

ATIVIDADE DO BACULOVÍRUS DE *Autographa californica* (Speyer) – vEGTDEL SOBRE *Heliothis virescens* (F.)

LUIZ ANTÔNIO ALVES JOSÉ
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. OCTAVIO NAKANO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, para obtenção do título de Doutor em Ciência – área de concentração: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Janeiro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

José, Luiz Antônio Alves

Atividade do baculovírus de *Autographa californica* (Speyer) - VEGTDEL sobre
Heliothis virescens (F.) / Luiz Antônio Alves José. - - Piracicaba, 1998.
113 p.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Baculovírus 2. Controle biológico 3. Lagarta-da-maçã-do-algodoeiro 4.
Poliedrose nuclear 5. Vírus de inseto I. Título

CDD 632.78

**ATIVIDADE DO BACULOVÍRUS DE *Autographa californica* (Speyer)
vEGTDEL SOBRE *Heliothis virescens* (F.)**

LUIZ ANTÔNIO ALVES JOSÉ

Aprovada em: 20/05/1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Octávio Nakano	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Djair Vendramim	ESALQ/USP
Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Arlindo Leal Boiça Júnior	FCAV/UNESP
Dr. Antonio Batista Filho	IB/Campinas/SP



Prof. Dr. OCTÁVIO NAKANO
Orientador

*Aos meus familiares ,
irmãos, cunhados, cunhadas,
sobrinhos,*

OFEREÇO.

*Aos meus pais,
Lazaro e Maria de Lourdes
e a minha esposa Márcia, pelo
grande apoio que venho recebendo,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Octavio Nakano, pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Hassan Oloumi (Pesquisador Entomologista, PhD) da American Cyanamid Company, NJ, EUA, pelo constante apoio, fundamental na viabilização deste trabalho;

Ao Dr. Donald Gates (American Cyanamid Company) e Sr. Arilton Frenhani (Cyanamid Química do Brasil Ltda.), pelo total apoio na realização deste trabalho;

Ao Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade concebida e pelos ensinamentos recebidos;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao colega David Nelson, pelo auxílio na elaboração do Summary;

À Dr^a Marinéia de Lara Haddad, pelo apoio estatístico e a Eng^o Agrônomo Alessandra C. Caseiro, pela realização das análises;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho;

A todos os colegas e funcionários do Centro de Pesquisas Agronômicas da Cyanamid Química do Brasil Ltda., que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

À Neide Graciano Zério, funcionária do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP), pelo empenho na criação de lagartas para a realização dos experimentos;

Ao Departamento de Formulações do American Cyanamid Company, Princeton, NJ, EUA, pelas informações e formulações enviadas para a realização dos experimentos.

Às funcionárias do Setor de Biblioteca da ESALQ/USP, pela amizade e auxílios prestados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Interação Baculoviroses x pH	04
2.2. Interação Baculoviroses x Temperatura	07
2.3. Interação Baculoviroses x Radiação Solar	10
2.4. Armazenamento de Baculovírus	14
2.5. Protetores Solares	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Metodologia Padrão	22
3.2. Bioensaios	24
3.2.1. Determinação da CL_{90-99} para lagartas de <i>H.</i> <i>virescens</i>	24
3.2.2. Influência do pH sobre a atividade do AcMNPV formulado ..	25
3.2.3. Efeito da temperatura sobre a atividade do AcMNPV formulado lado em condições de laboratório	27
3.2.4. Influência do armazenamento sobre a atividade do AcMNPV fórmula.....	29
3.2.5. Utilização de diferentes adjuvantes visando aumentar a ativi- dade residual do AcMNPV formulado	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Determinação da CL_{90-99} para lagartas de <i>H.</i> <i>virescens</i>	34

	Página
4.2. Avaliação do efeito do pH da calda sobre a atividade do baculovírus AcMNPV-vEGTDEL, para <i>H. virescens</i>	36
4.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade do baculovírus AcMNPV-vEGTDEL, para <i>H. virescens</i>	39
4.4. Avaliação do efeito do armazenamento do baculovírus AcMNPV-vEGTDEL, para <i>H. virescens</i>	42
4.5. Avaliação do efeito da adição de adjuvantes sobre o efeito residual do AcMNPV-vEGTDEL em <i>H. virescens</i>	45
5. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICE	63

ATIVIDADE DO BACULOVÍRUS DE *Autographa californica* (Speyer) vEGTDEL SOBRE *Heliothis virescens* (F.)

Autor: Luiz Antônio Alves José

Orientador: Prof. Dr. Octávio Nakano

RESUMO

Diferentes fatores do ambiente foram testados visando verificar a ação isolada de cada um sobre a atividade do vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) vEGTDEL formulado em lagartas de *H. virescens*. Foram estimados os valores de CL_{90-99} em teste de laboratório, sendo que o valor da CL_{90} observado e que foi adotado para a realização de todos os demais bioensaios foi $1,3 \times 10^6$ CIP (corpos de inclusão poliédrico)/ml ou $2,54 \times 10^{11}$ CIP/ha, considerando-se um volume de calda de 200 l/ha. Para todos os testes, foram utilizadas lagartas de *H. virescens* no 1º instar com a finalidade de se observar a atividade do vírus através dos níveis de mortalidade larval. Foram testados 6 níveis de pH da água utilizada para a diluição do vírus (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0), com o objetivo de se avaliar a ação do tempo de permanência do vírus (horas) sob diferentes pHs. Os tempos utilizados foram 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. A ação da temperatura do ambiente sobre a atividade do patógeno foi testada utilizando-se vasos contendo plantas de algodão pulverizadas com suspensão contendo o vírus na concentração $1,2 \times 10^{12}$ CIP/ha. Estas plantas foram mantidas em BOD nas temperaturas 20, 24, 27, 30, 32, 35, 37, 40 e 42°C por 8 horas na ausência de luz. A ação do armazenamento sobre a

atividade do baculovírus foi avaliada tomando-se como variáveis o tipo de embalagem (frasco de alumínio, frasco de vidro escuro, frasco plástico escuro), a temperatura (8, 24 e 30°C) e o período de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias). Foi realizado ainda um experimento visando observar a ação de alguns adjuvantes utilizados para aumentar a efetividade do vírus em condições de campo. Os adjuvantes testados foram Kinetic[®] (0,2%), Mirasperse[®] (0,5%), Coax[®] (3,5%) e carvão vegetal (50%) em misturas com o baculovírus formulado. Concluiu-se que o pH da água e a temperatura ambiente não afetaram a taxa de mortalidade final. A temperatura de 8°C se mostrou satisfatória para o armazenamento do baculovírus por 120 dias. O tipo de embalagem afetou o armazenamento quando a temperatura foi acima de 8°C. Dos adjuvantes testados, observou-se um aumento no período residual do vírus quando se utilizaram Coax[®] e carvão vegetal.

**ACTIVITY OF BACULOVIRUS OF *Autographa californica* (Speyer) –
vEGTDEL on *Heliothis virescens* (F.)**

Author: Luiz Antônio Alves José

Advisor: Prof. Dr. Octavio Nakano

SUMMARY

Different environment factors were tested in order to verify their effect on the activity of nuclear polyhedrosis virus (NPV) from the *Autographa californica* (Speyer) – vEGTDEL formulated. The LC₉₀₋₉₉ values were estimated through laboratory tests. The value $1,3 \times 10^6$ PIB/ml or $2,54 \times 10^4$ PIB/ha corresponding to the LC₉₀ was used for all the bioassays. Larvae of the *H. virescens* on first instar were used in order to observe the activity of the virus evaluating their mortality rate. Six pH ranges of the water (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0) were tested for the virus dilution aiming the determination of the effect of the virus exposition time on each pH. The virus exposure intervals tested were 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours. The effect of the environment temperature on the virus activity was tested using cotton plants cultivated in pots sprayed with a virus suspension at the rate $1,2 \times 10^{12}$ PIB/ha. These plants were maintained in a BOD at temperature of 20, 24, 27, 30, 32, 35, 37, 40 and 42°C for 8 hours in the absence of light. The effect of the storage on the baculovirus activity was evaluated by varying the type of package (aluminum flask, dark glass flask and dark plastic flask), the storage temperature (8, 24 and 30°C) and period of time (30, 60, 90 and 120 days). The acute and residual activities of the virus were also tested. Included in the formulation matrix mixed were kinetic[®] (0,2%), Miraspense[®]

(0,5%), Coax[®](3.5%) and Charcoal (50%). The water pH and the environment temperature didn't affect the final mortality rate. The best result for the virus storage for 120 days was obtained by the temperature of 8°C. Temperatures over 8°C affected the *H. virescens* virus mortality regardless of the packaging type. Coax[®] and Charcoal increased the virus residual activity.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de baculoviroses tem-se tornado uma alternativa adicional ao manejo de pragas visando o controle especificamente de pragas pertencentes à Ordem Lepidoptera.

Baculoviridae é a mais comum das 8 famílias de viroses de insetos, com mais de 500 espécies isoladas (Martignoni & Iwai, 1986). Baculoviroses ocorrem somente em animais invertebrados e são considerados excelentes entomopatógenos para utilização no controle de pragas. Nenhuma outra virose similar foi reportada em trabalhos de pesquisa nas áreas de medicina humana e veterinária, coleções e criações de animais. Trata-se portanto de uma forte evidência da segurança na utilização destes microrganismos visto que todos os vertebrados, incluindo o homem, têm sido expostos a estas viroses na natureza (Burges et al., 1980). Segundo Treacy & All (1996), muitos trabalhos de pesquisa têm demonstrado que microrganismos, plantas, invertebrados não hospedeiros originalmente, vertebrados e cultura de células de vertebrados não são afetados pelas baculoviroses.

Todas as espécies de baculovírus conhecidas até o momento têm-se mostrado altamente específicas. Uma destas espécies é o vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer). Este vírus somente infecta formas larvais de espécies

pertencentes à Ordem Lepidoptera, sendo que na família Noctuidae estão as espécies mais suscetíveis. Muito embora os VPNs se mostrem altamente específicos, existem fortes limitações para a sua utilização prática dentro do manejo de pragas. Uma forte limitação na utilização destes agentes microbianos se deve ao tempo necessário para levar um inseto infectado à morte. Dependendo do vírus e da espécie de inseto, este tempo pode ser ao redor de uma semana ou mais. Além disso, um inseto infectado continua a se alimentar e, em alguns casos, passa a se alimentar mais rapidamente causando um dano ainda maior (Subrahmanyam & Ramakrishnan, 1981).

A manipulação genética destes patógenos pode acelerar o processo de morte do inseto infectado mantendo suas características de especificidade. Uma das maneiras de se obter tal efeito é pela deleção de um gene viral. O'reilly & Miller (1989) identificaram no genoma de AcMNPV um gene que codifica a enzima ecdisteróide UDP-glucosil transferase (egt) que permite ao vírus inibir a mudança de instar do inseto infectado. Isto permite um aumento na atividade alimentar do inseto, conseqüentemente uma ingestão mais rápida das partículas virais, ao mesmo tempo que o vírus é beneficiado pelo aumento na sua progênie. Este baculovírus (AcMNPV) modificado é chamado de vEGTDEL.

Outra forte limitação na utilização do baculovírus a nível de campo se refere a sua rápida inativação pelo efeito da luz solar, mais especificamente pela radiação ultravioleta (UV) (Ignoffo et al., 1977; Ignoffo & Garcia, 1994). Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados na tentativa de aumentar a efetividade em campo de inseticidas microbianos. Para tal, certos adjuvantes são adicionados à formulação visando principalmente uma proteção contra a ação da UV (Bull et al., 1976; Smith et al., 1978; Bell & Kanavel, 1978; Hamm & Shapiro, 1992).

Outros fatores como pH da superfície foliar, temperatura e período de armazenamento e temperatura do ambiente também têm sido avaliados na tentativa de se obter informações seguras para uma melhor manipulação destes agentes microbianos (Ignoffo et al., 1974; Kinsinger & Mcgaughey, 1976; Ribeiro & Pavan, 1994).

Desenvolveu-se o presente trabalho com a finalidade de se observar o efeito do pH da água, temperatura do ambiente, armazenamento e a adição de adjuvantes sobre a atividade do baculovírus de *A. californica* -vEGTDEL sobre *H. virescens*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O grupo baculovírus é formado pelo vírus da poliedrose nuclear (VPN) e vírus da granulose (GV). Este grupo, dentre os patógenos de insetos, possui um grande potencial para controle de pragas (Alves, 1986). Isto se deve a sua alta especificidade, segurança para o homem, animais, organismos não alvo, e por serem eficientes no controle de muitas pragas. No Brasil, o *Baculovirus anticarsia*, utilizado para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hueb, vêm sendo utilizado em larga escala em programas de manejo de pragas da soja (Moscardi, 1983). Entretanto, o grande obstáculo na utilização prática de patógenos tem sido a sua rápida inativação no campo devido principalmente à ação da luz ultravioleta (UV) associada à luz solar (Ignoffo et al., 1976). Outros fatores também estão diretamente correlacionados à efetividade do vírus quando utilizado para o controle de pragas. Dentre tais fatores, destacam-se a temperatura do ambiente, pH da superfície foliar, tempo e temperatura de armazenamento do vírus (Ignoffo et al., 1976; Bull et al., 1976; Shapiro & Argauer, 1995).

2.1. Interação Baculoviroses x pH

Segundo Ignoffo & Garcia (1992), muitos estudos de campo e laboratório têm demonstrado que inseticidas microbianos e mais especificamente o vírus da

poliedrose nuclear (VPN) de espécies de *Heliothis* (Hz SVPN), são inativados pela exposição à alta temperatura, pH ou à luz solar. Em muitos destes trabalhos estes fatores de inativação do vírus são estudados separadamente, enquanto que um possível efeito adicional da água, pH ou temperatura combinados com a exposição à luz solar não têm sido analisado.

Andrews & Sikorowski (1973) citaram que o vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* perde atividade sobre a superfície foliar do algodoeiro. Uma provável causa desta inativação pode ser o orvalho que se forma sobre as folhas durante a noite. Entretanto, o vírus não é afetado a pH 9, ocorrendo 99% de inativação a pH 12. Os mesmos autores observaram que o pH do orvalho coletado se situava na faixa de 8,2 – 9,1. À medida que este orvalho secava, o pH aumentava e os poliedros se partiam, concluindo assim que o pH não foi a única causa por ocorrer tal fato.

Thomas et al. (1973) estudaram em laboratório a persistência do vírus da poliedrose nuclear de *Trichoplusia ni* (Hb.) em solo argilo – arenoso sob vários gradientes de pH (4,83 – 7,17). Avaliações de extratos de solo tratado com vírus realizadas a cada 3 meses mostraram que o vírus foi afetado pelo pH do solo. Quanto mais baixo o pH, mais rapidamente o vírus era inativado.

Em estudos de laboratório, Narayanam & Subramaniam(1975) observaram o efeito do pH da água variando de 3,8 a 9,8 sobre a atividade do vírus da poliedrose nuclear de *Spodoptera litura* (F.). Em pH neutro (7), obteve-se 100% de mortalidade após 4,5 dias, entretanto pH acima ou abaixo do neutro reduziu a taxa de mortalidade e prolongou a sobrevivência. Em pH 3,8 obteve-se 20% de mortalidade após 9 dias, enquanto que para pH 9,8 obteve-se 20% após 8 dias.

Muitos trabalhos têm atribuído a ambos, luz solar e pH alcalino da folha do algodão, a inativação do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* spp. na Califórnia. Entretanto, em estudos de campo realizados em Arkansas por Young & Yearian (1976), observou-se que a redução do pH da superfície foliar abaixo de 8,0 devido à adição de protetor solar não afetou a efetividade do vírus. Desta forma, concluíram que a alcalinidade do algodão não é o fator mais importante na redução da atividade viral.

Em outro estudo, Young et al. (1977) observaram que o pH do orvalho coletado da soja era de 7,8 e do algodão 8,8. Após a aplicação do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* em soja e algodão no campo foi observado uma pequena degradação após 7 dias. Por outro lado, Mcleod et al. (1977) concluíram que uma substancial perda de atividade do vírus se deve ao pH do orvalho em torno de 9,3, sendo que este pH é atingido logo no início do secamento do orvalho das folhas do algodoeiro. Exposições ao orvalho no algodoeiro a pH 7,4 ou 8,8, soja a pH 7,2 não resultaram em uma significativa inativação viral.

Batista et al. (1996) estudaram a eficiência do *Baculovirus anticarsia* em suspensões preparadas com diferentes tipos de água e níveis de pH. Em estudos preliminares, em laboratório, observou-se influência negativa dos pH 3 e 11, após 12 horas, com a diminuição do número de poliedros. Entretanto, estudos envolvendo populações naturais de *A. gemmatalis*, permitiram observar que os tratamentos com pH 3 e 11 foram menos eficiente.

Pawar & Ramakrishnan (1977) estudaram a estabilidade do *Baculovirus spodoptera*, observando que não ocorreu inativação do vírus em suspensão de pH 2, 6, 7 ou 9 por 24h, mas ocorreu 90% de inativação para pH 11 por 24 horas.

Ignoffo & Garcia (1992) estudaram a combinação de fatores ambientais na inativação do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* concluindo que temperaturas variando de 10 a 50°C e pH variando de 6 a 9 não afetam a inativação viral pela luz solar (UV), entretanto, a presença de água livre pode aumentar a extensão da inativação pela radiação ultravioleta.

2.2. Interação Baculoviroses x Temperatura

Como já foi citado por Shapiro & Argauer (1995), a inativação do vírus da poliedrose nuclear está relacionada à ação conjunta do pH da superfície foliar, temperatura e ação da radiação ultravioleta presente na luz solar. Entretanto, muitos trabalhos procuram elucidar melhor a ação de cada um destes fatores separadamente.

A ação da temperatura foi estudada por Morris (1971) visando verificar a patogenicidade do vírus da poliedrose nuclear de *Lambdina fiscellaria somniaria* (Hulst.). Para tal foram utilizadas lagartas de 5^o instar dessa espécie sendo observado que a exposição do vírus à uma temperatura de 45°C por mais de 200 h afetou os valores de LC₅₀ mas não a porcentagem de mortalidade final. Por outro lado, lagartas infectadas com o vírus foram expostas a três temperaturas (11,5, 21,5 e 28°C), sendo a mortalidade maior a 21,5°C.

Trabalho realizado com o vírus da poliedrose nuclear de *Prodenia litura* utilizando lagartas de *Spodoptera (Prodenia) litura* (F.) mostrou que o período de desenvolvimento larval está correlacionado ao período de incubação da doença, sendo este período maior a 20°C que a 28°C. Já a mortalidade aumentou com o aumento da temperatura (Pawar & Ramakrishnan, 1971).

Hunter & Hartsell (1971) utilizaram lagartas de *Plodia interpunctella* (Hb.) alimentadas com dieta até o 8º dia de vida, sendo então exposta ao vírus da granulose. Estas lagartas foram mantidas a 22, 27, 32 e 37°C por 12 dias. A maior taxa de mortalidade larval foi obtida a 32°C, enquanto que as lagartas mantidas a 37°C não apresentaram sintomas de infecção da doença e a taxa de mortalidade foi zero.

Esta temperatura favorável à incubação da doença pode variar de uma espécie para outra. Zarins et al. (1973) trabalharam com o vírus da poliedrose nuclear de *Neodiprion sertifer* Geoffr. observando que a mortalidade de lagartas de *N. sertifer* foi maior a 20°C. Sob esta condição, o período de incubação da doença foi de 5 a 7 dias e a mortalidade de 90 a 100% em um período variável de 6 a 12 dias. A doença também se desenvolveu a 15°C, mas o período de incubação foi mais longo.

Estudos de campo e laboratório conduzidos por Keller (1973) utilizando o vírus da granulose de *Cydia (Laspeyresia) pomonella* (L.) mostraram que a mortalidade de lagartas de 1º instar não diferiu significativamente variando-se a temperatura de 15 a 30°C. Já para 34°C houve uma redução significativa.

Hwang & Ding (1979) verificaram que para o vírus da poliedrose nuclear de *S. litura* a porcentagem de mortalidade larval para essa espécie depende da concentração da suspensão viral e do instar larval, enquanto que o tempo para se obter tal taxa de mortalidade é afetado pela concentração e a temperatura do ambiente. Segundo os mesmos autores, o grau de inativação do vírus sobre a superfície foliar depende do tempo de exposição à luz solar e a concentração da suspensão.

A estabilidade do vírus da poliedrose nuclear (*B. spodoptera*) foi testado por Pawar & Ramakrishnan (1977) em condições de laboratório. Uma suspensão do

vírus foi exposta a diferentes temperaturas, sendo que havia um declínio gradual na infectividade com exposição prolongada a 40 e 50°C.

Valicente & Cruz (1993) estudaram o efeito da temperatura ambiente (25°C a 30°C) sobre a perda de viabilidade do *B. spodoptera* na mortalidade de *S. frugiperda*. Observou-se que a mortalidade manteve-se alta com o vírus armazenado até 10 dias em temperatura ambiente (88%), enquanto que a menor mortalidade foi obtida aos 22 dias (59%).

Em trabalho desenvolvido por Mcleod et al. (1977) foi utilizado *B. heliothis* expostos a diferentes níveis de temperatura variando-se de 15 a 45°C. Dentro desta faixa de temperatura foi observado um baixo efeito sobre a atividade viral. Somente a 45°C foi observada uma significativa perda na atividade viral mas com exposição a luz ultravioleta simultaneamente.

O efeito da temperatura e baixo pH sobre a sobrevivência do vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* foi estudado por Knittel & Fairbrother (1987). Para este estudo, foi utilizado o VPN não incluso de *A. californica*, sendo que não foi observado formação de corpos de inclusão polinuclear a 37°C.

Im et al. (1990) estudaram o efeito da temperatura sobre a atividade do vírus da poliedrose nuclear de *S. litura*. Para estes trabalhos, foram realizadas aplicações de suspensões contendo o vírus sobre folhas de soja. Estas folhas foram infestadas com lagartas de 3^o e 5^o instar. Neste estudo, foi observado que a estabilidade do VPN decresceu rapidamente sob temperaturas acima de 60°C.

Saadany et al. (1992) procuraram estabelecer a interação entre a temperatura e a bioatividade do vírus da poliedrose nuclear de *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Foi constatado que a mortalidade larval aumenta com o aumento de temperatura,

entretanto, o tempo decorrido entre a infecção e a morte do inseto decresceu com aumento da temperatura (25 a 30°C).

Além da ação direta da temperatura sobre a atividade do vírus, outros estudos estão sendo realizados para verificar a estabilidade de protetores solares, aqui utilizados para minimizar a ação da radiação ultravioleta, diante de altas temperaturas. Shapiro & Argauer (1995) desenvolveram um estudo para verificar a estabilidade do Tinopal[®] LPW (protetor solar- Novartis) submetido a diferentes pHs, temperaturas e a radiação ultravioleta. Tinopal LPW se mostrou estável em pH variando de 3,0 a 10,4, sob temperatura de 121°C por 5 minutos, e exposição a luz ultravioleta (254, 302 e 360 nm) por um período acima de 7 dias.

2.3. Interação Baculovírus x Radiação Solar

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para determinar os fatores que influenciam a eficiência de entomopatógenos, com especial ênfase para viroses de insetos (Ignoffo & Hostetter, 1977 citado por Shapiro et al., 1983). Dentre tais fatores, especial atenção tem sido dada ao efeito da radiação solar afetando a estabilidade, não só de viroses entomopatogênicas, mas também de muitos outros patógenos de insetos (David, 1969). A radiação ultravioleta (UV), mais especificamente, ultravioleta A (UV-A) e ultravioleta B (UV-B) cujo spectrum varia de 280 a 400 nm da luz solar, constitui-se na principal causa desta inativação (Shapiro et al., 1983). Por exemplo, a meia vida de muitas viroses de insetos foi determinada por Ignoffo & Garcia (1992) como sendo abaixo de 3 horas após exposição direta à luz solar (UV) artificial.

Segundo Ignoffo & Garcia (1994), duas hipóteses têm sido formuladas para explicar a inativação de vírus e outros patógenos de insetos devido a ação da luz solar.

A primeira hipótese sugere que a luz solar tem um efeito direto sobre o DNA do vírus. Neste caso, há uma indução de uma conexão cruzada prejudicial, ruptura ou desenvolvimento de pontos instáveis no DNA, ou ambos ao mesmo tempo. Entretanto, esta hipótese não explica como se dá a inativação de microrganismos não vivos como a endotoxina na forma de cristal do *B. thuringiensis*. Outra hipótese citada pelos mesmos autores sugere que a luz solar provoca uma intensa formação de radicais livres reativos (peróxidos, hidroxils, oxigênio etc.) que podem degradar a porção responsável pela ação inseticida dos microrganismos. Sendo assim, as duas hipóteses não podem ser consideradas mutuamente exclusivas e a sua operacionalidade pode estar ligada ao mesmo ou diferente espectro do UV-A e UV-B.

O tempo necessário para que ocorra esta inativação do vírus ou diminuição na sua virulência pode variar de um tipo de vírus para outro, espécie de inseto, instar larval e ainda o comprimento de onda. Maccollom & Reed (1971) observaram que, para o vírus da poliedrose nuclear isolado de *Epiphyas postvittana* (Wlk.), somente 10 horas de exposição solar durante o primeiro dia já foi suficiente para causar uma grande redução na virulência para larvas desta praga da macieira.

Por outro lado, Bullock et al. (1970) procuraram determinar a ação de diferentes comprimentos de onda através da exposição do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* à luz solar ultravioleta monocromática. Foram utilizadas lagartas de *H. virescens* e *H. zea*. Comprimento de onda na faixa de 257 e 307,5 nm inativou significativamente o patógeno, assim como na de 364 nm.

Tentando estabelecer a participação da luz solar em termos percentuais, Smirnoff (1972) observou que a luz solar foi responsável em 50% pela inativação do vírus

da poliedrose nuclear de *Neodiprion swainei* (Middleton). Outros 19% foram atribuídos ao efeito da temperatura.

A relação planta x vírus foi estudada por Young & Yearian (1974). Os autores procuraram estabelecer a influência da superfície foliar de três culturas (soja, algodão e tomate) sobre a persistência do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis*. Foi observada uma rápida inativação do vírus em condições de campo na superfície superior das folhas de algodão, soja e tomate. A inativação foi maior em folhas do algodoeiro mostrando pouca atividade viral após 24 horas. A persistência foi maior em folhas de tomateiro quando comparada às outras culturas onde se observou pouca atividade viral após 96 horas.

Curiosamente em um estudo realizado por Ramoska et al. (1975), a simples exposição do vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) à luz ultravioleta na faixa de 320,0 nm por 60-420 segundos, aumentou a atividade do vírus. Este aumento foi medido em termos de CL_{50} para larvas de *T. ni*.

Para o vírus da granulose de *Plutella xylostella* (L.), Kao & Rose (1976) observaram diminuição na mortalidade após prolongada exposição à luz solar. Após 4 horas de exposição observaram 97,6% de mortalidade, enquanto que após 60 horas a taxa de mortalidade reduziu para apenas 6,5%.

Estudos de laboratório realizados por Nordin (1977), utilizando o vírus da poliedrose nuclear de *Hyphantria cunea* (Drv.), comprovaram a ação negativa da luz ultravioleta. Foi observada uma completa inativação do vírus após exposição direta à luz ultravioleta por um período de 100 minutos, sendo que a faixa de radiação utilizada foi de 253,7 nm.

Trabalho semelhante realizado por Pawar & Ramakrishnan (1977) com o vírus da poliedrose nuclear de *S. frugiperda* (F.) comprovou a rápida inativação do vírus quando foi colocada a 10 cm de uma fonte de luz ultravioleta. Completa inativação do vírus foi observada após 15 min.

Im et al. (1990) observaram prolongada atividade do vírus da poliedrose nuclear de *S. litura* quando este foi pulverizado na parte inferior das folhas de soja (10 dias). Por outro lado, quando a aplicação foi realizada na página superior das folhas de soja, a atividade do patógeno decresceu rapidamente após o terceiro dia.

A faixa de luz ultravioleta simulada utilizada por Ignoffo & Garcia (1992) foi de 320-400 nm (ultravioleta A) e 280-320 nm (ultravioleta B). Estudos de laboratório utilizando o vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* (*B. heliothis*) submetido a estas faixas de luz, demonstraram que 24 horas de exposição direta já foram suficientes para reduzir a mortalidade de lagartas de *H. zea* a valores próximos a 0.

Resultado semelhante foi obtido por Ignoffo & Garcia (1996) utilizando somente a luz ultravioleta na faixa de 365 nm. A inativação do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis* foi intensa após 24h de exposição direta. Observou-se para este caso 2,0% de mortalidade para lagartas de *H. zea*.

Batista Filho et al.(1992) avaliaram o efeito protetor conferido ao *Baculovirus anticarsia* pelas formulações pó molhável (caulim) e óleo emulsionável (milho) quando submetidas a radiação ultravioleta em condições de campo e laboratório. Ambas as formulações testadas prolongaram a persistência do baculovírus em condições de campo.

2.4. Armazenamento de Baculovirus

O baculovirus formulado pode ser armazenado em formulações secas, tipo pó-molhável ou formulações líquidas, tipo suspensão.

Tendo em vista tal aspecto, David et al. (1971) procuraram determinar a estabilidade de duas formulações do vírus da granulose de *Pieris brassicae* (L.). Foi testada uma formulação do vírus encapsulado na forma seca e uma suspensão aquosa do mesmo vírus. Os estudos para medir a atividade do patógeno foram realizados utilizando-se dietas semi-sintéticas que eram oferecidas às lagartas de segundo instar de *P. brassicae*. Foi observado que, para a formulação seca, o vírus apresentou uma perda significativa da atividade após 2 dias a 20°C e a taxa de diminuição da atividade aumentava com a temperatura variando de 0 a 40°C. A variação da umidade relativa do ar de 0 a 87% no armazenamento não afetou a virulência. Quando ambas as formulações foram mantidas por 7 dias a 30°C a atividade viral foi menor para a formulação seca quando comparado com a preparação aquosa.

Kinsinger & Mcgaughey (1976) estudaram a estabilidade do vírus da granulose de *P. interpunctella*(Hueb.) e do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em trigo armazenado. Os autores observaram uma redução de 10% na virulência e 85% para o *B. thuringiensis* quando o trigo tratado foi armazenado à temperatura constante de 42°C por 42 semanas. Desta forma, concluíram que o decréscimo na atividade foi diretamente proporcional à temperatura de armazenamento.

Em um experimento utilizando o vírus da granulose de *Chilo infuscatellus* Snell., Easwaramoorthy & Jayaraj (1988) observaram que a infectividade do vírus não foi afetada pelo armazenamento por 3 anos nas diferentes temperaturas testadas (0, 4 ou 28°C).

Estudos realizados por Geissler et al. (1991), utilizando o vírus da poliedrose nuclear de *Mamestra brassicae* e o vírus da granulose de *Agrotis segetum*, indicaram que para armazenamento a longo prazo a melhor opção é o freezer a -18°C . Para armazenamento intermediário, por aproximadamente 50 dias, foi possível se obter pouca variação na eficiência dos vírus quando armazenado em refrigerador ($+6^{\circ}\text{C}$).

Segundo Jarvis & Garcia (1994), o fator mais importante no armazenamento de baculoviroses é a presença ou não da luz. Vírus armazenado à temperatura variando de -85 a 37°C se mostraram completamente estáveis quando não foram expostos à luz.

Outra forma de armazenamento do vírus é na formulação do tipo óleo. Cherry et al. (1994) testaram 6 óleos vegetais e 12 óleos minerais, observando que o vírus, quando armazenado em óleo a 4°C por um período de 18 meses, apresentou uma redução de apenas 7% na sua potência. Para estes estudos foi utilizado o vírus da poliedrose nuclear de *S. litoralis*.

Batista Filho et al. (1991) testaram a estabilidade do *B. anticarsia* formulado com óleo de soja + emulsificante ou com talco em pó. Após 12 meses de armazenamento, o patógeno formulado em talco não apresentou redução significativa na sua atividade, enquanto que o formulado em óleo teve perdas acima de 50% da sua viabilidade.

2.5. Protetores Solares

Durante as três últimas décadas, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com baculoviroses e outros patógenos de insetos visando à obtenção de

substâncias, aqui chamadas de protetores solares, que quando adicionados à formulação do vírus lhe confira uma proteção contra a ação da radiação ultravioleta da luz solar. Desse modo, a atividade do vírus se prolonga por um tempo muito maior, viabilizando a sua utilização prática no controle de pragas (Shapiro et al., 1983; Shapiro, 1989; Ignoffo & Garcia, 1992; Treacy et al., 1996).

Os protetores solares mais comumente testados, sendo considerados como os mais promissores, são aqueles com boa capacidade de absorção da radiação ultravioleta (280-320 nm), responsável pela inativação viral (Shapiro et al., 1983). Dentre tais protetores, pode-se destacar alguns que vem sendo testados como o carbono ativo, vermelho do Congo, carvão em pó, tintura da Índia, óleo vegetal (soja), alguns ácidos, aminoácidos, Tinopal[®] LPW (Ciba Geigy Corp.) e Shade[®] (Sandoz Inc.) entre outros (Hostetter et al., 1973; Shapiro et al., 1983; Shapiro, 1989, Ignoffo et al., 1991; Hamm & Shapiro, 1992; Shapiro & Argauer, 1995; Ignoffo & Garcia, 1996).

Utilizando o protetor solar Shade[®] (poliflavenóide leucocianidin polímero), Young & Yearian (1974) conseguiram aumentar a persistência do *B. heliothis* em condições de campo. Sem o protetor solar a atividade do vírus permaneceu baixa após 24h, enquanto que a adição de Shade[®] e de sulfato de lignina manteve boa persistência do vírus por 48 horas.

Por outro lado, Ignoffo & Batzer (1971) utilizaram técnicas envolvendo microencapsulação e protetores solares para o *B. heliothis*. Combinações não encapsuladas do vírus + carbono ativado foram tão eficientes quanto combinações encapsuladas + carbono ativado. Bull (1978), citado por Couch & Ignoffo (1981), mostrou que formulações encapsuladas foram superiores às formulações comerciais do *B. heliothis*, tendo em vista a proteção contra a radiação ultravioleta.

Keller (1973) obteve excelente controle de *Cydia (Laspeyresia) pomonella* na cultura de maçã utilizando o vírus da poliedrose nuclear desta mesma espécie aplicada a cada 2 semanas adicionando-se 1% de leite desnatado em pó ao vírus formulado. Sem a adição do leite desnatado, o vírus foi rapidamente inativado pela luz solar.

Do mesmo modo, Schmid (1974) também obteve bons resultados adicionando-se 2% de leite desnatado em pó ou 1% de leite + 1% de tintura da Índia. Neste caso, o trabalho foi desenvolvido com o vírus da granulose de *Zeiraphera diniana* (Gn.)

Segundo Bull et al. (1976), a utilização de protetores solares (adjuvantes) e também a microencapsulação do vírus não tem produzido formulações consideradas economicamente viáveis para uso comercial.

Tentando aumentar a persistência e a eficiência de formulações do *B. heliothis*, Smith et al. (1978) testaram diferentes tipos de bicos em equipamentos de pulverização bem como diferentes combinações do vírus formulado com alguns adjuvantes (protetor solar, agente polimerizante, espalhante adesivo, humectante e óleo). A melhor mistura foi quando se adicionou ao vírus formado um protetor solar (2% de Shade[®]) mais álcool hidrolizado polivinil 99% (0,5% de PVA). Os autores ressaltaram que a escolha dos adjuvantes testados foi baseado não só na viabilidade econômica, mas também na sua disponibilidade no mercado.

Quatro baculoviroses foram testadas por Prichett et al. (1980) no controle de *Hyphantria cunea* (Drury). O vírus da poliedrose nuclear de *H. cunea* se mostrou mais viável em termos de eficiência quando comparado às outras duas viroses testadas (VPN de *A. californica* e 2 vírus da granulose de *H. cunea*). A adição de sacarose e leite em pó à formulação do VPN de *H. cunea* resultou em um aumento significativo na mortalidade larval.

Vail et al.(1980) obtiveram bom controle de *T. ni* em cultura de alface utilizando o vírus da poliedrose nuclear isolado de *A. californica* na concentração de $7,4 \times 10^{11}$ CIP(corpos de inclusão poliédrico)/ha. A adição do protetor solar Shade[®] (1,1 kg/ha) não aumentou a eficiência do vírus como agente de controle.

Por outro lado, Shapiro et al. (1983) testaram diferentes protetores solares para o vírus da poliedrose nuclear de *Lymantria dispar* (L.) obtendo boa proteção do vírus utilizando Shade[®] na concentração de 5%. Após exposição do vírus à radiação ultravioleta (> 400 nm) foi observado 63,8% de atividade do vírus. Nestes estudos, o material mais promissor foi o adjuvante Coax[®] (CCT Corp.). A formulação comercial deste adjuvante consiste de sementes do algodão moída, óleo bruto de semente de algodão e sacarose que atuam como estimulante alimentar. Segundo Smith et al. (1980), citado pelos mesmos autores, Coax[®] também atua como protetor solar. Utilizando-se 5 e 10% de Coax[®] observou-se 72 e 82% de atividade viral após exposição ao ultravioleta. Bons resultados também foram obtidos utilizando-se protetores solares de uso humano, como o ácido benzilidino sulfônico, Protec-100 (com PABA) e o ácido ethoxil p-amino-benzóico.

Shapiro (1984) obteve boa proteção do vírus da poliedrose nuclear de *L. dispar*, exposto à radiação ultravioleta (> 400 nm), utilizando guanina, adenina e ácido úrico (1-10%). O autor chama a atenção para o fato de que certos protetores solares com estrutura química parecida, como é o caso do ácido úrico e do ácido benzilidino sulfônico, podem apresentar a mesma capacidade protetora à radiação ultravioleta.

Martignoni & Iwai (1985) obtiveram melhores resultados utilizando Tinopal[®] DCS e Raymix[®] em pó (lignosulfonato) quando comparados ao Shade[®]. Neste caso, foi utilizado o vírus da poliedrose nuclear de *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough).

Shapiro (1985) observou boa proteção ao vírus da poliedrose nuclear de *L. dispar* contra a ação da radiação ultravioleta utilizando como adjuvante o ácido pantotênico (1%), piridoxine (1%), ácido fólico (0,1 a 1,0%) e riboflavina (0,5 e 1,0%). Estes adjuvantes são capazes de absorver a radiação ultravioleta na faixa de 280 a 320 nm.

Em outro estudo conduzido por Shapiro (1989), a adição de vermelho do Congo a formulação do vírus da poliedrose nuclear de *L. dispar* aumentou significativamente a atividade do vírus devido ao efeito protetor contra a ação da luz ultravioleta. Para 1% de concentração observou-se 100% de atividade do vírus após exposição do vírus à luz ultravioleta por 60 minutos.

Ignoffo et al. (1991) procuraram comparar quatro tipos de protetores solares que foram encapsulados com o CIP (corpo de inclusão poliédrico) do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis*. De todos protetores testados (Tinopal[®], vermelho do Congo, Shade[®] e Carbono), os que se mostraram mais eficientes foram, o vermelho do Congo e o carbono. Para estes estudos foram utilizadas lagartas de *H. virescens* no 1^o ínstar. Todas as formulações foram expostas à luz ultravioleta por um período de 24h.

Melhores resultados foram obtidos por Shapiro (1992) e Shapiro & Robertson (1992) em estudos realizados com o vírus da poliedrose nuclear de *L. dispar* utilizando-se o Tinopal[®] LPW como protetor solar. A 1% de concentração foi observado 100% de atividade viral após exposição à luz ultravioleta. Observaram ainda que a adição deste adjuvante, bem como alguns outros testados, contribuiu para uma redução na LC₅₀ e no LT₅₀, indicando que estas substâncias aumentam significativamente a virulência.

Em trabalho desenvolvido por Hamm & Shapiro (1992), foi comprovado que a adição de Tinopal[®] (0,1%) aumenta a eficiência do vírus da poliedrose nuclear de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

Ignoffo & Garcia (1996) testaram alguns aminoácidos visando estudar a sua ação protetora contra a ação inativadora da luz ultravioleta sobre o vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis*. Dos cinco aminoácidos testados (tirosina, fenilalanina, prolina, histidina e triptofano), somente o triptofano e tirosina promoveram proteção significativa ao *B. heliothis*.

Em condições de campo, Padmavathamma & Veeresh (1995) observaram que o melhor controle de *Plutella xylostella* (L.) em couve, foi obtido utilizando-se $1,7 \times 10^8$ CIP/ml do vírus da poliedrose nuclear de *P. xylostella* com mistura com 1% de tintura da Índia.

Segundo Shapiro & Argauer (1995), os protetores solares atuam absorvendo a radiação ultravioleta e transmitem a luz azul da faixa visível do espectro luminoso. Como a radiação ultravioleta A (UV-A) e ultravioleta B (UV-B) são absorvidos, tais substâncias são excelentes protetores para microrganismos.

Outro fator muito importante na formulação de patógenos é o tipo de inerte. Dentre as características desejáveis para um bom inerte, Ignoffo & Garcia (1996) procuraram testar alguns inertes em pó e observaram que o talco se mostrou melhor quando comparado ao caulín, bentonita, leite em pó desnatado e farinha de soja. Neste caso, o critério utilizado foi o pH, capacidade de dispersão após o armazenamento à seco em “freezer” e compatibilidade com protetores solares.

Baseando-se na hipótese de que a inativação pela radiação ultravioleta se dá através da formação de radicais livres reativos, Ignoffo & Garcia (1996) procuraram testar enzimas oxidativas e antioxidantes visando inibir a inativação do *B. heliothis*. Foram testados 3 antioxidantes (ácido ascórbico, feniltiocarbamida e propil galate) e 3 enzimas oxidativas (catalase, peroxidase e superóxido dióxido). Os melhores resultados foram

obtidos com propil galate (0,2 mg/ml) e a enzima catalase (0,4 mg/ml). Muito embora tais substâncias tenham aumentado a persistência do vírus, os autores chamam a atenção para o fato de que a sua utilização comercial seria economicamente inviável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Metodologia Padrão

Todos os bioensaios foram conduzidos em laboratório do Centro de Pesquisas Agronômicas da Cyanamid Química do Brasil Ltda., Itacemápolis (SP)

Para a realização dos bioensaios foi seguida uma metodologia padrão. Para tal, após a aplicação do baculovírus em condições de campo ou após a utilização da técnica de imersão das folhas, aguardou-se um tempo suficiente para que elas secassem, sendo em seguida, cortadas em um tamanho padrão de 7 cm de diâmetro em formato circular, sendo posteriormente colocadas em placas de Petri (9,0 cm x 1,5 cm) tipo descartável e esterilizada. No fundo de cada placa foram colocados 2 papéis de filtro umedecidos com água destilada sobre os quais colocou-se as folhas tratadas com a face superior voltada para cima. Em seguida, realizou-se as infestações com 4 lagartas recém eclodidas (< 24 horas de vida) de *H. virescens*.

Para vedação dessas placas utilizou-se filme de PVC (marca comercial “Magipac[®]”) com o objetivo de se evitar a fuga de lagartas e também permitir uma melhor ventilação, evitando a condensação da água sobre as folhas, o que poderia comprometer o

estudo. Decorridos 4 dias da infestação, as lagartas sobreviventes foram transferidas para bandejas de plástico (C-D International Inc., Pitman, NJ, USA). Estas bandejas são confeccionadas em material plástico, tipo PVC, medindo 20 cm de largura, 42 cm de comprimento e 2,5 cm de altura. A parte interna é dividida em pequenos compartimentos ou “células” medindo 4 cm x 4 cm e 2,2 cm de profundidade, sendo no total 32 “células” por bandeja. A vedação foi realizada com filme plástico com adesivo nas laterais. Este filme plástico é perfurado para que ocorram trocas gasosas com o ambiente, evitando assim saturação da umidade interna. Foi colocada uma lagarta por “célula”, sendo que para cada uma foi colocado um pedaço de folha de algodão não tratado cortado em formato retangular (4 cm x 2 cm) e um rolete de algodão hidrófilo (4 cm x 1,5 cm de diâmetro) embebido em água destilada. Tanto as placas de Petri quanto as bandejas plásticas, após serem devidamente identificadas, foram acondicionadas em sala com temperatura ambiente controlada (26°C) e umidade relativa do ar 60% ± 5%. Decorridos mais 4 dias, foi realizada a avaliação final contando-se o número de lagartas vivas por tratamento.

As lagartas utilizadas em todos os estudos conduzidos neste trabalho, foram da espécie *H. virescens* fornecidas pelo laboratório de biologia do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, Piracicaba (SP). Estas lagartas foram produzidas em dieta artificial à base de farinha de milho branco e germe de trigo nas seguintes proporções: farinha de milho (168 g), germe de trigo (42 g), levedura de cerveja (45 g), ácido ascórbico (6 g), ácido benzóico (1,5 g), Nipagin (1,2 g), agar (30 g) e água (1.400 ml) (Parra & Mihsfeldt, 1992). Estas proporções permitiram encher 200 tubos de vidro para a criação das lagartas, sendo que foram utilizados 7 ml/tubo/lagarta.

O isolado de baculovírus utilizado nesta pesquisa foi do vírus da poliedrose nuclear (VPN) de *A. californica* geneticamente modificado pela deleção do

gene EGT ou AcMNPV-vEGTDEL, e produzido **in vitro** utilizando célula ovariana de *Spodoptera frugiperda* (Smith). As formulações utilizadas foram elaboradas pelo laboratório de formulações da American Cyanamid Company, localizado em Princeton, NJ, EUA, sendo o material recebido em frascos plásticos escuros, vedado externamente com parafilme e fita isolante. As amostras foram armazenadas em câmara fria a 8°C e umidade relativa do ar 12%.

3.2. Bioensaios

3.2.1. Determinação da CL_{90-99} para lagartas de *H. virescens*

Para a determinação da CL_{90-99} para lagartas de *H. virescens* no 1º instar foi utilizada uma formulação do tipo pó molhável do vírus de poliedrose nuclear de *A. californica* – vEGTDEL, contendo $3,5 \times 10^9$ CIP (corpos de inclusão poliédrico)/g. Foram testadas as seguintes concentrações do vírus:

1. $6,0 \times 10^6$ CIP/ml de água
2. $6,0 \times 10^5$ CIP/ml de água
3. $6,0 \times 10^4$ CIP/ml de água
4. $6,0 \times 10^3$ CIP/ml de água
5. $6,0 \times 10^2$ CIP/ml de água
6. $6,0 \times 10$ CIP/ml de água
7. Controle (água destilada).

A primeira concentração ($6,0 \times 10^6$ CIP/ml) foi obtida por pesagem em balança de precisão e as demais obtidas por sucessivas diluições, partindo-se da maior

concentração. Antes de se tomar cada alíquota (100 ml) para compor a diluição seguinte, as suspensões permaneceram em agitador por 4 minutos.

Para cada diluição do vírus (tratamento), foram preparados 1 000 ml de suspensão (total de 7 tratamentos) colocada em becker de 2.000 ml.

Para cada tratamento, foram coletadas 2 folhas localizadas no ponteiro da planta de algodoeiro (*G. hirsutum*), cultivar IAC-22. Estas folhas foram imersas em solução contendo o vírus em suspensão por um período de 3 a 4 segundos. Em seguida, foram colocadas sobre papel de filtro por um período de 40 a 60 minutos para que secassem por completo. Foi seguida a mesma metodologia descrita no item (3.1), sendo que para este estudo foram utilizadas 4 lagartas por placa de Petri. Foram testados 07 tratamentos e 10 repetições, sendo cada repetição composta de duas placas de Petri contendo 1 folha de algodão por placa .

As avaliações ocorreram 4 dias após as infestações em placa de Petri e aos 4 dias após a transferência das lagartas sobreviventes para as bandejas plásticas . Foi determinada a porcentagem de mortalidade parcial (4^o dia) e mortalidade total ao final do estudo (8^o dia).

A estimativa da CL_{90-99} foi obtida a partir das linhas de regressão probit-log-dosagem estabelecidas por Bliss (1935) e as mortalidades corrigidas pela fórmula proposta por Abbott (1925).

3.2.2. Influência do pH sobre a atividade do MNPV formulado

O experimento constou de 6 níveis de pH da calda (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0) totalizando 07 tratamentos, visto que um tratamento foi o controle sem a adição do vírus, somente água destilada (pH 5,5). Para a correção do pH da calda foram utilizadas duas soluções-tampão à base de fosfato monobásico de potássio 0,125 M (K_2HPO_4) e

fosfato dibásico de potássio (KH_2PO_4). Inicialmente foi realizado um estudo de titulação para a determinação das devidas proporções de cada solução na composição de cada pH desejado. Em seguida, foram preparadas uma solução estoque para cada solução tampão, que foram utilizadas nas misturas. Após a mistura das soluções estoques nas proporções pré-estabelecidas foi checado o pH de cada solução utilizando-se pH-metro. As mesmas soluções estoques foram utilizadas com a finalidade de se obter o pH desejado caso a pré-mistura não tenha atingido este valor. Toda a operação de mistura das soluções foi realizada com agitador funcionando durante a aferição do pH das soluções. Para cada tratamento foram preparados 3,0 l de calda adicionando-se água destilada à solução tampão obtida para cada pH. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro escuro (1,0 l/cada) e armazenados em BOD na ausência de luz, temperatura de 26°C e umidade relativa do ar 60%.

A diluição do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) utilizada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml, valor este determinado com base no experimento descrito no item 3.2.1. A formulação do vírus foi do tipo pó-molhável contendo $3,5 \times 10^9$ CIP/g.

Os bioensaios foram realizados 0, 2, 6, 10, 14, 24, 48 e 72 horas após a preparação da calda para os diferentes pH. Para a realização destes bioensaios foram utilizadas 14 folhas de algodoeiro coletadas no ponteiro da planta (2 folhas/planta). Para cada repetição foram utilizadas 2 folhas (7 repetições). Estas folhas foram imersas na calda por 4 segundos utilizando-se para tal um becker de 2.000 ml. Foram colocados 1.000 ml de calda para cada pH, sendo que após o uso esta suspensão era retornada aos frascos de armazenamento. As folhas foram colocadas sobre papel de filtro por um período de 30 a 40 minutos para sua completa secagem. Ao fim deste período, foi seguido o procedimento

descrito no item 3.1. Foram utilizadas 4 lagartas no 1º instar por placa de Petri, totalizando 56 lagartas por tratamento.

As avaliações foram realizadas ao final de 4 e 8 dias após a infestação inicial. Foi determinada a porcentagem de mortalidade para cada período por pH, baseando-se no número de lagartas infestadas e o número de lagartas vivas ao final de cada etapa do bioensaio.

Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos ao teste F de análise de variância. Como não foi observado efeito significativo na interação tempo x pH, as variáveis foram analisadas separadamente.

Foi realizada análise de regressão polinomial para a variável pH e foi aplicado teste de Tukey ($P \leq 0,01$) para a variável tempo.

3.2.3. Efeito da temperatura sobre a atividade do AcMNPV formulado em condições de laboratório

O delineamento experimental adotado para este experimento foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 04 repetições. Os tratamentos foram compostos por 9 temperaturas (20, 24, 27, 30, 32, 35, 37, 40 e $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e tratamento controle mantido sob temperatura ambiente. Para a obtenção destas temperaturas, foram utilizadas BODs da marca Eletrolab, dotadas de regulador automático de temperatura.

Cada repetição constituiu-se de 01 vaso plástico (aproximadamente 500g de capacidade), onde foi semeado algodão, cultivar IAC-22, sendo deixadas 3 plantas por vaso. Ao iniciarem-se os estudos, as plantas estavam com 25 cm de altura, em média, aos

35 dias após o plantio. Estes vasos foram mantidos em casa de vegetação até o início dos estudos. No total, foram utilizados 04 vasos por tratamento, ou um vaso por repetição.

Estes vasos foram colocados em linha reta, espaçados 1,0 m um do outro. O equipamento utilizado para aplicação foi do tipo CO₂ dotado de barra com 3 bicos de pulverização. Esta barra é formada por um bico superior mediano e dois laterais, sendo que por ter o formato em “U” invertido o bico superior pulveriza a planta de cima para baixo e os dois laterais de baixo para cima. O espaçamento entre os dois bicos laterais inferiores é de 60 cm e a altura dos braços laterais 37 cm. O tipo de bico utilizado foi cone vazio, modelo TXVS-4, marca Spraying Systems Co. e filtro Teejet® em polipropileno nº 8079-pp. O equipamento foi calibrado para obtenção de um volume de calda de 200 l/ha.

A dosagem do baculovírus (MNPV de *A. californica* – vEGTDEL) utilizada foi de $1,2 \times 10^{12}$ CIP/ha. A formulação utilizada foi do tipo pó-molhável contendo $3,5 \times 10^9$ CIP/g.

Imediatamente após a aplicação, foram marcadas as folhas que receberam a calda (4 folhas/vaso) e os vasos levados para BOD onde foram mantidos à temperatura estabelecida para cada tratamento (UR = $68,4 \pm 4\%$). Os vasos foram mantidos nas diferentes temperaturas por um período de 8 horas na ausência completa da luz. Após este período, foram coletadas 4 folhas marcadas por vaso, totalizando 16 folhas por tratamento. Estas foram colocadas em placa de Petri, seguindo a metodologia padrão estabelecido para bioensaios descrito no item 3.1. Foram utilizadas lagartas de *H. virescens* no 1º instar com menos de 24 horas de idade. Foram infestadas 4 lagartas por folha totalizando 64 lagartas por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos 4 dias (placa de Petri) e 8 dias (bandejas) após a infestação inicial. Foi determinada a porcentagem de mortalidade baseando-se no número de lagartas vivas encontradas após cada período e o número total de lagartas utilizadas por tratamento.

Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos ao teste F de significância. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (Estudo Fmax) para verificação da necessidade ou não de transformação dos dados.

3.2.4. Influência do armazenamento sobre a atividade do AcMNPV formulado

Foram testados 3 parâmetros diferentes relativos ao armazenamento de patógenos e apresentados a seguir:

- Tipo de embalagem: frasco plástico escuro, frasco de vidro escuro e lata de alumínio;
- Temperatura de armazenamento: 8, 24 e 30°C;
- Período de armazenamento: 0, 1, 2, 3 e 4 meses.

Foram utilizadas 10 gramas/embalagem do baculovírus (AcMNPV – vEGTDEL) em formulação do tipo pó-molhável contendo $3,5 \times 10^9$ CIP/g. As embalagens utilizadas no estudo tinham capacidade para 25g e foram vedadas com parafilme para evitar que a umidade do local de armazenamento interferisse no estudo. A dosagem utilizada para a realização dos bioensaios foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

As amostras armazenadas a 24 e 30°C foram mantidas em BOD e na ausência de luz durante toda a realização do estudo, enquanto que a amostra armazenada a 5°C foi mantida em geladeira, também na ausência de luz.

Mensalmente realizou-se um bioensaio visando-se avaliar a atividade do baculovírus armazenado sobre lagartas de *H. virescens* no 1º instar. Para a realização destes bioensaios, o procedimento seguido foi de pesagem e diluição de cada amostra em 1,0 l de água destilada (pH 5,5). Ao todo foram testados 3 tipos de embalagens e 3 temperaturas, totalizando 9 tratamentos e mais 1 tratamento controle sem a adição do vírus à água de imersão.

Foram coletadas 14 folhas do ponteiro do algodão para cada tratamento (2 folhas/planta). Cada planta coletada foi considerada como uma repetição (total de 7 repetições). Estas folhas foram imersas nas suspensões contendo o baculovírus por aproximadamente 3 segundos. Após completa secagem, as folhas foram recortadas e colocadas em placa de Petri. O procedimento seguido foi o mesmo descrito no item 3.1 para a realização destes bioensaios. Foram utilizadas 4 lagartas de 1º instar de *H. virescens* por placa.

As avaliações foram realizadas aos 4 dias (placa de Petri) e 8 dias (bandejas) após as infestações. Determinou-se o número de lagartas vivas por repetição, sendo em seguida estabelecida a porcentagem de mortalidade para cada tratamento.

Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos à análise fatorial (3x3). Foi realizada a decomposição dos graus de liberdade para as interações significativas e a aplicação do teste t a 5% de probabilidade para a comparação das médias.

3.2.5. Utilização de diferentes adjuvantes visando aumentar a atividade residual do AcMNPV formulado

Foi realizado um experimento constituído de 7 tratamentos (Tabela 1). A metodologia utilizada para este experimento foi a demarcação de uma linha de 20 m² de uma cultura de algodão por tratamento. Foi obedecido um espaçamento de 4 m entre tratamentos (bordadura).

Os adjuvantes testados encontram-se expressos na Tabela 1. Foi testado um adjuvante de nome comercial Kinetic[®] (polialcalineóxido modificado + polidimetilsiloxane e surfactante não iônico) na concentração de 0,2% do volume de calda, sendo este composto utilizado como agente aderente e penetrante (Setre Chemical Company). Outro adjuvante testado foi Mirasperse[®] (Staley Manufacturing Company) testado na concentração de 0,5% do volume de calda, sendo este composto utilizado como uma agente que melhora a viscosidade e a distribuição do produto durante a aplicação. Testou-se ainda o produto Coax[®] (CCT Corporation) na concentração de 3,5% do volume da calda. Este produto é composto basicamente de óleo vegetal, farelo de semente de algodão e dissacarídeo, sendo utilizado como substância fagoestimulante. Segundo Smith et al. (1980) citado por Shapiro et al. (1983), Coax[®] também atua como protetor solar.

O quarto produto utilizado foi o carvão vegetal, sendo que para este tratamento o produto foi adicionado à formulação do baculovírus (ACMNPV), na concentração de 50% em relação ao total de corpos de inclusão poliédrico (CIP). O carvão vegetal foi utilizado como agente de proteção à ação inativadora da radiação ultravioleta sobre o baculovírus.

Tabela 1. Tratamentos, dosagens e adjuvantes testados. Piracicaba (SP), janeiro a fevereiro/1996.

Tratamento	Dosagem X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante
1. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	-
2. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Kinetic [®] (0,2%)
3. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Mirasperse [®] (0,5%)
4. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Coax [®] (3,5%)
5. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)
6. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Dipel [®] PM)	-	250 g/ha
7. Testemunha	-	-

- Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) para os tratamentos 1, 2, 3 e 4.

O equipamento de pulverização foi calibrado de modo a se obter um volume final de calda de 200 l/ha. A diluição do baculovírus foi de $1,2 \times 10^{12}$ CIP/ha, sendo que as amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas de 2,0 l utilizando pulverizador do tipo CO₂. A barra de pulverização utilizada era dotada de 3 bicos do tipo cone vazio, modelo TXVS-4, marca Spraying Systems CO. e filtro Teejet[®] em polipropileno nº 8079-pp. Imediatamente após a aplicação de cada tratamento, foram marcadas 2 folhas por planta, as quais realmente receberam o tratamento por igual, totalizando 40 plantas por tratamento ou 80 folhas marcadas por tratamento.

Após 1 hora, foram coletadas 16 folhas por tratamento (2 folhas marcadas/planta), acondicionadas em sacos de papel e levadas ao laboratório para a realização dos bioensaios. Foi colocada 1 folha por placa de Petri, seguindo o procedimento descrito no item 3.1. O mesmo procedimento foi adotado após 1, 2, 3 e 4 dias após a

aplicação, visando verificar o efeito da adição de adjuvantes sobre a atividade residual do vírus formulado.

As avaliações constituíram-se na contagem do total de lagartas de *H. virescens* vivas e mortas ao final de cada período, seguindo nos bioensaios para folhas coletadas aos 0, 1, 2, 3 e 4 dias após a aplicação.

Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos ao teste F de significância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos ao teste para verificação da homocedasticidade de variâncias (estudo Fmax) para verificação da necessidade ou não da transformação dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da CL₉₀₋₉₉ para lagartas de *H. virescens*

Os valores da CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉ para lagartas de 1^o instar alimentadas com folhas tratadas com baculovírus AcMNPV-vEGTDEL estão expressos na Tabela 2. Tais resultados evidenciam que o valor da CL₉₀ para a referida praga é de $1,3 \times 10^6$ CIP (corpos de inclusão poliédrico)/ml com intervalo de confiança variando de $4,4 \times 10^5$ a $1,3 \times 10^7$ CIP/ml para 90% de probabilidade. Para 95% de probabilidade tem-se um intervalo de confiança variando de $3,3 \times 10^5$ a $9,3 \times 10^7$ CIP/ml.

Tabela 2. Determinação da CL₉₀₋₉₉ para lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1^o instar utilizando AcMNPV-vEGTDEL. Efeito da concentração (CIP/ml) e intervalos de confiança. Piracicaba, SP, 1996.

CL	Concentração (CIP/ml)	90% IC*		95% IC*	
		Limites		Limites	
		Inferior	Superior	Superior	Inferior
CL ₅₀	$7,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$
CL ₉₀	$1,3 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$
CL ₉₉	$1,3 \times 10^7$	-	-	-	-

Resultado bastante similar foi obtido por Vail et al. (1978) em um trabalho de susceptibilidade comparativa de *H. virescens* e *Helicoverpa zea* ao vírus AcMNPV. Foi observado LD₅₀ de $4,09 \times 10^4$ CIP/ml de dieta (intervalo de confiança de 3,5 a $4,71 \times 10^4$ CIP/ml para 95% de probabilidade). Apesar de certa similaridade entre os resultados obtidos. A diluição em dieta artificial para este caso, pode ter elevado a mortalidade larval devido a utilização de substâncias fagoestimulantes.

Já para testes a nível de campo, Vail et al. (1980) e Jaques (1977) demonstraram que a dosagem satisfatória do vírus de *A. californica* (AcMNPV) para o controle de *T. ni* foi de $7,4 \times 10^{11}$ CIP/ha. Os níveis de controle para esta dosagem estiveram acima de 80%. É evidente que a dosagem para testes de campo, na maioria dos casos, deve ser muito maior que a dosagem obtida experimentalmente em laboratório. Comparando-se os dois testes pode-se observar que tomando-se como base a concentração $1,3 \times 10^6$ CIP/ml, que foi a que proporcionou 90% de controle quando convertido para CIP/ha, considerando-se um volume de aplicação de 200 l/ha, apresenta valor próximo ao obtido pelos mesmos autores anteriormente citados ($2,5 \times 10^{11}$ CIP/ha). Pode-se observar ainda que a concentração em campo é maior que a utilizada em testes de laboratório. Isto é explicado por vários fatores como a espécie, instar larval, cultura, aplicação e principalmente a ação dos fatores abióticos como a luz ultravioleta, temperatura, pH, umidade relativa do ar e a precipitação, que são fatores atuantes em condições de campo.

4.2. Avaliação do efeito do pH da calda sobre a atividade do baculovírus

AcMNPV – vEGTDEL, para *H. virescens*

Os valores de mortalidade (%) obtidos para os diferentes níveis de pH da calda e para os diferentes períodos encontram-se expressos nas Tabelas 3 e 4 e Figura 1.

A análise estatística dos resultados obtidos aos 4 dias após a infestação permite observar que a interação pH x tempo não foi significativa (Tabela 4). Sendo assim, os dados de mortalidade obtidos para a variável pH e tempo podem ser analisados separadamente.

Na Figura 1 pode-se observar que de um modo geral, à medida que se eleva o pH da calda, há um aumento na mortalidade. Isto para as avaliações realizadas aos 4 dias após a infestação, pois aos 8 dias, foi observado 100% de mortalidade para todos os pH testados na concentração utilizada de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml. Estes resultados mostram que o meio ácido se mostra inicialmente mais prejudicial ao baculovírus quando comparado ao meio alcalino da calda.

Ignoffo & Garcia (1992) citam que a inativação de baculovirose pode ocorrer para pH ácido combinados com a ação da luz solar. A maioria dos trabalhos realizados para a avaliação do efeito do pH tem procurado estudar o efeito do pH da superfície foliar e não do pH da água utilizada na diluição do baculovírus. Mesmo assim, alguns dados obtidos por Andrews & Sikorowski (1973) utilizando o VPN de *H. virescens* observaram que este não é afetado a pH 9,0, sendo que 99% de inativação foi observado a pH 12. Resultados semelhantes foram obtidos por Batista Filho (1997) quando observou que entre o pH 3 e 9, *Baculovirus anticarsia* não foi afetado, mesmo armazenado por 23

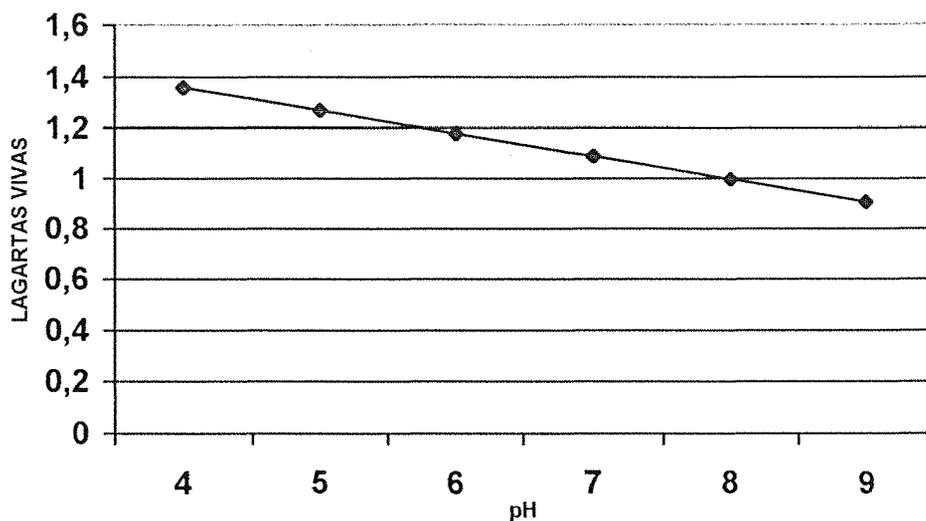
dias. Estudos preliminares em nossas condições têm demonstrado a influência negativa dos pH 3 e 11, após 12 horas, com a diminuição do número de poliedros (Batista et al., 1996).

Pawar & Ramakrishnan (1977) observaram 90% de inativação do *Baculovirus spodoptera* a pH 2, 5, 7 e 9 no mesmo período de tempo, evidenciando que o pH não afetou a virulência. Fixando-se o pH e analisando-se os diferentes períodos de tempo, observa-se que houvera diferença significativa nas avaliações realizadas aos 4 dias após a infestação (Tabela 28). O baculovírus foi afetado quando se armazenaram as amostras ou diluições nos diferentes pH por um período maior ou igual a 48 horas. A mortalidade foi pouco afetada para um período variando de 0 a 24 horas. Entretanto, a mortalidade final (Tabela 4) não foi afetada, não havendo diferença entre os períodos testados. Sendo assim, pode-se constatar que amostras de baculovírus (AcMNPV-vEGTDEL) diluídas em meio mais alcalino, variando de 4,0 a 9,0, pode ser utilizado até 72 horas da sua preparação desde que mantido na ausência de luz e a 26°C.

Tabela 3. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) para *H. virescens* por diferentes períodos (horas) antes da aplicação. Porcentagem de mortalidade ao final de 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

PH*	Mortalidade (%)						
	0h	3h	6h	12h	24h	48h	72h
4,0	91,1	92,8	94,6	83,9	92,8	69,6	69,5
5,0	80,3	92,8	98,2	80,3	92,8	64,3	75,0
6,0	91,1	92,8	96,4	82,1	96,4	66,1	71,4
7,0	91,1	89,3	98,2	71,4	98,2	62,5	60,7
8,0	100,0	94,6	98,2	94,6	96,4	80,3	78,8
9,0	92,8	94,6	96,4	87,5	92,8	76,8	83,9
Testemunha	8,9	3,6	3,6	5,3	1,8	10,7	30,3

*** % mortalidade não corrigida.



$$Y_{ij} = 1,720116618 - 0,090379009 \cdot X_i$$

Figura 1. Número de lagartas vivas de *H. virescens* tratadas com folhas de algodão que receberam o baculovírus diluído em água nos diferentes pHs testados aos 4 dias após a infestação.

Tabela 4. Análise de variância dos dados de mortalidade total agrupando todos os pHs testados para os diferentes períodos de tempo.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
(Tratamentos)	41	238,11224	5,80762	6,21	0,0001
pH	5	15,62245	3,12449	3,34**	0,0061
Tempo (horas)	6	192,04082	32,00680	34,22**	0,0001
pH x tempo	30	30,44898	1,01497	1,09ns	0,3545
Resíduo	252	235,71429	0,93535		
Total	293	473,82653			

Desvio padrão = 0,502530

C.V. = 85,38779

4.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade do baculovírus AcMNPV-vEGTDEL, para *H. virescens*

Os valores de mortalidade (%) obtidos para lagartas de 1º instar de *H. virescens* submetidas ao tratamento com baculovírus previamente exposto a diferentes temperaturas encontram-se na Tabela 5 e Figuras 2 e 3.

A análise da porcentagem de mortalidade obtida aos 4 dias após o oferecimento de folhas tratadas às lagartas, permite observar que temperaturas acima de 27°C reduziram significativamente a mortalidade somente a 30 e 32°C. Acima de 35°C, a taxa de mortalidade voltou a subir, ficando próximo dos valores obtidos abaixo de 27°C (Figura 2). Entretanto, a mortalidade final obtida aos 8 dias após o início do experimento mostra que não houve influência da temperatura sobre a atividade viral. As porcentagens de mortalidade final obtidas para as diferentes temperaturas ficaram sempre próximos de 90% (Tabela 5). Isto permite mostrar que a temperatura do ambiente isoladamente não afetou a atividade do vírus exposto por período de 8 horas (Figura 3).

Tabela 5. Porcentagem de mortalidade de *H. virescens* submetida ao baculovírus AcMNPV-vEGTDEL exposto a diferentes temperaturas. Piracicaba(SP), 1997.

Temperatura (°C)	Mortalidade (%)	
	4 DAT	8 DAT
20	79,7 d	92,2 b
24	51,5 cd	92,2 b
27	59,4 cd	90,6 b
30	15,6 ab	76,5 b
32	29,7 abc	90,6 b
35	42,2 cd	89,0 b
37	51,5 cd	95,3 b
40	51,5 cd	93,7 b
42	48,4 c	93,7 b
Testemunha	4,7 a	9,4 a

* Valores seguidos da mesma letra na coluna vertical não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

** Coeficiente de variação (4 DAT = 58,92 ; 8 DAT = 55,12)

Utilizando temperaturas acima de 50°C, por duas horas, Valicente & Cruz (1993) não observaram efeito sobre a virulência de *B. sporoptera*.

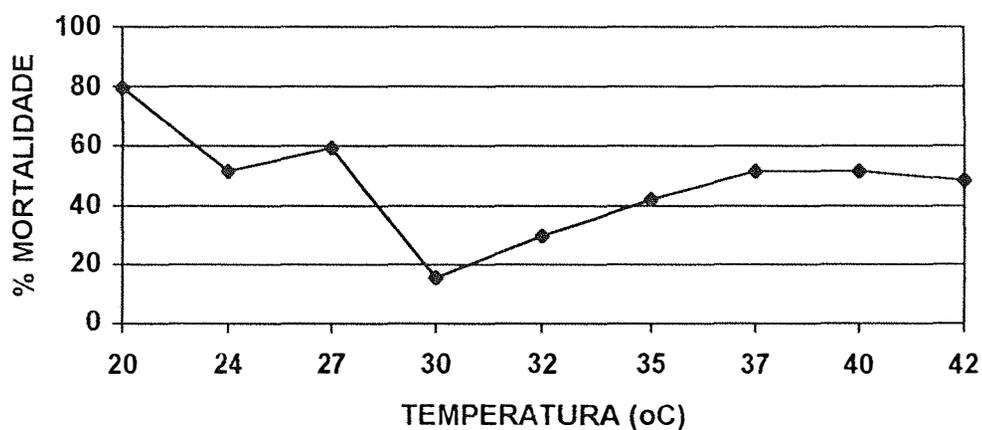


Figura 2. Variação da porcentagem de mortalidade de lagartas de *H. virescens* no 1º instar aos 4 dias após a infestação com folhas tratadas mantidas a diferentes temperaturas.

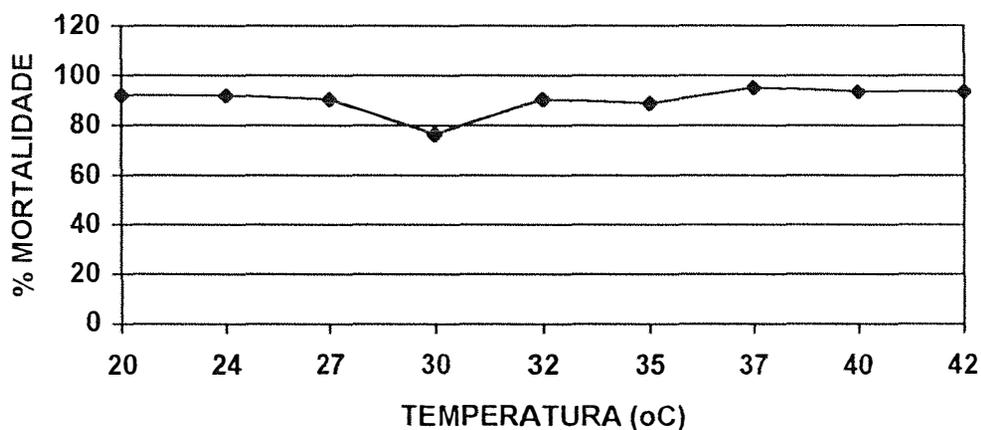


Figura 3. Variação da porcentagem de mortalidade de lagartas de *H. virescens* no 1º instar aos 8 dias após a infestação com folhas não tratadas mantidas a diferentes temperaturas.

Trabalhos desenvolvidos por alguns autores com diferentes viroses de insetos têm mostrado que a inativação do vírus se faz pela ação conjunta da radiação ultravioleta, pH da superfície foliar, temperatura, entre outros fatores (Shapiro & Argauer, 1995).

Em trabalho semelhante desenvolvido por Morris (1971), mesmo expondo-se o VPN de *Lambdina fiscellaria somniaria* (Hulst) à 45°C por um período de 200h, não foi observada uma redução na mortalidade final de lagartas de 5º instar de *L. f. somniaria*.

Augusto & Batista Filho (1994), estudando o efeito de três tipos de inertes pertencentes ao grupo do caulim sobre a atividade de *Baculovirus anticarsia* observaram que, após 20 dias de armazenamento à 45°C, os níveis de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* permaneceram inalterados, exceto para o tratamento caulim tipo 40, que teve sua eficiência reduzida para apenas 10%.

A temperatura do ambiente tem grande influência no desenvolvimento do vírus quando este já se encontra infectando o inseto, ou seja, no desenvolvimento da doença. Temperaturas mais altas aceleram a atividade viral, conseqüentemente, tem-se uma taxa de mortalidade mais alta, entretanto, deve-se determinar a temperatura ideal para cada baculovirose, pois para temperaturas acima ou abaixo do ideal a taxa de mortalidade tende a ser menor (Hunter & Hartsell, 1971).

4.4. Avaliação do efeito do armazenamento sobre a atividade do baculovírus

AcMNPV-vEGTDEL, para *H. virescens*

Os valores de mortalidade (%) obtidos para diferentes tipos de embalagens mantidas a 3 gradientes de temperatura e 4 períodos de armazenamento estão expressos na Tabela 6 e Figuras 4 a, b, c.

A análise dos dados permite observar que à temperatura de 8°C, independentemente do tipo de embalagem, ocorreu satisfatório armazenamento do vírus até 120 dias. A atividade viral praticamente não foi alterada, mantendo a mortalidade de lagartas de 1^o instar próximo a 100% (Tabela 6). Já para o armazenamento realizado à 24°C observou-se uma redução na atividade do vírus, principalmente após 60 dias do início do experimento. Após este período, houve uma redução na mortalidade estatisticamente significativa para o baculovírus armazenado em frasco de alumínio e frasco de vidro escuro, 73,2 e 82,1% respectivamente. Para o vírus armazenado em frasco de plástico escuro, obteve-se 85,7% de mortalidade aos 60 dias. Aos 90 e 120 dias, a maior redução na porcentagem de mortalidade foi observada quando o vírus foi armazenado em frasco de alumínio, 76,8 e 44,6% respectivamente. Para os mesmos períodos, obteve-se 98,2 e 71,4% para a embalagem de vidro escuro e 94,6 e 80,3% para a embalagem de plástico escuro (Tabela 6).

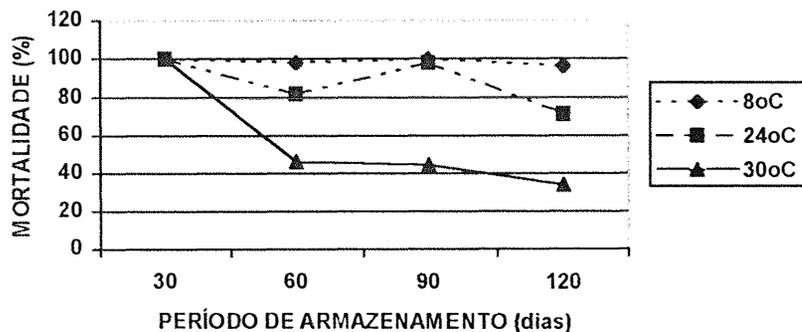
Tabela 6. Influência do armazenamento sobre a atividade do vírus AcMNPV-VEGTDEL. Porcentagem de mortalidade para lagartas de *Heliothis virescens* no 1^o instar ao final de 8 dias após a infestação para os diferentes tratamentos e períodos de armazenamento. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de Embalagem	Temperatura (°C)	Período de armazenamento (dias)			
		30	60	90	120
Frasco de alumínio	8	100,0 p	100,0 p	98,2 p	100,0 p
	24	98,2 p	73,2 efm	76,8 fm	44,6 cd
	30	96,4 p	39,3 bc	17,8 de	21,4 ab
Frasco de vidro escuro	8	100,0 p	98,2 p	100,0 p	96,4 p
	24	100,0 p	82,1 fmo	98,2 op	71,4 def
	30	100,0 p	46,4 cd	44,6 c	33,9 bc
Frasco de plástico escuro	8	100,0 p	98,2 p	98,2 p	100,0 p
	24	100,0 p	85,7 fmop	94,6 mop	80,3 fmo
	30	96,4 p	33,9 bc	25,0 b	17,8 a

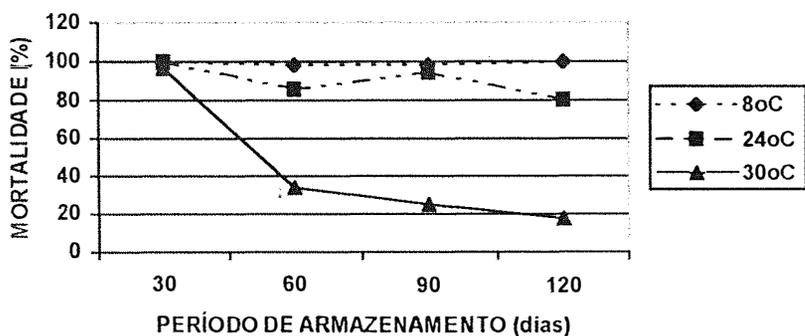
* Valores seguidos da mesma letra (coluna vertical e horizontal) não diferiram significativamente entre si.

Por outro lado, o armazenamento realizado a 30°C foi o mais prejudicial, reduzindo drasticamente a atividade do vírus já a partir de 60 dias do início do experimento (Figuras 4 a, b, c). Aos 30 dias não foi observado qualquer efeito sobre a mortalidade final, entretanto, aos 60 dias todas as amostras acondicionadas nas diferentes embalagens foram afetadas. A porcentagem de mortalidade, neste caso, manteve-se em valores abaixo de 46,4%. Aos 90 dias a embalagem que mais protegeu o vírus da ação da temperatura foi o frasco de vidro escuro (44,6% de mortalidade), seguido pelo frasco de plástico escuro (25,0%) e o frasco de alumínio (17,8%). Apesar de não se observar diferenças significativas, a embalagem de vidro manteve-se superior em relação às demais quanto à proteção ao vírus para temperatura de 30°C. Logo em seguida se observa maior proteção dada pela embalagem de plástico escuro quando comparada ao frasco de alumínio. A análise das Figuras 4 a e b permitem observar os aspectos anteriormente discutidos.

(a)



(b)



(c)

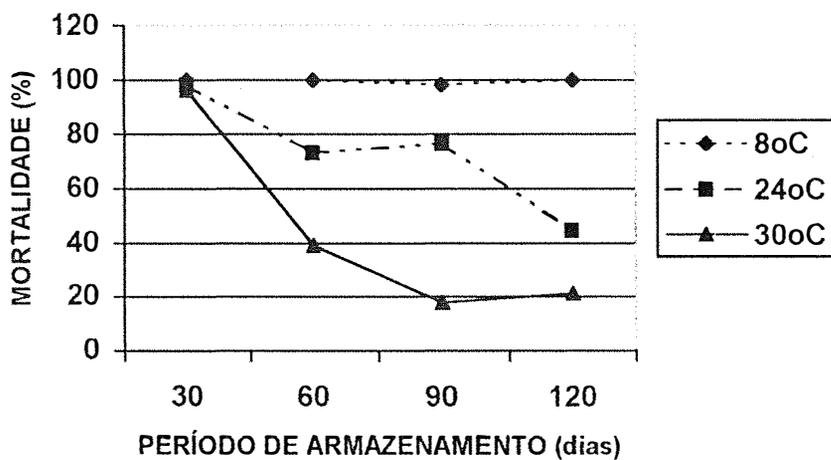


Figura 4. Mortalidade total para lagartas de *Heliothis virescens* no 1º instar que receberam tratamento com baculovírus mantido em (a) frasco de vidro escuro; (b) frasco de plástico escuro; (c) frasco de alumínio, nas diferentes temperaturas e períodos (dias).

A utilização de embalagens que não permitam a incidência da luz sobre o baculovírus se faz necessário para armazenamentos por longo período de tempo. Segundo Jarvis & Garcia (1994), a ausência ou não de luz é o fator mais importante no armazenamento de baculoviroses. Como foram utilizadas somente embalagens que propiciaram completa ausência de luz pode-se, com certeza, afirmar que o fator primordial na degradação do baculovírus (AcMVPN-vEGTDEL) foi a ação da temperatura. Do mesmo modo, pode-se afirmar que o armazenamento deste vírus por um período de 120 dias é perfeitamente possível a 8°C, desde que na ausência de luz e em embalagens vedadas impedindo a ação da umidade relativa do ar. Geissler et al. (1991) observaram que para o VPN de *Manestra brassicae* e o vírus da granulose de *Agrotis segetum* é possível se obter pouca variação na sua eficiência quando armazenados em refrigerador à 6°C por um período de 50 dias.

4.5. Avaliação do efeito da adição de adjuvantes sobre o efeito

residual do AcMNPV-vEGTDEL em *H. virescens*

Os valores de mortalidade (%) para lagartas de 1º instar obtidos ao final de 8 dias após a realização da infestação inicial para os diferentes tratamentos encontram-se expressos na Tabela 7.

Foram testados em mistura com o baculovírus AcMNPV – vEGTDEL, 4 tipos diferentes de adjuvantes. No tratamento 2 foi adicionado 0,2% de Kinetic[®] e para o tratamento 3, 0,5% de Mirasperse[®]. A adição de Kinetic[®] (0,2%) e Mirasperse[®] (0,5%) ao baculovírus formulado não promoveu aumento na atividade do vírus. Observando-se a

Tabela 7, tem-se os mesmos níveis de mortalidade, tanto com como sem a adição destes adjuvantes. Após 1 dia da aplicação observou-se 75,0 e 71,9% de mortalidade respectivamente, contra 62,5% obtido sem a adição de adjuvante. Comportamento semelhante foi observado aos 2, 3 e 4 dias após a aplicação. Tal fato pode ser explicado devido a ausência de precipitação durante o período de realização do experimento. Por se tratar de substâncias promotoras de uma melhor aderência, retenção e distribuição de inseticidas, esperava-se um aumento na atividade do vírus com adição deste tipo de adjuvante.

Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade na utilização destes adjuvantes como incrementadores na atividade do vírus e bactérias (Mcguire & Shasha, 1990). Entretanto, os fatores que mais contribuem para uma diminuição na atividade do baculovírus são a ação da luz ultravioleta, a temperatura e o pH da superfície foliar (Ignoffo et al., 1976; Shapiro et al., 1983; Treacy et al., 1996).

A adição de Coax[®] (3,5%), mostrou efetivo aumentando a mortalidade. Em todas as avaliações realizadas, a ação de Coax[®], promoveu um aumento na mortalidade, quando comparado com o tratamento sem a adição de qualquer adjuvante (Tabela 7). Entretanto, somente na avaliação realizada 1 dia após o tratamento observou-se diferença significativa entre estes tratamentos. Sendo assim, a adição de Coax[®] ao vírus formulado representou um aumento da ordem de 40% na mortalidade final. Segundo Ignoffo et al. (1976), a adição de compostos fagoestimulantes ao vírus formulado permite um aumento na efetividade do baculovírus ou permite uma redução na dosagem de aplicação. Isto se deve a um aumento no consumo foliar, propiciado pelo composto fagoestimulante. Este fato foi evidenciado por Alves et al. (1992) que testaram o efeito fagoestimulante de um adjuvante a base de óleo vegetal quando adicionado à suspensão

aquosa de *B. anticarsia*. Os autores observaram que a diferença no consumo entre folíolos de soja tratados com o vírus e adjuvantes, e vírus sem adjuvantes foi pequeno. Entretanto, essa diferença representou 0,27 cm² de área foliar, contendo 1,4 x 10⁴ CIP a mais do que foi ingerido pelos insetos. O maior consumo de partículas virais propiciou 60% de mortalidade no 6º dia, enquanto que o tratamento com o patógeno isolado (sem adjuvante), observou-se apenas 20% de mortalidade.

Tabela 7. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL em *Heliothis virescens* (F.). Porcentagens de mortalidade total para infestações realizadas após a aplicação dos diferentes tratamentos. Itacemópolis (SP), janeiro/1996.

Tratamento*	Conc. X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	% mortalidade				
			2 h	1 DAT	2 DAT	3 DAT	4 DAT
1. AcMNPV-vEGTDEL	1,2	-	96,9 b	62,5 b	43,3 ab	29,7 ab	20,3 ab
2. AcMNPV-vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	95,3 b	75,0 bc	32,8 ab	31,2 ab	14,1 ab
3. AcMNPV-vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	98,4 b	71,9 bc	42,2 ab	40,6 ab	26,5 ab
4. AcMNPV-vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	98,4 b	87,5 c	50,0 b	53,1 b	32,8 b
5. AcMNPV-vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	100,0 b	93,8 c	62,5 b	50,0 b	34,4 b
6. Dipel ^R PM	250 g/ha	-	26,5 b	18,7 a	17,2 a	26,5 ab	15,6 ab
7. Testemunha	-	-	10,9 a	4,7 a	18,7 a	18,7 a	10,9 a

* Valores seguidos da mesma letra na coluna vertical não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

** Coeficiente de variação (2 h = 17,9; 1 DAT = 38,4; 2 DAT = 31,2; 3 DAT = 29,3; 4 DAT = 18,2)

Resultados bastante semelhantes foram observados com a adição de carvão vegetal (50%). Já na avaliação realizada para infestações realizadas 2 horas após o tratamento, se observou 100% de mortalidade (Tabela 7). Mesmo após 1 dia da aplicação

do vírus, a mortalidade larval se manteve alta (93,8%), reduzindo para 62,5% aos 2 DAT e 50,0% aos 3 DAT. Estes resultados comprovam que a utilização do carvão vegetal propiciou menor redução da mortalidade, pelo menos até 1 dia após o tratamento. A adição de protetores solares à formulação de baculovírus tem propiciado um aumento significativo na sua persistência e efetividade por diferentes períodos. Entretanto, uma forte limitação para a utilização de certos adjuvantes é o seu custo. Os adjuvantes testados nesse trabalho se mostram economicamente viáveis, visto que já são utilizados na agricultura com outras finalidades.

O Dipel[®] PM (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), incluído nesse na dosagem de 250 g/ha, para efeito de comparação, baixíssima mortalidade em todas as infestações realizadas.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos concluiu-se que:

O valor estimado da CL_{90} para lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar é de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

O vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (vEGTDEL) formulado não é afetado pelo pH da calda de 4 a 9.

O baculovírus AcMVPN-vEGTDEL não sofre redução na sua efetividade de controle para lagartas de *H. virescens* no 1º instar em temperatura variando de 20 a 42 °C.

Dentre as temperaturas testadas, 8°C é a temperatura mais apropriada para o armazenamento desse vírus por até 120 dias.

A degradação do patógeno é maior a 30°C, independentemente do tipo de embalagem utilizada para a armazenagem do vírus.

A embalagem de vidro escuro é mais adequada para armazenamento do vírus por 90 dias a 30°C.

Coax[®] (3,5%) e carvão vegetal (50%) aumentam a efetividade do baculovírus por pelo menos 1 dia. Mirasperse[®] a 0,5% (v/v) e Kinetic[®] a 0,2% (v/v) não aumentam a efetividade do mesmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-67, 1925.

ALVES, S.B. Virus entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.171-87.

ALVES, L.F.A.; LEITÃO, A.E.F.; AUGUSTO, U.T.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A. Utilização de um adjuvante protetor contra a radiação solar e fagoestimulante em mistura com um vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera : : Noctuidade). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.59, n, 1 / 2, p. 23-7, 1992.

ANDREWS, G.L.; SIKOROWSKI, P.P. Effects of cotton leaf surfaces on the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.22., n.2, p.290-1, 1973.

AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A. Efeito de inertes do grupo do caulim sobre *Baculovirus anticarsia*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO , 4., Pelotas, 1994. **Resumos**. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, 1994. p. 101.

- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B. Stability of formulations of *Baculovirus anticarsia* emulsifiable oil and wettable powder under laboratory conditions. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.58, n.1-2, p.17-20, 1991.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.A.; AUGUSTO, N.T.; LEITE, L.G.; ALVES, S.B. Avaliação de persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* à campo e laboratório. In: SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL. **Anais**, v.21, n. 3, p 453-62, 1992.
- BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de formulações de *Baculovirus anticarsia*. Piracicaba, 1997. 86p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BATISTA, T.F.C.; BELARMINO, L.C.; BIANCHINI, C.J. Eficiência de *Baculovirus anticarsia* em suspensões preparadas com diferentes tipos de água e níveis de pH. In : SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Resumos**. Foz do Iguaçu: EMBRAPA/CNPSo, 1996. p.425.
- BELL, M.R.; KANAVEL, R.F. Tobacco budworm: Development of spray adjuvant to increase effectiveness of a nuclear polyedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v.71, n.2, p.350-2, 1978.
- BLISS, C.I. The calculation of the dosage-mortality curve. **Annual Applied of Biology**, v.22, p.134-67, 1935.
- BULL, D.L.; RIDGWAY, R.L.; HOUSE, V.S.; PRYOR, N.W. Improved formulations of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v.69, n.6, p.731-6, 1976.

- BULLOCK, H.R.; HOLLINGSWORTH, J.P.; HARTSTACK, A.W. Jr. Virulence of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus exposed to monochromatic ultraviolet irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, n.3, p.419-22, 1970.
- BURGES, H.D.; CROZIER, G.; HUBER, J.A. A review of safety tests on baculoviruses. **Entomophaga**, v.25, n.4, p.329-40, 1980.
- CHERRY, A.J.; PARNELL, M.A.; SMITH, D.; JONES, K.A. Oil formulation of insect viruses. **Bulletin Oilb-Srop**, v.17, n.3, p.254-7, 1994.
- COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In; BURGES, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. New York: Academic press, 1981. p.621-33.
- DAVID, W.A.L. The effect of ultraviolet radiation of known wavelenghts on a granulosis virus of *Pieris brassicae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.14, p.334-42, 1969.
- DAVID, W.A.L.; ELLABY, S.J.; TAYLOR, G. The stability of a purified granulosis virus of the European cabbageworm, *Pieris brassicae*, in dry deposits of intact capsules. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, n.2, p.228-33, 1971.
- EASWARAMOORTHY, S.; JAYARAJ, S. Effect of temperature and storage time on the infectivity of granulosis virus of sugarcane shoot borer, *Chilo infucatellus* Snell. **Journal of Biology Control**, v.2, n.2, p.106-8, 1988.
- GEISSLER, K.; SCHLIEPHAKE, E.; STEGLICH, R. First results from experiments on the storage stability and biological efficacy of different baculovirus formulation. **Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz**, v.27, n.6, p.479-85, 1991.

- HAMM, J.J.; SHAPIRO, M. Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener. **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.6, p.2149-52, 1992.
- HOSTETTER, D.L.; PINELL, R.E.; GREER, P.A.; IGNOFFO, C.M. A granulosis virus of *Pieris rapae* as a microbial control agent on cabbage in Missouri. **Environmental Entomology**, v.2, n.6, p. 11 09-12, 1973.
- HUNTER, D.K.; HARTSELL, P.L. Influence of temperature on Indian-meal larvae infected with a granulosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, n.3, p.347-49, 1971.
- HWANG, G.H.; DING, T. Studies on the nuclear polyhedrosis virus disease of the cotton leafworm, *Prodenia litura* F. **Acta Entomologica Sinica**, v.18, n.1, p.17-24, 1975.
- IGNOFFO, C.M.; BATZER, O.F. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. **Journal of Economic Entomology**, v.64, n.4, p.850-3, 1971.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting activity of inclusion bodies of the *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.21, n.1, p.210-13, 1992.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* Baculovirus by simulated sunlight-UV. **Environmental Entomology**, v.23, n.4, p.1025-9, 1994.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Aromatic/Heterocyclic amino acids and the simulated sunlight-ultra-violet inactivation of the *Heliothis/Helicoverpa* Baculovirus. **Environmental Entomology**, v.24, n.2, p.480-2, 1995.

- IGNOFFO, C.M. & GARCIA, C. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa Heliiothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.192-4, 1996.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; PINNELL, R.E. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. **Environmental Entomology**, v.3, p.117-9, 1974.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SMITH, D.B. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. **Journal of Economic Entomology**, v.69, n.2, p.207-10, 1976.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by na ultra-violet light source. **Environmental Entomology**, v.6, p.411-5, 1977.
- IGNOFFO, C.M.; SHASHA, B.J.; SHAPIRO, M. Sunlight ultraviolet protection of the *Heliiothis* nuclear polyhedrosis virus through starch encapsulation tecnology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.134-6, 1991.
- IM, D.J.; JIN, B.R.; CHOI, K.M.; KONG, S.K. Microbial control of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fab.), using a *S. litura* nuclear polyhedrosis virus. I. The effect of spray on soybean leaves, temperature, storage and sunlight of pathogenicity of the virus. **Korean Journal of Applied Entomology**, v.29, n.3, p.184-9, 1990.
- JAQUES, R.P. Field efficacy of viruses infections to the cabbage looper and imported cabbage worm on the late cabbage. **Journal of Economic Entomology**, v 70, n.1, p.111-8, 1977.

- JARVIS, D.L.; GARCIA, A. Jr. Long-term stability of baculoviruses stored under various conditions. **Biotechniques Euro Edition**, v.16, p.508-13, 1994.
- KAO, H.W. & ROSE, R.I. Effect of sunlight on the virulence of the granulosis virus of the diamondback moth and evaluation of some protective adjuvants. **Plant Protection Bulletin**, v.18, n.4, p.391-5, 1976.
- KELLER, S. Microbiological control of the codling moth (*Laspeyresia pomonella* (L.)) (= *Carpocapsa pomonella*) with specific granulosis virus. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.73, n.2, p.137-81, 1973.
- KINSINGER, R.A.; MacGAUGHEY, W.H. Stability of *Bacillus thuringiensis* and a granulosis virus of *Plodia interpunctella* on stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.69, n.2, p.149-54, 1976.
- KNITTEL, M.D.; FAIRBROTHER, A. Effects of temperature and pH on survival of free nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.12, p.2771-73, 1987.
- KWANG, G.H.; DING, T. Studies on the nuclear polyhedrosis virus disease of the cotton leafworm, *Prodenia litura* F. **Acta Entomologica Sinica**, v.18, n.1, p.17-24, 1975.
- MacCOLLUM, G.B.; RED, E.M. A nuclear polyhedrosis virus of the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, n.3, p.337-43, 1971.
- MacGAUGHEY, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v.229, p.193-5, 1985.

- MARTIGNONI, M.E.; IWAI, P.J. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas-fir Tussock moth (Lepidoptera – Lymantriidae) Baculovirus. **Journal of Economic Entomology**, v.78, n.4, p.982-7, 1985.
- MARTIGNONI, M.W.; IWAI, P.J. **Genetal technical report**. PNW-159, USDA, 50p., 1986.
- McGUIRE, M.R.; SHASHA, B.S. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.5, p.1813-7, 1990.
- McLEOD, P.J.; YEARIAN, W.C.; YOUNG, S.Y. Inactivation of *Baculovirus heliothis* by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.30, n.2, p.237-41, 1977.
- MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. **Comunicado Técnico**, EMBRAPA/CNPSo, Londrina, n.23, p. 1-21, 1983.
- MORRIS, O.N. The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations, and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, n.2, p.292-4, 1971.
- NARAYANAN, K.; SUBRAMANIAN, T.R. Effect of hydrogen-ion concentration on the activity on inclusion bodies of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. **Current Science**, v.44, n.22, p.814, 1975.
- NORDIN, G.L. Inactivation of a Baculovirus of *Hyphantria cunea* by sunlight and ultraviolet irradiation (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.50, n.1, p.18-22, 1977.

- O'REILLY, D.R.; MILLER, A. Baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, v.245, p.1110-2, 1989.
- PADMAVATHAMMA, K.; VEERESH, G.K. Effect of sunlight protectants and time of application on the virulence of nuclear polyhedrosis virus of *Plutella xylostella* (L.). **Current Research**, v.24, n.5, p.92-4, 1995.
- PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E. & LEPLA, C., ed. **Advances in insect rearing for research & pest management**. Westview Press, Oxford & IBH Publishing Co. Put Ltd, p. 195-209, 1992.
- PAWAR, V.M.; RAMAKRISHNAN, N. Investigations on the nuclear polyhedrosis of *Prodenia litura* Fabricius – I. nature of the polyhedral disease. **Indian Journal of Entomology**, v.33, n.2, p.111-22, 1971.
- PAWAR, V.M.; RAMAKRISHNAN, N. Stability of the baculovirus of *Spodoptera litura* (Fabricius). **Journal of Entomological Research**, v.1, n.2, p.206-12, 1977.
- PRITCHETT, D.W.; YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C. Efficacy of baculoviroses against field populations of fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.15, n.3, p.332-6, 1980.
- RAMOSKA, W.A.; STAIRS, G.R.; HINK, W.F. Ultraviolet light activation of insect nuclear polyhedrosis virus. **Nature**, v.253, n.5493, p.628-9, 1975.
- RIBEIRO, H.C.T.; PAVAN, O.H.O. Effect of temperature on the development of baculoviroses. **Journal of Applied Entomology**, v.118, n.3, p.316-20, 1994.

- SAADANY, G.B. EL; MOAWAD, G.M.; RIZK, M.A.; TANTAWY, J. The complex interaction between temperature and bioactivity of nuclear polyhedrosis virus infecting *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v.70, n.1, p.117-27, 1992.
- SCHMID, A. Investigations on the persistence of the granulosis virus of the larch bud moth *Zeiraphera diniana* (Gn.) and the protective effect of various substances. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.76, n.1, p.31-49, 1974.
- SHAPIRO, M. Host tissues and metabolic products as ultraviolet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.13, n.4, p.1131-4, 1984.
- SHAPIRO, M. Effectiveness of B vitamins as UV screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.14, n.6, p.705-8, 1985.
- SHAPIRO, M. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.2, p.548-50, 1989.
- SHAPIRO, M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.5, p.1682-6, 1992.
- SHAPIRO, M.; ARGAUER, R. Effect of pH, temperature, and ultraviolet radiation on the activity of an optical brightener as a viral enhancer for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. **Journal of Economic Entomology**, v.88, n.6, p.1602-06, 1995.

- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J.L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus activity by optical brighteners. **Journal of Economic Entomological**, v.85, n.4, p.1120-4, 1992.
- SHAPIRO, M.; AGIN, P.P.; BELL, R.A. Ultraviolet protectants of the gypsy moth (Lepidoptera: Limantriidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.12, n.3, p.982-5, 1983.
- SMIRNOFF, W.A. The effect of sunlight on the nuclear-polyhedrosis virus of *Neodiprion swainei* with measurement of the solar energy received. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, n.2, p.179-88, 1972.
- SMITH, D.B.; HOSTETTER, D.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation and equipment on application of a viral (*Baculovirus heliothis*) insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.71, n.5, p.814-7, 1978.
- SUBRAHMANYAM, B.; RAMAKRISHNAN, N. Influence of a baculovirus infection on molting and food consumption by *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.38, p.161-8, 1981.
- TABASHINK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, p.1671-6, 1990.
- THOMAS, E.D.; REICHELDERFER, C.F.; HEIMPERL, A.M. The effect of soil pH on the persistence of cabbage looper nuclear polyhedrosis virus in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.21, n.1, p.21-5, 1973.

- TREACY, M.F.; ALL, J.N. Impact of insect-specific AaHIT gene insertion on inherent bioactivity of baculovirus against tobacco budworm, *Heliothis virescens* and cabbage looper, *Trichoplusia ni*. In: Beltwide Cotton Conference, Nashville, 1996. **Proceedings**. Nashville: 1996.
- VAIL, P.V.; JAY, D.L.; STEWART, F.D.; MARTINEZ, A.J.; DULMAGE. Comparative susceptibility of *Heliothis virescens* and *H. zea* to the nuclear polyhedrosis virus isolated from *Autographa californica*. **Journal of Economic Entomology**, v.71, n.2, p.293-6, 1978.
- VAIL, P.V.; SEAY, R.E.; DEBOLT, J. Microbial and chemical control of the cabbage looper on fall lettuce. **Journal of Economic Entomology**, v.73, n.1, p.72-5, 1980.
- VALICENTE, F.H. ; CRUZ, I. Efeito do tempo de armazenamento em temperatura ambiente sobre o *Baculovirus spodoptera*, na mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba: SEB, 1993. p. 333.
- YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C. Persistence of *Heliothis* VPN on foliage of cotton, soybean, and tomato. **Environmental Entomology**, v.3, n.2, p.253-5, 1974.
- YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C. Influence of buffers on pH of cotton leaf surface and activity of a *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.11, n.3, p.277-82, 1976.
- YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C.; KIM, K.S. Effect of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.29, n.1, p.105-11, 1977.

ZARINS, I.; RITUMA, I.; ZARIN, I.A.; RITUMA, I.A.; SPALVINS, Z. Preliminary studies on the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly *Neodiprion sertifer* Geoffr. **Forest Protection**, p.68-72, 1973.

APÊNDICE

Tabela 8. Determinação da CL₉₀₋₉₉ para lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar. Número de lagartas testadas, número de lagartas vivas por repetição e % mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1996.

Concentração (CIP/ml)**	Nº de lagartas										Total	% Mor- talidade*	
	Testadas	1	2	3	4	5	6	7	8	9			10
1. 6,0 x 10 ⁶	80	7	5	1	8	3	6	3	4	3	2	42	47,5
2. 6,0 x 10 ⁵	80	4	7	5	3	7	5	5	5	4	4	47	41,2
3. 6,0 x 10 ⁴	80	8	6	6	7	8	5	5	8	8	7	70	12,5
4. 6,0 x 10 ³	80	4	5	6	4	7	7	8	6	8	7	62	22,5
5. 6,0 x 10 ²	80	7	8	8	7	8	7	8	7	8	7	75	6,2
6. 6,0 x 10 ¹	80	8	5	8	8	7	5	8	8	7	6	70	12,5
7. Testemunha	80	8	7	8	7	7	7	7	8	8	6	73	8,7

*% mortalidade não corrigida.

** Virus - AcMNPV-vEGTDEL

Tabela 9. Determinação da CL₉₀₋₉₉ para lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1^o instar. Número de lagartas testadas, número de lagartas vivas por repetição e % mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1996.

Concentração (CIP/ml)**	N ^o de lagartas										Total	% Mor- talidade*	
	testadas	1	2	3	4	5	6	7	8	9			10
1. 6,0 x 10 ⁶	80	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	97,5
2. 6,0 x 10 ⁵	80	0	1	0	0	2	0	1	0	0	3	7	91,2
3. 6,0 x 10 ⁴	80	6	3	4	6	6	5	2	6	7	4	49	38,7
4. 6,0 x 10 ³	80	4	4	6	3	7	5	6	4	7	7	53	33,7
5. 6,0 x 10 ²	80	7	7	8	6	7	7	8	6	8	7	71	11,2
6. 6,0 x 10 ¹	80	8	5	8	6	6	7	8	8	6	8	70	12,5
7. Testemunha	80	8	7	7	8	7	7	8	7	6	6	71	11,2

* % mortalidade não corrigida.

** Vírus - AcMNPV-*vEGTDEL*

Tabela 10. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) para *H. virescens* períodos (horas) antes da aplicação. Porcentagem de mortalidade ao final de 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

pH *	% mortalidade							
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	
4,0	91,1	92,8	94,6	83,9	92,8	69,6	69,6	
5,0	80,3	92,8	98,2	80,3	92,8	64,3	75,0	
6,0	91,1	92,8	96,4	82,1	96,4	66,1	71,4	
7,0	91,1	89,3	98,2	71,4	98,2	62,5	60,7	
8,0	100,0	94,6	98,2	94,6	96,4	80,3	67,8	
9,0	92,8	94,6	96,4	87,5	92,8	76,8	83,9	
Testemunha	8,9	3,6	3,6	5,3	1,8	10,7	30,3	

* Concentração utilizada para cada pH foi $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % mortalidade não corrigida.

Tabela 11. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 0 hora antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição							% mortalidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total	
1. pH 4,0	56	0	1	2	1	0	1	0	5	91,1
2. pH 5,0	56	0	0	1	0	5	3	2	11	80,3
3. pH 6,0	56	1	0	0	0	1	1	2	5	91,1
4. pH 7,0	56	0	2	0	1	1	1	0	5	91,1
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	2	0	0	1	1	0	4	92,8
7. Testemunha	56	8	7	7	7	7	7	8	51	8,9

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 12. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 3 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas		Repetição							% mortalidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total	
1. pH 4,0	56	0	1	0	0	1	1	1	4	92,8
2. pH 5,0	56	0	1	0	1	0	2	0	4	92,8
3. pH 6,0	56	2	0	1	0	0	0	1	4	92,8
4. pH 7,0	56	2	0	0	1	1	2	0	6	89,3
5. pH 8,0	56	0	1	0	1	1	0	0	3	94,6
6. pH 9,0	56	0	1	0	0	1	1	0	3	94,6
7. Testemunha	56	8	8	7	8	7	8	8	54	3,6

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^8$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 13. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 6 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas testadas**	Repetição								Total	% mortalidade***
		1	2	3	4	5	6	7	8		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	1	0	2	3	94,6	
2. pH 5,0	56	0	0	0	1	0	0	0	1	98,2	
3. pH 6,0	56	0	1	1	0	0	0	0	2	96,4	
4. pH 7,0	56	1	0	0	0	0	0	0	1	98,2	
5. pH 8,0	56	1	0	0	0	0	0	0	1	98,2	
6. pH 9,0	56	1	0	0	0	0	0	1	2	96,4	
7. Testemunha	56	8	7	8	8	8	7	8	54	3,6	

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 14. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 12 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição							Total	% morta- lidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7			
1. pH 4,0	56	3	2	1	1	0	0	2	9	83,9	
2. pH 5,0	56	2	1	1	2	2	2	1	11	80,3	
3. pH 6,0	56	1	3	2	0	0	2	2	10	82,1	
4. pH 7,0	56	3	4	1	3	1	3	1	16	71,4	
5. pH 8,0	56	0	1	1	0	1	0	0	3	94,6	
6. pH 9,0	56	0	2	2	0	2	1	0	7	87,5	
7. Testemunha	56	8	7	8	8	7	7	8	53	5,3	

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^8$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 15. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 24 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição								Total	% morta- lidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7				
1. pH 4,0	56	0	0	1	1	0	1	1	1	4	92,8	
2. pH 5,0	56	1	0	1	2	0	0	0	0	4	92,8	
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	2	2	96,4	
4. pH 7,0	56	1	0	0	0	0	0	0	0	1	98,2	
5. pH 8,0	56	1	0	1	0	0	0	0	0	2	96,4	
6. pH 9,0	56	0	0	0	2	0	0	2	2	4	92,8	
7. Testemunha	56	8	8	8	8	8	7	8	8	55	1,8	

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 16. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV- ν EGTDEL) mantido diluído por 48 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas testadas**	Repetição							% mortalidade***	
		1	2	3	4	5	6	7		Total
1. pH 4,0	56	1	2	4	0	1	4	5	17	69,6
2. pH 5,0	56	2	3	4	4	3	3	1	20	64,3
3. pH 6,0	56	2	2	3	4	3	2	3	19	66,1
4. pH 7,0	56	3	1	3	2	4	5	3	21	62,5
5. pH 8,0	56	0	2	0	5	0	1	3	11	80,3
6. pH 9,0	56	2	2	3	2	3	1	0	13	76,8
7. Testemunha	56	8	7	8	8	6	7	6	50	10,7

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^8$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 17. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 72 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas testadas**	Repetição							Total	% mortalidade***
		1	2	3	4	5	6	7		
1. pH 4,0	56	3	1	2	4	2	1	4	17	69,6
2. pH 5,0	56	4	2	2	2	1	1	2	14	75,0
3. pH 6,0	56	2	4	4	1	1	2	2	16	71,4
4. pH 7,0	56	2	1	6	2	3	3	5	22	60,7
5. pH 8,0	56	4	3	1	2	3	2	3	18	67,8
6. pH 9,0	56	2	0	2	3	1	1	0	9	83,9
7. Testemunha	56	3	5	7	6	6	5	7	39	30,3

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 18. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 0 hora antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição								% mortalidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	7	7	6	7	7	7	8	49		12,5

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 19. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-VEGTDEL) mantido diluído por 3 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição								Total	% morta- lidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	8			
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	7	8	6	8	7	8	8	7	8	52	7,1

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 20. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 6 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas		Repetição								% mortalidade***
	testadas**	I	2	3	4	5	6	7	Total		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	8	8	7	7	8	7	8	8	53	5,3

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^8$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 21. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV- ν EGTDEL) mantido diluído por 12 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas		Repetição								% mortalidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	8	7	8	8	7	7	8	8	53	5,3

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 22. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 24 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas								Total	% morta- lidade***
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	8	8	8	8	8	7	8	55	1,8

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 23. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL) mantido diluído por 48 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº lagartas		Repetição								% mortalidade***	
	testadas**		1	2	3	4	5	6	7	Total		
1. pH 4,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56		0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56		8	7	7	8	6	6	6	6	46	17,8

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1º instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 24. Efeito de diferentes pH da calda sobre a atividade do vírus (AcMNPV-VEGTDEL) mantido diluído por 72 horas antes da aplicação. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	N ^o lagartas		Repetição							% morta- lidade***	
	testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total		
1. pH 4,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
2. pH 5,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
3. pH 6,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
4. pH 7,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
5. pH 8,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
6. pH 9,0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
7. Testemunha	56	3	5	7	6	6	5	7	7	39	30,3

* Concentração utilizada para cada pH foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

** Foram utilizadas lagartas de 1^o instar.

*** % de mortalidade não corrigida.

Tabela 27. Aplicação do teste de Tukey para a variável tempo.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Tempo (horas)	6	192,04082	32,00680	32,60**	0,0001
Resíduo	287	281,78571	0,98183		
Total	293	473,82653			

Desvio padrão = 0,405298 C.V. = 87,48259

Tabela 28. Grupo de Tukey para as médias da variável tempo.

Tempo (horas)	Média	Grupo de Tukey
48	2,4048	a
72	2,2143	a
12	1,3333	b
0	0,7143	b c
3	0,5714	c
24	0,4286	c
6	0,2619	c

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Nível de significância 1%

Quadrado médio do resíduo = 0,981832

Faixa crítica estudentizada = 4,933

Diferença mínima significativa = 0,7543

Tabela 29. Efeito direto da temperatura sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL). Número total de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº de lagartas					Repetição					Mortalidade %
	Testadas	1	2	3	4	Total					
1. 20°C	64	1	4	7	1	13	79,7 d				
2. 24°C	64	4	12	8	7	31	51,5 cd				
3. 27°C	64	7	7	7	5	26	59,4 cd				
4. 30°C	64	13	15	14	12	54	15,6 ab				
5. 32°C	64	12	12	12	9	45	29,7 abc				
6. 35°C	64	8	7	13	9	37	42,2 bc				
7. 37°C	64	9	10	6	6	31	51,5 cd				
8. 40°C	64	8	8	7	8	31	51,5 cd				
9. 42°C	64	8	6	8	11	33	48,4 c				
10 Testemunha	64	16	16	14	15	61	4,7 a				

* Concentração testada foi de $1,2 \times 10^{12}$ CIP/ha.

** Valores seguidos da mesma letra não diferiram significativamente entre si.

- F = 11,91**

- Tukey (5%) (DMS = 4,8642)

Tabela 30. Efeito direto da temperatura sobre a atividade do vírus (AcMNPV- ν EGTDEL). Número total de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tratamento *	Nº de lagartas					Repetição				Mortalidade %
	Testadas	1	2	3	4	Total				
1. 20°C	64	1	1	2	1	5	92,2 b			
2. 24°C	64	0	4	1	0	5	92,2 b			
3. 27°C	64	2	2	2	0	6	90,6 b			
4. 30°C	64	6	6	2	1	15	76,5 b			
5. 32°C	64	1	2	0	3	6	90,6 b			
6. 35°C	64	4	0	1	2	7	89,0 b			
7. 37°C	64	0	3	0	0	3	95,3 b			
8. 40°C	64	1	3	0	0	4	93,7 b			
9. 42°C	64	1	0	0	3	4	93,7 b			
10 Testemunha	64	16	15	13	14	58	9,4 a			

* Concentração testada foi de $1,2 \times 10^{12}$ CIP/ha.

** Valores seguidos da mesma letra não diferiram significativamente entre si

- F = 28,91**

- Tukey (5%) (DMS = 3,7652); CV = 55,123; DP = 0,8966

Tabela 31. Influência do armazenamento por um período de 30 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de Embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas		Repetição							% mortalidade***		
		Testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total			
Frasco de alumínio	8	56	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3	94,6
	24	56	2	2	1	3	3	3	3	1	1	15	73,2
	30	56	5	5	2	1	1	1	1	1	1	16	71,4
Frasco de vidro escuro	8	56	1	1	2	1	1	1	1	1	0	7	87,5
	24	56	1	0	4	0	1	1	1	1	1	8	85,7
	30	56	1	0	1	3	2	2	2	2	2	11	80,3
Frasco de plástico escuro	8	56	1	1	0	0	1	1	0	1	1	4	92,8
	24	56	2	2	2	2	1	1	2	2	2	13	76,8
	30	56	3	4	1	1	1	1	2	3	3	15	73,2
Testemunha		56	7	8	7	8	8	8	8	8	8	54	3,6

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 32. Influência do armazenamento por um período de 60 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas		Repetição							% mortalidade***
		Testadas**	1	2	3	4	5	6	7	Total	
Frasco de alumínio	8	56	2	1	3	3	1	0	2	12	78,5
	24	56	3	4	5	5	2	6	3	28	50,0
	30	56	6	4	5	6	7	3	2	37	33,9
Frasco de vidro escuro	8	56	2	3	2	0	3	1	3	14	75,0
	24	56	4	6	5	2	2	5	3	27	51,8
	30	56	5	7	6	6	7	3	4	38	32,1
Frasco de plástico escuro	8	56	3	2	2	3	1	2	2	17	69,6
	24	56	4	2	3	4	3	4	3	23	58,9
	30	56	7	6	7	7	5	4	7	43	23,2
Testemunha		56	8	8	7	8	7	8	6	52	7,1

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 33. Influência do armazenamento por um período de 90 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas Testadas**	Repetição							% mortalidade***	
			1	2	3	4	5	6	7		Total
Frasco de alumínio	8	56	6	6	6	7	7	7	6	45	19,6
	24	56	8	8	8	8	8	8	8	56	0,0
	30	56	8	8	8	8	8	8	8	55	1,8
Frasco de vidro escuro	8	56	8	5	6	5	6	6	7	44	21,4
	24	56	8	7	7	8	8	8	6	50	10,7
	30	56	7	8	7	7	7	8	7	52	7,1
Frasco de plástico escuro	8	56	6	6	3	7	7	8	7	43	5,3
	24	56	8	7	6	8	8	7	6	48	14,3
	30	56	8	6	7	7	7	8	8	52	7,1
Testemunha		56	6	7	7	7	7	7	8	50	10,7

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 34. Influência do armazenamento por um período de 120 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 4 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas Testadas**	Repetição							Total	% mortalidade***	
			1	2	3	4	5	6	7			
Frasco de alumínio	8	56	4	4	5	6	4	4	4	3	30	46,4
	24	56	6	6	7	7	8	8	8	8	50	10,7
	30	56	7	6	7	6	6	7	7	6	46	17,8
Frasco de vidro escuro	8	56	4	6	6	5	5	6	5	4	36	35,7
	24	56	7	7	7	6	6	6	6	7	46	17,8
	30	56	7	8	7	6	6	8	5	7	48	14,3
Frasco de plástico escuro	8	56	6	7	7	5	5	4	5	3	37	33,9
	24	56	8	7	8	7	7	7	8	6	51	8,9
	30	56	6	8	8	7	7	7	8	8	52	7,1
Testemunha		56	8	8	8	6	6	8	8	7	53	5,3

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 37. Decomposição dos graus de liberdade da interação tempo x temperatura, decompondo o tempo.

Tempo (dias)	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Temp. x 30	2	20,698413	10,349206	9,3010**	0,0001
Temp. x 60	2	130,412698	65,206349	58,6020**	0,0001
Temp. x 90	2	19,650794	9,825397	8,8302**	0,0002
Temp. x 120	2	60,095238	30,047619	27,0043**	0,0001

* significativo ao nível de 1%.

Tabela 38. Aplicação do teste t a 5% de probabilidade.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Média	Teste t a 5%
90	30	7,571	a
90	24	7,333	a
120	24	7,000	a
120	30	6,952	a
90	8	6,286	b
60	30	5,429	c
120	8	4,905	c
60	24	3,714	d
30	30	2,000	e
60	8	1,905	e
30	24	1,714	e
30	8	0,667	h

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 39. Decomposição dos graus de liberdade da interação temperatura x embalagem, fixando a temperatura.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Modelo	8	201,07936508	25,13492063	3,99**	0,0002
Temperatura	2	188,79365079	94,39682540	14,97**	0,0001
Embalagem	2	1,53174603	0,76587302	0,12	0,8857
Temperatura*Embalagem	4	10,75396825	2,68849206	0,43	0,7895
Resíduo	243	1532,10714286	6,30496767		
Total	251	1733,18650794			
Desvio padrão = 0,116017		C.V. = 54,31453			

Tabela 40. Decomposição dos graus de liberdade da interação tempo x embalagem, decompondo o tempo.

Frasco	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Temp. x 1	2	84,309524	42,154762	6,6860	0,0015
Temp. x 2	2	43,880952	21,940476	3,4799	0,0324
Temp. x 3	2	71,357143	35,678571	5,6588	0,0040

Tabela 41. Aplicação do teste t a 5% de probabilidade.

Tempo (horas)	Frasco	Média	Teste t (5%)
30	3	5,785714	a
30	1	5,357143	a
30	2	5,321429	a
24	1	5,321429	a
24	3	4,821429	a b
24	2	4,678571	a b
8	2	3,571429	b c
8	3	3,535714	b c
8	1	3,214286	c

Tabela 43. Influência do armazenamento por um período de 60 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas Testadas**	Repetição							% mortalidade***		
			1	2	3	4	5	6	7		Total	
Frasco de alumínio	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	2	1	3	3	1	2	2	3	15	73,2
	30	56	5	4	7	6	7	3	2	2	34	39,3
Frasco de vidro escuro	8	56	0	1	0	0	0	0	0	0	1	98,2
	24	56	1	2	2	0	1	2	2	2	10	82,1
	30	56	3	6	5	3	6	3	4	4	30	46,4
Frasco de plástico escuro	8	56	0	0	0	1	0	0	0	0	1	98,2
	24	56	2	0	1	2	2	0	1	8	85,7	
	30	56	7	4	6	5	4	4	7	7	37	33,9
Testemunha		56	7	6	7	8	7	8	6	6	49	12,5

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 42. Influência do armazenamento por um período de 30 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de Embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas testadas**	Repetição							% mortalidade***	
			1	2	3	4	5	6	7		Total
Frasco de alumínio	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	1	0	0	0	0	0	0	1	98,2
	30	56	1	1	0	0	0	0	0	2	96,4
Frasco de vidro escuro	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	30	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
Frasco de plástico escuro	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	30	56	0	2	0	0	0	0	0	2	96,4
Testemunha		56	7	7	7	7	8	7	7	50	10,7

* Virus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 44. Influência do armazenamento por um período de 90 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas Testadas**	Repetição							% mortalidade***		
			1	2	3	4	5	6	7		Total	
Frasco de alumínio	8	56	0	1	0	0	0	0	0	0	1	98,2
	24	56	1	3	1	2	2	1	3	1	13	76,8
	30	56	5	7	8	5	7	7	7	7	46	17,8
Frasco de vidro escuro	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	1	0	2	0	0	0	1	0	4	98,2
	30	56	1	6	2	2	5	6	6	5	31	44,6
Frasco de plástico escuro	8	56	0	0	0	0	0	1	0	0	1	98,2
	24	56	1	0	0	1	1	1	0	0	3	94,6
	30	56	7	5	7	7	2	7	6	8	42	25,0
Testemunha		56	6	7	7	7	7	7	8	8	50	10,7

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) – vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 45. Influência do armazenamento por um período de 120 dias sobre a atividade do vírus (AcMNPV-vEGTDEL)*. Número de lagartas de *Heliothis virescens* (F.) no 1º instar testadas por tratamento, número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade 8 dias após a infestação. Piracicaba (SP), 1997.

Tipo de embalagem	Temp. (°C)	Nº lagartas Testadas**	Repetição							Total	% morta-Lidade***	
			1	2	3	4	5	6	7			
Frasco de alumínio	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	4	4	5	5	3	3	4	6	31	44,6
	30	56	5	6	7	6	7	7	7	6	44	21,4
Frasco de vidro escuro	8	56	0	0	0	0	0	2	0	0	2	96,4
	24	56	3	3	4	1	1	1	2	2	16	71,4
	30	56	5	8	5	5	5	5	3	6	37	33,9
Frasco de plástico escuro	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	24	56	1	3	1	3	0	0	2	1	11	80,3
	30	56	5	7	7	7	7	7	6	7	46	17,8
Testemunha		56	7	7	7	6	7	7	7	7	48	14,3

* Vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL.

** Concentração testada foi de $1,3 \times 10^6$ CIP/ml.

Tabela 46. Análise de variância dos dados de armazenamento 8 dias após as infestações.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
(Tratamentos)	35	1210,32936508	34,58083900	35,42	0,0001
Tempo (dias) – D	3	287,75793651	95,91931217	98,26**	0,0001
Temperatura (°C)-Temp	2	621,76984127	310,88492063	318,47**	0,0001
Embalagem – Emb	2	5,96031746	2,98015873	3,05*	0,0493
D x Temp	6	217,27777778	36,21296296	37,10**	0,0001
D x Emb	6	13,65873016	2,27645503	2,33*	0,0334
Temp x Emb	4	35,34920635	8,83730159	9,05**	0,0001
D x Temp x Emb	12	28,55555556	2,37962963	2,44	0,0054
Resíduo	216	210,85714286	0,97619048		
Total	251	1421,18650794			

* Significativo ao nível de 5%

** significativo ao nível de 1%

Desvio padrão = 0,851633

C.V. = 55,95099

Tabela 47. Decomposição dos graus de liberdade da interação tempo x temperatura, fixando a temperatura.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Modelo	11	1126,80555556	102,43686869	83,51**	0,0001
Tempo	3	287,75793651	95,91931217	78,20**	0,0001
Temperatura	2	621,76984127	310,88492063	253,46**	0,0001
Tempo x Temperatura	6	217,27777778	36,21296296	29,52**	0,0001
Resíduo	240	294,38095238	1,22658730		
Total	251	1421,18650794			

Desvio padrão = 0,792863

C.V. = 62,71765

Tabela 48. Decomposição dos graus de liberdade da interação tempo (dias) x temperatura (temp), decompondo o tempo.

Interação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Temp. x 30 dias	2	0,095238	0,047619	0,0388	0,9619
Temp. x 60 dias	2	244,222222	122,111111	99,5535**	0,0001
Temp. x 90 dias	2	221,365079	110,682540	90,2362**	0,0001
Temp. x 120 dias	2	373,365079	186,682540	152,2**	0,0001

** significativo ao nível de 1%.

Tabela 49. Aplicação do teste t a 5% de probabilidade.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Média	Teste t a 5%
120	30	6,0476	a
60	30	4,8095	b
90	30	4,4762	b
120	24	2,7619	c
60	24	1,5714	d
90	24	1,0952	d
120	8	0,0952	e
90	8	0,0952	e
60	8	0,0952	e

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 52. Decomposição dos graus de liberdade da interação temperatura x embalagem, decompondo o tipo de embalagem.

Frasco	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{CALCULADO}	Pr > F
Temp. x frasco 1	2	180,500000	90,250000	28,4283	0,0001
Temp. x frasco 2	2	171,166667	85,583333	27,4325	0,0001
Temp. x frasco 3	2	305,452381	152,726190	48,9541	0,0001

frasco1 = frasco de alumínio;

frasco 2 = frasco de vidro escuro;

frasco 3 = frasco de plástico escuro.

Tabela 53. Aplicação do teste t a 5% de probabilidade.

Temperatura (°C)	Embalagem	Média	Teste t a 5%
30	3	4,4643	a
30	1	3,6071	a b
30	2	3,5000	b
24	1	2,1429	c
24	2	1,0714	d
24	3	0,8929	d e
8	2	0,1071	e
8	3	0,0714	e
8	1	0,0357	e

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Embalagem 1 = frasco de alumínio

Embalagem 2 = frasco de vidro escuro

Embalagem 3 = frasco de plástico escuro

Tabela 55. Aplicação do teste t a 5% de probabilidade.

Tempo	Temperatura (°C)	Embalagem	Média	Teste t a 5%
120	30	3	6,5714	a
120	30	1	6,2857	a b
90	30	3	6,0000	b
60	30	3	5,2857	b c
120	30	2	5,2857	b c
60	30	1	4,8571	b c
90	30	2	4,4286	c
120	24	1	4,4286	c d
60	30	2	4,2857	c d
90	30	1	3,0000	d e
120	24	2	2,2857	d e f
60	24	1	2,1429	e f m
90	24	1	1,8571	f m
120	24	3	1,5714	f m o
60	24	2	1,4286	f m o
60	24	3	1,1429	f m o p
90	24	3	0,8571	m o p
90	24	2	0,5714	o p
120	8	2	0,2857	p
30	30	1	0,2857	p
60	8	3	0,1429	p
90	8	3	0,1429	p
60	8	2	0,1429	p
30	24	1	0,1429	p
90	8	1	0,1429	p
30	30	3	0,0000	p
30	24	3	0,0000	p
30	8	3	0,0000	p
120	8	3	0,0000	p
30	30	2	0,0000	p
30	24	2	0,0000	p
30	8	2	0,0000	p
90	8	2	0,0000	p
30	8	1	0,0000	p
60	8	1	0,0000	p
120	8	1	0,0000	p

Embalagem 1 = frasco de alumínio

Embalagem 2 = frasco de vidro escuro

Embalagem 3 = frasco de plástico escuro

Tabela 56. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 4 dias após a infestação em folhas coletadas 2 horas após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemópolis (SP), 23/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**	
			1	2	3	4	5	6	7	8			
1. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	-	2	3	3	2	4	2	2	2	6	24	62,5 bc
2. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	5	3	3	4	1	4	4	3	27	57,8 b	
3. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	1	4	3	1	6	2	4	2	23	64,1 bc	
4. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	1	3	4	3	3	2	1	2	19	70,3 bc	
5. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	2	1	1	1	0	1	2	2	10	84,4 c	
6. Dipel PM	250 g/ha	-	7	7	8	7	7	3	6	4	49	23,4 a	
7. Testemunha	-	-	8	8	5	8	7	8	8	7	59	7,8 a	

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas – 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 21,85**

Tukey (5%) – (CV = 34,929; DP = 0,7279; DMS = 2,0229)

Tabela 57. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 4 dias após a infestação em folhas coletadas 1 dia após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemápolis (SP), 24/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração		Repetição								M**		
	X 10 ¹²	CIP/ha	Adjuvante	1	2	3	4	5	6	7		8	Total
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2		-	5	8	6	7	8	6	5	5	50	21,9 ab
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2		Kinetic ^R (0,2%)	6	5	5	7	4	8	6	5	46	28,1 ab
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2		Mirasperse ^R (0,5%)	5	7	5	5	7	7	4	6	46	28,a ab
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2		Coax ^R (3,5%)	4	5	2	2	7	4	5	5	34	46,9 bc
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2		Carvão vegetal (50%)	3	5	0	3	2	1	4	6	24	62,5 c
6. Dipel PM	250 g/ha		-	6	7	6	8	8	6	7	6	54	15,6 a
7. Testemunha	-		-	8	8	6	8	8	8	7	8	61	4,7 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 10,58**

Tukey (5%) - (CV = 24,009; DP = 0,56429; DMS = 2,0758)

Tabela 58. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 4 dias após a infestação em folhas coletadas 2 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Itacemópolis (SP), 25/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	-	6	5	6	7	7	5	5	7	48	25,0 a
2. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	8	7	5	8	7	7	7	8	57	10,9 a
3. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	7	5	7	8	7	7	5	7	53	17,2 a
4. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	7	6	6	6	6	6	6	7	50	21,9 a
5. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	4	7	4	6	6	6	7	8	48	25,0 a
6. Dipel PM	250 g/ha	-	7	8	7	6	6	6	6	5	53	17,2 a
7. Testemunha	-	-	5	7	6	7	8	6	8	7	54	15,6 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas – 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 1,12 ns

Tukey (5%) – (CV = 316,225; DP = 0,1209)

Tabela 59. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 4 dias após a infestação em folhas coletadas 3 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemápolis (SP), 26/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração		Repetição								Total	M**
	X 10 ¹²	CIP/ha	1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	7	4	7	6	6	7	7	5	49	23,4 a
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	8	6	6	4	6	4	7	6	47	26,5 a
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	8	5	7	4	6	3	5	5	43	32,8 a
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	7	5	7	1	7	8	8	3	46	28,1 a
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	8	7	5	8	6	5	6	6	51	20,3 a
6. Dipel PM	250 g/ha	-	5	6	8	6	7	6	6	5	49	23,4 a
7. Testemunha	-	-	7	7	7	8	7	5	6	7	54	15,6 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 0,72 ns

Tukey (5%) - (CV = 24,453; DP = 0,0810)

Tabela 60. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 4 dias após a infestação em folhas coletadas 4 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Itacemápolis (SP), 27/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**	
			1	2	3	4	5	6	7	8			
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	6	7	7	8	8	6	8	8	7	57	10,9 a
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	8	8	6	8	8	8	8	6	8	60	6,2 a
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	7	6	8	5	8	8	6	6	7	53	17,2 a
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	7	7	8	5	6	7	8	8	5	53	17,2 a
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	8	7	5	8	6	6	6	7	7	54	15,6 a
6. Dipel PM	250 g/ha	-	8	6	6	8	8	7	7	4	8	54	15,6 a
7. Testemunha	-	-	7	7	7	7	7	8	7	7	8	58	9,4 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1° instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 0,981 ns

Tukey (5%) - (CV = 24,009; DP = 0,100)

Tabela 61. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 8 dias após a infestação em folhas coletadas 2 horas após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemópolis (SP), 27/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**	
			1	2	3	4	5	6	7	8			
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	96,9 b
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	0	0	0	2	0	1	0	0	0	3	95,3 b
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	98,4 b
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	98,4 b
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0 b
6. Dipel PM	250 g/ha	-	7	7	7	6	7	3	6	4	47	26,5 a	
7. Testemunha	-	-	8	8	5	8	6	7	8	7	57	10,9 a	

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 37,823***

Tukey (5%) - (CV = 17,956; DP = 0,934; DMS = 0,3639)

Tabela 62. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 8 dias após a infestação em folhas coletadas 1 dia após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemápolis (SP), 28/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	2	4	4	1	3	4	2	4	24	62,5 b
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	1	0	1	5	0	5	2	2	16	75,0 bc
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	3	3	3	0	4	3	1	1	18	71,9 bc
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	1	2	0	0	3	0	1	1	8	87,5 c
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	0	1	0	0	0	0	3	0	4	93,7 c
6. Dipel PM	250 g/ha	-	5	7	6	7	8	6	7	6	52	18,7 a
7. Testemunha	-	-	8	8	6	8	8	8	7	8	61	4,7 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 37,96**

Tukey (5%) - (CV = 38,453; DP = 0,8229; DMS = 1,9314)

Tabela 63. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 8 dias após a infestação em folhas coletadas 2 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Itacemápolis (SP), 23/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	-	6	3	5	5	5	3	3	5	35	43,3 ab
2. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	6	2	5	7	6	7	6	4	43	32,8 ab
3. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	4	4	2	7	4	6	4	6	37	42,2 ab
4. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	7	4	4	4	3	6	1	3	32	50,0 b
5. AcMNPV – vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	0	4	3	3	3	4	1	6	24	62,5 b
6. Dipel PM	250 g/ha	-	7	8	7	6	8	6	6	5	53	17,2 a
7. Testemunha	-	-	5	7	6	7	8	6	7	6	52	18,7 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1° instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas – 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 5,93**

Tukey (5%) – (CV = 31,2366; DP = 0.4206; DMS = 2,7951)

Tabela 64. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 8 dias após a infestação em folhas coletadas 3 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemópolis (SP), 30/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	7	3	7	6	5	6	7	4	45	29,7 ab
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	8	4	6	4	6	3	7	6	44	31,2 ab
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	8	5	6	3	6	2	5	3	38	40,6 ab
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	3	3	3	1	5	6	7	2	30	53,1 b
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	4	6	4	5	3	3	4	3	32	50,0 b
6. Dipel PM	250 g/ha	-	5	6	8	5	6	6	6	5	47	26,5 ab
7. Testemunha	-	-	7	7	6	7	7	5	6	7	52	18,7 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1º instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 3,59***

Tukey (5%) - (CV = 29,364; DP = 0,3052; DMS = 2,0758)

Tabela 65. Efeito de diferentes adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV-vEGTDEL. Avaliação realizada 8 dias após a infestação em folhas coletadas 4 dias após a aplicação. Número de lagartas vivas por repetição, total por tratamento e % de mortalidade. Iracemápolis (SP), 31/janeiro/1996.

Tratamento	Concentração X 10 ¹² CIP/ha	Adjuvante	Repetição								Total	M**
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	-	6	6	7	6	4	7	8	7	51	20,3 ab
2. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Kinetic ^R (0,2%)	7	8	6	7	8	8	6	5	55	14,1 ab
3. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Mirasperse ^R (0,5%)	6	5	7	5	6	5	6	7	47	26,5 ab
4. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Coax ^R (3,5%)	5	5	7	4	4	5	8	5	43	32,8 ab
5. AcMNPV - vEGTDEL	1,2	Carvão vegetal (50%)	6	5	3	7	5	4	6	6	42	34,4 b
6. Dipel PM	250 g/ha	-	8	6	6	8	7	7	4	8	54	15,6 ab
7. Testemunha	-	-	7	7	7	7	8	7	7	7	57	10,9 a

* Foram infestadas 64 lagartas de 1^o instar/tratamento.

** %M = % de mortalidade = ((total de lagartas vivas - 64)/64) x 100

*** Foi adicionado ácido cítrico (0,1%) em todos os tratamentos

F = 1,687**

Tukey (5%) - (CV = 18,248; DP = 0,2956; DMS = 1,748)

Tabela 66. Dados meteorológicos referentes ao período de realização do experimento nº 1 (efeito de adjuvantes sobre a atividade do vírus AcMNPV – vEGTDEL). Iracemápolis (SP), janeiro/1996.

Dia	Temperatura (°C)			Precipitação (mm)	Radiação glo- bal (cal/cm.d)	Insolação (h/d)	Umidade re- lativa do ar (%)
	Max	Min	Média				
23	31,0	20,0	25,5	0	393,0	5,4	77,0
24	34,8	20,5	27,7	0	554,0	10,5	73,0
25	35,0	21,3	28,2	0	536,0	10,2	68,0
26	34,8	20,6	27,7	0	519,0	7,8	75,0
27	34,7	21,2	27,9	0	467,0	8,9	80,0