

Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner new strains against *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

Cácia Leila Tigre Pereira VIANA¹, Sergio Antonio DE BORTOLI¹, Robson Thomaz THULER¹, Roberto Marchi GOULART¹, Ana Maria Guidelli THULER², Manoel Victor Franco LEMOS², Antonio Sergio FERRAUDO³

¹ Departamento de Fitossanidade, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. caciati@bol.com.br (autora correspondente)

¹ Departamento de Fitossanidade, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. bortoli@fcav.unesp.br

¹ Departamento de Fitossanidade, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. rthuler@hotmail.com

¹ Departamento de Fitossanidade, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. rm_goulart@yahoo.com

² Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. guidelli@fcav.unesp.br

² Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900. mvictor@fcav.unesp.br

³ Departamento de Ciências Exatas, UNESP-Campus de Jaboticabal - SP, 14884-900.

ferraudofcav.unesp.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a patogenicidade e a influência de isolados de *Bacillus thuringiensis* nas características biológicas de *Plutella xylostella*. Realizaram-se bioensaios com 58 isolados, um controle positivo com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, um controle negativo com *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e utilizou-se água com espalhante adesivo, como testemunha. Suspensões dessas bactérias foram pulverizadas em discos de couve e os mesmos fornecidos a lagartas de 2^o instar de *P. xylostella* para alimentação, em condição de confinamento em placas de Petri. Dos isolados estudados 11 causaram mortalidade total das lagartas, e os demais influenciaram negativamente no ciclo biológico da praga, sendo classificados nos grupos A (A1, A2 e A3) e B (B1 e B2), respectivamente, em função da maior ação sobre as principais características biológicas da praga. Dentre as características avaliadas, mortalidade larval e pupal, bem como a duração larval foram as mais relevantes para se determinar quais isolados que influenciaram na biologia de *P. xylostella*. Dessa forma, os isolados T3A.140, T3A.259, T08.024, E1, E26, 2.7L, 1.7L, E22, 22.7L, E2 e 49.19A causaram 100% de mortalidade larval e têm maior potencial para formulação de um produto comercial, além dos isolados que foram classificados no grupo A, que também podem ser utilizados em programas de manejo integrado de *P. xylostella*, em culturas de brássicas.

Palavras-chave adicionais: traça-das-crucíferas; entomopatógenos; brássicas; resistência.

Abstract

Viewing to study the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* strains on biological characteristics of *P. xylostella*, bioassays were made in which 58 strains of *B. thuringiensis*, a positive control with the strains HD1 from *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, a negative control with *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Coleopteran specific) were evaluated. Water with an adhesive spreader (Tween20[®]) was used as a standard check. Bacterial suspensions were sprayed on leaf disks of kale and later supplied to 2nd instar caterpillars of *P. xylostella* for food consumption in confined condition using disposable Petri dishes. Total mortality of caterpillars was observed in 11 of the evaluated strains and the remainder affected negatively pest biological lifecycle, being classified in groups A (A1, A2 e A3) and B (B1 e B2), respectively, in relation to the most harmful action over main biological characteristics of *P. xylostella*. Larve, pupae mortality and period of the larve period were more relevants parameters to determine which isolates affected most *P. xylostella* biology. It was thus verified that the isolates T3A.140, T3A.259, T08.024, E1, E26, 2.7L, 1.7L, E22, and 22.7L, caused 100 % larval mortality and are so thought to have the highest potential for development as commercial bioinsecticides. The strains which were classified in group A could be also used in integrated pest management programs of *P. xylostella*, in Brassicaceae crops.

Additional Keywords: diamondback moth; entomopatogenous; brassica; resistance.

Introdução

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada a praga mais importante das plantas da família Brassicaceae, no Brasil e no mundo (TALEKAR & SHELTON, 1993; CASTELO BRANCO et al., 2001; DIAS et al., 2002). Os danos por ela causados acarretam a depreciação do produto, o atraso no crescimento da planta e mesmo sua morte (MONNERAT et al., 2004). Algumas das dificuldades observadas no controle desta praga devem-se à coexistência de áreas de cultivo com idades diferentes, durante todo o ano, proporcionando à praga quantidade abundante e contínua de alimento (IMENES et al., 2002).

Para contornar os danos causados pela traça, o método de controle mais utilizado ainda é o químico, por ser considerado rápido e eficiente na redução populacional dessa praga (CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002; DIAS et al., 2004). No entanto, tal prática não tem apresentado bons resultados ao longo dos anos, uma vez que, em alguns casos, aplicações de inseticidas, em até três vezes semanais, não reduziram os danos da traça (CASTELO BRANCO et al., 2001).

O método químico utilizado desordenadamente tem conduzido à seleção de populações resistentes, e seu uso contínuo, em grandes quantidades, tem causado danos ao ambiente e intoxicação ao homem (CHEN et al., 1996; SOUZA & REIS, 1986).

Agentes entomopatogênicos destacam-se como uma alternativa para o controle mais eficaz e racional dessa praga, sendo que, dentre esses agentes, um dos mais estudados e utilizados é o *Bacillus thuringiensis* Berliner. Trata-se de uma bactéria que pode ser encontrada em diferentes regiões do mundo em diversos substratos, como no solo, na água, em insetos mortos e em algumas plantas (MONNERAT & BRAVO, 2000; KRYWUNCZYK & FAST, 1980).

B. thuringiensis é uma bactéria que sintetiza inclusões proteicas cristalinas na fase de esporulação, chamadas de cristais, que são formadas por δ -endotoxinas, ou proteínas Cry que apresentam ação extremamente tóxica a diversas ordens de insetos, principalmente no controle de insetos-praga da ordem Lepidoptera (MONNERAT & BRAVO, 2000; MEDEIROS, et al., 2005).

A grande vantagem do emprego desse microrganismo é sua ação restrita aos insetos-alvo, não afetando o ser humano e não danificando o ambiente (BATISTA et al., 2005). Produtos à base dessa bactéria são comercializados há mais de 50 anos e representam, atualmente, mais de 90% do mercado de produtos biológicos

para o controle de pragas (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

Apesar de a eficiência do *B. thuringiensis* ser comprovada para diversas pragas de diferentes ordens, tem sido relatada a seleção de populações resistentes a esta bactéria em todo o mundo, com destaque para *P. xylostella*, cuja resistência foi observada por ZHAO et al. (1993), TABASHNIK (1994), PEREZ & SHELTON (1997) e WRIGHT et al. (1997) em populações dos USA (Flórida, Hawaii e New York), América Central (Costa Rica, Guatemala, Honduras e Nicarágua) e Ásia (Japão, Malásia). No Brasil, CASTELO BRANCO et al. (2003) observaram resistência desta praga em populações provenientes de ambientes onde é comum o uso de *B. thuringiensis* e onde não se usava o entomopatógeno como bioinseticida.

Tem sido recomendado para o manejo da resistência de *P. xylostella*, além do controle com formulações à base de *B. thuringiensis*, o uso de outras táticas biológicas de controle, como os semioquímicos, visando à redução dos riscos de resistência, devido ao menor número de aplicações do bioinseticida, por estação (MAXWELL et al., 2006).

Cerca de 50.000 isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e atualmente diversos estudos de laboratório no mundo inteiro destinam-se à descoberta de isolados que possuam novas toxinas eficientes no controle de pragas (MONNERAT; BRAVO, 2000). Além da patogenicidade e virulência contra insetos-praga, são necessárias pesquisas para avaliar outros efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes. Embora difíceis de se detectar, tais efeitos certamente ocorrem e representam um importante parâmetro que auxilia na avaliação da atividade tóxica de *B. thuringiensis* (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Tendo em vista os problemas de resistência apresentados por *P. xylostella*, objetivou-se, com este trabalho, selecionar isolados de *B. thuringiensis* patogênicos às lagartas e estudar a influência no ciclo biológico desta praga.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) e no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da UNESP-Câmpus de Jaboticabal - SP.

Os isolados de *B. thuringiensis* utilizados nesta pesquisa foram obtidos do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos pertencentes à coleção do LGBBA, sendo que parte dos isolados é proveniente da coleção do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos de Piracicaba - SP e da coleção do

Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo de Sete Lagoas - MG. Estes isolados são mantidos em estoque em fitas de papel-filtro, que foram impregnadas com suspensões de esporos e mantidas a 28 °C em câmara climatizada, no LGBBA.

Para o preparo da suspensão esporos/cristais, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo a linhagem-padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD-1 (Lepidóptera-específico) e a linhagem-padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Coleóptera-específico), foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura “Nutrient Agar” NA (extrato de carne 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L e Ágar 15 g/L) e incubados a 30 °C, durante 5 dias, permitindo assim completa esporulação e liberação de cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido com auxílio de alça de platina para tubo Falcon contendo 10 mL de água Milli-Q autoclavada e 0,05% de Tween 20 (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex, e a partir desta foram feitas duas suspensões seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A suspensão seriada 10^{-2} foi utilizada para contagem de esporos e quantificação por mL de suspensão, que foi realizada por meio da leitura em câmara de Neubauer (ALVES & MORAES 1998) para padronização a uma concentração de 3×10^8 esporos/mL, constituindo a suspensão testada no bioensaio.

As lagartas de *P. xylostella* utilizadas foram obtidas da criação-estoque do LBCI, onde foram realizados os bioensaios. A couve (*Brassica oleracea acephala* var. Manteiga) para o experimento foi a mesma utilizada para a manutenção da criação da traça, sendo cultivada na área experimental do Câmpus. Para cada isolado, foram utilizados 5 discos de couve com diâmetro de 8 cm, que foram pulverizados com volume de 0,5 mL da suspensão por face do disco. A pulverização foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura do tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25 lbf/pol², sob capela de exaustão. Também se realizou uma testemunha pulverizando água com Tween.

Após a secagem por duas horas, em condição ambiente, os discos foram colocados em placas de Petri, sobre papel-filtro levemente umedecido com água. Sobre os discos foliares, colocaram-se 12 lagartas de *P. xylostella* de segundo instar para alimentação e, após 24 horas, iniciaram-se as avaliações. Para as lagartas que não morreram rapidamente, foi feito o acompanhamento da fase larval até a fase pupal. As pupas foram pesadas individualmente e colocadas em placas plásticas, tipo ELISA®, para o acompanhamento até a emergência dos adultos e determinação da razão sexual, através da

razão do número de fêmeas pelo número total de adultos. A diferenciação do sexo foi realizada por meio da coloração e do tamanho dos adultos, em que as fêmeas são mais claras e maiores, e os machos são escuros e menores; também foi observada a morfologia da região final do abdome, porque os machos apresentam uma fenda, e as fêmeas não.

As placas com os tratamentos foram mantidas em sala climatizada sob temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Avaliaram-se a mortalidade e a duração do período larval e pupal, o peso de pupas e a razão sexual. Para os dados obtidos, foi feita uma análise exploratória dos dados (Multivariada), aplicando-se a análise de agrupamento (AA) e a análise das componentes principais (ACP), utilizando o programa computacional “STATISTICA 6.0 version”.

Resultados e Discussão

Entre os 58 isolados testados em lagartas de *P. xylostella*, 11 causaram 100% de mortalidade dentro de 24 - 48 horas: T3A.140, T3A.259, T08.024, E1, E26, 2.7L, 1.7L, E22, 22.7L, 49.19A e E2, que apresentaram alto potencial para controle desta praga, com grande possibilidade para utilização em novas formulações. Estudos realizados por MEDEIROS et al. (2005) também relataram novos isolados que causaram 100% de mortalidade das lagartas de *P. xylostella*. Pesquisas para selecionar isolados com potencial de controle para lepidópteros-praga são extremamente viáveis e necessárias, incrementando os processos biotecnológicos na produção de bioformulados a serem utilizados em programas de manejo da praga, particularmente das raças resistentes.

O controle positivo feito com a linhagem-padrão, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* também causou 100% de mortalidade, mostrando que a população testada é suscetível a esta linhagem.

Para os isolados que não causaram 100% de mortalidade, foi estudada a influência sobre o ciclo biológico da praga e seu comportamento, quando em contato com o substrato alimentar contaminado com suspensão desses diferentes isolados. Observou-se, ainda, a sintomatologia ocorrida com as lagartas. Os sintomas observados foram perda do apetite e abandono do alimento, diminuição dos movimentos até a paralisação, corpo flácido, perda de agilidade e movimentos vagarosos, sem reação ao toque, como na lagarta sadia. A coloração do tegumento mudou de verde brilhante para amarelo-escuro a marrom-escuro, sem brilho. Nesta fase, a consistência dos excrementos apresentou-se aquosa. Estes sintomas foram observados tanto

para os isolados que causaram alta mortalidade, como também para aqueles que influenciaram negativamente na biologia da praga.

HABIB & ANDRADE (1998) citam que a perda do apetite e o abandono do alimento são os primeiros sinais da bacteriose, seguidos de regurgitações e diarreia, perda de brilho do tegumento que fica com tonalidades de cor marrom-escuro e perda da agilidade das lagartas. Em estágios mais avançados, a lagarta torna-se flácida e para totalmente de se movimentar. Estes aspectos da sintomatologia foram observados por diversos autores desde 1959, em lagartas, cujos resultados são concordantes com este trabalho (HEIMPEL & ANGUS, 1959; SILVA & CARVALHO, 2004).

Os isolados estudados que ocasionaram baixa mortalidade, ou seja, não causaram 100% de mortalidade, influenciaram diretamente na biologia do inseto, interferindo desde a fase larval até o peso de pupas (Tabelas 1, 2 e 3). RAMOS et al. (2004) trabalharam com isolados de *B. thuringiensis* contra lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e observaram que a maior parte deles apresentou efeito negativo no crescimento das lagartas, interferindo nas etapas da metamorfose. Essa influência que a bactéria pode causar no ciclo biológico do inseto, prejudicando a viabilidade das populações, também se torna uma característica muito importante a ser utilizada para o controle das pragas (IBARRA & LÓPEZ-MEZA, 1997).

Através da Análise Multivariada de Agrupamento (AA), pode-se observar que os isolados 45.7L, 24.7L, 12.7L, E15, 32.7L, 15.7L, 37.7L, 100.27A, 27.7L, 11.7L, 29.7L, 19.7L, E40, 38.7L, 153.30A, 97.27A e 48.1A foram agrupados com a testemunha e o controle negativo (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*) (Figura 1, grupo B), sendo estes os que proporcionaram baixa influência na biologia da praga, permitindo que o inseto completasse o ciclo biológico.

Os demais isolados ficaram em outro grupo (Figura 1, grupo A), dos que influenciaram negativamente de forma acentuada nas características biológicas da praga, provocando maior duração do ciclo com baixo peso de pupas, ou seja, apesar de as lagartas viverem mais, os isolados reduziram ou mesmo impediram a continuação de sua alimentação, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 3, quando os menores pesos de pupas estão associados com a maior duração larval. Nessas condições, pode haver maior exposição das lagartas a outros inimigos naturais, bem como geração de adultos menos viáveis. DEQUECH et al. (2005) fizeram um estudo de laboratório da interação entre o parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead, 1890) (Hymenoptera: Ichneumonidae) com o patógeno

B. thuringiensis aizawai no hospedeiro natural *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e observaram que esta interação implicou maior mortalidade de lagartas e não influenciou nas características biológicas do parasitoide e na sua descendência. Resultados semelhantes foram observados por alguns autores como ULPAH & KOK (1996), BLUMBERG et al. (1997) e MONNERAT & BORDAT (1998).

Na Figura 1, pode ser observado também que os isolados mais próximos do eixo "y" foram os que mais influenciaram negativamente nas características biológicas da praga, agrupando-se em menor número, da maior para a menor influência, até os que mais se aproximaram da testemunha, sendo os grupos A1, A2 e A3 dos isolados de maior efeito sobre a praga e os grupos B1 e B2 dos que tiveram menor efeito, respectivamente.

Pela Análise das Componentes Principais (ACP) (Figura 2), é possível verificar as características biológicas que mais influenciaram nos resultados, para que os isolados de *B. thuringiensis* fossem classificados em graus de efeito na população de *P. xylostella* testada. Nessa análise, os isolados localizados em direção às extremidades apontadas pelos vetores plotados foram os que mais sofreram influência nas características indicadas pelas siglas ML (mortalidade larval), MP (mortalidade pupal), DL (duração larval), RS (razão sexual), DP (duração pupal) e PESO (peso de pupas).

Os vetores localizados à direita, nos quadrantes positivos (Figura 2), indicam maior influência das características ML, MP e DL, agrupando os mesmos isolados que se destacaram no grupo A (Figura 1). Os isolados do lado esquerdo, nos quadrantes negativos (Figura 2), foram influenciados principalmente pelo alto peso de pupa (PESO), pela RS e DP, agrupando-se os isolados com a testemunha e o controle negativo (Figura 2), como na AA (Figura 1, grupo B).

Os isolados localizados próximos ao vetor DL da Figura 2 promoveram maior duração do período larval e, conseqüentemente, menor peso, como se pode constatar pelo direcionamento contrário do vetor peso, junto ao qual estão agrupados os isolados de menor influência no ciclo biológico do inseto e, por conseqüência, os que menos influenciaram no peso de pupas.

Os estudos dos efeitos subletais do patógeno podem revolucionar a concepção de eficiência de controle para o *B. thuringiensis*, uma vez que os insetos sobreviventes dos isolados que não causaram 100% de mortalidade, podem ter seu desenvolvimento biológico afetado de forma a torná-los incapazes de causar dano econômico às plantas. No entanto, se este efeito não for considerado, pulverizações desnecessárias de inseticidas poderão acontecer, o

que resultará na elevação do custo/produção e maior contaminação ambiental (POLANCZYK & ALVES, 2003). Além disso, é importante ressaltar que os insetos que não morreram imediatamente, ficam expostos à ação de inimigos naturais, favorecendo o controle biológico natural.

Tabela 1- Médias (\pm DP) da duração e mortalidade larval de *Plutella xylostella* alimentadas com folhas de couve cv. Manteiga tratadas e não tratadas com isolados de *Bacillus thuringiensis*. Mean (\pm SE) values of the life period and mortality of *Plutella xylostella* larvae fed on leaves of collard greens cv. Manteiga treated and not treated with strains of *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	Duração Larval (dias)	Mortalidade Larval (%)
Testemunha	8,48 \pm 0,43	7,96 \pm 3,39
<i>B. t. var. tenebrionis</i>	8,96 \pm 0,23	35,00 \pm 9,13
T20.002	8,08 \pm 0,74	68,33 \pm 25,95
T07.196	8,00 \pm 0,71	88,33 \pm 9,50
153.30A	7,82 \pm 0,95	38,33 \pm 20,92
48.1A	7,96 \pm 0,60	15,00 \pm 3,73
83.26A	8,46 \pm 0,42	66,67 \pm 22,05
100.27A	8,66 \pm 0,70	26,67 \pm 19,00
97.27A	7,68 \pm 0,31	10,00 \pm 10,87
E28	8,88 \pm 0,28	56,67 \pm 13,70
E41	8,72 \pm 0,18	30,00 \pm 7,45
E42	9,32 \pm 0,18	41,67 \pm 27,64
E40	8,54 \pm 0,23	40,00 \pm 14,91
E20	8,46 \pm 0,32	18,33 \pm 6,97
E43	9,46 \pm 0,32	53,33 \pm 15,14
E15	9,60 \pm 0,51	23,33 \pm 16,03
E7	9,18 \pm 0,58	48,33 \pm 12,36
E39	9,04 \pm 0,36	38,33 \pm 13,94
E49	9,56 \pm 0,18	58,33 \pm 15,59
E48	9,52 \pm 0,41	61,87 \pm 20,98
20.7L	9,54 \pm 0,30	73,33 \pm 20,75
E50	9,70 \pm 0,19	73,33 \pm 21,57
24.7L	9,52 \pm 0,15	21,67 \pm 11,18
E47	9,34 \pm 0,36	60,00 \pm 9,13
E44	9,16 \pm 0,22	55,00 \pm 25,41
E45	9,46 \pm 0,21	68,33 \pm 6,97
12.7L	9,08 \pm 0,18	31,67 \pm 9,13
11.7L	9,34 \pm 0,42	38,33 \pm 24,72
E46	9,36 \pm 0,50	48,33 \pm 18,07
15.7L	9,24 \pm 0,29	26,67 \pm 6,97
7.7L	9,64 \pm 0,23	43,33 \pm 22,36
19.7L	9,36 \pm 0,25	46,67 \pm 13,95
48.7L	9,68 \pm 0,27	56,67 \pm 12,36
45.7L	8,66 \pm 0,44	43,33 \pm 16,03
27.7L	9,82 \pm 0,30	41,67 \pm 14,44
47.7L	9,08 \pm 0,31	25,00 \pm 22,82
29.7L	9,52 \pm 0,34	26,67 \pm 13,69
43.7L	9,60 \pm 0,16	36,67 \pm 7,46
38.7L	8,98 \pm 0,44	38,33 \pm 20,07
T14.004	9,18 \pm 0,48	60,00 \pm 13,69
32.7L	9,36 \pm 0,46	20,00 \pm 9,50
37.7L	9,08 \pm 0,73	28,33 \pm 19,18
40.7L	9,12 \pm 0,56	48,33 \pm 25,96
44.7L	10,0 \pm 0,00	63,33 \pm 29,23
39.7L	9,98 \pm 0,58	73,33 \pm 16,03
42.7L	10,0 \pm 0,58	65,00 \pm 23,12
41.7L	9,76 \pm 1,12	66,67 \pm 29,46
26.7L	10,28 \pm 0,48	63,34 \pm 19,19
46.7L	9,68 \pm 0,50	53,33 \pm 28,02

Tabela 2 - Médias (\pm DP) da duração e mortalidade pupal de *Plutella xylostella* alimentadas com folhas de couve cv. Manteiga tratadas e não tratadas com isolados de *Bacillus thuringiensis*. Mean (\pm SE) values of pupa life duration and mortality of *Plutella xylostella* fedo on leaves of collard green cultivar Manteiga treated and not treated with *Bacillus thuringiensis* isolates.

Isolados	Duração Pupal (dias)	Mortalidade Pupal (%)
Testemunha (chech)	3,44 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00
<i>B. t. var. tenebrionis</i>	3,86 \pm 0,19	20,20 \pm 13,66
T20.002	2,58 \pm 1,77	60,42 \pm 21,92
T07.196	4,43 \pm 1,34	12,50 \pm 25,00
153.30A	3,40 \pm 0,55	21,96 \pm 18,64
48.1A	3,42 \pm 0,67	22,00 \pm 20,49
83.26A	2,74 \pm 1,58	50,67 \pm 39,61
100.27A	3,28 \pm 0,22	18,47 \pm 13,16
97.27A	3,48 \pm 0,41	9,48 \pm 11,18
E28	3,16 \pm 1,88	53,00 \pm 40,56
E41	3,76 \pm 0,29	50,55 \pm 17,61
E42	3,70 \pm 0,31	44,47 \pm 10,66
E40	3,86 \pm 0,27	18,89 \pm 22,08
E20	3,96 \pm 0,09	27,13 \pm 18,78
E43	3,76 \pm 0,34	47,00 \pm 28,20
E15	3,30 \pm 0,38	47,97 \pm 30,93
E7	3,94 \pm 0,13	54,28 \pm 20,10
E39	3,74 \pm 0,43	50,44 \pm 12,99
E49	2,68 \pm 1,51	51,05 \pm 32,52
E48	3,50 \pm 0,40	14,00 \pm 21,91
20.7L	3,48 \pm 0,05	32,15 \pm 2,36
E50	1,65 \pm 1,91	60,42 \pm 45,83
24.7L	3,58 \pm 0,27	18,89 \pm 19,31
E47	3,20 \pm 0,27	44,00 \pm 19,21
E44	2,10 \pm 1,24	56,17 \pm 40,60
E45	3,26 \pm 0,39	32,33 \pm 11,40
12.7L	2,88 \pm 0,18	36,78 \pm 25,26
11.7L	3,42 \pm 0,39	8,80 \pm 10,23
E46	3,42 \pm 0,62	53,73 \pm 20,01
15.7L	3,30 \pm 0,66	20,67 \pm 10,54
7.7L	2,72 \pm 1,52	55,11 \pm 42,76
19.7L	3,66 \pm 0,40	19,83 \pm 14,24
48.7L	3,06 \pm 0,34	34,11 \pm 25,33
45.7L	3,90 \pm 0,19	0,00 \pm 0,00
27.7L	3,28 \pm 0,26	7,50 \pm 11,18
47.7L	3,94 \pm 0,13	31,61 \pm 24,22
29.7L	3,68 \pm 0,72	20,49 \pm 14,33
43.7L	4,00 \pm 0,00	32,27 \pm 8,71
38.7L	3,90 \pm 0,14	9,44 \pm 12,97
T14.004	3,80 \pm 0,45	48,56 \pm 21,49
32.7L	3,24 \pm 0,74	18,97 \pm 9,35
37.7L	3,24 \pm 0,58	15,66 \pm 15,08
40.7L	3,80 \pm 0,27	29,90 \pm 23,14
44.7L	4,00 \pm 0,00	44,17 \pm 13,16
39.7L	4,00 \pm 0,00	46,25 \pm 20,20
42.7L	4,00 \pm 0,00	47,37 \pm 22,21
41.7L	3,00 \pm 2,00	50,45 \pm 36,19
26.7L	2,88 \pm 1,64	52,39 \pm 36,37
46.7L	3,12 \pm 0,85	55,83 \pm 31,68

Tabela 3 - Médias (\pm DP) da razão sexual e peso de pupas de *Plutella xylostella* alimentadas com folhas de couve cv. Manteiga tratadas e não tratadas com isolados de *Bacillus thuringiensis*. Means (\pm SE) values of the sex ratio and pupae weight of *Plutella xylostella* fed on leaves of collard greens cv. Manteiga treated and not treated strains with isolated of *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	Razão Sexual	Peso de pupas (mg)
Testemunha (check)	0,5 \pm 0,0	5,1 \pm 0,3
<i>B. t. var. tenebrionis</i>	0,5 \pm 0,1	5,3 \pm 0,5
T20.002	0,4 \pm 0,5	4,3 \pm 0,6
T07.196	0,4 \pm 0,5	4,6 \pm 0,6
153.30A	0,5 \pm 0,2	5,4 \pm 0,6
48.1A	0,5 \pm 0,2	4,8 \pm 0,4
83.26A	0,4 \pm 0,4	4,8 \pm 0,5
100.27A	0,6 \pm 0,3	4,9 \pm 0,5
97.27A	0,4 \pm 0,2	5,2 \pm 0,6
E28	0,4 \pm 0,4	4,1 \pm 0,7
E41	0,5 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4
E42	0,4 \pm 0,3	4,0 \pm 0,6
E40	0,5 \pm 0,4	4,8 \pm 0,8
E20	0,5 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2
E43	0,6 \pm 0,4	4,1 \pm 0,3
E15	0,6 \pm 0,2	4,7 \pm 0,7
E7	0,5 \pm 0,4	4,2 \pm 0,6
E39	0,5 \pm 0,4	4,9 \pm 0,4
E49	0,4 \pm 0,4	3,9 \pm 0,7
E48	0,5 \pm 0,2	4,1 \pm 0,5
20.7L	0,5 \pm 0,4	3,6 \pm 2,0
E50	0,4 \pm 0,3	4,1 \pm 0,7
24.7L	0,6 \pm 0,2	5,0 \pm 0,7
E47	0,5 \pm 0,6	3,8 \pm 0,4
E44	0,5 \pm 0,7	4,3 \pm 0,7
E45	0,5 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4
12.7L	0,5 \pm 0,1	5,1 \pm 0,4
11.7L	0,5 \pm 0,4	5,1 \pm 0,7
E46	0,5 \pm 0,4	4,3 \pm 0,7
15.7L	0,5 \pm 0,4	4,8 \pm 0,4
7.7L	0,4 \pm 0,4	5,2 \pm 0,6
19.7L	0,5 \pm 0,2	5,5 \pm 0,4
48.7L	0,4 \pm 0,3	4,1 \pm 0,2
45.7L	0,6 \pm 0,3	4,6 \pm 0,6
27.7L	0,4 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2
47.7L	0,5 \pm 0,4	4,6 \pm 0,2
29.7L	0,5 \pm 0,2	5,7 \pm 0,4
43.7L	0,5 \pm 0,4	4,4 \pm 0,3
38.7L	0,5 \pm 0,2	5,3 \pm 0,2
T14.004	0,4 \pm 0,3	4,8 \pm 0,4
32.7L	0,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,6
37.7L	0,5 \pm 0,2	5,1 \pm 0,8
40.7L	0,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,4
44.7L	0,5 \pm 0,1	3,7 \pm 2,2
39.7L	0,4 \pm 0,4	3,2 \pm 1,8
42.7L	0,6 \pm 0,4	3,5 \pm 2,0
41.7L	0,7 \pm 0,5	3,6 \pm 2,0
26.7L	0,5 \pm 0,4	4,2 \pm 0,3
46.7L	0,3 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3

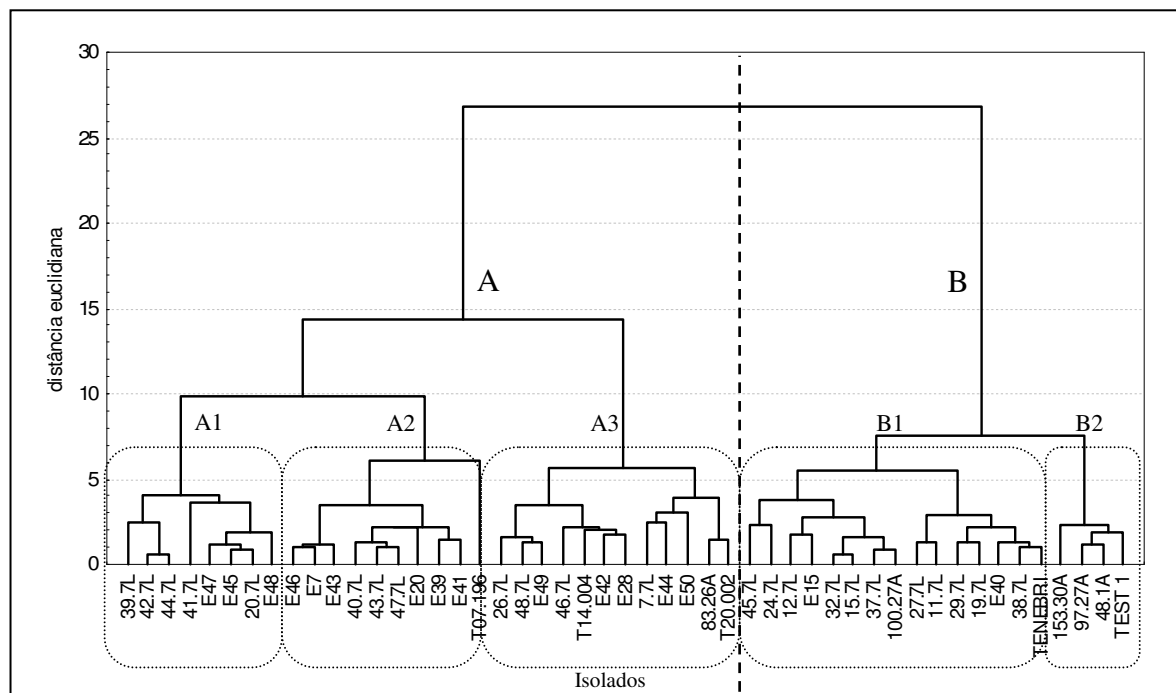


Figura 1 - Dendrograma mostrando a estrutura de grupos resultantes da análise multivariada para ação de isolados de *Bacillus thuringiensis* sobre *Plutella xylostella*. *Dendrograma showing the structure of resulting groups of the analysis multivariate for action of strains of Bacillus thuringiensis on Plutella xylostella.*

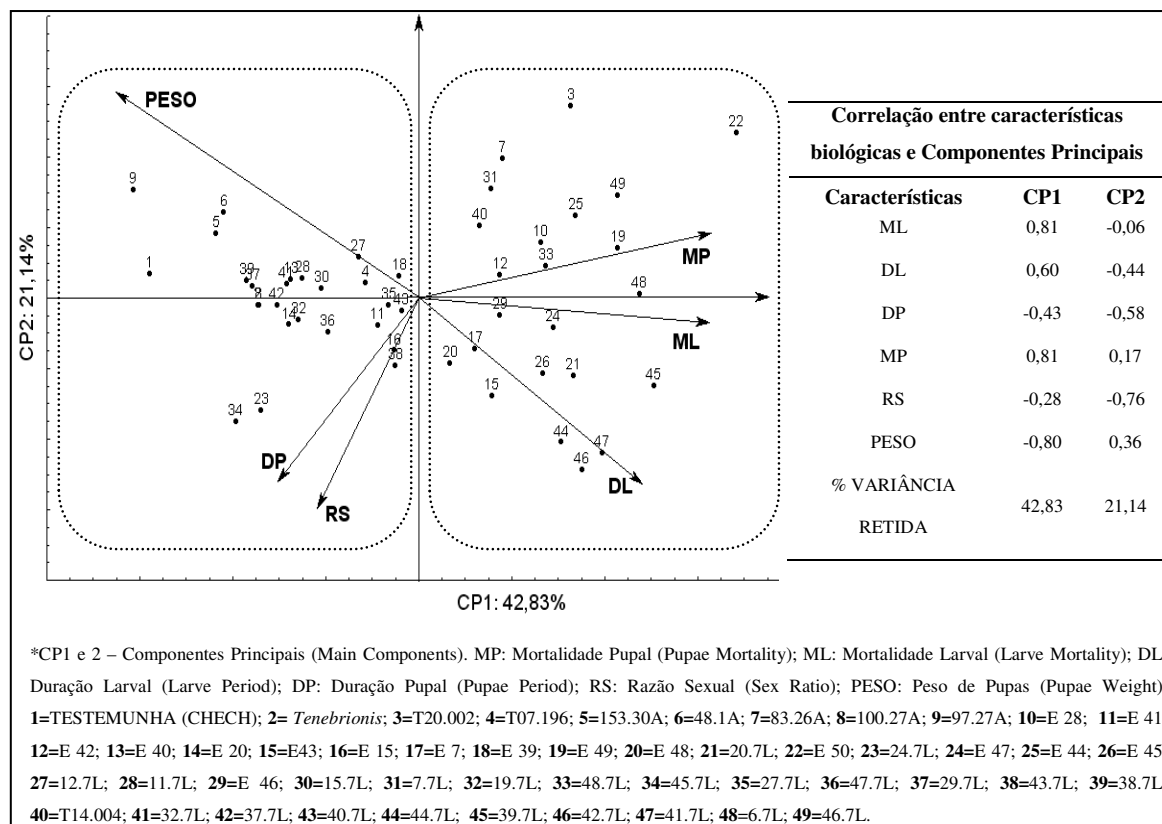


Figura 2 - Distribuição dos isolados de *Bacillus thuringiensis*, segundo a análise de componentes principais de agrupamento, de acordo com as características biológicas avaliadas para *Plutella xylostella*. *Distribution of the strains of Bacillus thuringiensis, according to the analysis of main components of grouping, in agreement with the appraised biological characteristics for Plutella xylostella.*

Conclusões

Os isolados que causaram 100% de mortalidade das lagartas em um curto período de tempo, demonstraram alta patogenicidade para *P. xylostella*; no entanto, é necessária a realização de testes em condições de campo para avaliar melhor a efetividade desses isolados sob a ação dos fatores abióticos de ocorrência natural.

Os demais tiveram influência negativa sobre a biologia de *P. xylostella*, sendo que os do grupo A são os que apresentam potencial para utilização em programas de manejo integrado que não visem apenas à eliminação da praga, mais sim a uma agricultura mais sustentável e racional.

A duração larval, bem como a mortalidade larval e pupal foram as características biológicas mais relevantes para se determinar quais os isolados que mais influenciam na biologia de *P. xylostella*.

Referências

- ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.765-778.
- BATISTA, A.; MELATTI, V.; DEMO, C.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda*** (Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera frugiperda*). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p.19. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81).
- BLUMBERG, D.; NAVON, A.; KEREN, S.; GOLDENBERG, S.; FERKOVICH, S. M. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, p.1.181-1186, 1997.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; MEDEIROS, M. A.; LEAL, J. G. T. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.60-63, 2001.
- CASTELO BRANCO, M.; AMARAL, P. S. T. Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.410-415, 2002.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. T. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.549-552, 2003.
- CHEN, C. C.; CHANG, S. J.; CHENG, L. L.; HOU, R. F. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.120, n.3, p.165-169, 1996.
- DEQUECH, S. T. B.; SILVA, R. F. P. da; FIUZA, L. M. Interação entre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai*, em Laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.6, p.937-944, 2005.
- DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor no Distrito Federal. Brasília: 2002. Comunicado Técnico, 74).
- DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.553-556, 2004.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.
- HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. The site of action of crystalliferous bacteria, in Lepidoptera larvae. **Journal of Insect Pathology**, New York, v.1, p.152-170, 1959.
- IBARRA, J.; LÓPEZ-MESA, J. Desarrollo de resistencia a *Bacillus thuringiensis*. **Agrociência**, Montecillo, v.31, p.121-131, 1997.
- IMENES, S.D.L.; CAMPOS, T. B. de ; RODRIGUES NETTO, S. M.; BERGMANN, E. C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.81-84, 2002.
- KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.36, p.139-140, 1980.
- MAXWELL, E. M.; FADAMIRO, H. Y.; MCLAUGHLIN, J. R. Suppression of *Plutella*

- xylostella* and *Trichoplusia ni* in Cole Crops with Attracticide Formulations. **Journal of Economic Entomology**, Auburn, v.99, n.4, p.6-17, 2006.
- MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A.C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.
- MONNERAT, R. G.; BORDAT, D. Influence of HD1 (*Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki*) on the developmental stages of *Diadegma* sp. (Hym., Ichneumonidae) parasitoid of *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.122, p.49-51, 1998.
- MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-2000.
- MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.607-609, 2004.
- PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. **Journal of Economic Entomology**, Auburn, v.90, p.87-93, 1997.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montecillo, v.7, n.2, p.1-10, 2003.
- RAMOS, F.; CARMONA, A.; BÈRES, M.; MÉNDEZ, M. Evaluación de Aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Bioagro**, Venezuela, v.16, n.3, 183-188, 2004.
- SILVA, L. K. F. da.; CARVALHO, A.G. de. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1909) em lagartas de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.249-252, 2004.
- SOUZA, J. C.; REIS, P. R. Controle da traça-dos-tomateiro em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n.4, p.343-354, 1986.
- TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.
- TALEKAR, N. S.; SHELTON, A. M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.38, p.275-301, 1993.
- ULPAH, S.; KOK, L. T. Interrelationship of *Bacillus thuringiensis* Berliner to the diamondback moth (Lepidoptera: Noctuidae) and its primary parasitoid, *Diadegma insulare*. **Journal Entomology Science**, Ibaraki University, Mito, v.31, p.371-377, 1996.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.201-230.
- WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v.63, p.1814-1819, 1997.
- ZHAO, J. Z.; ZHU, G. R.; ZHU, Z. L.; WANG, W. Z. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in china. **Resistance Pest Management**, Lansing, v.5, p.11-12, 1993.

Recebido em 06-02-2007

Aceito para publicação em 14-12-2008