xylostella* é devido à redução nos sítios de ligação e, com a intenção de entender a suscetibilidade da traça-das-crucíferas, Ferré e van Rie (2002) fizeram um modelo para demonstrar os sítios de ligação de proteínas Cry em *P. xylostella*, sendo assim foi possível justificar a suscetibilidade a Cry1Ca.

De acordo com Ferré e van Rie (2002), *P. xylostella* tem quatro locais de ligações para as toxinas Cry, que são: sítio 1, reconhecido apenas pela toxina Cry1Aa; sítio 2, compartilhado entre Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa e Cry1; sítio 3, reconhecido pela toxina Cry1Ba; e sítio 4, reconhecido pela toxina Cry1Ca (Figura 2). Sendo assim, é possível sugerir que as populações resistentes deste trabalho, NO-QA e Bt, provavelmente apresentam modificações nos sítios 1 e 2 que causam resistentes às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F, enquanto a população suscetível não apresenta essas modificações.

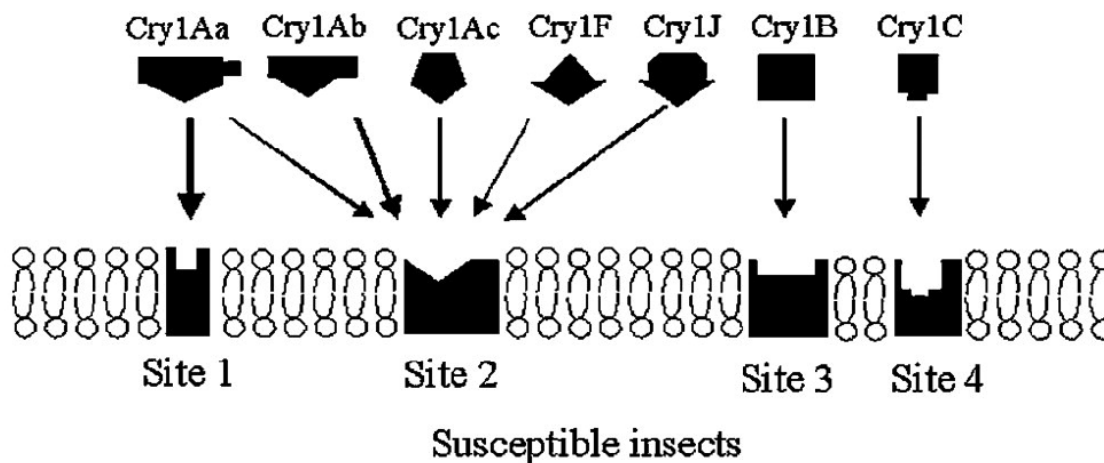


Figura 2. Modelo para sítios de ligação de proteínas Cry em *Plutella xylostella* (Ferré e van Rie, 2002).

De acordo com Zhu et al. (2014), a resistência a Cry1Ac é causada, provavelmente, por modificação em um receptor comum, no caso sítio 2, às toxinas

Cry1Ab e Cry1Ah, que possivelmente não é reconhecido por Cry1Ca. Isso justificaria a suscetibilidade a Cry1Ca das populações resistentes a Cry1Ac.

Tabela 3. Resultados das estimativas de concentrações letais da toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* para três populações de *Plutella xylostella*.

Pop	N <sup>a</sup>	Coef. angular (± EP)	CL <sub>50</sub> (95% I.C.) (µg/mL)	χ <sup>2</sup> (GL) <sup>b</sup>	Razão da resistência <sup>c</sup>	CL <sub>15</sub> (µg/mL)	CL <sub>25</sub> (µg/mL)
Bt	360	1,04 ± 0,09	0,10 ± 0,07 (0,07 - 0,14)	6,24 (4)	1,11	0,01 (0,00 - 0,01)	0,02 (0,01 - 0,03)
NO-QA	360	1,61 ± 0,16	0,09 ± 0,07 (0,06 - 0,13)	5,54 (3)	1,00	0,02 (0,01 - 0,03)	0,04 (0,02- 0,05)
PC	300	1,28 ± 0,11	0,13 ± 0,09 (0,10 - 0,19)	5,79 (3)	1,50	0,02 (0,01 - 0,03)	0,04 (0,02- 0,05)

<sup>a</sup>Número de lagartas testadas, incluindo controle; <sup>b</sup>Grau de liberdade; <sup>c</sup>CL<sub>50</sub>população / CL<sub>50</sub>população mais suscetível;

Segundo Kees (2013), a toxina Cry1Ca pode ser considerada altamente tóxica para as populações testadas em função dos valores de CL<sub>50</sub> encontrados. A proteína é considerada altamente tóxica quando é ativada com 0,01–0,10 µg/ml, média de toxicidade entre de 0,10-10 µg / ml, e pouco tóxica quando se encontra na faixa de 10-1000 µg/ml.

Shelton et al. (2009) coletaram vinte populações em diferentes países em cultivares de repolho e couve-flor e submetem-nas a testes com a toxina Cy1Ca, obtendo valores para CL<sub>50</sub> situados entre 0,01 µg/ml e 0,91 µg/ml. Para as populações resistentes a Cry1Ac utilizadas neste trabalho, Bt e NO-QA, os valores de CL<sub>50</sub> foram menores em relação a população SZ Cry1Ac resistente trabalhada por aqueles autores, com valores 0,10 µg/ml e 0,09 µg/ml, respectivamente, enquanto que para a população SZ foi de 0,35 µg/ml.

#### 4.3. Efeitos subletais de Cry1Ca em *Plutella xylostella*

A exposição à toxina Cry1Ca fez com que sobrevivência larval fosse reduzida com o aumento da concentração, nas três populações de *P. xylostella* (F<sub>2, 81</sub> = 6,586;



$P = <0,005$ ). As lagartas sem consumo de toxina (testemunha) da população Bt tiveram sobrevivência de 84,0%, diminuindo para 56,0% na maior concentração, o mesmo ocorrendo para NO-QA e PC, que tiveram sobrevivências larvais na testemunha de 84,0% e 82,0% e mortalidade de 24,0% e 34,0% na CL<sub>25</sub>, respectivamente (Tabela 4).

Na relação entre as populações não houve diferença significativa ( $F_{2, 81} = 1,892$ ;  $P = >0,1$ ). Com as CL<sub>15</sub>, as porcentagens de sobrevivência foram semelhantes entre as populações, variando de 76,0% a 84,0%, o mesmo sendo encontrado para as CL<sub>25</sub>, com variação de 56,0% a 76,0%. Esses resultados indicam tendência de aumento na mortalidade das lagartas com a aplicação da toxina, sendo essa tendência crescente de CL<sub>15</sub> para CL<sub>25</sub> (Tabela 4).

A toxina Cry1Ca mostrou elevada eficiência no controle de lagartas de vinte populações de campo de *P. xylostella*, sendo os insetos oriundos das culturas de repolho e couve-flor de diversos países (Índia, Indonésia, Taiwan, China, Austrália e EUA). Eficiência semelhante foi observada para uma população de *P. xylostella* 2000 vezes resistente a Cy1Ac (Shelton et al., 2009), corroborando os testes deste estudo.

Além disso, a toxina Cry1Ca também foi eficiente contra outros lepidópteros-praga, como: *Pieris rapae* L., 1758, *P. brassicae* (L., 1758) (Lepidoptera: Pieridae) e *Hellula undalis* (F., 1781) (Lepidoptera: Pyralidae), além de ser tóxica para diferentes espécies de *Spodoptera* (Shelton et al., 2009; Gomes et al., 2018).

A toxina Cry1Ca está presente em alguns formulados comerciais eficientes para o controle de lepidópteros-praga, inclusive para traças-das-crucíferas, como Agree® e Xentari® (Dilawari et al., 1996; van Frankenhuyzen, 2009; Wei et al., 2019), sendo ela considerada a segunda proteína mais tóxica para *P. xylostella*, inferior apenas a Cry1Ab, segundo Monnerat et al. (1999).

Uma população pode apresentar extrema resistência à toxina Cry1A e pouca ou nenhuma resistência à Cry1C, esta fato já foi relatado para a população NO-QA (Tabashnik et al., 1994, 1996 e 1998), e agora também é possível citar para a população Bt resistente utilizada neste trabalho.

Tabela 4. Sobrevivência larval de populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Sobrevivência larval (%)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	84,0±4,99Aa <sup>1</sup>	76,0 ±5,81Aab	56,0 ± 5,81Ab
NO-QA	84,0 ± 4,99Aa	84,0 ± 4,99Aa	76,0 ±5,81Ab
PC	82,0 ± 6,28Aa	76,0 ±9,33Aab	66,0 ±5,20Ab

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula=coluna), ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A sobrevivência pupal não apresentou diferença significativa entre as populações submetidas ao efeito da toxina Cry1Ca ( $F_{2, 81} = 0,189$ ;  $P = > 0,2$ ). Os resultados variaram de 54,0% a 68,0% para testemunha, de 46,0% a 66,0% para CL<sub>15</sub> e de 46,0% a 62,0% para CL<sub>25</sub>. Entre as concentrações de Cry1Ca também não houve diferença significativa ( $F_{2, 81} = 2,097$ ;  $P = >0,05$ ). Na população Bt os resultados foram semelhantes, variando de 46,0% a 64,0%; na NO-QA variou de 54,0% a 66,0%; e na PC de 50,0% a 68,0% (Tabela 5).

Tabela 5. Sobrevivência pupal de populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Sobrevivência pupal (%)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	64,0 ± 7,77Aa <sup>1</sup>	46,0 ± 8,45Aa	46,0 ± 4,26Aa
NO-QA	54,0 ± 6,70Aa	66,0 ± 7,91Aa	62,0 ± 5,53Aa
PC	68,0 ± 8,53Aa	60,0 ± 7,88Aa	50,0 ± 4,47Aa

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A exposição à toxina Cry1Ca fez o período pupal na população Bt ser maior na CL<sub>15</sub> (4,54 dias) e na NO-QA na CL<sub>25</sub> (4,87 dias), diferentes da PC que apresentou menor duração quando exposta a Cry1Ca (3,58 dias na CL<sub>15</sub> e 3,91 dias na CL<sub>25</sub>) ( $F_{2, 81} = 4,508$ ;  $P = <0,05$ ) (Tabela 6). A testemunha da população Bt (3,86 dias) apresentou período pupal menor em relação às outras (NO-QA = 4,27 dias e PC = 5,00 dias) ( $F_{2, 81} = 7,950$ ;  $P = <0,001$ ) (Tabela 6). Laurentis (2013), trabalhando com a população PC

verificou que, em contato com isolados/produtos à base de *B. thuringiensis*, a média do período pupal foi de 4,24 dias, com a testemunha apresentando 4,4 dias, enquanto De Bortoli (2014) encontrou média de 3,0 dias, mostrando com isso as populações estão sujeitas a alterações biológicas devido a vários fatores após gerações, inclusive por mutações, como citam Roux et al. (2007). Além disso, Robertson et al. (1995) dizem que a resposta natural de cada população tem sido ignorada para questões comparativas quando são tratados indivíduos expostos a produtos químicos ou biológicos, sendo assim difícil de haver uma padronização de resultados, uma vez que é normal acontecer variação natural quando há a repetição de qualquer bioensaio. Sendo assim, a variação do período pupal pode estar relacionada a essas características naturais das populações empregadas neste trabalho.

Tabela 6. Período pupal de populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Período pupal (dias)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	3,86 ± 0,07Bb <sup>1</sup>	4,54 ± 0,17 Aa	3,96±0,18 Aab
NO-QA	4,27 ±0,10Ab	4,47±0,10 Aab	4,87±0,09 Aa
PC	5,00 ± 0,11 Aa	3,58 ± 0,11 Bb	3,91 ± 0,13Ab

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula=linha; maiúscula=coluna), ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

Na comparação entre populações observa-se influência da toxina na CL<sub>15</sub> em relação ao peso de pupas. As populações Bt e PC mostraram menores valores para o parâmetro, com 5,57 mg e 5,81 mg, respectivamente, enquanto a NO-QA apresentou valor mais elevado (6,72 mg) ( $F_{2, 77} = 4,475$ ;  $P = 0,0145$ ) (Tabela 7).

O peso de pupas foi influenciado pelo tratamento nas populações Bt e PC e, por serem originárias de uma mesma população, ainda podem estar se comportando biologicamente da mesma forma. Laurentis (2013) e Roux et al. (2007) analisaram diferentes populações de *P. xylostella* e evidenciaram grandes diferenças na estrutura genética das populações.

Na comparação entre as concentrações não houve diferença significativa ( $F_{2, 77} = 2,175$ ;  $P = 0,1205$ ). Na população Bt os pesos foram semelhantes variando de 5,57

mg a 6,09mg, na NO-QA de 5,50 mg a 6,72 mg e na PC de 5,35 mg a 6,21 mg (Tabela 7).

Polanczyk e Alves (2005) correlacionaram lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com *B. thuringiensis* e peso de pupas, associando a diminuição do peso pupal à alterações fisiológicas decorridas da ingestão de Bt, enquanto De Bortoli et al. (2012) relataram que traça-das-crucíferas, sob efeito de produtos formulados à base de *B. thuringiensis*, sofreu diminuição no peso das pupas, resultados esses que contradizem aqueles apresentados na Tabela 8, com essa tabela mostrando que não houve diferença entre o peso pupal quando as lagartas ingeriram ou não a toxina. Também, em trabalho feito por Groeters et al. (1994), comparando parâmetros biológicos da população NO-QA com de população suscetível sob efeito de Bt, não observaram interferência no período e peso pupal, corroborando com este trabalho, sendo, com isso, possível afirmar que diferenças biológicas estão sempre sujeitas acontecer, não sendo possível padronizar respostas para indivíduos diferentes ainda que submetidos às mesmas condições.

As mudanças biológicas devido à exposição ao Bt são melhor caracterizadas na viabilidade larval, peso de pupas e com pouca influência nos períodos larval e pupal (Viana et al., 2009; De Bortoli et al., 2011).

Tabela 7. Peso de pupas de populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Peso de pupas (mg)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	6,09 ± 0,12Aa <sup>1</sup>	5,57 ± 0,31Ba	5,83 ± 0,24Aa
NO-QA	5,50 ± 0,26Aa	6,72 ± 0,34Aa	6,46 ± 0,50Aa
PC	5,35 ± 0,24Aa	5,81 ± 0,37Ba	6,21 ± 0,25Aa

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A exposição das lagartas das populações Bt e PC à toxina Cry1Ca fez a longevidade de machos ser maior para CL<sub>25</sub> ( $F_{2, 77} = 4,117$ ;  $P = <0,05$ ). Os machos da população PC na testemunha e na CL<sub>15</sub> tiveram menor sobrevivência em relação a CL<sub>25</sub>, com valores de 7,3 dias, 7,0 dias e 11,2 dias, respectivamente. Para machos da

população Bt a variação da longevidade foi de 7,8 dias (CL<sub>15</sub>) a 12,5 dias (CL<sub>25</sub>). Já, para NO-QA, os valores foram semelhantes variando de 7,5 dias a 8,8 dias (Tabela 8).

Na relação entre as populações também houve diferença significativa ( $F_{2, 77} = 3,341$ ;  $P = <0,05$ ). Nas CL<sub>25</sub> a população NO-QA sobreviveu menos em relação às outras, com 7,5 dias, enquanto os da Bt sobreviveram 12,5 dias e os da PC 11,2 dias. Nas CL<sub>15</sub> os valores para o parâmetro em análise foram similares, variando de 7,0 a 8,8 dias, o mesmo ocorrendo na testemunha, com valores de 7,3 dias a 10,8 dias (Tabela 8).

De Bortoli (2014) relatou que lagartas de *P. xylostella* expostas a Cry1Ac não sofreram alterações nas características biológicas dos adultos, com sobrevivência média de 18,5 dias. No entanto, os resultados aqui encontrados indicam que os machos tiveram menor sobrevivência, com essa diferença podendo estar relacionada à diferenças bióticas e abióticas entre os bioensaios.

Tabela 8. Longevidade de machos (dias) de *Plutella xylostella* com lagartas submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Longevidade de machos (dias)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	10,8 ± 1,43Aab <sup>1</sup>	7,8± 1,65 Ab	12,5 ± 1,22 Aa
NO-QA	8,8 ± 1,02 Aa	8,8± 1,31 Aa	7,5± 1,31 Ba
PC	7,3 ± 0,99 Ab	7,0± 1,10 Ab	11,2 ± 1,27 Aa

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A longevidade de fêmeas também foi afetada pela exposição às concentrações de Cry1Ca ( $F_{2, 81} = 2,972$ ;  $P = 0,05$ ), com a população PC afetada negativamente na CL<sub>15</sub>, em que as fêmeas tiveram menor longevidade (6,9 dias), enquanto a testemunha na CL<sub>25</sub> mostrou períodos de vida de 8,9 e 10,5 dias, respectivamente. As fêmeas das populações Bt e NO-QA tiveram valores semelhantes, com as de Bt vivendo de 10,4 a 12,9 dias, e as de NO-QA de 8,2 a 9,3 dias (Tabela 9).

Quando se analisa o comportamento das populações em função da toxina Cry1Ca verificam-se diferenças estatísticas ( $F_{2, 81} = 7,890$ ;  $P = <0,005$ ), sendo que

com a CL<sub>15</sub> as fêmeas da população PC viveram menos em relação às de Bt (6,9 dias e 11,8 dias, respectivamente). A população Bt também foi mais longeva na CL<sub>25</sub> com 12,9 dias, em relação a NO-QA com 8,2 dias. Na testemunha os valores foram semelhantes variando de 8,9 dias a 10,4 dias (Tabela 9).

Pelos resultados apresentados verificou-se que os insetos ao atingirem a fase adulta apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e populações na longevidade de fêmeas e somente entre as populações na fecundidade (Tabelas 9 e 10). Deve também ser salientado que alguns adultos emergiram com deformações nas asas. Nesse sentido, Santos (2018), submetendo lagartas de *P. xylostella* a produtos à base de *B. thuringiensis*, não observou diferenças na longevidade e fecundidade das fêmeas, contudo cita que alguns insetos também emergiram com deformações nas asas ou não conseguiram se desvencilhar por completo da exúvia pupal.

Tabela 9. Longevidade de fêmeas (dias) de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Longevidade de fêmeas (dias)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	10,4 ± 1,21 Aa <sup>1</sup>	11,8 ± 1,12 Aa	12,9 ± 1,29 Aa
NO-QA	9,3 ± 0,88 Aa	8,7 ± 1,45 Aab	8,2 ± 0,95Ba
PC	8,9 ± 0,80 Aab	6,9 ± 1,46 Bb	10,5 ± 0,98Aa

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey

O número de ovos/fêmea não foi influenciado pelas concentrações da toxina ( $F_{2, 81} = 1,756$ ;  $P = 0,1793$ ), com as fêmeas da população Bt ovipositando, em média, de 141,0 a 164,2 ovos, as de NO-QA de 99,9 a 141,9 ovos e as de PC de 107,9 a 129,8 ovos (Tabela 10).

Entre populações ocorreu diferença significativa para o número de ovos/fêmea ( $F_{2, 81} = 5,367$ ;  $P = 0,0065$ ), com a população Bt na CL<sub>25</sub> apresentando maior oviposição (164,20 ovos), enquanto na mesma concentração a população com menor taxa de oviposição foi NO-QA (101,00 ovos). Na CL<sub>15</sub> a quantidade de ovos depositada

foi equivalente nas três populações de *P. xylostella*, variando de 99,9 a 141,0 ovos, enquanto nas testemunhas foram obtidos de 122,1 a 161,2 ovos (Tabela 10).

Polanczyk e Alves (2005) observaram que alguns isolados de Bt podem causar alterações fisiológicas que afetam negativamente a reprodução dos insetos, com isso refletindo na quantidade de ovos ovipositados. Já, para os resultados deste trabalho não é possível fazer essa mesma afirmação, visto que a quantidade de ovos colocados pelas fêmeas que não tiveram contato com a toxina é semelhante àquelas que sofreram a ação do produto. Ramachandran et al. (1998) observaram que não houve diferença significativa de postura entre população resistente e suscetível de *P. xylostella* entre plantas transgênicas (Cry1Ac) e não transgênicas de canola, além disso sugeriram que a toxina Cry1Ac não foi capaz de interferir na oviposição da população suscetível, indicando que a suscetibilidade de lagartas não está relacionada com a preferência de oviposição.

Tabela 10. Fecundidade de fêmeas de populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais de Cry1Ca.

População	Fecundidade (ovos/fêmea)		
	Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
Bt	161,2 ± 17,12 Aa <sup>1</sup>	141,0 ± 13,59Aa	164,2 ± 16,06Aa
NO-QA	141,9 ± 11,06Aa	99,9 ± 17,09Aa	101,0 ± 25,36Ba
PC	122,1 ± 15,45Aa	107,9 ± 20,64Aa	129,8 ± 16,07ABa

<sup>1</sup>Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey.

Assim, foi constatado que algumas características biológicas (parâmetros biológicos) das populações de *P. xylostella* foram alteradas pelo consumo da toxina Cry1Ca de *B. thuringiensis*. O período pupal, longevidade de machos e fêmeas e fecundidade de ovos foram influenciados com a aplicação de Cry1Ca, com a população NO-QA sendo a mais afetada.

De acordo com Groeters et al. (1993), populações resistentes estão sujeitas a sofrer pressão pelo custo adaptativo (“fitness cost”), fato este que ocasiona menor sobrevivência desde a eclosão até a vida adulta, bem como redução da fecundidade.

Além disso, o acasalamento reduzido também pode estar inserido dentro do custo adaptativo sofrido pela população.

Os resultados médios obtidos para a tabela de vida de fertilidade de *P. xylostella* cujas lagartas foram submetidas à toxina Cry1Ca de Bt encontram-se na Tabela 11, onde se verifica que as taxas líquidas de reprodução ( $R_0$ ) da população Bt foram semelhantes na testemunha (41,6) e na CL<sub>15</sub> (34,2), sendo maiores que na CL<sub>25</sub> (16,5). Para NO-QA, a CL<sub>15</sub> resultou em uma  $R_0$  (21,8), em média, 57% menor do que na testemunha (37,9), enquanto na CL<sub>25</sub> teve valor de 30,4. Na população PC as taxas líquidas de reprodução foram semelhantes nos tratamentos, com testemunha apresentando valor de 17,6, CL<sub>15</sub> com 24,7 e CL<sub>25</sub> com 27,2.

Existe diferença quando se comparam as testemunhas nas populações, com menor valor de  $R_0$  para PC (17,6), comparado a Bt (37,9) e NO-QA (37,9), que não diferiram entre si. Nas CL<sub>15</sub> e CL<sub>25</sub>, as três populações tiveram comportamentos semelhantes, não diferindo entre si. Os valores de CL<sub>15</sub> variaram de 21,8 a 34,2, enquanto que para CL<sub>25</sub> a variação foi de 16,5 a 27,2 (Tabela 11).

A razão intrínseca de aumento ( $r_m$ ) na população Bt foi significativamente diferente entre os tratamentos, com maior valor na testemunha (0,30), sendo semelhantes com CL<sub>15</sub> (0,21) e CL<sub>25</sub> (0,20). Para a população NO-QA a testemunha também evidenciou maior valor (0,34) em relação a CL<sub>15</sub> (0,20) e a CL<sub>25</sub> (0,24). Em relação à população PC, os valores de CL<sub>15</sub> (0,25) e CL<sub>25</sub> (0,25) não diferiram da testemunha (0,21) (Tabela 11).

Quando se analisa os valores de  $r_m$  entre as populações observa-se que a testemunha da PC teve menor valor (0,21), em relação as demais populações (Bt = 0,30 e NO-QA = 0,34), não existindo diferenças entre estes dois últimos.

A razão finita de aumento populacional ( $\lambda$ ), que representa o fator de multiplicação da população original a cada intervalo unitário de tempo, na testemunha de Bt foi maior (1,36), em relação a CL<sub>15</sub> (1,23) e CL<sub>25</sub> (1,22). Na população NO-QA os tratamentos foram semelhantes à testemunha (1,28), sendo 1,23 para CL<sub>15</sub> e 1,41 para CL<sub>25</sub>. A população PC também não apresentou diferença entre os tratamentos, com valores 1,24 para a testemunha, 1,28 para CL<sub>15</sub> e 1,29 para CL<sub>25</sub> (Tabela 11).

Comparando-se as interações tratamentos X populações, observou-se efeito na testemunha da população Bt (1,36), resultando em maior  $\lambda$  em relação à NO-QA



(1,28) e PC (1,24). Para CL<sub>25</sub>, NO-QA apresentou maior  $\lambda$  (1,41) em relação a PC (1,29) e Bt (1,22), enquanto nas CL<sub>15</sub> os valores para as populações foram semelhantes (Tabela 11).

O tempo médio de uma geração (T), isto é, a duração média entre o nascimento de um indivíduo de uma geração e o da seguinte, mostrou diferença significativa entre os tratamentos nas populações Bt e NO-QA, enquanto na Bt a CL<sub>15</sub> teve maior valor (16,7 dias) em relação à testemunha (12,2 dias) e a CL<sub>25</sub> (13,8 dias). A população NO-QA apresentou valor significativamente menor na testemunha (10,5 dias), sendo para CL<sub>15</sub> (15,1 dias) e CL<sub>25</sub> (14,0 dias), semelhantes entre si, enquanto a PC respondeu de forma semelhante para todos os tratamentos (testemunha = 13,3 dias; CL<sub>15</sub> = 13,0 dias e CL<sub>25</sub> = 13,1 dias) (Tabela 11).

Comparando-se as interações tratamentos X populações, o tempo entre uma geração e outra foi menor na testemunha da população NO-QA com 10,5 dias, comparado com PC que foi de 13,3 dias e Bt 12,2 dias. CL<sub>15</sub> resultou maior valor de T para a população Bt (16,7 dias), seguido de PC (13,0 dias), com NO-QA (15,1 dias) semelhante à Bt e PC. CL<sub>25</sub> não provocou diferenças estatísticas, apresentando valores que variaram de 13,1 dias a 14,0 dias (Tabela 11).

Para o tempo necessário para duplicar em número de indivíduos (TD), a testemunha da população Bt diferiu das demais (2,2 dias), sendo 3,2 dias na CL<sub>15</sub> e 3,4 dias na CL<sub>25</sub>. A população NO-QA também diferiu entre os tratamentos, com TD de 2,0 dias na testemunha, 3,3 dias na CL<sub>15</sub> e 2,8 dias na CL<sub>25</sub>. Na PC não houve diferença entre os tratamentos, sendo 3,2 dias na testemunha, 2,8 dias na CL<sub>15</sub> e 2,7 dias na CL<sub>25</sub> (Tabela 11).

Analisando-se os resultados entre populações, apenas as testemunhas diferenciaram estatisticamente, com a população PC apresentando valor maior em relação as demais, duplicando a população em 3,2 dias, enquanto para Bt foi 2,2 dias e para NO-QA 2,0 dias (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados da tabela de vida de fertilidade para populações de *Plutella xylostella* submetidas a concentrações subletais da toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*.

		Tratamentos		
		Testemunha	CL <sub>15</sub>	CL <sub>25</sub>
<b>R<sub>0</sub></b>	Bt	41,6 aA <sup>1</sup> (31,6 - 51,6)	34,2 aA (25,0 - 43,3)	16,5 bA (12,9 - 20,2)
	NO-QA	37,9 aA (31,1 - 44,8)	21,8 bA (13,7 - 29,9)	30,4 abA (14,6 - 46,1)
	PC	17,6 aB (12,5 - 22,6)	24,7 aA (14,1 - 35,3)	27,2 aA (19,5 - 34,9)
<b>r<sub>m</sub></b>	Bt	0,30 aA (0,27 - 0,33)	0,21 bA (0,18 - 0,24)	0,20 bA (0,18 - 0,23)
	NO-QA	0,34 aA (0,33 - 0,36)	0,20 bA (0,18 - 0,22)	0,24 bA (0,20 - 0,28)
	PC	0,21 aB (0,19 - 0,24)	0,25 aA (0,220 - 0,27)	0,25 aA (0,22 - 0,28)
<b>λ</b>	Bt	1,36 aA (1,32 - 1,39)	1,23 bA (1,20 - 1,27)	1,22 bB (1,19 - 1,25)
	NO-QA	1,28 aB (1,23 - 1,32)	1,23 aA (1,20 - 1,25)	1,41 aA (1,39 - 1,43)
	PC	1,24 aB (1,21 - 1,27)	1,28 aA (1,25 - 1,31)	1,29 aB (1,25 - 1,32)
<b>T (Dias)</b>	Bt	12,2 bA (11,4 - 12,9)	16,7 aA (15,7 - 17,8)	13,8 bA (12,7 - 14,9)
	NO-QA	10,5 bB (10,0 - 11,0)	15,1 aAB (14,1 - 16,1)	14,0 aA (13,3 - 14,8)
	PC	13,3 aA (12,8 - 13,7)	13,0 aB (11,8 - 14,2)	13,1 aA (12,6 - 13,5)
<b>TD (Dias)</b>	Bt	2,2 bB (2,0 - 2,4)	3,2 aA (2,8 - 3,7)	3,4 aA (2,9 - 3,8)
	NO-QA	2,0 bB (1,9 - 2,1)	3,3 aA (3,0 - 3,7)	2,8 aA (2,3 - 3,2)
	PC	3,2 aA (2,8 - 3,5)	2,8 aA (2,5 - 3,0)	2,7 aA (2,4 - 3,0)

<sup>1</sup>Médias (Intervalo de confiança) seguidas pela mesma letra não diferem (minúscula = linha; maiúscula = coluna), ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey. R<sub>0</sub> = taxa líquida de reprodução; r<sub>m</sub> = taxa intrínseca de aumento; λ = razão finita de aumento; T = tempo médio de gerações; TD = tempo para a população duplicar em número.

A dinâmica populacional dos insetos-praga pode ser afetada pela disponibilidade e qualidade da planta hospedeira, podendo provocar mudanças significativas no desempenho dos imaturos, bem como dos adultos (Golizadeh et al., 2009). Os parâmetros da tabela de vida obtidos e analisados neste trabalho mostram que a população Bt apresentou menores valores para taxa líquida de reprodução, taxa intrínseca de aumento e taxa finita de aumento quando submetida a maior concentração de toxina Cry1Ca (CL<sub>25</sub>). A taxa líquida de reprodução das três populações foi semelhante à da testemunha em pelo menos uma das concentrações de Cry1Ca, sendo que isso implica que essas populações, mesmo com a aplicação da toxina em doses subletais, deixa um elevado número de descendentes para a próxima geração. Santos (2018) relatou que população de *P. xylostella* suscetível a toxinas Bt de diferentes produtos formulados tem aumento na progênie da geração seguinte.

As populações Bt e NO-QA sofreram aumento no tempo médio de gerações (T) com a exposição à toxina, com a Bt tendo aumento com a CL<sub>15</sub> e a NO-QA, tanto com CL<sub>15</sub> como com CL<sub>25</sub>, mostrando maior tempo de geração para o inseto. Com isso, em condições práticas de campo, o tempo de contato com a planta seria maior, podendo acarretar maiores índices de consumo foliar. Nesse sentido, Santos (2018) relata resultados semelhantes com o produto formulado Agree®, que é um híbrido transconjugado de *Bt aizawai* e *Bt kurstaki*, contendo as toxinas Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry2.

A taxa intrínseca de aumento ( $r_m$ ), ou seja, a capacidade inata da espécie aumentar em número foi diferente nas populações Bt e NO-QA, sendo influenciada pelas CL<sub>15</sub> e CL<sub>25</sub>, com valores menores em relação à suas respectivas testemunhas. Andrewartha e Birch (1954) dizem que esse é o parâmetro mais importante para estimar o sucesso de uma espécie no ambiente, inferindo que quanto maior o seu valor mais bem-sucedida será a espécie. Sendo assim, os dados obtidos nesse trabalho são promissores para o uso da toxina Cry1Ca no manejo de traça-das-cucíferas, uma vez que suas populações poderão ser afetadas ao longo das gerações.

Medeiros et al. (2000) afirmam que a tabela de vida de fertilidade é capaz de relacionar o aumento populacional através do potencial reprodutivo de fêmeas por unidade tempo, sendo que em relação a esse parâmetro a única população que sofreu interferência dos tratamentos foi a Bt.

A população PC não sofreu nenhuma alteração nos parâmetros da tabela de vida, tanto para lagartas expostas ou não à ação da toxina Cry1Ca, tendo a população respondendo da mesma forma. As diferenças apresentadas entre populações foram demonstradas geralmente nas testemunhas, onde foram obtidas respostas diferentes apenas para a taxa de crescimento populacional, com as populações Bt e PC apresentando os menores valores.

Segundo Zago et al. (2014), estudar diferentes populações de um inseto-praga é de extrema importância para o sucesso de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), principalmente com indivíduos resistentes, uma vez que a resistência é um dos grandes problemas de diferentes cultivos, dificultando o combate às pragas em condições de campo e, comumente, levando a um aumento no número de aplicações e/ou das doses/dosagens dos diferentes produtos aplicados na tentativa de solucionar o problema. Esses mesmos autores ressaltam também a preocupação que se deve ter quanto à resistência de insetos-praga também aos bioinseticidas, uma vez que esses produtos são utilizados não só na agricultura convencional, mas também na orgânica.

O conhecimento sobre a ação de uma toxina Cry ou um bioinseticida em um indivíduo ou população é muito importante para, entre outros objetivos, o manejo da resistência, bem com estudos sobre os efeitos subletais desses produtos, esclarecendo seus efeitos no desenvolvimento dos indivíduos/populações onde a mortalidade não foi provocada, até mesmo pelas doses recomendadas, visto que os efeitos de doses subletais podem concorrer também para a seleção de populações tolerantes ou resistentes, além de eventuais desequilíbrios poderem levar a surtos de pragas secundárias (Desneux et al., 2007; Roux et al., 2007; Guedes e Cutler, 2013; França et al, 2017).

Nesse sentido, mais estudos em laboratório são necessários antes de serem realizados testes em condições de campo, particularmente com a finalidade de se verificar as respostas das toxinas expostas a outras variáveis, como diferentes temperaturas, exposição por sucessivas gerações, utilização de outras variedades de plantas e, principalmente, testes com inimigos naturais checando se há interferência em organismos benéficos, como parasitoides e predadores, além de serem checados incrementos nas doses das toxinas.

Deve também ser ressaltado que os insetos altamente resistentes a Bt HD-1 são suscetíveis à toxina Cry1Ca, sugerindo a possibilidade de utilização desta toxina no controle ou a sua incorporação em formulações comerciais a serem produzidas futuramente.

## 5. CONCLUSÃO

- A toxina Cry1Ca é eficaz para controlar *P. xylostella*;
- As concentrações subletais influenciam negativamente as características biológicas do inseto;
- A toxina Cry2Ac não é eficiente.

## 6. REFERÊNCIAS

- Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL (2014) Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In: Dhadialla TS, Gill SS (Eds.) **Advances in Insect Physiology**. New York: Elsevier p. 39-70
- Andrewartha HG, Birch LC (1954) The innate capacity for increase in numbers. In: Andrewartha HG, Birch LC (Eds.). **The distribution and abundance of animals**. Chicago: University of Chicago Press, p. 31-54
- APRD, *Arthropod Pesticide Resistance Database* 2018 Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org/>>. Acesso em: 21 set. 2018
- Badenes-Perez FR, Reichelt M, Gershenzon J, Heckel DG (2011) Phylloplane location of glucosinolates in *Barbarea* spp. (Brassicaceae) and misleading assessment of host suitability by a specialist herbivore. **New Phytologist** 189(2):549–556.
- Badenes-Perez FR, Shelton AM, Nault BA (2004) Evaluating trap crops for diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 97:1365-1372.
- Boiça Júnior AL, Tagliari SRA, Pitta RM, Jesus FGD, Braz LT (2011) Influence of cabbage genotypes (*Brassica oleracea* L var acephala DC) on the biology of *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência e Agrotecnologia** 35(4):710-717.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49(4):423-435.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2005) *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use In: Gilbert LI, Gill SS (Eds.) **Insect control: biological and synthetic agents** *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. New York : Elsevier BV, p. 175–206.
- Bravo A, Jansens S, Peferoen M (1992) Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology** 60:237-246.
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 41:423-31.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Guadalupe P, Nunez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of cry genes in mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology** 1:4965-4972.
- Broad ST, Schellhorn NA, Lisson SN, Mendham NJ (2008) Host location and oviposition of lepidopteran herbivores in diversified broccoli cropping systems. **Agricultural and Forest Entomology** 10(2):157-165.

Budhi R, Sharma KC, Chandel VGS, Devi N (2017) Variations in developmental biology and morphometrics of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) collected from different geographic areas of North Indian. **Environment & Ecology** 35:829-833.

Capinera JL (2015) **Diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Plutellidae)**. University of Florida. Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN27600.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2019.

Castelo Branco M, França FH (2015) Traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L). In: Vilela EF, Zucchi RA (Eds.) **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Piracicaba: Fealq, p. 516-528.

Castelo Branco M, França FH, Medeiros MA, Leal JG (2001) Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira** 19(1):60-63.

Celestino FN, Souza LP, Valbon WR, Bestete LR, Rondelli VM (2015) Traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) In: Holtz, MA, Rondelli VM, Celestino FN, Besteste LR, Carvalho JR (Eds.). **Pragas das brássicas**. Colatina: IFES, p. 30-73.

Chapman JW, Reynolds DR, Smith AD, Riley JR, Pedgley DE, Woiwod IP (2002) High altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the UK: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. **Ecological Entomology** 27(7):641-650.

Charleston DS, Gols R, Hordijk KA, Kfir R, Vet LEM, Dicke M (2006) Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* plants on the emission of volatiles that attract parasitoids of the diamondback moth to cabbage plants. **Journal of Chemical Ecology** 32:325–49.

Chen S, Nelson MN, Chèvre AM, Jenczewski E, Li Z, Mason AS, Meng J, Plummer JA, Pradhan A, Siddique KHM, Snowdon RJ, Yan G, Zhou W, Cowling WA (2011) Trigenomic bridges for brassica improvement. **Critical Reviews in Plant Sciences** 30:524–547.

Cheng L, Yu G, Chen Z, Li Z (2008) Insensitive acetylcholine receptor conferring resistance of *Plutella xylostella* to nereistoxin insecticides. **Agricultural Sciences in China** 7(7):847-852.

Chuan TH, Lim BH (1977) Effect of interplant distance on the distribution pattern of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L) among host plants. **Malaysian Applied Biology** 6:19-23.

Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR (2018) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 21 set. 2018.

De Barjac H, Bonnefoi AA (1968) Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. **Journal of Invertebrate Pathology** 11:335–347.



De Bortol CP (2018) **The investigation of factors potentially involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* in native *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) populations.** 127 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

De Bortoli CP (2014) **Toxicidade e efeitos subletais de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* Berliner em diferentes populações de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em laboratório.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

De Bortoli CP, Jurat-Fuentes JL (2019) Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. **Current Opinion in Insect Science** 1:01-23.

De Bortoli SA, Polanczyk RA, Vacari AM, De Bortoli CP, Duarte RT (2013) *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): tactics for integrated pest management in Brassicaceae. In: Soloneski, S, Larramendy, M (Eds.). **Weed and pest control** - conventional and new challenges. Rijeka: InTech, p. 31-51.

De Bortoli SA, Vacari AM, Goulart RM, Santos RF, Volpe HXL, Ferraudo AS (2011) Capacidade reprodutiva e preferência da traça-das-crucíferas para diferentes brassicáceas. **Horticultura Brasileira** 29(2):187-192.

De Bortoli SA, Vacari AM, Lemes AAF, De Bortoli CP, Ramalho DG, Vieira NF, Santos RF (2017b) Produção de insetos e o controle biológico aplicado. In: Castilho RC, Barilli DR, Truzzi CC (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola – X.** Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 78-80.

De Bortoli SA, Vacari AM, Magalhães GO, Dibelli W, De Bortoli CP, Alves MP (2012) Subdosages of *Bacillus thuringiensis* on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Caatinga** 25(2):50-57.

De Bortoli SA, Vacari AM, Polanczyk RA, Veiga ACP, Goulart RM (2017a) Effect of *Bacillus thuringiensis* on parasitoids and predators. In: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: characterization and use in the field of biocontrol.** Basel: Springer, p. 67-78.

De Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics** 17:193–199.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review Entomology** 52:81-106.

Dias DGS, Soares CMS, Monnerat RG (2004) Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira** 22(3):553-556.

Dilawari VK, Khanna V, Gupta VK, Dhaliwal HS, Dhaliwal GS (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin proteins from HD-1 and HD-73 strains against *Plutella xylostella* (L.). **Allelopathy Journal** 3:491–496.

Ferré J, van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 47:501-533.

Figueiredo CS, Lemes ARN, Sebastião I, Desidério JA (2019) Synergism of the *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2, and Vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control **Applied Biochemistry and Biotechnology** doi:10.1007/s12010-019-02952-z

Filgueira FAR (2008) **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 421 p.

Finney DJ (1971) **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 333 p.

Fiuza LM (2009) Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 38:32–35.

França SM, Breda MO, Barbosa DRS, Araujo AMN, Guedes CA (2017) The sublethal effects of insecticides in insects. In: Shields VDC (Ed.). **Biological control of pest and vector insect**. London: IntechOpen, p. 163-200.

Frost SW (1949) The diamondback moth in Pennsylvania. **Journal of Economic Entomology** 42(4):681-682.

Furlong MJ, Ju KH, Su PW, Chol JK, Il RC, Zalucki MP (2008). Integration of endemic natural enemies and *Bacillus thuringiensis* to manage insect pests of Brassica crops in North Korea. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 125:223–238

Furlong MJ, Shi ZH, Liu YQ, Guo SJ, Lu YB, Liu SS, Zalucki MP (2004). Experimental analysis of the influence of pest management practice on the efficacy of an endemic arthropod natural enemy complex of the diamondback moth. **Journal of Economic Entomology** 97:1814–1827.

Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM (2013) Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects **Annual Review of Entomology** 58:517–541.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002) **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p.

Golizadeh A, Kamali K, Fathipour Y, Abbasipour H (2009) Life table of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Plutellidae) on five cultivated brassicaceous host plants. **Journal of Agricultural Science and Technology** 11:115-124.

Gómez I, Rodríguez-Chamorro DE, Flores-Ramírez G, Grande R, Zúñiga F, Portugal FJ, Sánchez J, Pacheco S, Bravo A, Soberón M (2018) *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) aminopeptidase N1 is a functional receptor of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin. **Applied and Environmental Microbiology** 84(17):1-11.

Groeters FR, Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW (1993) Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 86(4):1035–1039.

Groeters FR, Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW (1994) Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution** 48:197-201.

Grzywacz D, Rossbachb A, Rauf A, Russel, DA, Srinivasane R, Shelton AM (2010) Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. **Crop Protection** 29:68-79.

Guedes RNC, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70(5):690-697.

Gupta BL, Dow JAT, Hall TA, Harvey WR (1985) Electron probe x-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K<sup>+</sup>-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, in vitro. **Journal of Cell Science** 74:137-152.

Habib MEM, Andrade CES (1998) Bactérias entomopatogênicas. In: Alves SB (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 383-446.

Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews** 53(2):242-255.

Holtz MA, Rondelli VM, Celestino FN, Besteste LR, Carvalho JR (2015) **Pragas das brássicas**. Colatina: IFES, 230 p

Hong CP, Kwon SJ, Kim JS, Yang TJ, Park BS, Lim YP (2008) Progress in understanding and sequencing the genome of *Brassica rapa*. **International Journal of Plant Genomics** 1:1-9.

Ibargutxi MA, Muñoz D, Escudero IRDE, Caballero P (2008) Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). **Biological Control** 47:89–96.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. **Anuários**: banco de dados. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

Imenes SDL, Campos TB, Rodrigues Netto SM, Bergmann EC (2002) 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** 69(1):81-84.

Jakka SR, Ferré J, Jurat-Fuentes JL (2015) Cry toxin binding sites and their use in strategies to delay resistance evolution In: M Soberón, Y Gao, A Bravo (Eds.) **Bt**

**resistance** - characterization and strategies for gm crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Wallingford: CAB International, p. 138-149.

Jisha KC, Vijayakumari K, Puthur JT (2013) Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum** 35:1381-1396.

Jurat-Fuentes JL, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5–10.

Jurat-Fuentes JL, Jackson TA (2012) Bacterial entomopathogens. In: Kaya H, Vera FE, Kaya HK (Eds.). **Insect Pathology**. London: Academic Press, p. 268-349.

Karim S, Dean DH (2000) Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. **Current Microbiology** 41:276–283.

Karim S, Riazuddin S, Gould F, Dean DH (2000) Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 67:198–216.

Kees F (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1-16.

Kees F (2013) Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 114:76-85.

Krebs CJ (1994) **Ecology**: the experimental analysis of distribution and abundance New York: Harper Collins, 800 p.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1-41.

Laurentis VL (2013) **Variabilidade populacional de *Plutella xylostella* (L, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e suscetibilidade a *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Li J, Carroll J, Ellar DJ (1991) Crystal structure of insecticidal delta–endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 25 Å resolution. **Nature** 353(6347):815–821.

Li Z, Feng X, Liu SS, You M, Furlong MJ (2016) Biology, Ecology, and Management of the Diamondback Moth in China. **Annual Review of Entomology** 61:277-296.

Li Z-Y, Zalucki MP, Bao H-L, Chen H-Y, Hu Z-D, Feng X (2012) Population dynamics and outbreaks of diamondback moth, *Plutella xylostella*, in Guangdong Province, China: climate or the failure of management? **Journal of Economic Entomology** 105:739–752

Liu SS, Li YH, Lou YG (2006) Non-host plant extracts reduce oviposition of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and enhance parasitism by its parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae). **Bulletin of Entomological Research** 96:373–378.

López-Pazos SA, Arias ACR, Ospina SA, Cerón J (2010) Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. **FEMS Microbiology Letters** 302:93-98.

Maia AHN, Luiz AJB, Campanhola C (2000) Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects **Journal of Economic Entomology** 93(2):511-518.

**MAPA/AGROFIT**. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 jun. 2019

Marchioro CA, Foerster LA (2011) Development and survival of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Yponomeutidae) as a function of temperature: effect on the number of generations in tropical and subtropical regions. **Neotropical Entomology** 40(5):533-541.

Masson L, Prefontaine G, Peloquin L, Lau PCK, Brousseau R (1989) Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. **Journal of Biochemistry** 269:507–512.

Mazlan N, Mumford J (2005) Insecticide use in cabbage pest management in the Cameron Highlands, Malaysia. **Crop Protection** 24:31–39.

Mcgaughey WH (1985) Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science** 229:193–195.

Medeiros PT, Dias JMCS, Monnerat RG, Souza NR (2003) **Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 4 p. (Circular técnica, 29)

Medeiros RS, Ramalho FS, Lemos WP, Zanuncio JC (2000) Age-dependent fecundity and life fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het, Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology** 124:319-324.

Michereff MFF, Vilela EF, Michereff Filho M, Mafra Neto A (2000) Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35(10):1919-1926.

Michereff MFF, Vilela EF, Michereff Filho M, Mafra Neto A (2000) Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35(10):1919-1926.

Monnerat R, Masson L, Brousseau R, Pusztai-Carey M, Bordat D, Frutos R (1999) Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella* **Current Microbiology** 39:159-162.

Monnerat RG (1995) **Interrelations entre la teigne des crucifères, *Plutella xylostella*, son parasitoïde *Diadegma* sp. et la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* Berliner.** 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier.

Monnerat RG, Bravo A (2000) Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo IS, Azevedo JL (Eds.). **Controle Biológico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 163-200.

Monnerat RG, Praça LB (2006) *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: Oliveira-Filho EC, Monnerat RG (Eds.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** Planaltina: Embrapa, p. 121-155.

Moriuti S (1986) Taxonomic notes on the diamondback moth In: Diamondback Moth Management. Proceedings of the First International Workshop, Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan, p. 83-88.

Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure** 9:409-417.

Nikolov LA, Shushkov P, Nevado B, Gan X, Al-Shehbaz IA, Filatov D, Bailey CD, Tsiantis M (2019) Resolving the backbone of the Brassicaceae phylogeny for investigating trait diversity. **New Phytologist** 1:1-14.

Philips CR, Fu Z, Kuhar TP, Shelton AM, Cordero RJ (2014) Natural history, ecology, and management of Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), with emphasis on the United States. **Journal of Integrated Pest Management** 5:1-11.

Polanczyk RA, Alves SB (2005) Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Scientia Agricola** 62(5):464-468.

Polanczyk RA, Alves, SB (2003) *Bacillus thuringiensis* - uma breve revisão **Agrociência** 7(2):1-10.

Praça LB, Martins ÉS, Melatti VM, Monnerat, RG (2007) ***Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae):** aspectos gerais, modo de ação e utilização. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 40 p (Documentos, 239).

Rabinovitch L, Vivoni AM, Machado V, Knaak N, Berlitz DL, Polanczyk RA, Fiuza LM (2017) *Bacillus thuringiensis* characterization: morphology, physiology, biochemistry, pathotype, cellular, and molecular aspects. In: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*:** characterization and use in the field of biocontrol. Basel: Springer, p. 1-18.

Ramachandran S, Buntin GD, All JN, Tabashnik BE, Raymer PL, Adang MJ, Pulliam DA, Stewart CN (1998) Survival, development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology** 91(6):1239–1244.

Raymond B (2017) The biology, ecology and taxonomy of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. In: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***: characterization and use in the field of biocontrol. Basel: Springer, p. 18-40.

Robertson JL, Preisler HK, Ng SS, Hickie LA, Gelernter WD (1995) Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides **Journal of Economic Entomology** 88:1–10.

Roush RT, Miller GL (1986) Considerations for design of insecticide resistance monitoring. **Journal of Economic Entomology** 79:293–298.

Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D, Legal L (2007) SSRPCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 3:240-250.

Samec D, Salopek-Sondi B (2019) Cruciferous (Brassicaceae) vegetables. In: Nabavi, SM, Silva, AS (Eds.). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Gurgaon: Elsevier, p. 195–202.

Santos NA (2018) ***Xylocoris sordidus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae): possível agente de controle biológico aplicado** 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) – USP, Ribeirão Preto.

Santos VC, Siqueira HAA, Silva JE, Farias MJDC (2011) Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology** 40(2) 264-270.

Sarfraz M, Keddie AB, Dossdall LM (2005) Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a review. **Biocontrol Science and Technology** 15:763–789.

SAS Institute (2015) **SAS/IML® 141 User's Guide** Cary, NC: SAS Institute Inc.

Sayyed AH, Moores G, Crickmore N, Wright DJ (2008) Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth **Pest Management Science** 64:813-819.

Schnepf HE, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62(3):775–806.

Shelton AM, Badenes-Perez E (2006) Concepts and applications of trap cropping in pest management. **Annual Review of Entomology** 51:285–308.

Shelton AM, Gujar GT, Chen M, Rauf A, Srinivasan R, Kalia V, Mittal A, Kumari A, Ramesh K, Borkakatti R, Zhao JZ, Endersby N, Russell D, Wu YD, Uijtewaal B (2009) Assessing the susceptibility of cruciferous Lepidoptera to Cry1Ca2 and Cry1Ca4 for future transgenic cruciferous vegetables **Journal of Economic Entomology** 102:2217-2223.

Silva GS, Bernardes Filho AC, Barbosa JC, Alves AU (2011) Espaçamentos entrelinhas e entre plantas no crescimento e na produção de repolho roxo. **Bragantia** 70(3):538-543.

Silveira Neto S, Nakano O, Bardin D, Vila Nova NA (Eds.) (1976) **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Editora Ceres, 420 p.

Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A (2013) Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides** 41:87–93.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 39:47–79.

Tabashnik BE, Carriere Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 35:926-935.

Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 83:1671-1676.

Tabashnik BE, Finson N, Groeters FR, Moar WJ, Johnson MW, Luo K, Adang MJ (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 91:4120–4124.

Tabashnik BE, Groeters FR, Finson N, Liu YB, Johnson MW, Heckel DG, Luo K, Adang MJ (1996) Resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*: the moth heard round the world. In: Brown TM (Ed.) **Molecular genetics and evolution of pesticide resistance**. Washington: ACS Symposium Series, p. 130–140.

Tabashnik BE, Liu YB, Malvar T, Heckel DG, Masson L, Ferre J (1998) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 353:1751–1756.

Tabashnik BE, van Rensburg JB, Carrière Y (2009) Field-evolved insect resistance to bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology** 102:2011-2025.

Talekar NS, Shelton AM (1993) Biology, ecology, and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology** 38:275–301.



Tang JD, Shelton AM, van Rie J, De Rocks S, Moar WJ, Roush RT, Peferoen M (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth. **Applied and Environmental Microbiology** 62:564- 569.

Thuler RT (2009) Criação de *Plutella xylostella*. In: De Bortoli SA (Ed.). **Criação de insetos: da base a biofábrica**. Jaboticabal: edição própria, p. 58-68.

Vacari AM (2009) **Caracterização biológico-comportamental de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) predando *Plutella xylostella* (L, 1758)**. 102 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

van Frankenhuyzen K (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: Entwistle P, Cory J, Bailey M, Higgs S (Eds.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: Wiley, p.1–35.

van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1-16.

van Rie J, Ferré J (2002) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **Annual Review of Entomology** 47:501–33.

Viana CLTP, De Bortoli SA, Thuler RT, Goulart RM, Thuler AMG, Lemos MVF, Ferraudo AS (2009). Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica** 37(1):22-31.

Villas Bôas GL, Castelo Branco M, Medeiros MA, Monnerat RG, França FH (2004) Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a população natural de parasitoides. **Horticultura Brasileira** 22(4):696-699.

Walters FS, Stacy CM, Lee MK, Palekar N, Chen JS (2008) An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against Western corn rootworm larvae. **Applied and Environmental Microbiology** 74:367-374.

Wang X, Wang J, Cao X, Wang F, Yang Y, Wu S, Wu Y (2018) Long-term monitoring and characterization of resistance to chlorfenapyr in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China. **Pest Management Science** doi:10.1002/ps.5222

Wei J, Zhang Y, An S (2019) The progress in insect cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** e21547 doi:10.1002/arch.21547.

Zago HB, Siqueira HA, Pereira EJ, Picanço MC, Barros R (2014) Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. **Pest Management Science** 70:488-495.

Zalucki MP, Furlong MJ (2011) Predicting outbreaks of a migratory pest: An analysis of DBM distribution and abundance revisited. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MANAGEMENT OF THE DIAMONDBACK MOTH AND OTHER CRUCIFER INSECT PESTS **Conference Paper...** Nakhon Pathom, Thailand: AVRDC: The World Vegetable Centre, p. 8-14.

Zalucki MP, Shabbir A, Silva R, Adamson D, Shu-Sheng L, Furlong MJ (2012) Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? **Journal of Economic Entomology** 105(3):1115–1129.

Zalunin IA, Elpidina EN, Oppert B (2015) The role of proteolysis in the biological activity of Bt insecticidal crystal proteins. In: Soberón M, Gao Y, Bravo A (Eds.). **Bt resistance** - characterization and strategies for gm crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Wallingford: CAB International, p 107-118.

Zhang MY, Lovgren A, Lauden R (1995) Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured *Spodoptera* and *Drosophila* cells. **Journal of Invertebrate Pathology** 66:4651.

Zhu X, Lei Y, Yang Y, Baxter SW, Li J, Wu Q, Zhang Y (2014) Construction and characterisation of near-isogenic *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) strains resistant to Cry1Ac toxin. **Pest Management Science** 71:225–233.