

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

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner
EFETIVOS EM LAGARTAS DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)**

Cácia Leila Tigre Pereira Viana

Engenheira Agrônoma

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner
EFETIVOS EM LAGARTAS DE *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)**

Cácia Leila Tigre Pereira Viana

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

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

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

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CÁCIA LEILA TIGRE PEREIRA VIANA – Nascida em Mucurici-ES, em 08 de setembro de 1980. Técnica Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Alegre-ES, título obtido em 1998. Engenheira Agrônoma pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), título obtido em outubro de 2004. Estágio no Laboratório de entomologia e iniciação científica com bolsa do CNPq durante a graduação. Mestranda em Agronomia / Entomologia Agrícola pela UNESP- Campus de Jaboticabal, com início em março de 2005 e término em fevereiro de 2007. Aprovada para o Doutorado na mesma Área e Instituição do Mestrado, com início em março de 2007.

Confiança...

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

“Sois meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus,

eu confio em ti”

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

*Ao meu amado esposo, Francisco, com a simplicidade de ser o DÊ,
para todos que o conhecem; pela sua incansável luta de estar sempre ao meu
lado, desafiando junto comigo os obstáculos da vida.*

***EU TE AMO... Estou imensamente feliz por estarmos casados,
e quero que saiba que esta Vitória É Nossa!!!***

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

DEDICO

***Às minhas irmãs Kátia e Lílian e aos meus irmãos
Enilton e Edílson, pelo carinho e apoio constantes...***

***E também a minha linda sobrinha Heloísa,
pelo seu tão singelo sorriso.***

***Aos cunhados (as) Alexandre, Jarbas,
Sandra e Adriana, pelo incentivo.***

***Aos meus amigos de Pinheiros e Alegre (ES),
e aos de Teixeira de Freitas (Ba), pela alegria da nossa amizade. Em especial a
minha mãezinha Neuza pelo seu amor e dedicação.***

***Aos meus queridos sogros, Sr. Luiz e a Dona Rita,
e a cunhada Marina, pelo apoio, atenção, incentivo.***

***Aos novos e eternos amigos: Família Guidelli,
em especial ao Sr. Sebastião e a Dona Laura,
pelo acolhimento, confiança e carinho...Muito obrigado.***

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Ao Professor Dr. Dirceu Pratisoli do CCA-UFES, pela orientação em trabalhos e preparação para o mundo da pesquisa durante a graduação.

Ao Robson e a Ana Maria, principalmente pela amizade. Mas também, pela atenção, companheirismo, ensinamentos, e força total para realização deste trabalho. Muitas foram às dúvidas, medos, angústias, porém vocês me davam a certeza que era tudo normal e que no fim daria tudo certo. Muito obrigado.

Ao amigo Roberto, pela confiança, atenção, paciência e por muitas horas de estudo, experimento, conversas... Também à sua família, em especial aos seus pais, Sr. Robertinho e Dona Sheila, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do LBCI: Roberto, Robson, Marieli, Leandro, Jackeline, Rafael, Juliana, Haroldo, José Armando (Pi), Alessandra e Marina, pela atenção durante as fases experimentais e principalmente pela convivência de trabalho. Ao Eudes, que atualmente está trabalhando na Embrapa Semi-árido, pela atenção e amizade.

Aos amigos do LGBBA: Ana Maria, Paula, Juliana Rossi, Juliana Costa, Viviane, Martinha, Camila, Janaína, Elaine, Eliane, Vivian, Juliana Xavier, Najara, Sandrinha, Paulo F., e outros, pela convivência tão agradável e em especial pela ajuda e aprendizagem na área de

microbiologia básica e aplicada que vocês me concederam. E também ao funcionário Aldo pelas horas de conversas e incentivo.

Ao Professor Dr. Antônio Sérgio Ferraud, pela disponibilidade para realização das análises estatísticas e por toda atenção dispensada.

A família do meu orientador, principalmente a sua esposa Dona Ângela, pela amizade, atenção, confiança dispensada a mim e ao Dé. Muito obrigada pelo carinho dedicado a família laboratorial.

Ao Sr. Melquíades e a Dona Juracy (pais do Robson), pela amizade, confiança e carinho.

Aos meus vizinhos, em especial Dona Terezinha e Sr. Valter pela atenção e carinho.

A Comunidade Santa Tereza de Jesus, em especial ao Pe. Marcelo e ao Pe. Paullinho pela atenção, amizade e, principalmente, orientação sob a luz divina.

Ao Departamento de Fitossanidade / Entomologia Agrícola, em especial aos funcionários: Márcia, Lígia, Lúcia, Roseli, Zuleni, Altamiro, e aos demais, que sempre estiveram a disposição para ajudar.

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

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

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

SUMÁRIO

PAG.

RESUMO	iii
SUMMARY	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BERLINER EFETIVOS NO CONTROLE DE <i>PLUTELLA XYLOSTELLA</i> (L., 1758) (Lep.: PLUTELLIDAE)	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1. Linhagens e isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.2. Extração do DNA genômico para utilização em PCR.....	20
2.3. Comprovação da presença do gene <i>cry1</i> nos isolados.....	21
2.4. Identificação de subclasses do gene <i>cry1</i>	22
2.5. Criação e manutenção de <i>Plutella xylostella</i>	24
2.6. Bioensaio com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra lagartas da traça-das-crucíferas	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Caracterização molecular	29
3.2. Bioensaio com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra lagartas da traça-das-crucíferas	32
4. CONCLUSÕES	41
5. REFERÊNCIAS	42

CAPÍTULO 3 - EFEITO DE NOVOS ISOLADOS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BERLINER EM <i>PLUTELLA XYLOSTELLA</i> (L., 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE).....	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS	61
CAPÍTULO 4 - Tempo Letal E sobrevivência DE lagartas de <i>PLUTELLA XYLOSTELLA</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) TRATADAS COM isolados de <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BERLINER	66
1.INTRODUÇÃO	66
2.MATERIAL E MÉTODOS	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4. CONCLUSÕES	78
5. REFERÊNCIAS	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
APÊNDICES.....	84

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EFETIVOS EM LAGARTAS DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

RESUMO – A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) e no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. O objetivo geral foi selecionar novos isolados de *Bacillus thuringiensis* através da caracterização molecular, identificando as diferentes subclasses do gene *cry1*, determinar a patogenicidade contra lagartas de *Plutella xylostella* e avaliar a influência no ciclo biológico da praga. Foram utilizados 95 isolados de *B. thuringiensis* obtidos da coleção do LGBBA. O material genético foi extraído pela matriz de troca iônica “Kit Instagene Matrix” e submetido a PCR com iniciadores gerais para o gene *cry1* e específicos para as subclasses. Realizaram-se bioensaios com 58 isolados, um controle positivo com a linhagem padrão HD-1 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, um controle negativo com *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e água com espalhante adesivo, como testemunha. O conteúdo das subclasses estudadas para o gene *cry1* foi determinado para 58 isolados, o que representa 60% do total. Dentre os 95 isolados estudados, 27,4% demonstraram que o conjunto gênico *cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Fa* e *cry1Bd* é a frequência mais comum. Dos 58 isolados testados, 11 causaram mortalidade total das lagartas e os demais influenciaram negativamente o ciclo biológico da praga. Dentre as características avaliadas, a mortalidade larval e a pupal, bem como a duração larval foram as mais relevantes para se determinar quais isolados influenciaram a biologia da praga. Portanto, os isolados que causaram 100% de mortalidade larval têm grande potencial para formulação de produtos comerciais a serem utilizados em programas de manejo integrado de *P. xylostella*.

Palavras-Chave: brássicas, entomopatógenos, gene *cry*, PCR, traça-das-crucíferas

***Bacillus thuringiensis* Berliner SELECTION AGAINST CATERPILLARS OF
Plutella xylostella (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)**

SUMMARY – The research was developed in the Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) and in the Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) at the FCAV-UNESP-Campus de Jaboticabal, SP. The general objective was to select new strains of *Bacillus thuringiensis* through the molecular characterization, identifying the different subclasses of the gene *cry1*, to determine the pathogenicity against caterpillars of *Plutella xylostella* and to evaluate the influence in the pest biological parameters. It was used 95 isolated of *B. thuringiensis* obtained of the collection of LGBBA. The genetic material was extracted by the head office of change ionic "Kit Instagene Matrix" and submitted to PCR with general initiators for the gene *cry1* and specific for the subclasses. Bioassays were made using 58 strains of *B. thuringiensis*, a positive control with var. *tenebrionis* and water was used with adhesive spreader Tween20®, as a standard the strains HD1 from *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, a negative control with *B. thuringiensis* check. The content of the subclasses studied for the gene *cry1* was determined for 58 isolated, what represents 60% of the total. Among the 95 isolated studied, 27,4% demonstrated that the genic group *cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Fa* and *cry1Bd* is the most common frequency. Total mortality of caterpillars was observed in 11 of studied strains and the remainders affected negatively pest biological lifecycle. Larvae and pupae mortality, and larvae period were more relevants parameters to determine which isolates affect *P. xylostella* biology. In this way, the isolates caused 100 % larval mortality have higher potential for development a commercial bioinseticide to use in *Plutella xylostella* integrated pest management programs.

Keywords: brassicas, entomopatogenous, gene *cry*, PCR, diamondback moth

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Plutella xylostella (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida como traça-das-crucíferas, é considerada a praga mais importante das brássicas, com ocorrência freqüente em todas as áreas de cultivo no mundo (TALEKAR & SHELTON, 1993; CASTELO BRANCO et al., 2001; DIAS et al., 2004). O repolho se destaca como a espécie mais importante dentre as crucíferas, devido a sua ampla distribuição, facilidade na produção e grande consumo (SILVA JÚNIOR, 1987). Esta praga causa sérios danos à cultura, depreciando o produto, interferindo no crescimento da planta e até mesmo provocando sua morte ou perda total nos campos de produção (CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, 2001; MONNERAT et al., 2004).

A traça-das-crucíferas é um inseto de ciclo curto, em que a temperatura é fator determinante, pois em condições mais quentes o ciclo pode ser de 12 dias. O número de gerações varia de 5 a 10 por ano, dependendo das condições climáticas e da disponibilidade de alimento, pois as populações dessa praga variam muito de um ano a outro (CASTELO BRANCO & VILLAS BÔAS, 1997; DIAS et al., 2004). As fêmeas ovipositam na face inferior das folhas. Após a eclosão, as lagartas de primeiro ínstar “minam” as folhas, alimentando-se do parênquima por dois ou três dias. Em seguida, abandonam as “minas” e passam a alimentar-se da epiderme, perfurando as folhas e inutilizando-as para o consumo. Quando completam o desenvolvimento larval, empupam no interior de um pequeno casulo de seda na face inferior das folhas (IMENES et al., 2002).

MUSSURY et al. (2002) relataram que *P. xylostella* tem sido também considerada uma das principais pragas em plantios de canola, causando danos desde a fase vegetativa até o final do florescimento, destruindo, muitas vezes, a haste floral. No Brasil, foi constatada também sua ocorrência em canola a partir do início de agosto até o final de setembro (DOMICIANO & SANTOS, 1996).

A presença desta praga pode ser verificada o ano todo, com os maiores picos populacionais nos períodos mais quentes e secos (CASTELO BRANCO et al., 2003),

por isso tem se tornado alvo de pesquisas em todas as regiões produtoras, visando a obtenção de medidas de controle tecnicamente mais adequadas, economicamente satisfatórias e ecologicamente corretas (THULER, 2006).

Algumas das dificuldades observadas no controle desta praga se deve às áreas de cultivo coexistirem durante todo o ano, com plantas de idades diferentes, proporcionando à praga quantidade abundante e contínua de alimento (IMENES et al., 2002).

O método de controle mais utilizado em áreas de cultivo de brássicas ainda é o químico, sendo que aparentemente é o que traz os melhores resultados, de forma rápida, prática e eficiente na redução dos prejuízos ocasionados pela praga (CASTELO BRANCO et al., 2003; DIAS et al., 2004). O emprego deste método de forma contínua e em grandes quantidades traz riscos de intoxicação aos produtores, animais domésticos e selvagens, pode deixar resíduos nos alimentos que são consumidos em sua maioria *in natura* ou com pouco preparo, além da contaminação do ambiente e, principalmente, dos inimigos naturais (CHEN et al., 1996; MONNERAT et al., 2004).

O uso contínuo e desordenado desse controle, sem orientação técnica, tem conduzido à seleção de populações resistentes aos mais diversos compostos químicos, (CASTELO BRANCO & GUIMARÃES, 1990; CASTELO BRANCO, 1999). Têm sido recomendadas, atualmente, várias estratégias de manejo para a cultura, como a determinação do nível de dano econômico através da contagem do número de furos nas folhas (CASTELO BRANCO et al., 1996), o uso de variedades resistentes e feromônios (FRANÇA & CASTELO BRANCO, 1987; MELO et al., 1994; CASTELO BRANCO, 1999; MAYER & MICHELL, 1999; MICHEREFF et al., 2000; IMENES et al., 2002;), plantas inseticidas (TORRES et al., 2001), rotação de culturas e eliminação de restos culturais (CASTELO BRANCO et al., 2003) e o emprego de agentes de controle biológico como os parasitóides, predadores e microrganismos entomopatogênicos (IDRIS & GRAFIUS, 1998; BARROS & VENDRAMIM, 1999; CASTELO BRANCO & MEDEIROS 2001; MUSSURY et al., 2002; DIAS et al., 2004) que podem minimizar os danos causados pela traça-das-crucíferas,.

O controle biológico de pragas utilizando agentes entomopatogênicos como bactérias, fungos e vírus proporcionam uma série de vantagens como: proteção do potencial produtivo da cultura, diminuição do uso de produtos químicos tóxicos, preservação do ambiente, especificidade ao inseto alvo, redução nos custos da produção agrícola, surgimento de novas indústrias visando os bioinseticidas, maior segurança ao homem, ausência de toxicidade às plantas (HABIB & ANDRADE, 1998; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2001; MONNERAT & BRAVO, 2000). Para ALVES et al. (1998), o Brasil, em virtude de sua grande diversidade em patógenos e do seu clima tropical favorável à ocorrência de doenças em insetos, vem sendo beneficiado por diversos programas oficiais de controle biológico. MEDEIROS (1997) também relata a biodiversidade brasileira de agentes de controle biológico, que detém muitas espécies ainda desconhecidas, adaptadas às condições locais e com potencial para uso no controle de pragas.

Diante dos problemas ocasionados pelo controle químico, uma alternativa eficaz e racional para evitar os danos causados por *P. xylostella* é o controle biológico com organismos entomopatogênicos. Dentre eles, o mais utilizado e estudado para a maioria das pragas agrícolas, principalmente para esta traça, é o *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (MONNERAT et al., 1999; CASTELO BRANCO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2005). Este agente tem sido usado para controle de insetos-praga das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (MONNERAT & BRAVO, 2000; MEDEIROS, et al., 2005), sendo que diversos trabalhos relatam o uso desta bactéria para controle da traça-das-crucíferas, pelo fato dela produzir substâncias chamadas proteínas Cry que são extremamente tóxicas (CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002; MONNERAT et al., 2004; DIAS et al., 2004; SAYYED et al., 2004; KHAN et al., 2005).

B. thuringiensis é uma bactéria em forma de bastonete, gran-positiva, flagelada, pertencente à família Bacillaceae; é aeróbica e facultativamente anaeróbica, podendo ser encontrada nos mais variados ecossistemas terrestres (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Desenvolve-se em meios aeróbicos artificiais bastante simples e, sob ausência de certos nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, entra em processo de esporulação durante a fase estacionária. Durante a esporulação ela sintetiza uma

inclusão protéica cristalina, composta por subunidades denominadas cristais, com atividade inseticida. Os cristais são constituídos por δ -endotoxinas, ou proteínas Cry, que vão sendo acumuladas na célula bacteriana (HERRNSTADT et al., 1986; DIAS, 1992; GLARE & O' CALLAGHAM, 2000).

Os cristais de *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos pelas larvas dos insetos suscetíveis, sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que solubilizam o cristal e ativam as toxinas (proteínas Cry). As toxinas se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino médio das larvas, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana e ocasionam a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do inseto. Em consequência, a larva pára de se alimentar, torna-se imóvel e morre por inanição ou septicemia (KNOWLES, 1994; PRAÇA et al., 2004; COPPING & MENN, 2000).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, ou seja, cada toxina é codificada por genes *cry* (LI et al., 1991). Atualmente mais de 200 genes *cry* foram seqüenciados e classificados em 22 grupos e em diferentes subgrupos, dependendo do grau de similaridade de seus aminoácidos (SANCHIS et al., 1988; LERECLUS et al., 1993).

Os genes *cry* codificam proteínas do tipo Cry1, Cry2 e Cry9 tóxicas para lepidópteros; as do tipo Cry1 ainda se dividem em subclasses, como observado por BRAVO et al. (1998), que constataram a presença de 12 subclasses mais específicas desse gene: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1Ae*, *cry1Ba*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Ea*, *cry1Eb*, *cry1F* e *cry1Fb*, em isolados mexicanos.

A variabilidade genética existente em diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas como a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). A PCR baseia-se na atividade da enzima DNA polimerase que é capaz de produzir uma cadeia de DNA complementando outra já existente. Através da técnica é possível detectar indícios da presença de genes que codificam para as

proteínas tóxicas já conhecidas, ou não; também dão idéia da patogenicidade dos isolados de *B. thuringiensis* (KUO & CHARK, 1996).

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

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

América Latina, Cuba e México lideram a utilização de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* para controle de pragas nas culturas de algodão, banana, batata, citros hortaliças, fumo, milho e pastagens. No Brasil, estes bioinseticidas são pouco utilizados para controle de pragas de importância agrícola, tendo as principais limitações: elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores públicos e privados no desenvolvimento e formulações desses produtos (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Com a presença desses produtos no mercado por mais de 40 anos, foi gerado um acúmulo de informações sobre aspectos determinantes na eficiência desses bioinseticidas, a exemplo da idade larval mais suscetível, comportamento alimentar do inseto, limitações ambientais, métodos de aplicação e formulação (NAVON, 2000). A partir destas informações e devido ao modo de ação dessa bactéria, foi considerado pouco provável o aparecimento de insetos resistentes, porém, alguns estudos já relataram espécies de insetos-praga que selecionaram indivíduos resistentes (TABASHNIK, 1994).

P. xylostella foi o primeiro inseto para o qual observaram-se populações de campo com altos níveis de resistência em respostas a tratamentos comerciais com *B. thuringiensis* (TABASHNIK et al., 1997; HERRERO et al., 2001). Casos de resistência

da traça foram detectados pela primeira vez, no Havaí, mas, também, em outros países já foram verificadas populações resistentes, a exemplo do Japão, USA, Tailândia, Honduras, Malásia, Brasil, México, Filipinas e Nicarágua (ZHAO et al.,1993; TABASHNIK,1994; PEREZ & SHELTON, 1997; WRIGHT et al.,1997).

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

O uso do bioinseticida à base de *B. thuringiensis*, em combinação com outras táticas de manejo, pode resultar numa ótima estratégia para contornar o problema da resistência, como por exemplo o uso de áreas de refúgio, rotação de culturas, emprego de inimigos naturais associados com as δ -endotoxinas, ou então associá-las com produtos químicos dentro de uma filosofia de manejo integrado de pragas (van RIE & FERRÉ, 2000; MEDEIROS, 2004).

Cerca de 50.000 isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e atualmente diversos estudos de laboratório no mundo inteiro se destinam à descoberta de isolados que possuam novas e eficientes toxinas no controle de pragas (MONNERAT & BRAVO, 2000), principalmente para contornar os problemas resultantes do manejo inadequado do método de controle microbiano (MAXWELL et al., 2006).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar novos isolados de *B. thuringiensis* através da caracterização molecular, identificando as diferentes subclasses do gene *cry1*, bem como determinar a patogenicidade desses isolados em lagartas de *P. xylostella*, além de avaliar a influência dos mesmos no ciclo biológico da praga e no tempo letal.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Revista de Biotecnologia Ciência, e Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 20, p. 30-33, 2001.

ALVES, S. B.; MOINO, A.; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1145-158.

BARROS, R.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de cultivares de repolho, utilizados para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 469-476, 1999.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVERUS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental microbiology**, Washington, v.64, n.12, p. 4965-4972, 1998.

CASTELO BRANCO, M. Associação de armadilhas de feromônio e número de machos coletados para a redução do uso de inseticidas no controle da traça das crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, p.280, 1999.

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.; 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.; FRANÇA, F.H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. T. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.549-552, 2003.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A. Survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p.327-332, 2001.

CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A. L. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 24-25, 1990.

CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M. A. Impacto de inseticidas sobre parasitóides da traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2001.

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

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H. Nível de dano da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 220-223, 1996.

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.

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

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 59-76, 1992.

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.

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

FRANÇA, F. H.; CASTELO BRANCO, M. Resistência varietal a insetos e ácaros em hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 8-11, 1987.

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

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

HERRNSTADT, C.; SOARES, G. G.; WILCOX, E. R.; ESWARDS, D. L. A. New strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. **Biotech**, San Diego, v. 47, p. 305-308, 1986.

HERRERO, S. S.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Mannose Phosphate Isomerase Izoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidoptera species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 979-981, 2001.

IDRIS, A. B.; GRAFIUS, E. Diurnal flight activity of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in the field. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, n. 2, p. 406 - 414, 1998.

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.

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

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

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

KUO, W. S.; CHAK, K. F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1369-1377, 1996.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice.** Chichester : J. Wiley & Sons, 1993. p.37-70.

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.

MAYER, M. S.; MITCHELL, E. R. Differences between attractive diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), sex pheromone lures are not determinable through analysis of emissions. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 229-236, 1999.

MEDEIROS, M. A. de. O controle biológico de insetos-praga e sua aplicação em cultivos de hortaliças. **Circular Técnica da Embrapa Hortaliças**, Brasília, n 8, p. 1-15, 1997.

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

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A.C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

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

MICHEREFF, M. F. F.; VILELA, E. F.; MICHEREFF FILHO, M.; MAFRA NETO, A. Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.1919-1926, 2000.

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

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.

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

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 669-676, 2000.

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.

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

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Princeton, v. 2, p. 393-404, 1988.

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

SILVA JÚNIOR, A. A. **Repolho: fitologia, fitotecnia, tecnologia alimentar e mercadologia**. Florianópolis: EMPASC, 1987. p.295.

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

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D. G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, New York, v. 94, p. 1640-1644, 1997.

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

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

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. de. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 151-156, 2001.

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

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

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

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

CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EFETIVOS NO CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L., 1758) (LEP.: PLUTELLIDAE)

1. INTRODUÇÃO

Plutella xylostella (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida como traça-das-crucíferas, é um microlepidóptero freqüentemente encontrado em cultivos de brássicas. É considerada uma praga cosmopolita, ocorrendo nas mais diversas regiões do globo, independente das condições climáticas (IMENES et al., 2002). Práticas culturais como plantios sucessivos e a não eliminação dos restos culturais, principalmente para o repolho, são muito comuns em plantios de crucíferas (CASTELO BRANCO et al., 2003), juntamente com condições climáticas que favorecem o rápido crescimento das populações (BARRANTES & RODRIGUES, 1996), aumenta consideravelmente o nível de dano, devido à possibilidade de sua multiplicação contínua (CASTELO BRANCO et al., 2003).

CASTELO BRANCO et al. (1997), estudando a incidência da traça em cultivos de brássicas no Brasil, constataram sua ocorrência durante todo o ano, com declínio na densidade populacional durante o período chuvoso devido a remoção dos ovos e morte de larvas e pupas por asfixia.

O controle da traça-das-crucíferas vem sendo efetuado com o uso contínuo e excessivo de inseticidas químicos, tais como fosforados, carbamatos e piretróides, no entanto, foram observadas populações da traça resistentes à estes agroquímicos em diversas áreas de cultivo (CASTELO BRANCO, 1999; IMENES et al., 2002).

Faz-se necessário, então, reduzir o uso desses produtos mediante o emprego de estratégias mais seguras de controle, como agentes biológicos, principalmente bactérias, que é uma alternativa econômica e ecologicamente viável. Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, *Bacillus thuringiensis* Berliner é a mais

empregada, sendo ela a base das formulações, que representando 90%–95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

B. thuringiensis é uma bactéria com ampla distribuição, podendo ser encontrada em praticamente todos os ambientes, e, além disso, produz diferentes toxinas, altamente específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, as quais não contaminam o ambiente (SOUZA et al., 1999; MONNERAT & BRAVO, 2000).

Foi considerado durante muito tempo, que devido ao modo de ação dessa bactéria, seria pouco provável o aparecimento de insetos resistentes a esse bacilo, porém, alguns estudos constaram populações com seleção de insetos-praga para resistência (TABASHNIK, 1994). *P. xylostella* foi o primeiro inseto para o qual observaram-se populações de campo com altos níveis de resistência ao *B. thuringiensis* em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil (TABASHNIK et al., 1997; WRIGHT et al., 1997; HERRERO et al., 2001).

Muitos isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e atualmente diversos estudos de laboratório no mundo se destinam à descoberta de isolados que possuam novas toxinas eficientes no controle de pragas (MONNERAT & BRAVO, 2000), principalmente para contornar os problemas resultantes do manejo inadequado advindo do excesso de aplicações de bioinseticidas (MAXWELL et al., 2006).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi a caracterização molecular para identificar as subclasses do gene *cry1* de novos isolados de *B. thuringiensis* efetivos à lagartas de *P. xylostella*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1. Linhagens e isolados de *Bacillus thuringiensis*

A linhagem padrão (Lepidoptera-específico) utilizada como controle positivo foi o *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 e a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Coleoptera-específico) como controle negativo, obtidas do “*Bacillus* Genetic Stock Center”.

Foram utilizados 95 isolados de *B. thuringiensis* obtidos do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos pertencentes à coleção do LGBBA, sendo que parte dos isolados são provenientes 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 estocados em fitas de papel filtro, que foram impregnadas com suspensões de esporos e acondicionadas em tubos plásticos com capacidade para 1ml, mantidas a 10 °C em câmara climatizada. Para evitar contaminação do estoque em papel, a condução do experimento iniciou-se a partir de um estoque em água, ou seja, uma fita de papel impregnada com esporos foi submersa em água estéril e armazenada sob as condições anteriores.

Os isolados estudados estão inseridos na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Bacillus thuringiensis* utilizados na pesquisa.

Nº	Código do LGBBA	Nº	Código do LGBBA	Nº	Código do LGBBA
1	37.1 A ³	33	49.19 A ¹	65	58.17 A ³
2	97.27 A ¹	34	100.27 A ¹	66	142.30 A ³
3	E1 ¹	35	E7 ³	67	E14 ³
4	E40 ³	36	E42 ³	68	E44 ³
5	1.7L ²	37	3.7L ²	69	5.7L ²
6	13.7L ²	38	15.7L ²	70	17.7L ²
7	26.7L ²	39	28.7L ²	71	30.7L ²
8	38.7L ²	40	40.7L ²	72	42.7L ²
9	59.17 A ³	41	76.25 A ³	73	86.26 A ³
10	T3A.140 ¹	42	T07.196 ¹	74	T14.034 ¹
11	E20 ¹	43	E26 ³	75	E28 ³
12	E46 ³	44	E48 ³	76	E50 ³
13	7.7L ²	45	9.7L ²	77	11.7L ²
14	19.7L ²	46	22.7L ²	78	24.7L ²
15	32.7L ²	47	34.7L ²	79	36.7L ²
16	44.7L ²	48	46.7L ²	80	48.7L ²
17	48.1 A ¹	49	54.3 A ³	81	58.23 A ³
18	98.50 A ³	50	106.12 A ³	82	153.30 A ¹
19	E2 ³	51	E13 ³	83	E15 ³
20	E41 ³	52	E43 ³	84	E45 ³
21	2.7L ²	53	4.7L ²	85	6.7L ²
22	14.7L ²	54	16.7L ²	86	18.7L ²
23	27.7L ²	55	29.7L ²	87	31.7L ²
24	39.7L ²	56	41.7L ²	88	43.7L ²
25	75.25 A ³	57	83.26 A ¹	89	93.11A ³
26	T.3A259 ¹	58	T08.024 ¹	90	T20.002 ¹
27	E22 ³	59	E27 ³	91	E39 ³
28	E47 ³	60	E49 ³	92	69.24A ³
29	8.7L ²	61	10.7L ²	93	12.7L ²
30	20.7L ²	62	23.7L ²	94	25.7L ²
31	33.7L ²	63	35.7L ²	95	37.7L ²
32	45.7L ²	64	47.7L ²		

* ¹: Coleção do Laboratório de Jaboticabal (SP); ²: Coleção do Laboratório de Sete Lagoas (MG); ³: Coleção do Laboratório de Piracicaba (SP).

2.2. Extração do DNA genômico para utilização em PCR

Para realização das análises de PCR, o material genético (DNA) de cada um dos isolados e dos controles (positivo e negativo) foi extraído pela matriz de troca iônica, “Kit Instagene Matrix”, produzida pela Bio-Rad, seguindo as instruções do fabricante, como descrito abaixo.

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas de Petri com meio de cultura semi-sólido denominado “Nutrient Agar” (NA) (GORDON et al., 1973) contendo extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Agar 15g/L. Para o cultivo dos isolados nestas placas foi coletado de cada isolado uma alíquota do estoque em água e inoculada sob a forma de estrias no meio de cultura, para obter o isolamento de colônias. As placas foram incubadas em câmara climatizada por 12 h a 30°C.

Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1ml de água estéril em tubos plásticos de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidade e levados à centrifugação por 1 minuto a 15000 Xg a 20°C.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µl da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 minutos. Após a incubação, o material foi agitado vigorosamente em aparelho do tipo Vórtex por 10 segundos e incubado em água fervente (100°C) por 8 minutos. A amostra foi novamente agitada em Vórtex por 10 segundos e centrifugada a 20°C por 3 minutos. Posteriormente 200 µl do sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga esterilizado. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a 20°C.

2.3. Comprovação da presença do gene *cry1* nos isolados

Para a confirmação da presença do gene *cry1* nos isolados e nas linhagens padrão (controles positivo e negativo) foi utilizado o par de iniciadores gerais, denominado Gral-*cry1*, descrito por BRAVO et al. (1998), cujas seqüências estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores gerais para o gene *cry1*.

Iniciador	Seqüências do gene	Produto Amplificado (pb)	Temperatura Pareamento (°C)
gral- <i>cry1</i>	5'CTGGATTTACAGGTGGGGATAT 3'(d) 5' TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT 3'(r)	558	50

(d): direto; (r): reverso

As reações de amplificação para este par de iniciadores foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 20 ng de DNA molde; 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl). Os reagentes foram misturados até completa homogeneização e, em seguida, 18 µl da mistura foram distribuídos em placas esterilizadas para PCR, com 96 poços. As amostras de DNA de cada isolado foram distribuídas num volume de 2 µl (20ng) em cada poço da placa contendo a “mix” (mistura dos reagentes). Em todos os lotes de reação foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, contendo o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5

minutos a 95°C; 31 ciclos, consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto; pareamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e no final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao fim do programa foi adicionado um passo único para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada da placa do termociclador (BRAVO et al.,1998).

Após as amplificações foram adicionados às amostras 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal em cuba “sunrise” (96 canaletas), por 2 horas, a 100 V, conduzida em tampão TEB (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses foi empregada uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1Kb “1Kb DNA ladder”, produzida pela Invitrogen, que serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e foto documentados em equipamento GEL DOC2000 - Bio-Rad, através do software Quantity-one.

2.4. Identificação de subclasses do gene *cry1*

A identificação das subclasses do gene *cry1* dos isolados foi realizada para 9 tipos: *cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Ea*, *cry1Fa*, *cry1Ab*, *cry1Ae*, *cry1Bd* e *cry1Ac* (Tabela 3). Os iniciadores específicos para estes genes foram elaborados e otimizados no LGBBA, para a linhagem de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD-1¹.

¹ GUIDELLI, A. M.:(Laboratório de Genéticas de Bactérias e Biotecnologia Aplicada – UNESP – Jaboticabal). Comunicação Pessoal, 2006.

Tabela 3. Seqüências dos iniciadores específicos para o gene *cry1*.

Iniciadores	Seqüências	Produto Amplificado (pb=pares de base)
<i>cry1Aa</i>	5' TTCGCATCATTTCCTTAG 3' (d) 5' CTGTCCACGATAAATGTTCC 3' (r)	1035
<i>cry1Ca</i>	5'AGAGCGGAGAAGAAGTGGAG 3' (d) 5'CTTCCTCTTCTACACAGTTGC 3' (r)	559
<i>cry1Fa</i>	5' AATGTAGAGCCGTTTGTAGTG3' (d) 3' CCCTCAAGTTATTTAGACCTG 3' (r)	595
<i>cry1Ea</i>	5'TCTACATTACCGCAAACCCTC - 3' (d) 5'- AAGGCGATGTTTGTGCTAC - 3' (r)	≅530
<i>cry1Da</i>	5'GAAGGGAAGGAAATACAGAGC 3' (d) 5'GTTATTGGAGTGAAGAGTGTTG 3' (r)	670
<i>cry1Ab</i>	5' CGGGTAATCGCTCGTCTATC 3' (d) 5' CTTACTTCTCGCCATTATCC 3' (r)	640
<i>cry1Ae</i>	5' GCTCTTACAACCGCTATTCC 3' (d) 5' TATTATCCTGTGGTGGTATTTTC 3' (r)	838
<i>cry1Ac</i>	5' GGTGCTGGATTTGTGTTAGG 3' (d) 5' TTCTTTCTATGCCCTGAGCC 3' (r)	612
<i>cry1Bd</i>	5' TAGGCGTGTGGGTGGTATTC - 3' (d) 5' ACACTTCTGCTTCCCATTCTG - 3' (r)	522

(d): direto; (r): reverso

O preparo das amostras para reação de PCR foram conduzidas em um volume final de 20 µl, contendo 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM), 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,3 µM de cada iniciador, solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl), sendo estas quantidades para todos os iniciadores específicos. Para os demais componentes da reação de PCR houve variações nas quantidades, sendo: 20 ng de DNA molde e 2,0 mM de MgCl₂ para o iniciador *cry1Bd*; 20 ng de DNA molde e 1,5 mM de MgCl₂ para os iniciadores *cry1Ca*, *cry1Fa*, *cry1Da* e *cry1Ea*; 30 ng de DNA molde e 1,5 mM de MgCl₂ para os iniciadores *cry1Aa* e *cry1Ae*; 30 ng de DNA molde e 1,25 mM de MgCl₂ para o iniciador *cry1Ac*; 30 ng de DNA molde e 2,0 mM de MgCl₂ para o iniciador *cry1Ab*.

O produto da amplificação para cada isolado também foi submetido à eletroforese e visualizado em géis de agarose sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad), através do software Quantity-one. Para verificar a reprodutibilidade da metodologia foram realizadas três repetições de amplificações com cada iniciador, para cada amostra.

2.5. Criação e manutenção de *Plutella xylostella*

Os insetos utilizados foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da UNESP – Campus de Jaboticabal.

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

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

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

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

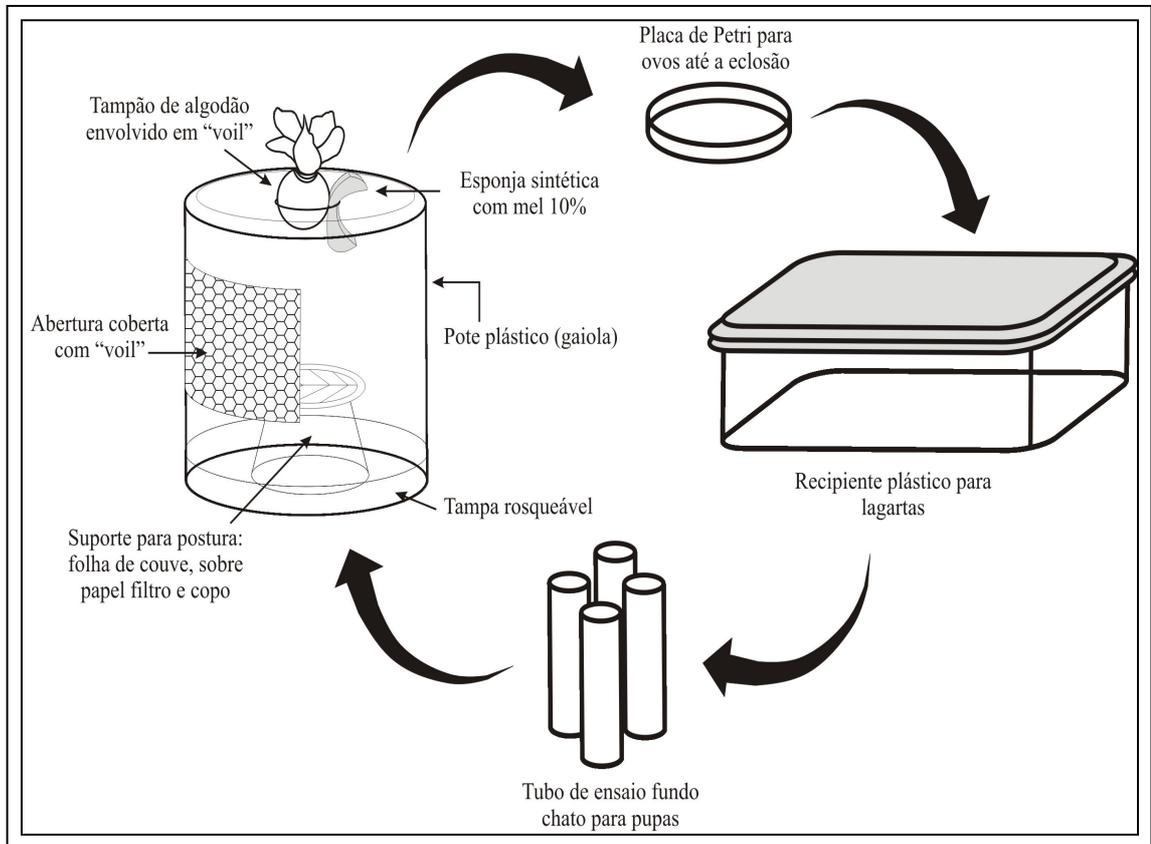


Figura 1. Esquema de criação da traça-das-crucíferas desenvolvido por THULER (2006), baseado na metodologia de BARROS (1998).

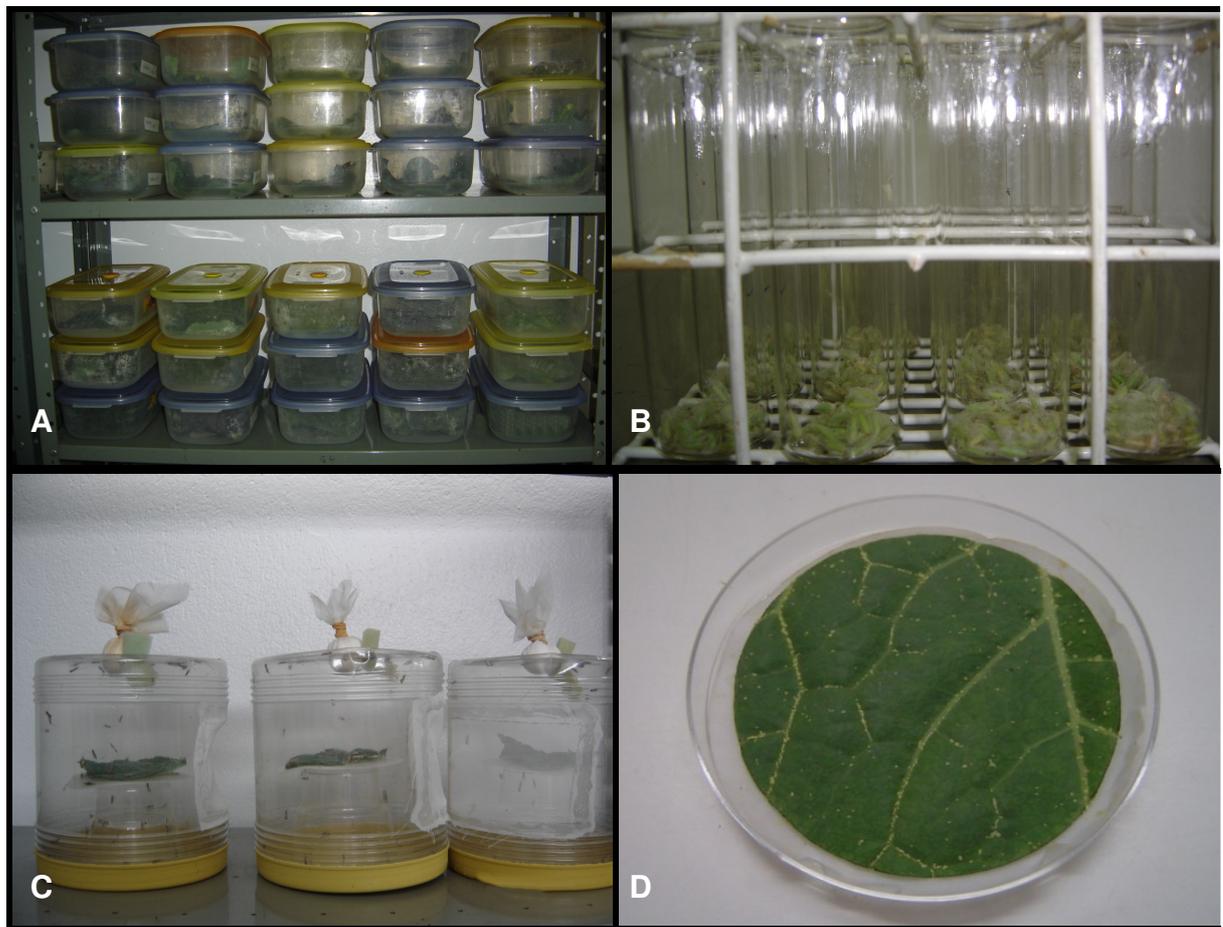


Figura 2. A) Manutenção das lagartas; B) Manutenção das pupas; C) Manutenção dos adultos; D) Manutenção dos ovos (THULER, 2006).

2.6. Bioensaio com isolados de *B. thuringiensis* contra lagartas da traça-das-crucíferas

O bioensaio foi realizado com 58 isolados de *B. thuringiensis*, os quais demonstraram apresentar os genes para controle de lepidópteros.

Para o preparo da suspensão esporo/cristal os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD-1 (Lepidoptera-específico) e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Coleoptera-específico), foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura Agar Nutriente

“NA” (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Ágar 15g/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 em câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998) para padronização a uma concentração de 3×10^8 esporos/ml, constituindo a suspensão testada no bioensaio.

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, e uma pulverização contendo água com Tween como testemunha. A pulverização foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25lbf/pol², sob capela de exaustão. Após a secagem, por duas horas, em condição ambiente, os discos foram colocados individualmente em placas de Petri sobre papel filtro levemente umedecido com água. Sobre cada disco foliar colocou-se 12 lagartas de *P. xylostella* de segundo ínstar para alimentação (Figura 3).

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, sendo que a primeira avaliação foi feita com 24 horas, devido ao modo de ação da bactéria, e as demais diariamente até o início da formação da pré-pupa.

Avaliou-se a mortalidade e o período larval. Para os dados obtidos foi feita uma análise exploratória dos dados (Multivariada), aplicando-se a análise discriminante, utilizando-se o programa computacional STATISTICA (data analysis software system), version 7.0, 2004.



Figura 3. Seqüência do bioensaio com *Bacillus thuringiensis* em lagartas de *Plutella xylostella*: A: suspensão esporos/cristais em tubo Falcon; B: capela de exaustão para pulverização associada ao compressor; C: pistola pulverizando a suspensão sobre o disco de couve; D: secagem dos discos sob condições ambiente; E: placas de Petri para o confinamento; F: experimento em sala climatizada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização molecular

Com a utilização do iniciador geral *gral-cry1*, foi possível identificar produto de amplificação para o gene *cry1*, indicando que a maioria dos isolados estudados apresentaram o conteúdo gênico efetivo para lepidópteros (Figura 4 e apêndice A).

O conteúdo das subclasses estudadas para o gene *cry1* foi determinado para 58 isolados, o que representa 60% do total (95 isolados), os quais foram: T3A.140, T3A.259, T08.024, E1, T20.002, 49.19A, E2, T07.196, 153.30A, 48.1A, 83.26A, 100.27A, 97.27A, E26, E22, E28, E41, E42, E40, E20, E43, E15, E7, E39, 22.7L, E49, E48, 20.7L, E50, 2.7L, 1.7L, 24.7L, E47, E44, E45, 12.7L, 11.7L, E46, 15.7L, 7.7L, 19.7L, 48.7L, 45.7L, 27.7L, 47.7L, 29.7L, 37.7L, 43.7L, 38.7L, T14.004, 32.7L, 40.7L, 44.7L, 39.7L, 42.7L, 41.7L, 26.7L e 46.7L.

Estes isolados amplificaram fragmentos de DNA quando se utilizou os iniciadores específicos para as subclasses do gene *cry1*: *cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Ea*, *cry1Fa*, *cry1Ab*, *cry1Ae*, *cry1Bd* e *cry1Ac*. Os iniciadores específicos foram elaborados no LGBBA pelo “software” Gene Runner e revelaram padrões de amplificação distintos, proporcionando bandas visíveis para cada gene entre os diferentes isolados de *B. thuringiensis*, como podem ser visualizados na Figura 4. O produto amplificado com esses iniciadores apresentaram o tamanho esperado, com uma variação de aproximadamente 522 a 1050 pares de bases, para as referidas subclasses.

O conjunto gênico *cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Fa* e *cry1Bd* é a frequência mais comum para 26 isolados (27,4%) (Figura 4B, 4C, 4D, 4F e 4G). Como também, em um estudo feito com isolados da Espanha, os autores constataram que *cry1Aa* apresentava uma frequência de 49%, seguido dos genes *cry1D* e *cry1C*, com 35 e 34%, respectivamente (FERRANDIS et al., 1999). Quando se utilizou iniciadores específicos para os genes *cry1Ea* e *cry1Ae*, apenas 9 dos isolados apresentaram produto de amplificação, o que significa que estes genes tem uma probabilidade muito baixa de serem encontrados (Figura 4I e 4H e Apêndices H e I), apesar que alguns trabalhos já relataram a existência de isolados contendo o gene *cry1Ea* (LOGUERCIO et al., 2001; HERNADÉZ, et al., 2004). No entanto, 41% dos isolados apresentaram banda para o

gene *cry1Aa* e 39% para o gene *cry1Bd* (Apêndices B e C). Estes resultados também foram constatados por ARANGO et al., (2002), em que os genes *cry1Aa* e *cry1B* foram muito comuns nos diferentes isolados da Colômbia, como também *cry1Ab* e *cry1Ac*.

Nos isolados 49.19A, T08.024, E1, E7, 1.7L, 20.7L e 26.7L foram observados fragmentos de 1035, 640 e 612pb, indicando presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* (Figura 4), os quais representam o conteúdo genético da linhagem padrão utilizada como controle positivo, *B. thuringiensis* var. *kusrtaki*, específico para lepidópteros (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Este conteúdo foi considerado o mais abundante em isolados de coleções do México, Colômbia e China e estas, por sua vez, são direcionadas para pesquisas que envolvem testes com insetos-praga de interesse agrícola, como novas alternativas de controle (CHILCOTT et al., 1998; ARANGO et al., 2002; HERNADÉZ et al., 2004). Este trabalho também teve este objetivo, pois com a determinação do tipo de gene *cry1*, baseado no estudo da PCR, é possível direcionar os trabalhos de bioensaio.

As subclasses estudadas demonstram serem muito freqüentes na maioria dos isolados, sendo que dos 58 isolados contendo genes *cry1*, 11 continham combinações de 6 genes analisados. Esta alta freqüência de genes *cry1* também foi observado em análise de diferentes coleções de isolados de *B. thuringiensis*, como foi detectado na coleção do México por BRAVO et al. (1998). Eles também relataram que a caracterização desta coleção de *B. thuringiensis* é valiosa, uma vez que, pode ajudar na compreensão do papel desta bactéria no ambiente, pois a sua distribuição pode ter relação direta com insetos específicos.

VILLAS-BÔAS & LEMOS (2004) estudaram uma coleção brasileira com 218 isolados de *B. thuringiensis* constatando que o gene *cry1* foi o mais abundante, afirmando que a diversidade genética desta bactéria resulta da influência de fatores ecológicos diferentes e pela conquista de habitats variados. Esta consideração também pode ser atribuída aos isolados deste trabalho, pois a variação da freqüência gênica observada está relacionada com a procedência das coleções estudadas.

Os isolados desta pesquisa foram coletados em locais onde estão mantidas as coleções originais, como também em outras regiões do Brasil, porém, estas

informações não estão disponíveis. É necessário ressaltar que são isolados provenientes de regiões brasileiras com diferentes condições climáticas, e que apresentam uma grande quantidade de genes da família *cry1* que podem ser utilizados no desenvolvimento de programas de controle de diversos lepidópteros-praga.

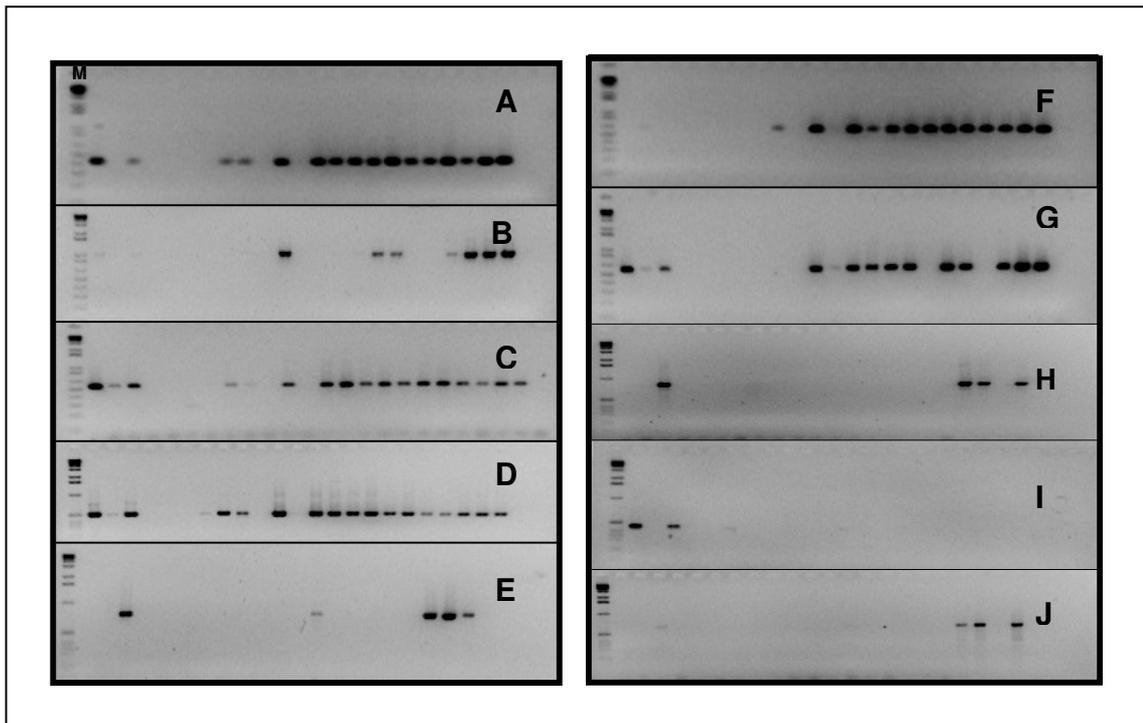


Figura 4. Partes dos eletroforogramas dos produtos obtidos por PCR para isolados de *Bacillus thuringiensis* com fragmentos amplificados para iniciador geral e específicos: **Gral *cry1* (A)** com os isolados E1, E7, E15, E20, E26, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49 e E50. Os específicos para as subclasses: ***cry1Aa* (B)** com os isolados, E26, E43, E44, E47, E48, E49 e E50; ***cry1Ca* (C)** com os isolados E1, E2, E7, E22 E26, E28, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49 e E50; ***cry1Bd* (D)** com os isolados E1, E2, E7, E15, E20, E26, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49 e E50; ***cry1Ab* (E)** com os isolados 49,19A, 100.27A, T08.024, T07.196, e T14.034; ***cry1Da* (F)** com os isolados E26, E28, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49 e E50; ***cry1Fa* (G)** com os isolados E1, E2, E7, E28, E40, E41, E42, E45, E46, E48, E49 e E50; ***cry1Ae* (H)** com os isolados 49,19A, T07.196, T08.024 e T14.034; ***cry1 Ea* (I)** com os isolados E1 e E7; ***cry1 Ac* (J)** com os isolados T07.196, T08.024 e T14.034. **M:** Marcador Molecular 1Kb Plus DNA.

3.2. Bioensaio com isolados de *B. thuringiensis* contra lagartas da traça-das-crucíferas

O bioensaio foi realizado com os 58 isolados que apresentaram produto de amplificação para os genes específicos para Lepidoptera. Estes isolados causaram níveis variados de mortalidade, então, para a melhor discussão dos resultados foi feita uma classificação da mortalidade em três intervalos com base nos valores expressos pela patogenicidade.

Do total de isolados testados 26 causaram em média 75,14% de mortalidade das lagartas de *P. xylostella*, com intervalo de 47-100%, que foram classificados num grupo de Alta mortalidade (A). Os demais causaram mortalidades menores, variando de 26-46%, classificados no grupo (M) com média de 36,8% de mortalidade, e o terceiro grupo com intervalo de mortalidade de 8-26% classificados no grupo (B) de Baixa mortalidade com média de 18,67% de mortalidade (Tabela 4). Nesta tabela, é possível verificar também que as subclasses do gene *cry1* se distribuíram por todos os grupos de mortalidade.

Os isolados do grupo A apresentam praticamente os mesmos genes, no entanto, os isolados T20.002 e o 83.26A demonstraram ter apenas uma subclasse, o gene *cry1Aa* e causaram 68,3 e 66,7% de mortalidade, respectivamente (Tabela 4). Porém, este gene também demonstra ser o único presente no isolado 48.1A do grupo B, no qual se encontra a menor média de mortalidade. Provavelmente, este gene pode estar associado ou mesmo ocorrendo em competição com outros genes, pelos sítios receptores no epitélio intestinal dos insetos.

MEYER et al. (2001) também observaram que o gene *cry1Aa* não foi efetivo contra duas espécies de lepidópteros de famílias diferentes: *P. xylostella* e *Pectinophora gossypiella* (S.) (Lepidoptera: Gelechiidae) e afirmaram que esta proteína não é ativa para diversos lepidópteros-praga. ZHAO et al. (2000) também estudaram gene *cry1A* para estas pragas e afirmaram que o sítio receptor no epitélio intestinal é o principal mecanismo de resistência. Esta afirmação também pode ser atribuída para o gene *cry1F* em relação somente a *P. xylostella* (ZHAO et al., (2000).

A frequência gênica *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, ou pelo menos um gene dela, foi a mais observada para os isolados do grupo A, sendo estes os genes presentes no controle positivo, linhagem padrão, *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* HD-1(Tabela 4).

O isolado E22 é uma exceção, demonstrando não ter os genes do controle positivo, sendo seu conteúdo genético apresentado pelo produto de amplificação da PCR foi *cry1Ca*, *cry1Ae* e *cry1Bd*, causando 100% de mortalidade (Tabela 4). No entanto, a eficiência deste isolado pode estar associada aos três genes ou não, pois através do estudo de PCR não é possível verificar se todos os genes estão sendo expressos.

KHAN et al. (2005) realizaram bioensaios com isolado de *B. thuringiensis* contra duas populações de *P. xylostella*, uma de laboratório e outra de campo, e concluíram que os insetos oriundos do campo estavam resistentes às toxinas *cry1Ca* e *cry1Ac*, as quais representam o conteúdo gênico deste isolado; também relataram que a principal causa da resistência deve ser atribuída ao manejo inadequado do plantio de onde se coletou os insetos para o teste. Estes resultados são confirmados por GILLILAND et al. (2002), que fizeram a mesma observação para fases larvais de *Agrotis ipsilon* (H.) (Lepidoptera: Noctuidae). Porém, para os dois outros genes verificados no isolado E22 (*cry1Ae* e *cry1Bd*) não foram encontrados relatos de resistência para traça-das-crucíferas, principalmente para o segundo gene, que ainda não é muito referenciado.

Foi discutido no item anterior que o gene *cry1Ae* apresentou pouca frequência, ou seja, poucos isolados demonstraram sua presença. No entanto, no caso do isolado E22, ele pode ter contribuído para a alta toxicidade. Para o gene *cry1Bd*, que apresentou alta frequência no conteúdo genético da maioria dos isolados, há um favorecimento do efeito tóxico dos isolados que o apresentam.

Os genes *cry1Da*, *cry1Ca* e *cry1Fa* demonstraram grande abundância entre os isolados dos três grupos. Em 1998, BRAVO et al. relataram que toxinas pertencentes ao grupo Cry1C e Cry1D apresentaram eficiência no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). No entanto, LUO et al. (1999) observaram baixa eficiência para a mesma praga, usando subclasse *cry1Ca*. Já para o gene *cryF* foi verificada resistência para *P. xylostella* (ZHAO et al., 2000) e para o gene *cry1Da*

pouca toxicidade (´LEZ-CABRERA et al., 2001). Dessa forma, pode-se observar que a toxicidade de cada gene pode ter efeitos diferentes entre espécies de lepidópteros, como também variar entre populações usadas nos diversos bioensaios das pesquisas (SAYYED et al., 2005).

É importante ressaltar que para os isolados de todos os grupos que apresentaram conteúdo gênico semelhante, mas não a mesma eficiência contra lagartas da traça, poderia estar existindo ação sinérgica de outros genes que o produto da PCR não demonstrou, como também competindo pelo sitio receptor. 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 que este fator é determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (POLANCZKY & ALVES, 2003).

Os receptores geralmente são específicos para determinadas toxinas Cry, sendo que para algumas espécies já foram identificados os que estão presentes na microvilosidades apicais do intestino médio. Para diversos lepdópteros e inclusive para a traça-das-crucíferas foram identificadas várias N-aminopeptidases (glicoproteína) como o principal receptor para Cry1 (GÓMES et al., 2001).

A traça-das-crucíferas foi o primeiro inseto para o qual observaram-se populações de campo resistentes aos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*, principalmente o Dipel® (TABASHNIK et al., 1997; HERRERO et al., 2001; CASTELO BRANCO et al., 2003). No entanto, os isolados do grupo A (Tabela 4) causaram altos níveis de toxicidade contra esta praga, apresentando possivelmente os mesmos genes presentes naquele produto. Por outro lado, como relatado anteriormente, pode ser que outros genes que o isolado contenha estejam contribuindo para esta toxicidade.

Para confirmar a mortalidade causada pelos isolados do grupo A, cita-se o trabalho de ´LEZ-CABRERA et al. (2001) que observaram que *cry1Ab* e *cry1Ac* ainda são muito tóxicos contra *P. xylostella*, e que a variação da suscetibilidade é um parâmetro genético, porém está diretamente relacionada com a origem da população. Entretanto, os resultados prévios de SAYYED et al. (2005) indicaram resistência da traça às toxinas codificadas por *cry1Ab* e *cry1Ac* em populações de campo e atribuiu

que existe a possibilidade desta resistência ser de caráter dominante, o que deve ser levado em conta ao considerar áreas de refúgio, uma estratégia de manejo de resistência.

Pode ser constatado que os genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* são extremamente abundantes, tanto em isolados de *B. thuringiensis* testados em diversos bioensaios, como em produtos formulados, o que leva a concluir que a resistência está diretamente relacionada com o manejo da cultura, pois a suscetibilidade é muito vulnerável ao uso excessivo de uma mesma estratégia de controle.

Outro fator a considerar é que a técnica da PCR não permite afirmar se todos os genes estão sendo expressos nos isolados estudados, ou se algum está sendo bloqueado por ação de outro. Assim, o conteúdo genético destes isolados que causaram alta mortalidade precisa ser verificado mais detalhadamente para afirmar quais são as toxinas envolvidas ou mesmo se a população testada é suscetível.

Tabela 4. Distribuição dos isolados e linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis* em diferentes grupos de mortalidade para lagartas de *Plutella xylostella* e combinações específicas de subclasses de gene *cry1*.

Isolado	Mortalidade		Frequência do gene <i>cry1</i>	Média do intervalo de mortalidade (%)
	Média %	Grupo		
TEST	8,0	B		
97.27A	10,0	B	<i>Bd</i> ;	
48.A	15,0	B	<i>Aa</i>	
E20	18,3	B	<i>Bd</i>	
32.7L	20,0	B	<i>Da</i>	18,67% (8-26%) (B: BAIXA MORTALIDADE)
24.7L	21,7	B	<i>Aa; Ca; Ab; Bd</i>	
E15	23,3	B	<i>Ea</i>	
47.7L	25,0	B	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd; Ac</i>	
100.27A	26,7	B	<i>Ab</i>	
15.7L	26,7	M	<i>Bd</i>	
29.7L	26,7	M	<i>Ea; Ab</i> ;	
37.7L	28,3	M	<i>Bd</i>	
E41	30,0	M	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd; Ac</i>	
12.7L	31,7	M	<i>Aa; Da; Fa; Bd</i>	
TENEBRI	35,0	M		
43.7L	36,7	M	<i>Aa; Da; Bd</i>	
153.30A	38,3	M	<i>Fa</i>	
E39	38,3	M	<i>Aa; Ea; Fa</i> ;	
11.7L	38,3	M	<i>Da; Fa; Bd</i>	
38.7L	38,3	M	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd; Ac</i>	
E40	40,0	M	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
E42	41,7	M	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
27.7L	41,7	M	<i>Bd</i>	36,8% (27- 47%) (M: MÉDIA MORTALIDADE)
7.7L	43,3	M	<i>Ca; Da; Ea; Ab; Bd</i>	
45.7L	43,3	M	<i>Aa; Ca; Da; Fa</i>	
19.7L	46,7	M	<i>Ea</i>	

Tabela 4. Continuação.

Isolado	Mortalidade Média%	Grupo	Frequência do gene <i>cry1</i>	Média do grupo de cada intervalo de mortalidade (%)
E7	48,3	A	<i>Aa; Ca; Ea; Ab; Ae; Ab; Fa; Bd; Ac</i>	
E46	48,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
40.7L	48,3	A	<i>Aa; Da; Bd</i>	
E43	53,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
46.7L	53,3	A	<i>Ca; Da; Fa; Bd</i>	
E44	55,0	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Ab; Bd</i>	
E28	56,7	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
48.7L	56,7	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa</i>	75,14% (47 a 88%)
E49	58,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	(A: ALTA MORTALIDADE)
E47	60,0	A	<i>Aa; Ca; Da; Bd</i>	
T14.004	60,0	A	<i>Aa; Ca; Ab</i>	
E48	61,9	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
44.7L	63,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
		A	<i>Aa; Ca; Da; Ea; Fa; Ab; Bd; Ac</i>	
26.7L	63,3			
42.7L	65,0	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
83.26A	66,7	A	<i>Aa</i>	
41.7L	66,7	A	<i>Aa; Da; Fa; Bd</i>	
T20.002	68,3	A	<i>Aa</i>	
E45	68,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Bd</i>	
		A	<i>Aa; Ca; Fa; Ab; Ae; Bd; Ac</i>	
20.7L	73,3			
E50	73,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bc</i>	
39.7L	73,3	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Bd</i>	
T07.196	88,3	A	<i>Ca; Ab</i>	
22.7L	100,0	A	<i>Aa; Ca; Ae; Ab; Bd</i>	
HD-1	100,0	A	<i>Aa; Ab; Ae</i>	
T3A.140	100,0	A	<i>Ae; Ac</i>	
T3A.259	100,0	A	<i>Ca; Ae; Ac</i>	
		A	<i>Aa; Ca; Fa; Ab; Ae; Bd; Ac</i>	
T08.024	100,0	A	<i>Aa; Ca; Ea; Fa; Ab; Ae; Bd; Ac</i>	
E1	100,0			
49.19A	100,0	A	<i>Aa; Fa; Ab; Ae; Bd; Ea</i>	
E2	100,0	A	<i>Aa; Ca; Fa;</i>	
E26	100,0	A	<i>Aa; Da; Bd</i>	
E22	100,0	A	<i>Ca; Ae; Bd</i>	
2.7L	100,0	A	<i>Aa; Ca; Da; Fa; Ab; Bd</i>	
1.7L	100,0	A	<i>Aa; Ca; Ea; Ab; Bd; Ac</i>	

A maior ou menor eficiência de mortalidade causada pelos isolados não pôde ser associada com a presença ou ausência das subclasses específicas para lepidópteros, entretanto, é possível, através de uma análise multivariada do tipo discriminante, estabelecer modelos matemáticos que buscam interagir estas variáveis e estabelecer funções discriminantes, as quais poderão agilizar o trabalho de condução de bioensaios, selecionando com mais rapidez o grau de toxicidade de cada isolado de *B. thuringiensis* presente em banco de germoplasmas de muitos laboratórios.

A partir das variáveis observadas na caracterização molecular, como a presença ou ausência das subclasses do gene *cry1* e das variáveis do bioensaio, como Mortalidade Larval (ML) e Duração Larval (DL), e também da classificação prévia dos isolados com base no intervalo de mortalidade, desconsiderando os que causaram 100% de mortalidade, obteve-se condição de realização da análise discriminante para este trabalho, que forneceram modelos que discriminam cada grupo de mortalidade.

Os dados da Tabela 5 apresentam as funções discriminantes obtidas e que representam a classificação prévia dos isolados com alta, média ou baixa mortalidade de lagartas de *P. xylostella*. Portanto, são funções que permitirão selecionar isolados de diversas coleções que poderão ser efetivos contra lepidópteros-praga, desde que disponham das variáveis já mencionadas, para substituição no modelo. Cada função da Tabela 4 poderá ser escrita no seguinte esquema de equação:

$$Y = a_1(ML) + a_2(DL) + a_3(cry1Aa) + a_4(cry1Ca) + \dots + a_{11}(cry1Ac) + \text{constante};$$

onde o valor de Y representa o valor de mortalidade previsto para cada grupo e a_1, a_2, \dots parâmetros do modelo.

O gráfico representado na Figura 5, obtido com as respectivas funções da Tabela 5, revela distintamente os três grupos de mortalidade: o grupo A e o B com porcentagem de discriminação (acerto) de 100% e o grupo M com 94,44% de discriminação. No grupo B da Figura 5 aparece uma seta mostrando o erro do grupo M, pois a análise classificou o isolado como sendo de baixa mortalidade. Portanto, a representação gráfica é a confirmação da aplicabilidade do modelo, pois a porcentagem

de discriminação foi muito boa, representando claramente a distinção dos grupos; e concordando com o que foi relatado por alguns autores, em que as funções discriminantes obtidas são combinações de variáveis que melhor discriminam grupos definidos previamente (REIS, 1988; MARCUS, 1990; HAIR et al., 2005). Assim, a análise discriminante mostrou eficiência na discriminação de grupos.

Com estas funções discriminantes, além de agilizar os trabalhos de seleção de isolados de *B. thuringiensis*, também tem-se como objetivo mostrar mais uma ferramenta confiável para seleção de novos isolados, em especial para grandes bancos de germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos, não somente para ordem Lepidoptera, como também para outras ordens de insetos. Dessa forma, as coleções poderão ter um pré-diagnóstico do material que possuem para a condução de pesquisas, tanto para novos bioinseticidas como, até mesmo, para outros trabalhos da engenharia genética, a exemplo de plantas transgênicas.

É necessário enfatizar que as funções determinadas neste trabalho se basearam na classificação de mortalidade estabelecida (Tabela 4), pois para que novos isolados sejam selecionados a partir destas funções, é preciso que os pesquisadores estejam cientes sobre os intervalos de mortalidade a serem utilizados na criação dos modelos. A aplicação dessas funções requer apenas dados da presença e ausência das subclasses do gene *cry1* já mencionadas neste trabalho e dos dados de ML e DL.

Para coleção que disponha de mais subclasses do gene *cry*, faz-se necessário a elaboração dos seus próprios modelos matemáticos.

Tabela 5. Resultados originados pelo modelo matemático da análise discriminante para classificação de cada grupo de mortalidade de *Plutella xylostella* em função das variáveis Mortalidade Larval (ML), Duração Larval (DL) e subclasses do gene *cry1* de *Bacillus thuringiensis*.

Variáveis	GRUPO B	GRUPO M	GRUPO A
ML	-9,7391	-3,31576	5,98244
DL	-0,0184	0,19411	-0,14552
<i>cry1Aa</i>	-0,0648	0,44407	-0,32499
<i>cry1Ca</i>	-2,1299	-1,25736	1,72487
<i>cry1Da</i>	-1,1097	-0,17524	0,52313
<i>cry1Ea</i>	-3,0812	-0,39306	1,37934
<i>cry1Fa</i>	-0,2973	0,43506	-0,23707
<i>cry1Ab</i>	1,0083	-0,23749	-0,16484
<i>cry1Ae</i>	-0,5154	-0,17497	0,31620
<i>cry1Bd</i>	-0,1724	-0,17007	0,19306
<i>cry1Ac</i>	0,6609	0,16346	-0,35780
Constante	-11,0227	-2,06641	-3,88319
% de discriminação	100	94,44	100

* GRUPOS DE MORTALIDADE: B-BAIXA; M-MÉDIA; A-ALTA.

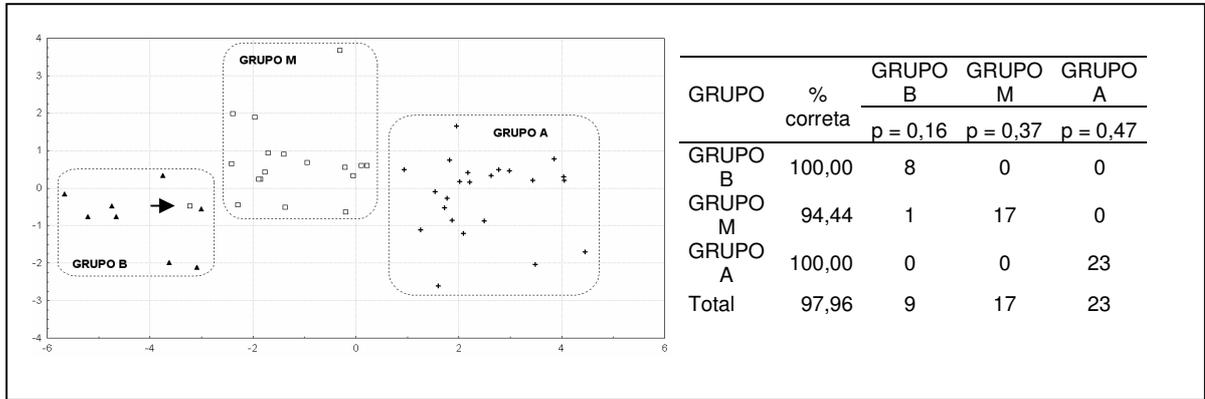


Figura 5. Gráfico contrastando as funções discriminantes dos grupos de mortalidade das lagartas de *Plutela xylostella* causada por isolados e linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis*.

De modo geral, a caracterização molecular através da técnica por PCR proporciona uma resposta rápida sobre a presença ou ausência dos genes *cry*, mas não inferem se os genes são expressos ou não. Assim, um gene detectado pode estar interrompido, mutado ou sob controle de um promotor defectivo, ou então, estar presente em níveis muito baixos não contribuindo para o efeito letal do isolado. Além desta técnica, o emprego do bioensaio é o teste mais importante para definir a toxicidade de um isolado de *B. thuringiensis* e, dessa forma, selecionar o isolado com eficiência para controle da praga.

Para fins de seleção, os isolados do grupo A atingiram altos níveis de mortalidade, proporcionando uma média de 75,14% de mortalidade, sendo índice suficiente para ser considerado promissor no controle biológico da traça-das-crucíferas, ressaltando-se que dentro deste grupo existem isolados com potencial de 100% de mortalidade.

4. CONCLUSÕES

- Através da caracterização molecular pela técnica da PCR constatou-se grande variação de subclasses do gene *cry* específicas para lepidópteros em praticamente todos isolados estudados;
- No geral, a maioria dos isolados selecionados para lepidópteros apresenta grande potencial para controle da *P. xylostella*;
- A análise discriminante pode ser utilizada como excelente ferramenta para seleção prévia de isolados para controle dos insetos-praga, de forma rápida e segura.
- Os isolados que demonstraram eficientes para controle da devem ser estudados sob condições de campo;
- A caracterização molecular através da técnica da PCR associada com o bioensaio são fundamentais para obtenção rápida de informações precisas de novos isolados de *B. thuringiensis*, em relação a diversas pragas agrícolas.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MORAES, S.B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-778.

ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 92, n. 3, p. 466-474, 2002,

BARRANTES, A. J. A.; RODRIGUEZ, V. C. L. Abundancia estacional y dano de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) y el cultivo de repollo, durante la epoca seca en Alfaro Ruiz, Alajuela, Costa Rica. **Manejo Integrado de Plagas**, Chillan, v. 39, p. 17-24, 1996.

BARROS, R. **Efeito de cultivares de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* (L.) na biologia da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) e do parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879**. 1998. 98f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C. P. Alexandre Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n.3, p.587-616, 1992.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVERUS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p. 4965-4972, 1998.

CASTELO BRANCO, M. Associação de armadilhas de feromônio e número de machos coletados para a redução do uso de inseticidas no controle da traça das crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, p.280, 1999.

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

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.

CHILCOTT, C. N.; BROADWEL, A.; WIGLEY, P. J. Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 in New Zealand. **Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v. 26, p. 63-68, 1998.

FERRANDIS, M. D.; JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Microbiology Systems Applied**, Löbdergraben, v. 22, n. 2, p. 179-185, 1999.

GILLILAND, A. ; CHAMBERS, C. E.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.4. p. 1509–1515, 2002.

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

GÓMES, I.; OLTEANS, D. I.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 246, n. 31, p. 28906-28912, 2001.

GORDON, R. E.; HAYVES, W. C.; PANG, C. H. N. **The Genus *Bacillus***. Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture, 1973. 283 p. (Agriculture Handbook, n. 427).

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 600p.

HERNÁNDEZ, C. S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 85, p. 182-187, 2004.

HERRERO, S. S.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Mannose Phosphate Isomerase Isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidoptera species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 979-981, 2001.

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.

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

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

LOGUERCIO, L.; SANTOS, C. G.; BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 362-367, 2001.

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M. J. Toxicity, binding and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 &-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.2, p. 457-464, 1999.

MARCUS, L. Traditional morphometrics. In: ROHLF, F.J.; BOOKSTEIN, F.L. (Eds.). **Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop**. The University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, Michigan. 1990. p.77-122.

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.

MEYER, S.; TABASHNIK, B. E. ; LIU, Y. B.; WIRTH, M. C.; FEDERICI, B. A. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* lacks toxicity to susceptible and resistant larvae of

diamondback moth (*Plutella xylostella*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 462–463, 2001.

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.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montecillo, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

REIS, S. F. dos. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 250p.

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

SOUZA, M.T. de; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, Mendoza, v.23, n. 1, p.43-49, 1999.

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

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

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

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 Meio Ambiente, v. 1, p.201-230, 1998.

VILLAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004.

ZHAO, J. Z.; COLLINS, H. L.; TANG, J. D.; CAO, J.; EARLE, E. D.; OUSH, R. T.; HERRERO, S.; ESCRICHE, B.; FERRE', J.; SHELTON, A. M. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of *cry1c*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3784–3789, 2000.

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, n. 5, p.1814-1819, 1997.

CAPÍTULO 3 - EFEITO DE NOVOS ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EM *Plutella xylostella* (L., 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

1. 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., 2004). 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 se devem 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 protéicas 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 da eficiência do *B. thuringiensis* ser comprovada para diversas pragas de diferentes ordens, tem sido relatado 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), 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 a base de *B. thuringiensis*, o uso de outras táticas de controle como os semioquímicos, visando a redução dos riscos de resistência, devido ao menor número de aplicações do bioinseticida (MAXWELL et al., 2006).

Cerca de 50.000 isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e atualmente diversos estudos de laboratório no mundo se destinam 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 difícil 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 da praga.

2. 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 FCAV – UNESP - Campus de Jaboticabal, SP.

As metodologias empregadas no preparo da suspensão esporos/cristais, na criação e manutenção da traça e na condução do bioensaio estão descritas nos itens 2.5 e 2.6 do capítulo 2.

As avaliações foram realizadas com 24 horas após a exposição das lagartas a couve tratada e as demais diariamente, para o acompanhamento da fase larval até a fase pupal. As pupas foram pesadas individualmente e colocadas em placas plásticas tipo ELISA[®], 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 escuros e menores; também foi observada a morfologia da região final do abdome, aonde 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.

Avaliou-se a mortalidade e duração do período larval e pupal, peso de pupas e razão sexual. Para os dados obtidos foi feita uma análise exploratória dos dados (Multivariada), aplicando-se a análise de agrupamento (AA) e a análise dos componentes principais (ACP), utilizando o programa computacional “STATISTICA 7.0 version”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 58 isolados testados em lagartas de *P. xylostella*, 11 causaram 100% de mortalidade dentro de 24 - 48 horas, sendo eles: 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 no 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 foram perda do apetite, diminuição dos movimentos até a paralisação, corpo flácido, perda de agilidade e movimentos vagarosos, sem reação ao toque. 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 a biologia da praga (Figura 1).

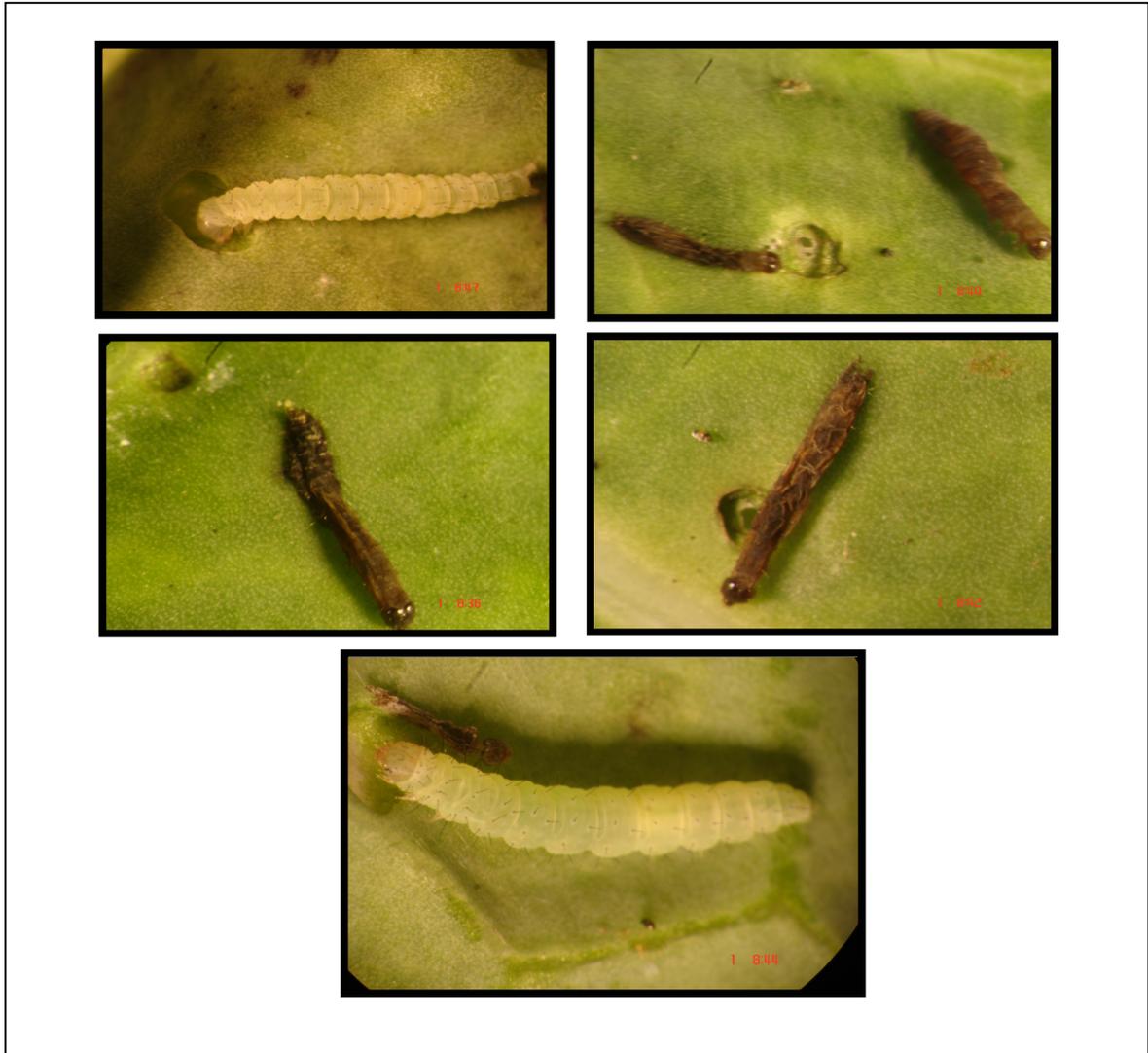


Figura 1. Sintomatologia apresentada pelas lagartas de *Plutella xylostella* contaminadas com *Bacillus thuringiensis*: mudança da cor do tegumento de verde brilhante para amarelo-escuro a marrom-escuro, sem brilho.

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. Após 6 horas de contaminação as lagartas torna-se flácida e pára totalmente de se movimentar. Estes aspectos da sintomatologia foram observados por diversos autores desde 1959, em lagartas, cujos resultados são concordantes com os deste trabalho (HEIMPEL & ANGUS, 1959; SILVA & CARVALHO, 2004).

Os isolados estudados que ocasionaram baixa mortalidade, ou seja, não causaram 100% de mortalidade, influenciaram diretamente a 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* em lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) e observaram que a maior parte deles apresentaram efeito negativo no crescimento, 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 2, grupo B), sendo estes os que proporcionaram pequena influência na biologia da praga, permitindo que o inseto completasse o ciclo biológico.

Os demais isolados ficaram no grupo A (Figura 2, grupo A), dos que influenciaram negativamente de forma acentuada as características biológicas da praga, provocando maior duração do ciclo com baixo peso de pupas, ou seja, apesar das lagartas viverem mais, os isolados reduziram ou mesmo impediram a continuação de sua alimentação, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 3, estando a maior duração larval associada com os menores pesos de pupas. Os isolados que proporcionaram este efeito na biologia da praga, em condições de campo, poderão conduzir maior exposição das lagartas a outros inimigos naturais, bem como geração de adultos

menos viáveis. DEQUECH et al. (2005) fizeram um estudo em laboratório da interação entre o parasitóide *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 em maior mortalidade de lagartas e não influenciou nas características biológicas do parasitóide e na sua descendência. Resultados semelhantes foram obtidos por alguns autores como ULPAH & KOK (1996), BLUMBERG et al. (1997) e MONNERAT & BORDAT (1998).

Na Figura 2 pode ser observado também que os isolados mais próximos do eixo “y” foram os que mais influenciaram negativamente as 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.

Pela Análise das Componentes Principais (ACP) (Figura 3) é possível verificar as características biológicas que mais influenciaram os 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 influenciaram 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 3), indicam maior influência dos isolados nas características ML, MP e DL, agrupando os mesmos que se destacaram no grupo A (Figura 3). Os isolados do lado esquerdo, nos quadrantes negativos (Figura 3), influenciaram principalmente peso de pupa (PESO), RS e DP, agrupando-se com a testemunha e o controle negativo (Figura 4), como na Análise de Agrupamento (Figura 3, grupo B).

Os isolados localizados próximo ao vetor DL da Figura 3 promoveram maior duração do período larval e menor peso de pupas (Tabela3), 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 aqueles que menos influenciaram no peso das 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 morrem 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 com isolados e linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis* e não tratadas.

Tratamentos	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 lagartas de *Plutella xylostella* alimentadas com folhas de couve cv. Manteiga tratadas com isolados e linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis* e não tratadas.

Tratamentos	Duração Pupal (dias)	Mortalidade Pupal (%)
Testemunha	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 com isolados e linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis* e não tratadas.

Tratamentos	Razão Sexual	Peso de pupas (mg)
Testemunha	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

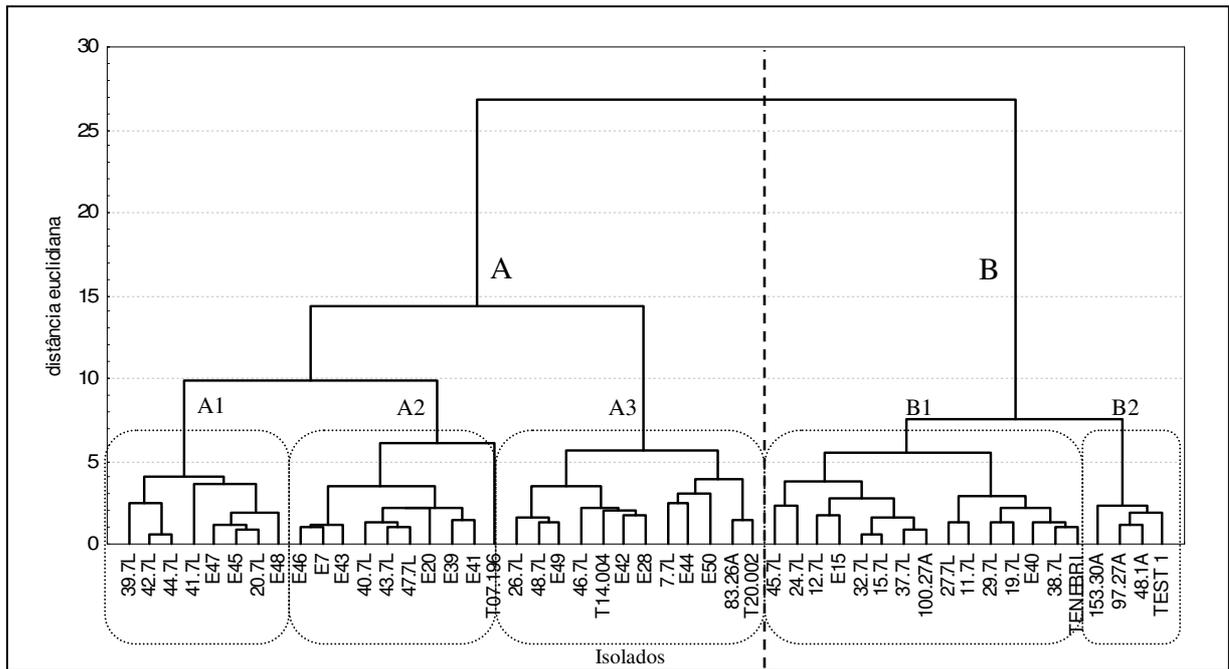


Figura 2. Dendrograma mostrando a estrutura de grupos resultantes da análise multivariada para ação de isolados e linhagem padrão (controle negativo) de *Bacillus thuringiensis* sobre *Plutella xylostella*.

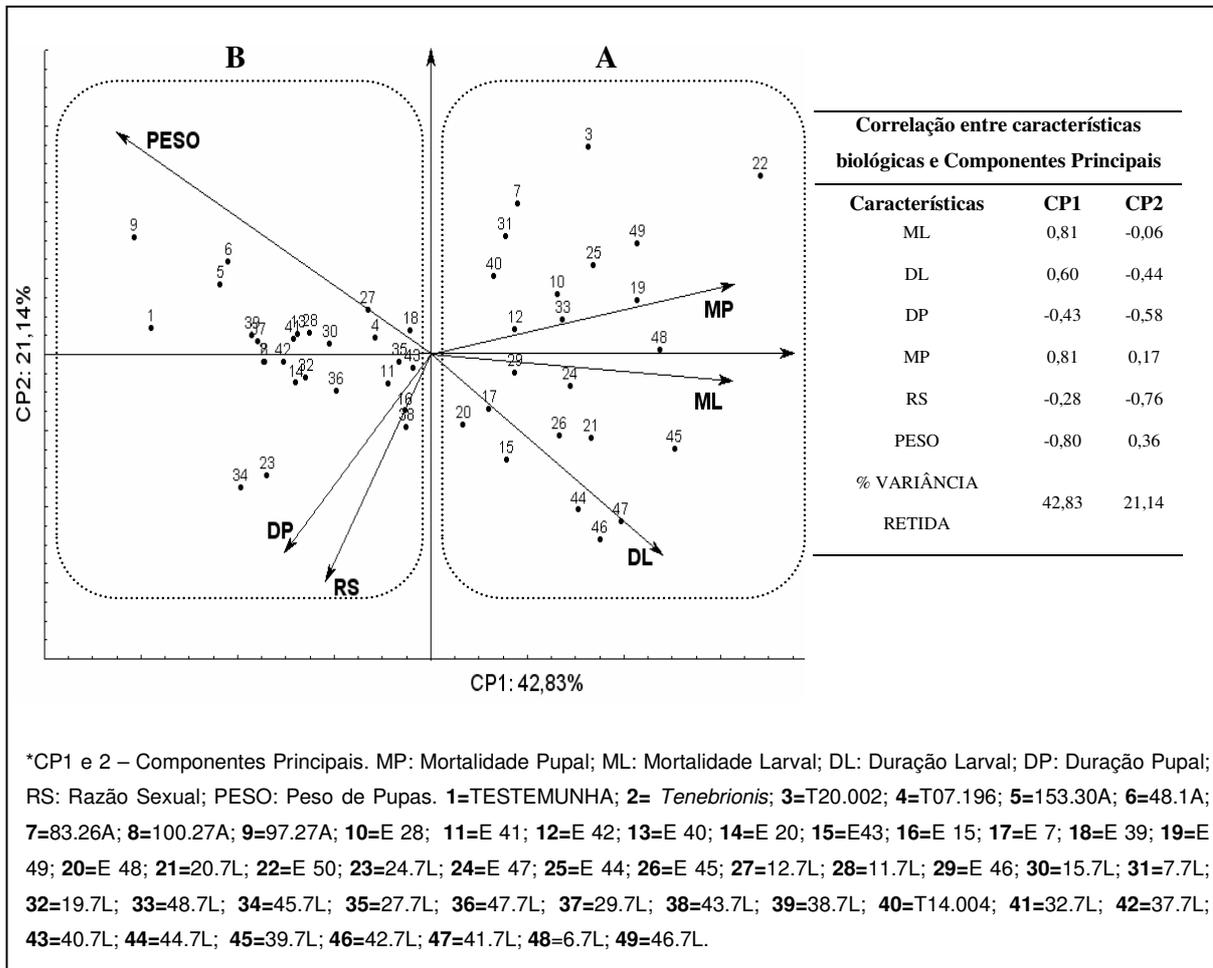


Figura 3. Distribuição dos isolados e da linhagem padrão (controle negativo) de *Bacillus thuringiensis*, segundo a análise de componentes principais de agrupamento, de acordo com as características biológicas avaliadas para *Plutella xylostella*.

4. CONCLUSÕES

- Onze isolados causaram 100% de mortalidade das lagartas em um curto período de tempo, apesar da alta patogenicidade para *P. xylostella*, é necessário a realização de testes em condições de campo para avaliar a efetividade desses isolados sob a ação dos fatores abióticos de ocorrência natural;
- Os isolados que não causaram alta mortalidade tiveram influência negativa sobre a biologia de *P. xylostella*, sendo os 30 isolados do grupo A, os quais apresentam potencial para utilização em programas de manejo integrado que não visem apenas à eliminação da praga, mais sim 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 influenciaram a biologia de *P. xylostella*.

5. REFERÊNCIAS

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. 1181-1186, 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 flavicineta* (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. **Comunicado Técnico**, Brasília, n. 74, 2002.

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**, Barquisimeto, 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-do-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 of 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 Meio Ambiente, v. 1, p.201-230, 1998.

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, n.5, p.1814-1819, 1997.

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

CAPÍTULO 4 - TEMPO LETAL E SOBREVIVÊNCIA DE LAGARTAS DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) TRATADAS COM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner

1. INTRODUÇÃO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é o principal fator redutor da produção de brássicas nos plantios comerciais em todas as regiões de cultivo do mundo (DICKSON et al., 1990; IMENES et al., 2002). No Brasil, a presença desta praga tem sido constatada praticamente durante todo o ano (BARROS et al., 1993), principalmente devido às condições climáticas que favorecem o rápido crescimento das populações (BARRANTES & RODRIGUES, 1996), aumentando consideravelmente o nível de dano, devido à possibilidade de sua multiplicação contínua (CASTELO BRANCO et al., 2003).

Devido ao alto potencial biótico da praga, o controle químico tem sido o mais utilizado por ser tratar de um método rápido e prático, no entanto, o aparecimento de populações da traça resistentes aos inseticidas tem ocorrido, dificultando o seu manejo (CASTELO BRANCO, 1999; IMENES et al., 2002). Diante da dificuldade de controle ocasionada pela resistência, alternativas têm sido buscadas por meio de métodos biológicos como o uso de parasitóides, predadores e microrganismos entomopatogênicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (DIAS et al., 2004).

Bioinseticidas à base desta bactéria são comercializados a mais de 50 anos e representam, atualmente, mais de 90% do mercado de produtos biológicos para o controle de insetos-praga das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (VALADARES-INGLIS et al., 1998; MONNERAT & BRAVO, 2000). Este bacilo é de ocorrência natural no solo, na água, em insetos mortos e em ambientes onde se armazena grão (MONNERAT et al., 1999).

Para insetos da ordem Lepidoptera, os produtos geralmente são formulados à base da linhagem HD-1 do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, sendo que o produto Dipel® ,formulado com esta linhagem, tem grande espaço no mercado mundial, com

eficiência para 170 lepidópteros-praga (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). No entanto, *P. xylostella* foi o primeiro inseto para o qual observou-se população de campo com altos níveis de resistência em respostas a tratamentos comerciais com *B. thuringiensis* (TABASHNIK et al., 1997; HERRERO et al., 2001).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar o Tempo Letal a partir da mortalidade de lagartas de *P. xylostella* causada por isolados de *Bacillus thuringiensis*, bem como avaliar a porcentagem de insetos sobreviventes durante diferentes períodos de exposição ao substrato contaminado.

2. 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 FCAV – UNESP - Campus de Jaboticabal, SP.

Foram utilizados 12 isolados e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, obtidos do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos, pertencentes à coleção do LGBBA, sendo que parte dos isolados são provenientes 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. Esses isolados foram selecionados com base no bioensaio do capítulo 2, sendo aqueles que mataram mais rapidamente as lagartas.

As metodologias empregadas no preparo da suspensão esporo/cristal dos isolados e na criação e manutenção de *P. xylostella* estão descritas nos itens 2.5 e 2.6 do capítulo 2.

Assim, para o bioensaio foram utilizados, para cada isolado, 2 discos de couve com diâmetro de 14 cm, que foram pulverizados com volume de 2,5 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 25lbf/pol², sob capela de exaustão. 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 colocou-se 30 lagartas de *P. xylostella* de segundo ínstar, para alimentação; totalizando 60 lagartas por isolado.

As avaliações foram feitas com 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 72 e 96 horas após à exposição das lagartas à couve tratada. 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.

Os dados de sobrevivência acumulada foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo do Tempo Letal (TL_{50}) foi utilizada a análise de Probit (FINNEY, 1971), pelo programa POLO PC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as avaliações de mortalidade em intervalos de tempo menores que 24 horas, sendo este o mais utilizado para testes de bioensaio, pôde-se observar que alguns isolados não causaram efeito letal imediato, sendo porém nas primeiras 12 horas de alimentação, a média de sobreviventes foi relativamente alta sendo de 94,5% para todos os isolados (Tabela 1).

A partir das 16 horas de confinamento iniciou uma variação na média de sobrevivência, que pode ser verificado nos isolados 1.7L, 49.19A e na linhagem padrão HD-1, diferindo dos cinco primeiros isolados inseridos na Tabela 1. Estes isolados apresentam potencial para serem utilizados como base para novos bioinseticidas, principalmente no caso específico de *P. xylostella*, para o qual se constatou população resistente a este bacilo em diversas regiões do mundo (ZHAO et al., 1993; TABASHNIK, 1994; PEREZ & SHELTON, 1997; WRIGHT et al., 1997).

Neste bioensaio, os indivíduos da população mostrou-se suscetíveis a linhagem HD-1, salientando-se que o parâmetro suscetibilidade é extremamente relativo, como mencionado por SAYYED et al. (2005), dependendo não só da influência genética de

ambos os organismos, como também das condições em que vive o inseto, tanto de laboratório ou como de campo. Alguns autores relatam que a resistência apresentada por *P. xylostella* ao *B. thuringiensis* pode ser de caráter dominante (LIU & TABASHNIK, 1997; SAYYED & WRIGHT, 2001; SAYYED et al., 2005), no entanto, a população utilizada vem sendo criada há muitas gerações em laboratório sem intervenção de produtos químicos e biológicos e sem sofrer pressão de seleção.

Para os isolados 1.7L, e 49.19A, o efeito tóxico em um pequeno intervalo de tempo de confinamento, possivelmente está relacionado à ação conjunta ou mesmo individual das toxinas presentes nos mesmos.

Os isolados T3A.140, E1, 1.7L, 49.19A, HD-1, T08.024, T3A.259 e E2 proporcionaram a menor média de sobreviventes com 20 horas de confinamento, sendo que no próximo intervalo de avaliação (22 horas), praticamente não observou-se sobreviventes, diferindo dos demais.

Os isolados T07.196, 2.7L, E22, 22.7L e E2 apresentaram ao longo de todos os períodos de avaliação uma média alta de insetos sobreviventes, ocasionando redução total da sobrevivência com 96 horas, o que para os demais iniciou-se com 22 horas.

Para os sete últimos isolados relacionados na Tabela 1, foi possível verificar um efeito tóxico nas lagartas num intervalo muito curto de tempo, entre as avaliações de 12 e de 22 horas; sendo que este tipo de informação normalmente não se encontra disponível na literatura, principalmente porque a maioria das avaliações de bioensaios são realizadas com 24 horas após o contato com o substrato tratado, sem mencionar nenhum tipo de observação no decorrer daquele intervalo.

Por outro lado, atualmente, grande parte dos trabalhos enfatiza a patogenicidade da bactéria em relação ao alvo, e não avaliam os indivíduos sobreviventes que podem morrer num intervalo de tempo maior, como relatado neste trabalho. Isolados que apresentam este comportamento têm sido descartados, entretanto, o controle biológico dentro do manejo integrado de pragas não pode ter somente a visão inseticida, mas sim trabalhar o ecossistema como um todo, preocupando-se em especial com os inimigos naturais e outros integrantes da fauna benéfica.

POLANCZYK (2004) estudou a patogenicidade do isolado ESALQ-3.7 de *B. thuringiensis* contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1794) (Lepidoptera: Noctuidae) por 7 dias e constatou que o pico de mortalidade ocorreu com 3 dias, ou seja, 72 horas após o contato com a bactéria. Portanto, estes resultados afirmam a relevância do estudo sobre o efeito tóxico letal após 24 horas, pois os indivíduos sobreviventes em 24 horas não indicam que o isolado seja ineficiente.

Um programa de controle para a traça-das-crucíferas, associando diferentes táticas de manejo com o monitoramento nos plantios de brássicas, principalmente com feromônio, pode reduzir o número de aplicações de bioinseticidas e viabilizar os produtos por um período ainda maior. Dessa forma, é para este tipo de manejo que este estudo tem a sua relevância, pois isolados que proporcionam sobreviventes por um determinado intervalo, expõem por muito mais tempo a praga à ação do ambiente. Lembrando-se, ainda, que lagartas contaminadas deixam de se alimentar cerca de 1-5 minutos após ingerir o substrato tratado com a bactéria, conforme KNOWLES (1994), não mais ocorrendo dano à planta.

Tabela 1. Sobrevivência (%) de lagartas de *Plutella xylostella* criadas com folhas de couve cv. Manteiga tratadas com isolados e linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis*, por diferentes períodos de avaliação.

Isolados de <i>B. thuringiensis</i>	Sobrevivência em diferentes períodos de avaliação (horas)								
	1	6	12	16	20	22	24	48	96
2.7L	100,00 a	95,00 a	83,40 a	78,30 abc	63,65 ab	63,50 ab	63,35 ab	45,00 ab	0,00 a
E22	100,00 a	93,30 a	86,50 a	76,70 abc	60,00 ab	55,00 b	53,35 ab	30,00 bc	0,00 a
22.7L	98,35 a	93,30 a	91,65 a	76,65 abc	56,65 bc	50,00 b	46,65 b	28,30 bc	0,00 a
E2	100,00 a	100,00 a	98,35 a	88,35 ab	85,00 ab	65,00 ab	53,35 ab	6,65 cd	0,00 a
T07.196	100,00 a	96,70 a	95,00 a	93,35 a	91,70 a	86,70 a	83,35 a	63,35 a	0,00 a
T08.024	100,00 a	98,35 a	88,35 a	35,00 cd	16,74 d	11,70 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
E26	100,00 a	95,00 a	86,70 a	41,65 cd	21,65 d	8,00 c	6,65 c	0,00 c	0,00 a
T3A.259	100,00 a	98,35 a	91,65 a	43,30 bcd	25,00 cd	8,35 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
T3A.140	96,65 a	96,65 a	78,30 a	38,35 cd	5,00 d	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
E1	100,00 a	100,00 a	81,70 a	43,35 bcd	15,00 d	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
1.7L	100,00 a	100,00 a	75,00 a	28,35 d	5,00 d	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
49.19A	98,35 a	98,35 a	81,70 a	23,35 d	3,35 d	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
HD-1	100,00 a	96,65 a	86,70 a	23,35 d	8,30 d	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 a
CV (%)	1,61	2,44	23,91	21,53	23,26	27,72	34,65	47,55	

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si, Tukey (p=0,05)

Para isolados também foi determinado o Tempo Letal Médio (TL₅₀) de mortalidade de lagartas de *P. xylostella*, tempo em que ocorre a mortalidade de 50% dos insetos.

O bom ajuste das curvas de TL₅₀, obtido através do programa POLO-PC, para os isolados E2, 1.7L, E1 e HD-1, pode ser observado pelos valores não significativos de X² (p<0,05) indicados na Tabela 2 .

As curvas traçadas para os isolados E1, 1.7L, HD-1, e E2 indicam a perfeita adequação dos dados ao modelo empregado (Figura 1A a 1D), com tendência logística para aumento da mortalidade a partir das 13 horas de exposição das lagartas.

A TL₅₀ para os isolados E1, 1.7L, HD- 1 ficou estabelecida no intervalo de tempo de 12 – 14 horas quando ocorreu a morte de 50 % das lagartas, sendo que 80 a 100 %

de mortalidade foi alcançada próximo de 24 horas de confinamento. Estes mesmos isolados causaram as menores médias de sobrevivência, como relatado anteriormente, mostrando seus potenciais para controle de *P. xylostella*.

Por outro lado, o valor significativo de χ^2 ($p < 0,05$) para os isolados indica, que os dados não se ajustam bem ao modelo empregado. Em função desta inadequação dos dados ao modelo de PROBIT, a TL_{50} obtida não deve ser considerada e, portanto, não foi apresentada (Tabela 2). A curva para estes isolados (Figura 2) demonstra a disparidade entre os dados observados e os esperados, calculados pelo modelo, o que faz com que a curva não obedeça ao padrão log esperado.

Tabela 2. Resultados da Análise de Probit apresentando os Tempos Letais Médios (TL₅₀), calculados em função da mortalidade larval de *Pluetlla xylostella* e parâmetros para obtenção das curvas de regressão (A, B e MN), com análise de χ^2 .

Isolados de <i>B. thuringiensis</i>	Equação		χ^2	GL	¹ TL ₅₀
	A	B			
2.7L	-3,9727	2,6249	22,80*	11	-
E22	-3,1525	2,1884	34,634*	11	-
22.7L	0,6890	-0,4599	24,09*	11	-
E2	0,2308	-1,1519	9,0406 ^{ns}	11	30,0813
T07.196	0,1232	-0,7635	61,315*	11	-
T08.024	1,0138	-0,8374	12,528*	11	-
E26	-7,9021	6,7214	14,956*	11	-
T3A.259	-11,3831	9,1510	25,013*	11	-
T3A.140	-4,7307	4,3791	59633*	11	-
E1	1,4704	-1,2149	2,5946 ^{ns}	11	14,5157
1.7L	0,8458	-0,7173	4,4587 ^{ns}	11	13,0660
49.19A	0,2506	-0,2098	0,3744*	11	-
HD-1	-12,6413	10,9340	8,2577 ^{ns}	11	13,7512

¹TL₅₀ – horas

* - significativo

ns – não significativo

A Figura 2 representa os isolados cujos valores de χ^2 foram significativos, não sendo observado ajuste ao modelo de Probit. No entanto, alguns destes isolados, como 2.7L, E22 e T07.196 permitiram uma média de sobreviventes maior que 50% até 22 horas, quando então iniciou aumento gradual da mortalidade.

Os isolados T3A.140 (Figura 2F), T3A.259 (Figura 2G), 22.7L (Figura 2C), E22 (Figura 2B), 2.7L (Figura 2A), T08.024 (Figura 2E), E26 (Figura 2H) e 49.19A (Figura 2

l) proporcionaram pico de mortalidade de 80-100% no intervalo de 24 a 48 horas. Já o T07.196 precisou de 72 horas para causar a mesma mortalidade, contudo, estes também são resultados significativos, pois a morte por septicemia ou por falta de alimento ocorre em um período de 24 a 72 horas, como relatado por KNOWLES (1994) e POLANCZYK (2004).

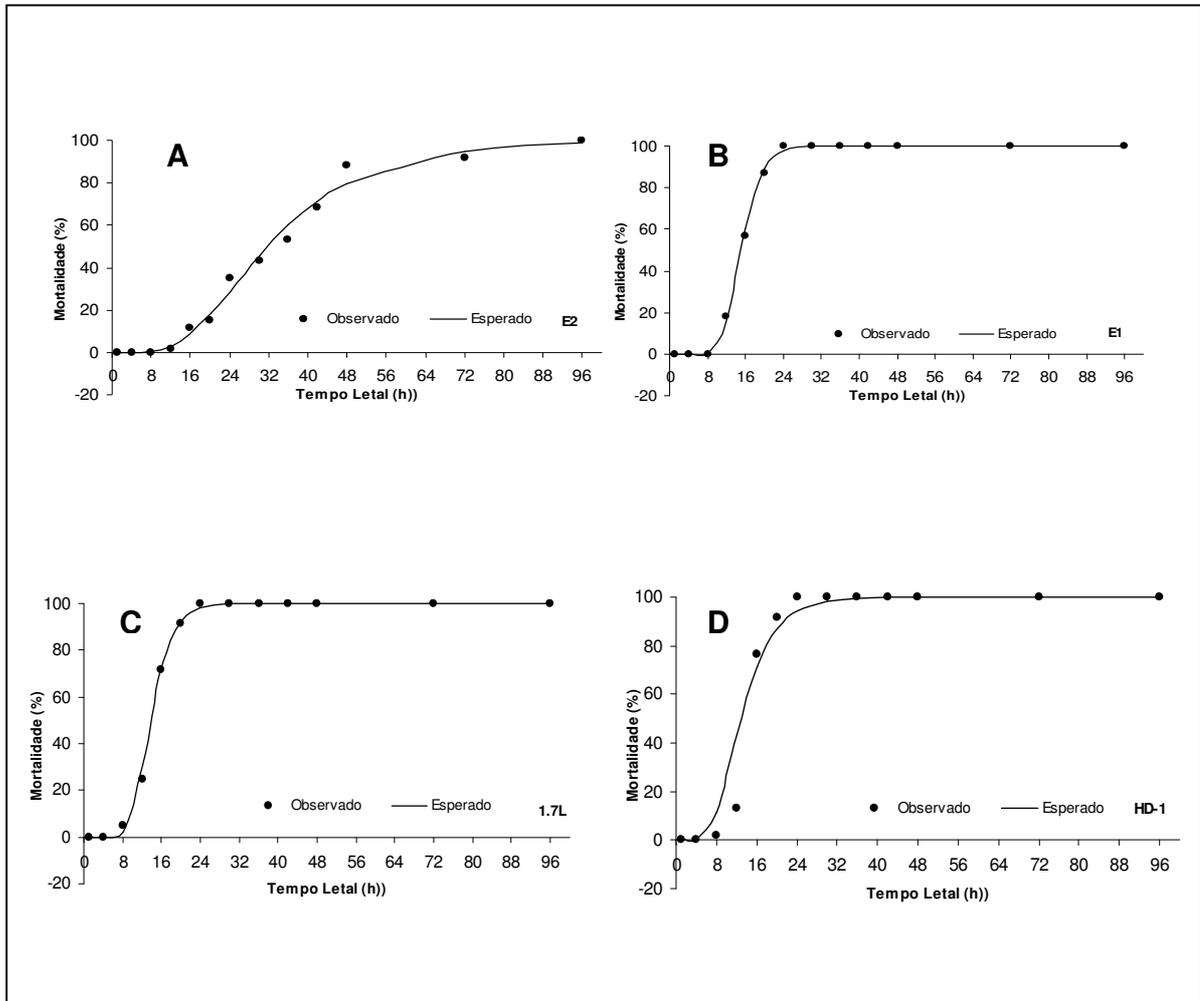


Figura 1. Curvas ajustadas para os Tempos Letais Médios (TL_{50}) dos isolados e da linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis*: (A) E2, (B) E1, (C) 1.7L, (D) HD-1, calculados em função da mortalidade larval de *Plutella xylostella*.

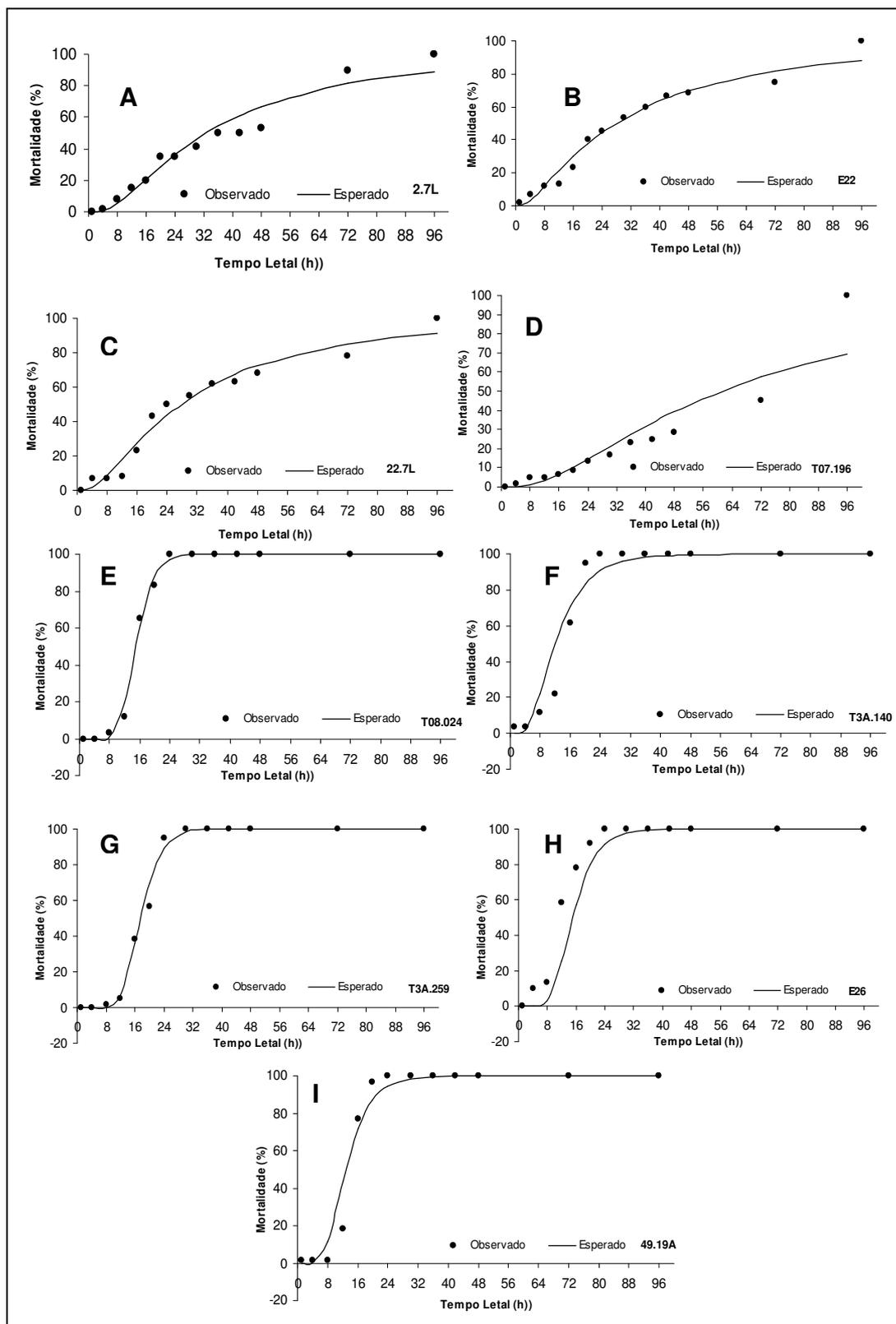


Figura 2. Curvas não ajustadas para os Tempos Letais Médios (TL_{50}) dos isolados e da linhagem padrão HD-1 de *Bacillus thuringiensis*: (A) 2.7L, (B) E22, (C) 22.7L, (D) T07.196, (E) T08.024, (G) T3A.259, (F) T3A.140, (H) E26 e (I) 49.19A calculados em função da mortalidade larval de *Plutella xylostella*.

Na literatura são encontrados poucos relatos de estudo de TL₅₀ para isolados de *B. thuringiensis*, porém, para CL₅₀ estes estudos estão mais avançados, apesar de ainda constituir um assunto recente para caracterização de microrganismos entomopatogênicos. Muitos autores têm encontrado dificuldade para relacionar os dados de CL₅₀ de forma comparativa, pois os métodos de bioensaios empregados ainda são muito relativos, ou seja, ocorrem variações de metodologias entre laboratórios, não existindo uma padronização, apesar de os bioensaios tomarem por base principal de comparação a linhagem padrão de *B. thuringiensis* HD-1 (GLARE & O' CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK, 2004) .

A mesma dificuldade é considerada para estudos de TL₅₀, que também é um tema pouco utilizado, apesar de sua valia, principalmente para constar nos rótulos de novos bioinseticidas, a fim de orientar melhor a utilização, como também gerar informações fundamentais para o sucesso do controle biológico com este agente.

A determinação da TL₅₀ para estes isolados de *B. thuringiensis* em função da mortalidade larval foi um grande passo no conhecimento biológico dos dois organismos envolvidos, e que serve de base para estudos posteriores que visem o processo de formulação. Outro ponto a se considerar, é o comportamento dos demais isolados, que mesmo não apresentando um poder letal em período curto, proporcionaram as maiores mortalidades num intervalo de tempo considerado bom comparados a outros entomopatógenos, principalmente aos fungos.

4. CONCLUSÕES

- De modo geral, os isolados estudados apresentam efeito tóxico variável para os diferentes períodos de avaliação;
- A sobrevivência dentro dos tratamentos com exceção para os isolados 2.7L, E22, 22.7L, E2 e T07.196 não foi superior a 22 horas, representando a alta eficiência para os isolados T08.024, E26, T3A.259, T3A.140, E1 e 1.7L, 49.19A;
- O TL para a maioria dos isolados pôde ser considerado baixo, ficando abaixo de 24 horas, indicando grande potencial de utilização.

5. REFERÊNCIAS

BARRANTES, A. J. A.; RODRIGUEZ, V. C. L. Abundancia estacional y dano de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) y el cultivo de repollo, durante la epoca seca en Alfaro Ruiz, Alajuela, Costa Rica. **Manejo Integrado de Plagas**, Chillan, v. 39, p. 17-24, 1996.

BARROS, R.; ALBERT-JÚNIOR, I. B.; OLIVEIRA, A. J.; SOUZA, A. C. F.; LOGES, V. Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repollo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 3, p. 463-469, 1993.

CASTELO BRANCO, M. Associação de armadilhas de feromônio e número de machos coletados para a redução do uso de inseticidas no controle da traça das crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, p.280, 1999.

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.

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

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

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 205 p.

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

HERRERO, S. S.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Mannose Phosphate Isomerase Izoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidoptera species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 979-981, 2001.

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.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, Bethesda, v. 24, n. 2, p. 131-137, 1994.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2218-2223, 1997.

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

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, n. 1, p. 87-93, 1997.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias – Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

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

SAYYED, A.H.; WRIGHT, D.J. Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia. **Pest Management Science**, Hoboken , v. 57, n. 5, p. 413-421, 2001.

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

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

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 Meio Ambiente, v. 1, p.201-230, 1998.

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, n. 5, p.1814-1819, 1997.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de uma agricultura sustentável é uma preocupação mundial, e que tem levado à busca de alternativas menos prejudiciais ao ambiente, como a substituição dos produtos químicos por agentes de controle biológico. Os métodos biológicos com organismos entomopatogênicos ainda são pouco empregados, sendo um dos mais utilizados *Bacillus thuringiensis*. Isso se deve à faixa restrita de hospedeiro, à rápida ação dos cristais protéicos contra a praga alvo e à facilidade de obtenção destes cristais, tornando economicamente viável a sua utilização.

Com base nesta concepção, esta pesquisa estudou novos isolados de *B. thuringiensis* que pudessem expressar um potencial de controle sobre a traça-das-crucíferas. Como esse inseto tem apresentado populações resistentes a esta bactéria, e o método de controle químico ainda é o mais usado, faz-se necessário buscas constantes de genes codificando novas toxinas.

Através dos resultados obtidos foram selecionados 11 isolados que causaram 100% e 15 que causaram de 60-98% de mortalidade em um curto período de tempo, e com isso demonstraram alto potencial de uso para controle de *Plutella xylostella*. No entanto, é necessário a realização de testes em condições de campo para avaliar a efetividade desses isolados sob a ação dos fatores abióticos de ocorrência natural e como também realizar estudos de expressão gênica, para confirmação sobre o gene que está expressando a toxina responsável pela morte do inseto.

Outro ponto a considerar é que parte dessa resistência apresentada pela *P. xylostella* ocorre, principalmente, pela forma incorreta que são empregadas as táticas de controle, o que leva ao desgaste de estratégias, tornando-as ineficazes. O uso do bioinseticida à base de *B. thuringiensis* juntamente com outras táticas de manejo pode resultar em uma ótima estratégia para contornar o problema da resistência.

Neste trabalho também verificou-se isolados que causaram mortalidades muito baixas, que, porém, influenciaram negativamente a biologia da praga, impedindo que o inseto completasse o seu ciclo em condições normais, podendo ser utilizados em

programas de manejo integrado que não visem apenas à eliminação da praga, mais sim uma agricultura mais sustentável.

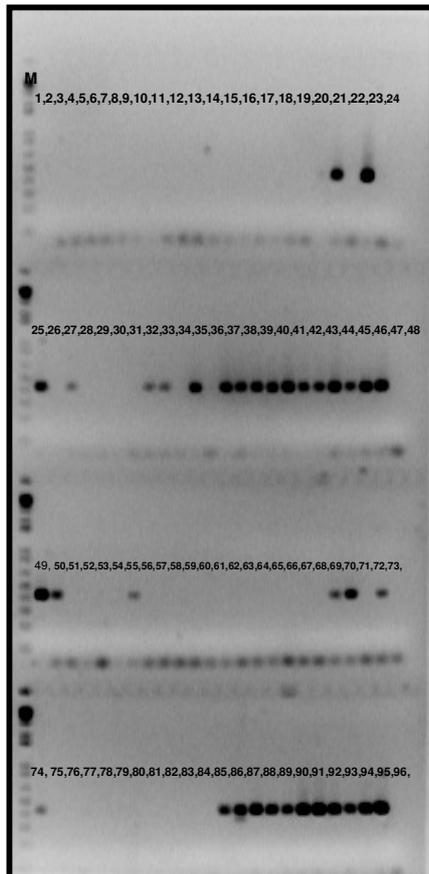
Atualmente, a pesquisa tem enfatizado muito o efeito tóxico imediato dos isolados de *B. thuringiensis* num período de 24 horas. Entretanto, a avaliação em intervalos reduzidos e em um período de tempo maior proporciona informações valiosas a respeito do comportamento dos isolados quanto a toxicidade. Esta pesquisa evidenciou justamente esta fase do bioensaio, pois o número de lagartas sobreviventes entre 20 e 22 horas de avaliação foi praticamente zero. Também, muitos isolados que são estudados apenas pelo seu efeito tóxico imediato deveriam ser reavaliados em períodos um pouco maiores e com isso disponibilizar mais informações a respeito deste assunto.

Outra característica estudada foi a determinação da TL_{50} para isolados de *B. thuringiensis* em função da mortalidade larval, significando um avanço no conhecimento biológico dos dois organismos envolvidos, e que pode ser considerado mais um importante parâmetro a ser pesquisado em estudos de seleção de isolados.

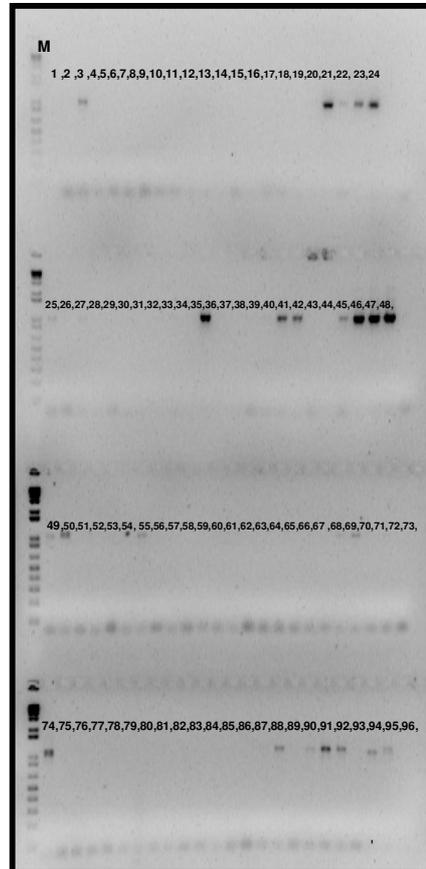
Portanto, muitos são os trabalhos no mundo que buscam resultados positivos associando diferentes táticas de controle para *P. xylostella*, cujo objetivo final é a busca de gêneros alimentícios seguros, livres de resíduos danosos ao homem e ao ambiente.

APÊNDICES

Apêndice A

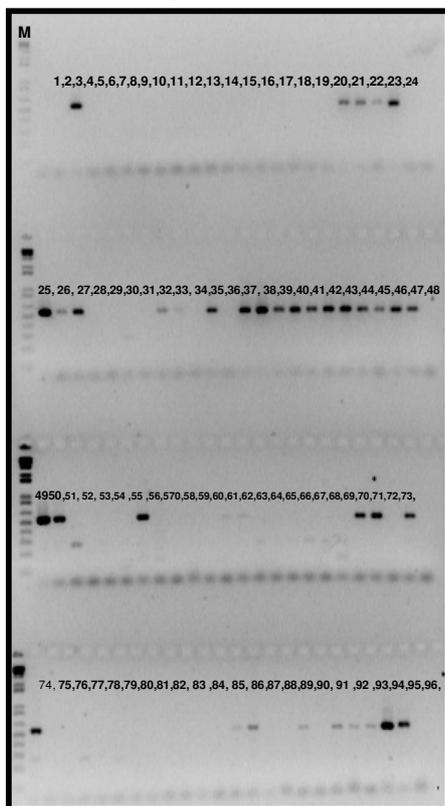


Apêndice B

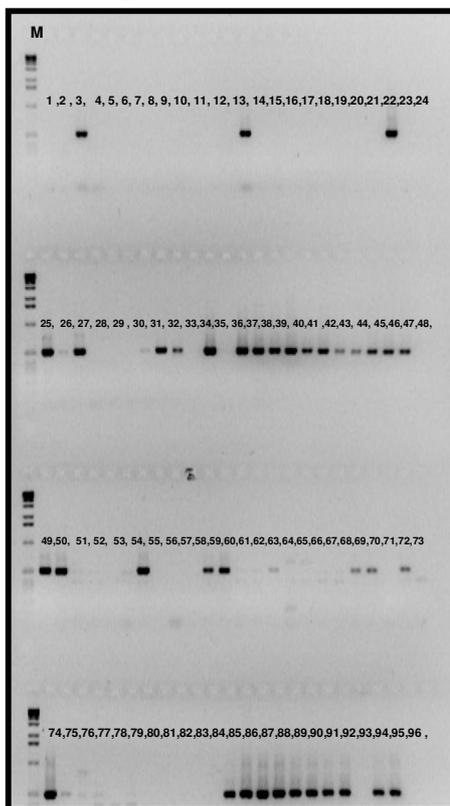


Eletroforogramas dos produtos obtidos por PCR para os isolados de *Bacillus thuringiensis* com iniciador geral para o Gral *cry1* (APÊNDICE A) e o iniciador específico *cry1Aa* (APÊNDICE B). Os números que representam os fragmentos amplificados por cada isolado estão representados no APÊNDICE K. M: Marcador Molecular 1Kb Plus DNA.

Apêndice C

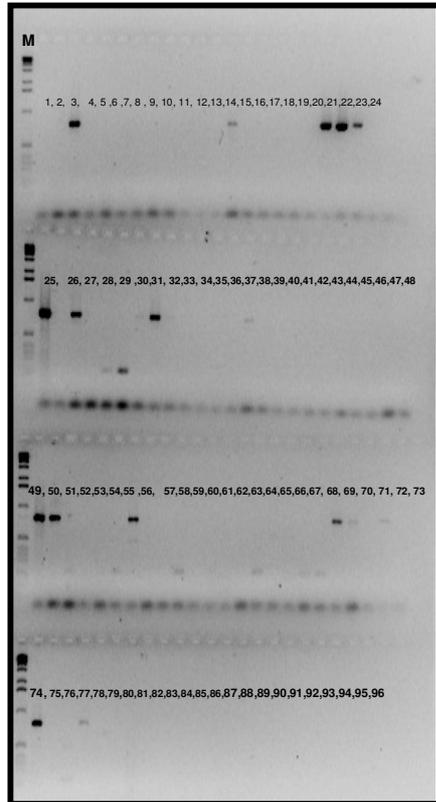


Apêndice D

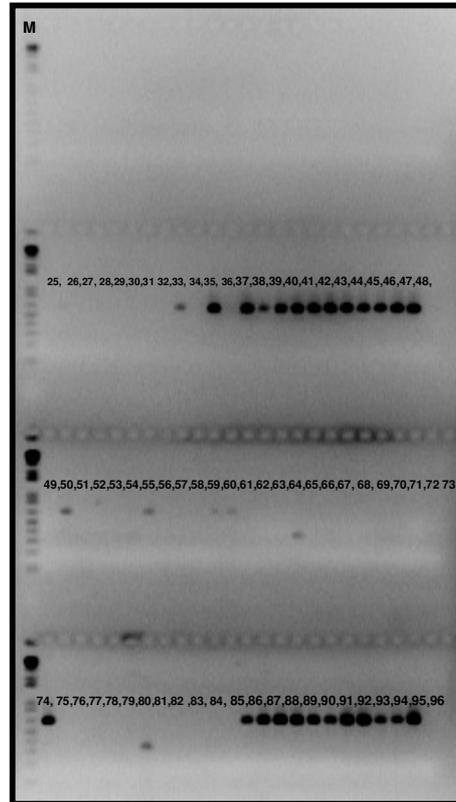


Eletroforogramas dos produtos obtidos por PCR para os isolados de *Bacillus thuringiensis* com iniciador específico *cry1Ca* (APÊNDICE C) e o iniciador específico *cry1Bd* (APÊNDICE D). Os números que representam os fragmentos amplificados por cada isolado estão representados no APÊNDICE K. M: Marcador Molecular 1Kb Plus DNA.

Apêndice E

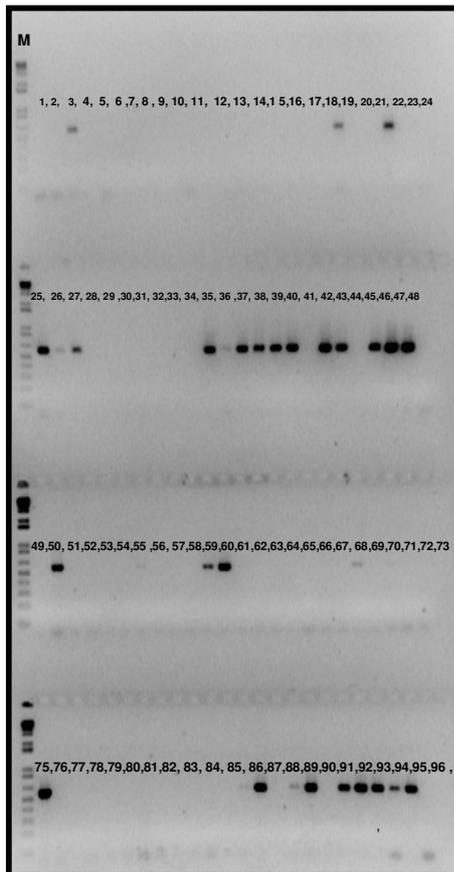


Apêndice F

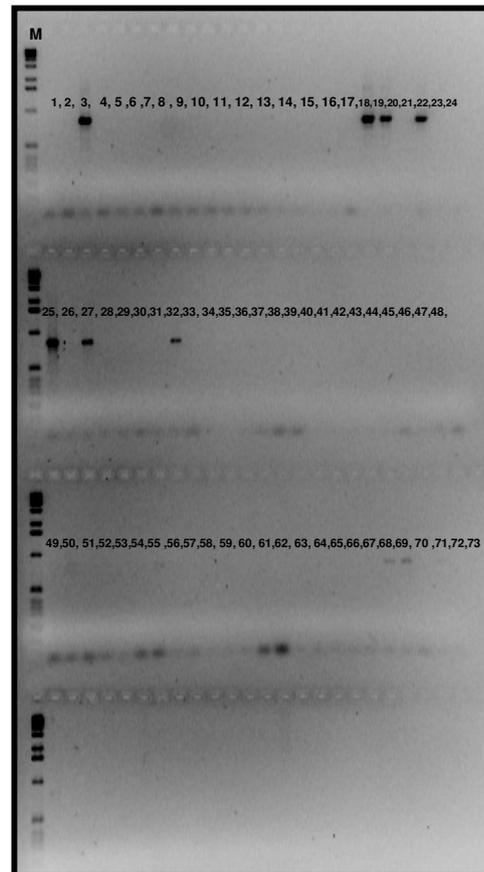


Eletróforogramas dos produtos obtidos por PCR para os isolados de *Bacillus thuringiensis* com iniciador específico *cry1Ab* (APÊNDICE E) e o iniciador específico *cry1Da* (APÊNDICE F). Os números que representam os fragmentos amplificados por cada isolado estão representados no APÊNDICE K. M: Marcador Molecular 1Kb Plus DNA.

Apêndice G

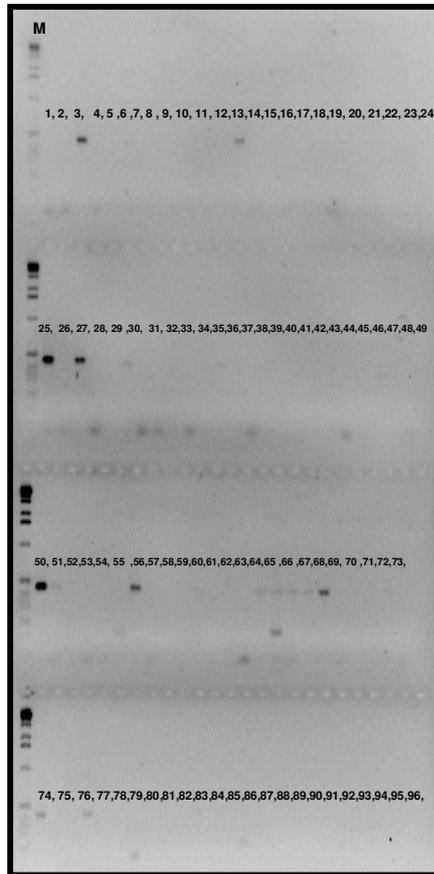


Apêndice H

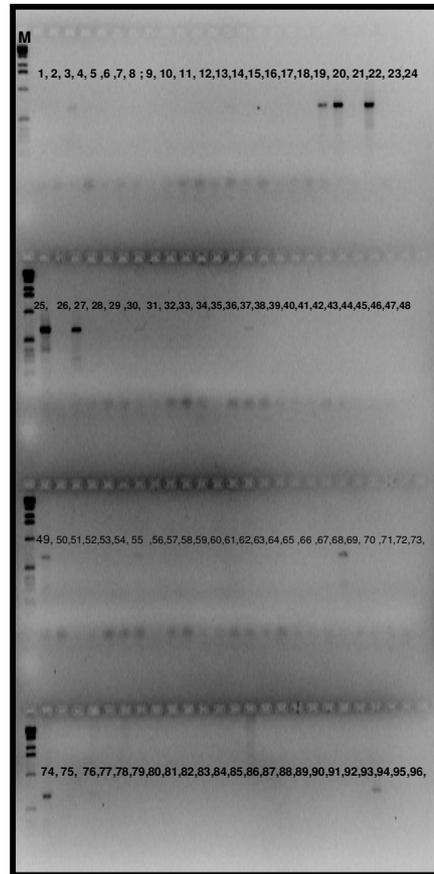


Eletroforogramas dos produtos obtidos por PCR para os isolados de *Bacillus thuringiensis* com iniciador específico *cry1Fa* (APÊNDICE G) e o iniciador específico *cry1Ae* (APÊNDICE H). Os números que representam os fragmentos amplificados por cada isolado estão representados no APÊNDICE K. M: Marcador Molecular 1Kb Plus DNA.

Apêndice I



Apêndice J



Eletroforogramas dos produtos obtidos por PCR para os isolados de *Bacillus thuringiensis* com iniciador específico *cry1Ea* (APÊNDICE I): e o iniciador específico *cry1Ac* (APÊNDICE J). Os números que representam os fragmentos amplificados por cada isolado estão representados no APÊNDICE K.

APÊNDICE K: Isolados de *Bacillus thuringiensis* que apresentaram fragmentos de amplificação para os diferentes iniciadores:

*Nº	Isolado	Nº	Isolado	Nº	Isolado	Nº	Isolado
1	37.1 A	25	E1	49	1.7L	73	26.7L
2	48.1 A	26	E2	50	2.7L	74	27.7L
3	49.19 A	27	E7	51	3.7L	75	28.7L
4	54.3 A	28	E13	52	4.7L	76	29.7L
5	58.17 A	29	E14	53	5.7L	77	30.7L
6	58.23 A	30	E15	54	6.7L	78	31.7L
7	59.17 A	31	E20	55	7.7L	79	32.7L
8	75.25 A	32	E22	56	8.7L	80	33.7L
9	76.25 A	33	E26	57	9.7L	81	34.7L
10	83.26 A	34	E27	58	10.7L	82	35.7L
11	86.26 A	35	E28	59	11.7L	83	36.7L
12	93.11 A	36	E39	60	12.7L	84	37.7L
13	97.27 A	37	E40	61	13.7L	85	38.7L
14	98.50 A	38	E41	62	14.7L	86	39.7L
15	100.27 A	39	E42	63	15.7L	87	40.7L
16	106.12 A	40	E43	64	16.7L	88	41.7L
17	142.30 A	41	E44	65	17.7L	89	42.7L
18	153.30 A	42	E45	66	18.7L	90	43.7L
19	T3A.140	43	E46	67	19.7L	91	44.7L
20	T.3A.259	44	E47	68	20.7L	92	45.7L
21	T07.196	45	E48	69	22.7L	93	46.7L
22	T08.024	46	E49	70	23.7L	94	47.7L
23	T14.034	47	E50	71	24.7L	95	48.7L
24	T20.002	48	69.24 A	72	25.7L	96	CN

* Número referente ao fragmento amplificado pelo isolado no gel de eletroforese para cada iniciador conforme apresentado nos apêndices de A a J.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)