

## CONTROLE BIOLÓGICO

**Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) a isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner**CÁCIA L.T.P. VIANA<sup>1</sup>, SERGIO A. DE BORTOLI<sup>1</sup>, ELIZABETH C. PEDROSO<sup>1</sup> E ALESSANDRA M. VACARI<sup>1</sup><sup>1</sup> Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n., 14884-900, Jaboticabal-SP. E-mail: [caciat@gmail.com](mailto:caciat@gmail.com), [bortoli@fcav.unesp.br](mailto:bortoli@fcav.unesp.br)*BioAssay 11: ba11001 (2021)*Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) to *Bacillus thuringiensis* Berliner strains

**ABSTRACT** - The objective was to observe the susceptibility of a population of *Plutella xylostella* (L.) maintained for 100 generations in laboratory to strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner. The concentrations  $9 \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4.5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7.5 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $4.5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7.5 \times 10^7$ ,  $9.5 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^8$  e  $3 \times 10^8$  spores/mL were evaluated for the strains: E1, 49.30A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140, T08024, E26, E22 and T07. The strains E26, E22 and T07 did not cause mortality for *P. xylostella* larvae. The *P. xylostella* larvae have a very high susceptibility pattern to the concentrations evaluated for six strains tested (E1, 49.30A, E2, 1.7L, T3A.259 and T3A.140). Only the T08.024 strain allowed the estimation of lethal concentration that kills 50% of the population (2.7 spores/mL).

**KEY WORDS** - Diamondback moth,  $LC_{50}$ , Probit analysis, Insect pathogen.

**RESUMO** - O objetivo foi observar a suscetibilidade da população de *Plutella xylostella* (L.) mantida por mais de 100 gerações em laboratório, a isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner com patogenicidade comprovada para lepidópteros-praga em bioensaios e em análises moleculares. As concentrações  $9 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $4,5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $9,5 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^8$  e  $3 \times 10^8$  esporos/mL foram testadas com os seguintes isolados: E1, 49.30A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140, T08024, E26, E22 e T07. Avaliou-se a mortalidade larval a cada 24 horas. Os isolados E26, E22 e T07 não causaram mortalidade para lagartas de *P. xylostella*. As lagartas de *P. xylostella* apresentaram um padrão de suscetibilidade muito elevado para as concentrações avaliadas para seis isolados testados (E1, 49.30A, E2, 1.7L, T3A.259 e T3A.140). Dentre os isolados avaliados, apenas o isolado T08.024 apresentou dados que permitiram a determinação da concentração letal que mata 50% da população (2,7 esporos/mL).

**PALAVRAS-CHAVE** - Traça-das-crucíferas,  $CL_{50}$ , Análise de Probit, Entomopatógeno.

As diferentes espécies da família Brassicaceae são cultivadas por pequenos e médios agricultores que têm sérios problemas fitossanitários, entre os quais o ataque de insetos, principalmente, lepidópteros como *Ascia monuste orseis* (L.) (Lepidoptera: Pieridae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (Godin & Boivin 1998). *Plutella xylostella* é considerada a principal praga devido ao seu dano, podendo inviabilizar o produto para o comércio. As lagartas de primeiro ínstar possuem o hábito minador no qual entram no parênquima foliar e nos demais ínstars possuem hábito

desfolhador, destruindo a epiderme das folhas (Dickson *et al.* 1990).

A dificuldade de controle desta praga pode estar relacionada com a sobreposição de gerações, disponibilidade de hospedeiros simultaneamente nas áreas (brássicas cultivadas e espécies nativas), ciclo rápido e o mais importante, o aparecimento de populações resistentes ao manejo inadequado das táticas de controle (Kumaraswamia *et al.* 2001, Kwon *et al.* 2004).

A aplicação de formulações a base de *Bacillus thuringiensis* têm sido uma tática promissora para controle de lepidópteros-

praga em diversas culturas de importância agrícola, incluindo *P. xylostella* em brássicas (Monnerat & Bravo 2000, Medeiros *et al.* 2006, Heckel *et al.* 2007), sendo vantajoso por evitar desequilíbrio ecológico no agroecossistema, pois muitos são específicos aos insetos-alvo e seletivos aos inimigos naturais; além de causar mortalidade direta, os patógenos podem afetar as características biológicas e reprodutivas dos insetos; podem ser associados a outros métodos de controle compatíveis; reduzir os custos da produção agrícola; não poluem o ambiente e não são tóxicos aos homens e animais, desde que selecionados e manuseados corretamente, entre outras (Alves 1998). *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva que produz cristais protéicos durante a esporulação, que ao serem ingeridos por insetos suscetíveis são solubilizados no mesêntero, liberando as proteínas chamadas  $\delta$ -endotoxinas. Estas proteínas são ativadas por proteinases do mesêntero, atravessam a membrana peritrofica e interagem com receptores específicos situados no epitélio do intestino médio, provocando formação de poros iônicos na membrana das células epiteliais e rompimento dessas células. As larvas intoxicadas cessam a alimentação 2-3 horas após a ingestão das toxinas e por fim morrem por falta de absorção de nutrientes ou septicemia causada por bactérias da flora intestinal do inseto (Monnerat & Bravo 2000, Viana *et al.* 2009).

O potencial de controle de produtos à base dessa bactéria tem proporcionado uma série de estudos com isolados provenientes de vários locais geográficos, com a finalidade de encontrar perfis genéticos diversificados em relação às toxinas sintetizadas por eles, a fim de possibilitar alternativas de toxicidade na elaboração de formulações. Para *P. xylostella*, foram relatados casos de resistência a produtos com linhagens deste entomopatógeno (Heckel *et al.* 2007). Para tanto, muitos bioensaios são realizados com populações mantidas em laboratório por muitas gerações, as quais podem apresentar uma resposta biológica que venha comprometer a patogenicidade dos isolados. Para tanto, o objetivo foi observar o comportamento de suscetibilidade de lagartas de *P. xylostella* em laboratório, frente a uma série de isolados com patogenicidade comprovada para lepidópteros-praga em bioensaios e em análises moleculares conduzidos em estudo prévio realizado por Viana (2007).

## Material e Métodos

**Criação de *Plutella xylostella*.** Para a criação dos insetos utilizou-se a metodologia descrita por Barros & Vendramim (1999) e adaptada para as condições do LBCI, segundo De Bortoli *et al.* (2012). A população de *P. xylostella* utilizada foi criada em laboratório por pouco mais de 100 gerações. Tanto para a alimentação das lagartas quanto para substrato de oviposição foram utilizadas folhas de couve do híbrido HS-20. Após a emergência, os adultos foram liberados em gaiolas de plástico transparente (15 cm de diâmetro  $\times$  16 cm de altura) contendo um disco de folha de couve de 8 cm de diâmetro colocado sobre um disco de papel filtro do mesmo tamanho, levemente umedecido. Os discos de folha e papel foram dispostos sobre um copo plástico transparente com a

abertura voltada para baixo, ficando o disco de folha de couve elevado dentro da gaiola, onde ocorreu a oviposição. No ápice do recipiente foi feita uma abertura (2,3 cm de diâmetro), utilizada para fixação de esponja embebida em solução aquosa de mel a 10%. Cada gaiola tinha uma abertura lateral quadrada (10  $\times$  10 cm), coberta com tecido tipo voile. Os discos de folha de couve, onde foram realizadas as posturas, foram retirados das gaiolas e transferidos para placas de Petri até a eclosão das lagartas, sendo transferidos para caixas plásticas (30  $\times$  15 cm) com folhas de couve que serviram para alimentação durante esta fase de desenvolvimento das lagartas. Diariamente, as folhas consumidas foram retiradas e substituídas por novas até que as lagartas atingissem a fase pupal. As lagartas foram mantidas nas folhas de couve até a formação das pupas. As pupas foram coletadas com o auxílio de pincel ou pinça e acondicionadas em tubos de ensaio de fundo chato (8  $\times$  2 cm), vedados com filme plástico (PVC) contendo pequenos furos feitos com um estilete, para permitir a aeração interna.

**Isolados e preparação da suspensão.** Foram utilizados os isolados de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV-UNESP (LGBBA), os quais foram: 49.19A, E2, 1.7L, T3A.259, T3A.140, T08024, E26, E22 e T07: Os isolados selecionados para este estudo foram caracterizados molecularmente como específicos para lepidópteros e descritos por Viana (2007).

Para o preparo da suspensão esporo/cristal os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura Agar-Nutriente e incubados a 30°C, durante 5 dias, para permitir completa esporulação e liberação de cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon contendo 10 mL de água autoclavada e 0,005% de Tween 20® (estabilizador de emulsão; solúvel e dispersível em água). A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex e a partir desta foram feitas duas suspensões seriadas para contagem de esporos em câmara de Neubauer para padronização das concentrações:  $9 \times 10$ ,  $9 \times 10^2$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $(1,5; 6; 8 \text{ e } 9) \times 10^5$ ,  $(1,5; 2; 3; 4,5; 6; 7,5 \text{ e } 9) \times 10^6$ ,  $(1,5; 2; 3; 4; 4,5; 6; 7,5; 9) \times 10^7$  e  $(1,5 \text{ e } 3) \times 10^8$  esporos/mL.

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

**Bioensaios.** O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP) em Jaboticabal, sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. Foram utilizadas lagartas de segundo instar de *P. xylostella*, oriundas da criação-estoque do LBCI.

Aplicou-se um volume de 0,5 mL da suspensão por face do disco, além de uma pulverização de 0,50 mL de água com Tween como testemunha, em 3 discos de folha de couve com diâmetro de 8 cm, para cada concentração dos isolados. A pulverização foi realizada com auxílio de uma pistola para

pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25lbf/pol<sup>2</sup>, sob capela de exaustão, com uma distância de 20 cm do alvo (disco foliar). Os discos secos em condição ambiente foram colocados individualmente em placas de Petri sobre papel filtro levemente umedecido com água. Sobre cada disco foliar foram colocadas 15 lagartas de *P. xylostella* de segundo instar, para alimentação.

Os bioensaios foram representados por 26 concentrações por isolado (totalizando 260, sendo 10 isolados para 26 concentrações). Para cada tratamento utilizou-se 3 repetições, contendo 45 lagartas. A avaliação da mortalidade larval foi iniciada com 24 horas após o confinamento nas placas, até a mortalidade total ou formação de pupas.

A suscetibilidade das lagartas foi determinada com base nos dados da mortalidade larval. Entretanto, para os isolados que proporcionaram um perfil de mortalidade variado, realizou-se a estimativa da concentração letal.

**Análise dos dados.** Os dados obtidos nos bioensaios de sustentabilidade foram submetidos aos testes de normalidade (teste de Kolmogorov) e homogeneidade da variância (teste de Bartlett). Em seguida foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (nível de significância 0,05). Apenas o isolado T08024 apresentou concentrações com variação da mortalidade de lagartas entre cerca de 10% a 90%. Dessa forma, os dados se ajustaram ao modelo de Probit para análise de regressão (Finney 1971). As análises foram conduzidas utilizando-se o software Polo PC.

## Resultados e Discussão

As lagartas de *P. xylostella* apresentaram um padrão de suscetibilidade muito elevado para as concentrações avaliadas de seis isolados (Tabela 1). Apenas o isolado T08024 apresentou dados que permitiu análise de CL<sub>50</sub> (Tabela 2 e Fig. 1). Isso porque, para obter a CL<sub>50</sub> são necessárias no mínimo cinco concentrações para que ocorra o ajuste dos dados na análise de Probit. Essas concentrações devem ter variação da mortalidade de lagartas entre cerca de 10% a 90%. Dessa forma, apenas os dados obtidos com o isolado T08024 se ajustaram ao modelo de Probit para análise de regressão (Finney 1971). Os isolados E26, E22 e T07 não causaram mortalidade das lagartas de *P. xylostella*, mesmo sendo caracterizados molecularmente para Lepidoptera.

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

A variação da eficiência dos isolados pode ser explicada por uma série de fatores ligados ao modo de ação desta bactéria, principalmente pela ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo este fator determinante

no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (Polanczyk & Alves 2003). A eficácia também depende da presença de outras toxinas como a Vip, Cyt e outras exotoxinas que podem influenciar na toxicidade dos isolados, uma vez que os bioensaios foram conduzidos com suspensão esporo-cristal. A ação de outras toxinas que podem compor o perfil gênico dos isolados também podem influenciar o potencial dos mesmos, de forma positiva ou negativa, porque algumas destas toxinas apenas são sintetizadas na fase vegetativa da multiplicação bacteriana (Lee et al. 2003, Costa 2009).

O valor não significativo de  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ) possibilitou o ajuste da CL<sub>50</sub>  $2,7 \times 10^6$  esporos/mL para o isolado T08.024 (Tabela 2).

A mortalidade larval ocasionada pelo isolado T08.024 foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações, ou seja, aumentaram com o incremento da concentração. Este isolado de *B. thuringiensis* apresentou um perfil genético muito variado quanto à produção de proteínas, descrito nos trabalhos de Viana (2007) e Viana et al. (2009), onde foram discutidos os possíveis genes que podem estar associados ao efeito letal deste isolado em lagartas de *P. xylostella*, sendo eles: *cry1Aa*; *cry1Ca*; *cry1Fa*; *cry1Ab*; *cry1Ae*; *cry1Bd* e *cry1Ac*. Os genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* compõem o perfil molecular da formulação comercial Dipel®, e eles têm efeito tóxico sobre *P. xylostella* (Lez-Cabrera et al. 2001), assim como em *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) (Brighenti et al. 2005). Entretanto, em literatura foi demonstrado que determinadas populações da traça-das-crucíferas apresentam resistência às toxinas dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac*; e que há a possibilidade desta resistência ser de caráter dominante (Sayyed et al. 2005, Gong et al. 2010). A variação na suscetibilidade das toxinas de *B. thuringiensis* tem relação direta com o manejo da cultura, ou seja, com os tratamentos fitossanitários, restos de cultivos associado a sobreposição de gerações, cultivo de várias espécies de brássicas e dentre outros fatores.

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

A constituição molecular de T08.024 como apresentado pela análise de PCR, é extremamente diversificada em termos de patogenicidade (Viana et al. 2009). Sendo assim, é fundamental conhecer este perfil genético em condições de expressão gênica, a fim de possibilitar uma afirmação mais consistente da potencialidade do agente entomopatogênico, em relação à composição de proteínas tóxicas. Bravo et al. (1998) relataram que o gene *cry1* é frequentemente encontrado nas coleções desta bactéria no mundo, assim como o trabalho de Wang et al. (2007) que estudaram a

**Tabela 1.** Suscetibilidade de lagartas de *Plutella xylostella* por meio da mortalidade (%) após 24 horas, causada por isolados de *Bacillus thuringiensis* que não ajustaram a curva concentração-resposta pela análise de  $\chi^2$ .

Concentração (esporo/mL)	Mortalidade (%) de lagartas de <i>P. xylostella</i> causada por isolados de <i>B. thuringiensis</i>					
	E1	49.30A	E2	1.7L	T3A.259	T3A.140
9×10	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9×10 <sup>2</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9×10 <sup>3</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9×10 <sup>4</sup>	93,33	64,44	55,55	91,11	86,66	86,66
1,5×10 <sup>5</sup>	93,33	64,44	55,55	91,11	100,00	97,77
6×10 <sup>5</sup>	88,88	64,44	66,66	91,11	100,00	97,77
8×10 <sup>5</sup>	88,88	55,55	66,66	91,11	100,00	97,77
9×10 <sup>5</sup>	100,00	100,00	100,00	95,55	100,00	100,00
1,5×10 <sup>6</sup>	100,00	82,22	55,55	100,00	100,00	100,00
2×10 <sup>6</sup>	100,00	91,11	68,88	100,00	100,00	100,00
3×10 <sup>6</sup>	100,00	91,11	75,55	100,00	100,00	100,00
4,5×10 <sup>6</sup>	100,00	91,11	97,77	100,00	100,00	100,00
6×10 <sup>6</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
7,5×10 <sup>6</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9×10 <sup>6</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,5×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4,5×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
7,5×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
9×10 <sup>7</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,5×10 <sup>8</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3×10 <sup>8</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

N (número de lagartas) = 45

distribuição destes genes na China e concluíram que *cryIC*, *cryIA* e *cryID* apresentam altos índices de frequência. A literatura mostra que as proteínas resultantes dos genes *cryIB* e *cryIC* são muito estudadas com o objetivo de engenharia genética, pois são tóxicas a muitas pragas de grande

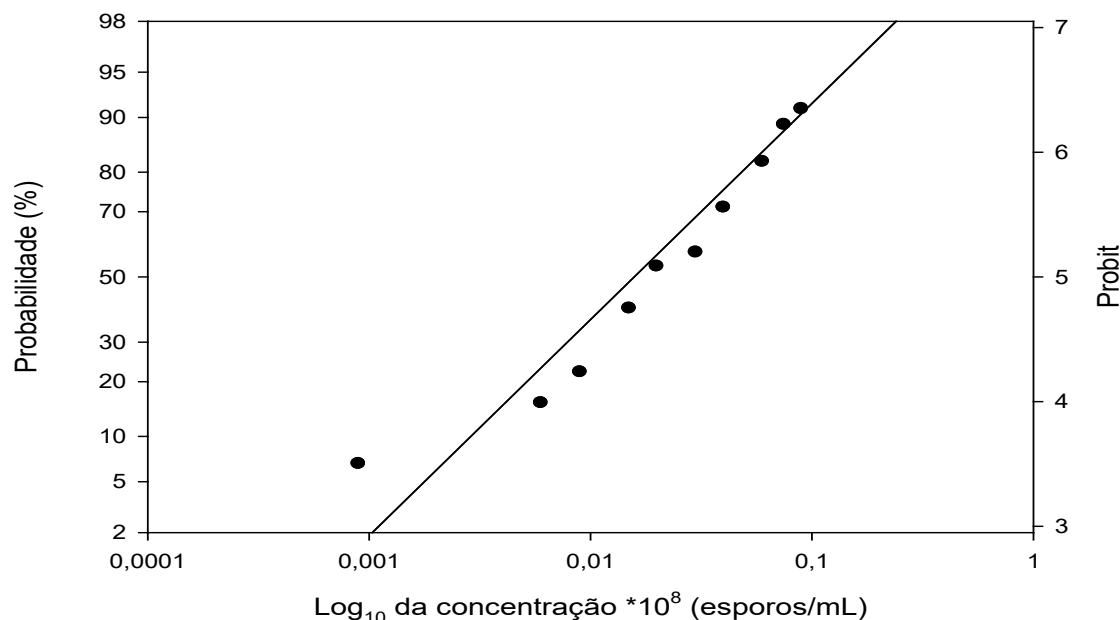
importância econômica, assim como de difícil controle (Valicente *et al.* 2000).

Atualmente, os objetivos gerais das pesquisas têm envolvido a busca por novas toxinas com potencial de controle, bem como resgatar o efeito conjunto de duas ou

**Tabela 2.** Inclinação (média  $\pm$  erro padrão) da curva, qui-quadrado ( $\chi^2$ ), graus-liberdade, CL<sub>50</sub> ( $\pm$  Intervalo de Confiança) e probabilidade (P) da curva concentração-mortalidade larval de *Plutella xylostella*.

Tratamento	Inclinação ( $\pm$ EP)	$\chi^2$	GL	<sup>1</sup> CL <sub>50</sub> (IC 95%)	P
T08.024 <sup>2</sup>	1,96203 $\pm$ 0,1767	6,546 <sup>ns</sup>	10	2,7*10 <sup>6</sup> (0,0076-0,0107)	0,65

<sup>1</sup>CL<sub>50</sub> - esporos/mL; ns - não significativo; <sup>2</sup> T08.024 - isolado de *Bacillus thuringiensis*

**Figura 1.** Curva de concentração-resposta do isolado T08024 de *Bacillus thuringiensis* para lagartas de *Plutella xylostella* após 24 horas.

mais em um isolado ou outro veiculador, podendo vir a ser uma excelente forma de contornar esta capacidade do inseto-praga (Duma 2009). Outras pesquisas focam engenharia genética, utilizando estas toxinas, como aquela apresentada pelo isolado T08.024, para serem incorporadas no genoma de variedades altamente produtivas, a fim de minimizar problemas de resistência, bem como redução de custos com outras formas de controle (Gong et al. 2010).

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

Os isolados estudados fazem parte de um banco que apresenta uma constituição genética muito importante para a

traça-das-crucíferas, o que implica também na necessidade de estudos com outras pragas da mesma ordem. A possibilidade destes isolados expressarem a proteína Cry1C pode favorecer muitos estudos moleculares de inserção do domínio III da Cry1C em proteínas com menor toxicidade, como Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ea e Cry1Ba, tornando-as mais tóxicas para diferentes insetos-alvo (De Maagd et al. 2001, Bravo et al. 2004).

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

Os isolados E26, E22 e T07 não causaram mortalidade das lagartas de *P. xylostella*, mesmo sendo caracterizados molecularmente para Lepidoptera. Nos bioensaios não apresentaram condição de toxicidade, provavelmente porque

os genes identificados pela PCR no trabalho de [Viana \(2007\)](#) não expressaram as proteínas. Estes bioensaios foram repetidos em triplicata para averiguar possíveis problemas decorrentes de contaminação por manuseio, ou até mesmo fatores abióticos como falta de temperatura no período da esporulação, todavia, os resultados sempre foram os mesmos.

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

O isolado T08.024 que possibilitou o ajuste da  $CL_{50}$   $2 \times 10^6$  esporos/mL, sendo valor não significativo de  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ), também apresenta potencial de controle para esta praga, porém devem ser conduzidos estudos de expressão, bem como sua avaliação em condições de campo em locais de ocorrência freqüente desta praga, para confirmar a patogenicidade mesmo exposto aos fatores ambientais.

### Literatura citada

- Alves, S.B. 1998. Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens, p. 21-37. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1163p.
- Barros, R. & J.D. Vendramim. 1999. Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). An. Soc. Entomol. Bras. 28: 469-476.
- Bravo, A., I. Gómez, C. Conde, C. Munhoz-Garay, J. S'Anchez, M. Miranda, S. Zhuang, S. Gill & M. Soberon. 2004. Oligomerização triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N-receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta 1667: 38-46.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiverus, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Pena, M.E. Nunez-Valdez, M. Soberon & R. Quintero. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4965-4972.
- Brighenti, D.M., C.F. Carvalho, G.A. Carvalho & C.R.G. Brighenti. 2005. Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). Ciênc. Agrotec. 29: 60-68.
- Costa, J.R.V. 2009. Predição in vitro da atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner e efeito sinérgico no controle de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). 93p. Jaboticabal: FCAV-Unesp (Tese de doutorado).
- De Bortoli, S.A., A.M. Vacari, G.O. Magalhaes, W. Dibelli, C.P. De Bortoli, M.P. Alves. 2012. Subdosagens de *Bacillus thuringiensis* em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Rev. Caatinga 25: 50-57.
- De Maagd, R.A., A. Bravo & N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has involved specific toxins to colonize the insect world. TREND Genet. 17: 193-199.
- Dickson, M.H., A.M. Shelton, S.D. Eigenbrode, M.L. Vamossy & M. Mora. 1990. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. HortScience 25: 1643-1646.
- Duma, V.F. 2009. Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Brasília: Universidade de Brasília. 140p. (Tese de mestrado).
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. 205 p.
- Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J. Invertebr. Pathol. 101: 1-16.
- Godin, C. & G. Boivin. 1998. Lepidopterous pests of Brassica crops and their parasitoids in southwestern Quebec. Environ. Entomol. 27: 1157-1165.
- Gong, Y., W. Chongli, Y. Yihua, W. Shuwen & W. Yidong. 2010. Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. J. Invertebr. Pathol. 104: 90-96.
- Guidelli-Thuler, A.M. M.V.R. Lemos, R.T. Thuler & I. Abreu. 2009. Monitoring the expression of the sigma35 and cry2AB genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence. Sci. Agric. 66: 403-409.
- Heckel, D.G., L.J. Gahan, S.W. Baxter, J.Z. Zhao, A.M. Shelton, F. Gould & B.E. Tabashnik. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol. 95: 192-197.
- Kumaraswamia, N.S., T. Maruyama, S. Kurabea, T. Kishimoto, T. Mitsui & H. Horia. 2001. Lipids of brush border membrane vesicles of BBMV from *Plutella xylostella* resistant and susceptible to Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Comp. Biochem. Physiol. 129: 173-183.
- Kwon, D.H., B.R. Choi, H.M. Park, S.H. Lee, T. Miyata, J.M. Clark & S.H. Lee. 2004. Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. Pestic. Biochem. Physiol. 80: 21-30.
- Lee, M.K., F.S. Walters, H. Hart, N. Palekar & J.S. Chen. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis*

- vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab Endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4648-4657.
- Lez-Cabrera, J.G., S. Herrero, A.H. Sayyed, B. Escriche, Y.B. Liu, S.K. Meyer, D.J. Wright, B.E. Tabashnik & J. Ferré. 2001. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4610-4613.
- Medeiros, P.T., E.H. Sone, C.M.S. Soares, J.M.C.S. Dias & R.G. Monnerat. 2006. Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. *Hortic. Bras.* 24: 245-248.
- Melatti, V.M. 2008. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). Brasília: Universidade de Brasília. 120p. (Tese mestrado).
- Monnerat, R.G. & A. Bravo. 2000. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, p. 163-200. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (Eds). *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3.
- Polanczyk, R. & S. Alves. 2003. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociência* 7: 1-10.
- Santos Jr., H.J.G. dos. 2009. Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp. (Westwood) (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae). 77p. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tese de Doutorado em Entomologia Agrícola).
- Sayyed, A.H., R. Gatsi, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche, D.J. Wright & N. Crickmore. 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6863-6869.
- Valicente, F.H., M.R. Barreto, M.J.V. Vasconcelos, J.E.F. Figueiredo & E. Paiva. 2000. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 47-153.
- Viana, C.L.T.P. 2007. Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner efetivos em lagartas de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). 90p. Jaboticabal: FCAV-Unesp (Tese de mestrado em Agronomia - Entomologia Agrícola).
- Viana, C.L.T.P., R.M. Goulart, S.A. De Bortoli, A.M.G. Thuler, R.T. Thuler, M.V.F. Lemos & S.A. Ferraudo. 2009. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). *Científica* 37: 22-31.
- Wang, L., X.F. Li, J. Zhang, J.Z. Zhao, Q.J. Wu, B. Xu & Y.J. Zhang. 2007. Monitoring of resistance for the diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ba toxins and a Bt commercial formulation. *J. Appl. Entomol.* 131: 441-446.