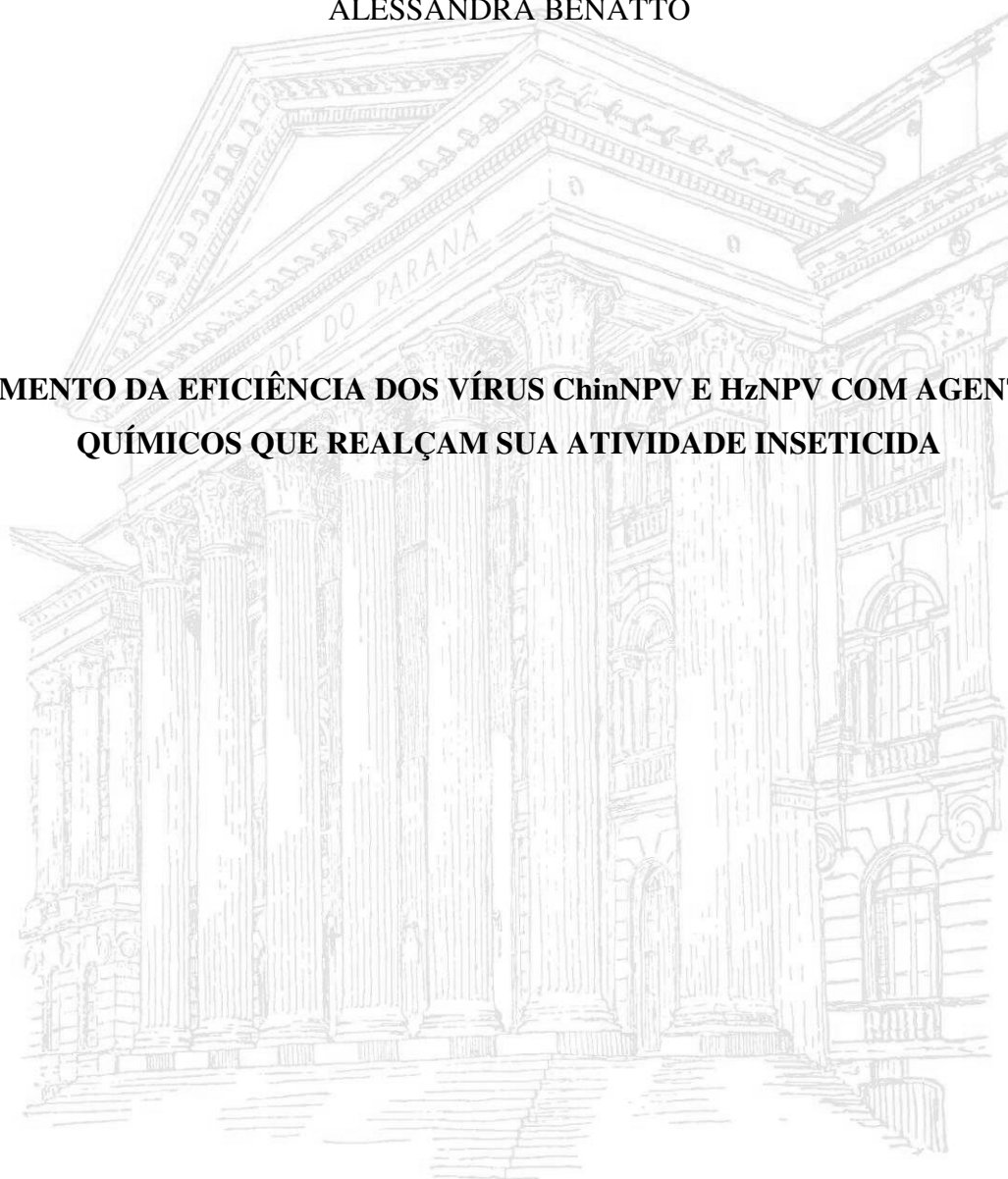


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRA BENATTO

**AUMENTO DA EFICIÊNCIA DOS VÍRUS $ChNPV$ E $HzNPV$ COM AGENTES
QUÍMICOS QUE REALÇAM SUA ATIVIDADE INSETICIDA**



CURITIBA

2018

ALESSANDRA BENATTO

**AUMENTO DA EFICIÊNCIA DOS VÍRUS *Chin*NPV E *Hzn*NPV COM AGENTES
QUÍMICOS QUE REALÇAM SUA ATIVIDADE INSETICIDA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9 – 944)

Benatto, Alessandra

Aumento da eficiência dos vírus ChinNPV e HzNPV com agentes químicos
que realçam sua atividade inseticida. / Alessandra Benatto. – Curitiba, 2018.
103 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

1. Inseticidas. 2. Baculoviridae. 3. Sinergismo. I. Título II. Sosa-Gómez,
Daniel Ricardo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

CDD (20. ed.) 632.951



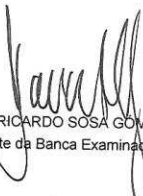
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ENTOMOLOGIA)

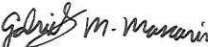
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALESSANDRA BENATTO** intitulada: **Aumento da eficiência dos vírus ChinNPV e HzNPV com agentes químicos que realçam sua atividade inseticida**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2018.


DANIEL-RICARDO SOSA GOMEZ
Presidente da Banca Examinadora


GABRIEL MOURA MASCARIN
Avaliador Externo


EDUARDO CARNEIRO DOS SANTOS
Avaliador Interno


BRAULIO DOS SANTOS
Avaliador Externo


FERNANDO HERCOS VALICENTE
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ana Maria, e aos meus irmãos, Fábio e Diego, à minha cunhada, Ana Paula, e à minha sogra, Eliane, por terem sempre me apoiado, independente das dificuldades ao longo do caminho.

Ao meu marido, Carlos, por sempre ter me incentivado, apoiado e acreditado em mim.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Entomologia pela oportunidade concedida.

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

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), por conceder a estrutura física e disponibilização de materiais necessários para realização dos experimentos.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, pela orientação, paciência e confiança depositada ao longo desses quatro anos de doutorado.

Aos Drs. Braúlio Santos, Eduardo Carneiro dos Santos, Fernando Hercos Valicente e Gabriel Moura Mascarin, por aceitarem compor a banca examinadora e por todas as contribuições significativas para o aprimoramento deste trabalho.

À querida amiga Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira pela sua valiosa contribuição nas análises estatísticas e principalmente pela amizade, acolhida e todo apoio que recebi.

À Dra. Ivani de Oliveira Negrão Lopes, pela realização de parte das análises estatísticas.

À Dra. Suely Ruiz Giolo, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, por disponibilizar seu conhecimento e tempo para a conclusão das análises necessárias para a conclusão deste trabalho.

À equipe técnica dos laboratórios de Entomologia da Embrapa Soja: Ivanilda L. Soldório, Sérgio H. da Silva, Jovenil José da Silva, José Jairo da Silva, Miguel Pereira de Souza, e, principalmente, Fábio E. Paro, que disponibilizou muito do seu tempo e experiência para me auxiliar durante o desenvolvimento dos experimentos.

À equipe de campo da Embrapa Soja, Oriverto Tonon, Adriano dos Santos Dalben, Wilson Pozenatto e pela ajuda nos experimentos em casa de vegetação e campo.

Aos meus amigos Patrícia E. Husch, Érica A. Taguti, Daniel B. Amorim, Jibran F. Piña, Gizele R. Baldo, Juliane A. Schneider, Maria Amélia R. Gholmie, pelo incentivo, pelas discussões técnicas, pelos conselhos, e pela ajuda prática para que este trabalho fosse concluído.

À equipe de estagiários (e ex-estagiários) do laboratório de Entomologia da Embrapa Soja: Cibeli Oliveira, Jéssica Silvério, Julianna Ruediger e Ana Jorgini, pela amizade de todos os dias e pelo auxílio prestado.

À Dra. Maria Aparecida C. Zawadneak, por todo o incentivo de sempre, pela amizade, apoio e por ter me dado a primeira oportunidade de trabalhar com entomologia.

A todos os demais amigos e colegas de pós-graduação e professores que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Inseticidas à base de vírus têm sido utilizados no controle biológico de pragas em várias regiões do mundo, devido à sua especificidade e segurança para organismos não-alvo. No entanto, a sua aceitação como bioinseticidas é limitada em função de seu tempo de ação relativamente lento. Para contornar essas limitações e melhorar o desempenho de vírus de poliedrose nuclear (NPV), agentes químicos com potencial sinergista têm sido estudados. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de branqueadores ópticos na atividade viral *Chrysodeixis includens* nucleopoliedrovirus (ChinNPV) e *Helicoverpa zea* nucleopoliedrovirus (HzNPV) em laboratório, casa de vegetação e campo. Em laboratório, três concentrações (variando de 0,025% a 1,5%) de seis produtos (Fluorescent Brightener 28 - FB 28, 4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid, Calcofluor White Stain, ácido bórico, clorfluazuron e Umbeliferona), em combinação com isolados de NPV (5.000 CO.ml⁻¹ ChinNPV e 1.000 CO.ml⁻¹ HzNPV) foram incorporados na dieta artificial, sem formol. Os tratamentos foram oferecidos a lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*. Posteriormente, FB 28 (0,1%) foi adicionado a sete concentrações de ChinNPV em dieta artificial e oferecido à lagartas de terceiro e quarto ínstares de *C. includens*. As lagartas foram mantidas em BOD em bandejas plásticas (26 ± 2 °C, 70 ± 10%, fotofase de 14 h). A influência de FB 28 (0,1%) no peso larval, sobrevivência e produção de corpos de oclusão (CO's) de ChinNPV foi avaliada em larvas de terceiro e quarto ínstares de *C. includens*. Experimentos para avaliar o efeito da adição de FB 28 (0,1%) em ChinNPV e HzNPV foram realizados em casa de vegetação e campo. Plantas de soja foram pulverizadas com duas concentrações de cada isolado viral, ChinNPV e HzNPV, e as mesmas concentrações combinadas com FB 28 (0,1%). Folíolos de soja foram coletados imediatamente e em diferentes períodos após as aplicações e oferecidos às lagartas em laboratório. A mortalidade foi avaliada diariamente até o 12º dia. Os dados foram submetidos à Análise de Sobrevida de Risco Competitivo, seguindo o modelo de Fine & Gray, para comparar as curvas de incidência acumulada de morte. Os resultados obtidos em laboratório indicam que a combinação NPV / FB 28 (0,1%) mostra efeito sinergista tanto para ChinNPV quanto para HzNPV, aumentando a atividade viral e diminuindo o tempo médio de mortalidade. A adição de FB 28 (0,1%) para ChinNPV reduziu a CL₅₀ em lagartas de terceiro e quarto ínstares. Foi observada uma redução significativa no rendimento de COs / mg de larvas em insetos tratados com FB 28 (0,1%), independente da temperatura de incubação. Em casa de vegetação, não foram observadas diferenças significativas entre as curvas da incidência acumulada de morte entre as maiores concentrações de vírus com ou sem FB 28. Em condições de campo, FB 28 (0,1%) incrementou a atividade viral de ChinNPV e HzNPV, quando associado à concentrações mais elevadas de vírus, em até 120h após a aplicação. O uso do FB 28 não proporciona benefícios para a produção em massa do ChinNPV. No entanto, a magnitude da redução nas CL₅₀ e a diminuição do tempo médio de mortalidade (TMM), indicam que FB 28 aumentou a virulência de ChinNPV e HzNPV

Palavras-chave: Baculoviridae; branqueadores ópticos; *Chrysodeixis includens* (Walker); *Helicoverpa armigera* (Hübner); sinergismo

ABSTRACT

Virus-based insecticides have been used as biological pest control in several countries/regions around the world, mainly due to their specificity and safety to non-target organisms. However, their acceptance as bioinsecticides is limited because of their relatively slow action. To circumvent these bottlenecks and improve nuclear polyhedrosis virus (NPV) performance, synergistic agents were studied. This work aimed to evaluate effective of optical brightener additions in *Chrysodeixis includens* nucleopolydovirus (ChinNPV) e *Helicoverpa zea* nucleopolydovirus (HzNPV) viral activity in laboratory, greenhouse and field. In laboratory, three concentrations (ranging from 0.025% to 1.5%) of the six products (Fluorescent Brightener 28 - FB 28; 4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid; Calcofluor White Stain; boric acid; chlorfluazuron and umbeliferone), in combination with NPV isolates (5.000 CO.ml⁻¹ ChinNPV e 1.000 CO.ml⁻¹ HzNPV) were incorporated into the artificial diet, without formalin. Fluorescent Brightener 28 (0.1%) was added to seven concentrations ChinNPV. Early 3rd instar soybean loopers feeding on the diet ad libitum were kept in trays in environmental chambers (26 ± 2°C, 70 ± 10%, 14-h photophase). The influence of FB 28 (0.1%) on the larval weight, survival and occlusion bodies (OB) yield on *Chrysodeixis includens* third and fourth instar larvae was examined. Experiments on the efficacy of optical brightener formulations of ChinNPV and HzNPV were conducted on soybean in greenhouses and field. Soybean plants were sprayed with two concentrations of each viral isolate, ChinNPV and HzNPV, and the same concentrations combined with FB 28 (0.1%). Leaflets were collected immediately and at different periods after applications and offered to soybean loopers. Mortality was assessed daily until the 12th day. Data were submitted to the Competitive Risk Survival Analysis, following the Fine & Gray model, to compare curves of cumulative incidence of mortality. Bioassays indicate that NPV/FB 28 (0.1%) combination showed synergist effect and the infectivity of ChinNPV and HzNPV, increased the activity viral and decreasing mean time to mortality. Addition of the selected optical brightener FB 28 (0.1%) to ChinNPV reduced the LC₅₀ also enhanced mortality in third and fourth instar larvae. A significant decreasing in the yield of OBs/mg larval weight was observed in FB 28 (0.1%) treated insects, independent of temperature. In greenhouse, no significant differences were observed among the curves of cumulative incidence of mortality among the highest virus concentrations with or without FB 28. Under field conditions, FB 28 (0.1%) promoted enhancement in viral activity of ChinNPV and HzNPV when associated with highest doses of NPV, in up to 120 h after application. We conclude that use of FB 28 did not provide benefits for the mass production of ChinNPV. However, the magnitude of reduction in LC₅₀s and the lower mean time to death (MTD) in *C. includens* indicated that FB 28 greatly enhanced the virulence of the ChinNPV and HzNPV.

Key-words: Baculoviridae; optical brighteners; *Chrysodeixis includens* (Walker); *Helicoverpa armigera* (Hübner); synergism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,025% FB 28, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	32
Figura 2. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,05% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	32
Figura 3. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,1% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	33
Figura 4. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	33
Figura 5. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,025% FB 28, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	34
Figura 6. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,05% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	34
Figura 7. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,1% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	35
Figura 8. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	35
Figura 9. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 1,0% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	36
Figura 10. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>H. armigera</i> entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 1,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.	36
Figura 11. Curvas de mortalidade de lagartas 3º(C e D) e 4º (A e B) ínstar de <i>C. includens</i> em resposta à adição de FB 28 (0,1%) a diferentes concentrações de ChinNPV inoculado em dieta artificial.	36
Figura 12. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e incubadas em diferentes temperaturas.	40
Figura 13. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em diferentes temperaturas.	41

Figura 14. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 22° C.	41
Figura 15. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 26° C.	42
Figura 16. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 30° C.	42
Figura 17. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e incubadas em diferentes temperaturas.	43
Figura 18. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em diferentes temperaturas.	43
Figura 19. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 22° C.	44
Figura 20. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 26° C.	44
Figura 21. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de <i>C. includens</i> inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 30° C.	45
Figura 22. Curvas de incidência acumulada de morte em função do tempo registradas entre os tratamentos aplicados em casa de vegetação e causa de morte de lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em condições de laboratório. Sendo: T1=ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ ; T2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ ; TR1= ChinNPV $1,5,0 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ + 0,1% FB28; TR2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ + 0,1% FB28.	64
Figura 23. Curvas de incidência acumulada de morte em função do tempo registradas entre as datas de coleta de folhas em casa de vegetação oferecidas a lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em condições de laboratório. Sendo: T1=ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ ; T2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ ; TR1= ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ + 0,1% FB28; TR2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha ⁻¹ + 0,1% FB28.	65
Figura 24. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em casa de vegetação e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> em condições de laboratório. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.	65
Figura 25. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em condições de laboratório. Safra 2016-2017. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.	70
Figura 26. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> em condições de laboratório. Safra 2016-2017. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.	71
Figura 27. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em condições de laboratório. Safra 2017-2018. Sendo: Cd:	

lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.
..... 71

Figura 28. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de quarto ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Safra 2017-2018. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.
..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de produtos com potencial sinergista utilizados em combinação com ChinNPV ($5,0 \times 10^3$ CO.mL ⁻¹) e HzNPV ($1,0 \times 10^3$ CO.mL ⁻¹).	26
Tabela 2. Efeito de agentes químicos adicionados a ChiNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> . ChinNPV: 5.000 CO.mL ⁻¹	30
Tabela 3. Efeito de agentes químicos adicionados a HzNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> . HzNPV: 1.000 CO.mL ⁻¹	31
Tabela 4. Efeito da adição de FB 28 (0,1%) a ChinNPV na CL ₅₀ e CL ₉₀ de lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> obtidas a partir de modelos Weibull-2, com dois parâmetros.	37
Tabela 5. Efeito da adição de FB 28 (0,1%) a ChinNPV na CL ₅₀ e CL ₉₀ de lagartas de quarto ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> obtidas a partir de modelos Weibull-2, com dois parâmetros.	37
Tabela 6. Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) adicionado a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i>	39
Tabela 7. Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) adicionado a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 4º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i>	40
Tabela 8. Efeito de FB 28 no peso larval e na produção de corpos poliédricos de oclusão (CO) em isolado de ChinNPV inoculado em lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em laboratório. CO: 10 ⁶ . mL ⁻¹	45
Tabela 9. Efeito de FB 28 no peso larval e na produção de corpos poliédricos de oclusão em isolado de ChinNPV inoculado em lagartas de 4º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> em laboratório. CO: 10 ⁶ . mL ⁻¹	46
Tabela 10. Descrição de tratamentos aplicados em casa de vegetação e campo safra 2016/2017.	61
Tabela 11. Dados climáticos registrados na área experimental da Embrapa Soja durante o ano de 2017.	62
Tabela 12. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a HzNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> . Pulverização em plantas de soja em casa de vegetação.	66
Tabela 13. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> . Pulverização em plantas de soja em casa de vegetação.	66
Tabela 14. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> . Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2016/2017.	68
Tabela 15. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a HzNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> . Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2016/2017.	69
Tabela 16. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> . Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2017/2018.	69
Tabela 17. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 4º ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> . Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2017/2018.	70

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 1 -Avaliação do potencial sinergista de agentes químicos combinados com isolados de ChinNPV e HzNPV e seu efeito um branqueador óptico na produção de corpos poliédricos de oclusão de ChinNPV em diferentes temperaturas	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
Colônia de insetos	24
Obtenção dos isolados de vírus de poliedrose nuclear	24
Procedimentos para realização dos bioensaios	25
Seleção de produtos com potencial sinergista associados à vírus de poliedrose nuclear	25
Efeito de Fluorescent Brightener 28 na concentração letal dos isolados de vírus de poliedrose nuclear e tempo de sobrevivência	26
Efeito de Fluorescent Brightener 28 na produção de corpos poliédricos de oclusão de ChinNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i>.....	26
Análise de dados	27
RESULTADOS	29
Seleção de produtos com potencial sinergista associados à ChinNPV e HzNPV	29
Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na concentração letal de ChinNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i>	37
Determinação do efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> em diferentes temperaturas	38
Determinação do efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na produção de corpos poliédricos de oclusão e no peso de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> em três diferentes temperaturas	39
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2 - Efeito de branqueador óptico na infectividade de ChinNPV e HzNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> em c vegetação e campo	
RESUMO.....	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58

MATERIAL E MÉTODOS	59
Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> em plantas de soja em casa de vegetação.....	59
Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> em plantas de soja em condições de campo	60
Análise de dados	62
RESULTADOS	62
Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> em plantas de soja em casa de vegetação.....	62
Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> em plantas de soja em condições de campo	66
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
CAPÍTULO 4 - REFERÊNCIAS	81
ANEXO 1 - LEGENDA DOS TRATAMENTOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL OFERECIDA À LAGARTAS DE <i>Chrysodeixis includens</i> EM LABORATÓRIO.....	90
ANEXO 2 - LEGENDA DOS TRATAMENTOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL OFERECIDA À LAGARTAS DE <i>Helicoverpa armigera</i> EM LABORATÓRIO.....	92
ANEXO 3 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM AGENTES QUÍMICOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Chrysodeixis includens</i>.	93
ANEXO 4 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS A ChinNPV À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Chrysodeixis includens</i>. ChinNPV: 5.000 CO.ml⁻¹	96
ANEXO 5 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM AGENTES QUÍMICOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Helicoverpa armigera</i>.	99
ANEXO 6 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS A HzNPV À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Helicoverpa armigera</i>. HzNPV: 1.000 CO.ml⁻¹	101
ANEXO 7 – COMPARATIVO DE MODELOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE COMPLEMENTO LOG-LOG	103

INTRODUÇÃO GERAL

A soja é uma das principais commodities produzidas no Brasil e apresenta uma ampla gama de artrópodes-praga, com grande destaque para lagartas desfolhadoras da família Noctuidae. Dentre as espécies de maior importância no cenário atual, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) é uma espécie de grande poder destrutivo, cujo hábito de permanecer se alimentando em extratos mais baixos das plantas dificulta seu controle (Moscardi et al., 2012). *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809), espécie recém-introduzida no Brasil, também vem causando consideráveis perdas de produção ao cultivo da soja (Sosa-Gómez, 2017), além de apresentar amplo potencial de distribuição, representando grande risco para as lavouras (Kriticos et al., 2015).

O uso de inseticidas químicos é o principal método de controle para estas espécies. No entanto, aplicações constantes de agrotóxicos afetam o equilíbrio do agroecossistema por eliminar inimigos naturais (Bueno et al., 2012), além de aumentar a pressão de seleção de populações de insetos resistentes (Sosa-Gómez; Omoto, 2012). O uso de entomopatógenos no controle biológico de pragas se apresenta como alternativa em áreas que recebem frequentes aplicações de inseticidas químicos (Rossi-Zalaf et al., 2008), auxiliando no manejo de populações resistentes e, pelas suas características segue as premissas do manejo integrado de pragas (MIP).

Dentre os entomopatógenos que podem ser utilizados em programas de controle biológicos, os vírus entomopatogênicos destacam-se por sua virulência e especificidade em relação ao hospedeiro, oferecendo assim segurança a organismos não alvo, vertebrados e ao meio ambiente (Moscardi, 1998). Os principais grupos utilizados em programas de controle biológico são os vírus de granulose e poliedrose nuclear, que pertencem à família Baculoviridae, composta por quatro gêneros: Alphabaculovírus, Betabaculovírus, Deltabaculovírus e Gamabaculovírus (Jehle et al., 2006).

Um dos principais programas de controle biológico já realizado envolvendo o uso de baculovírus foi o *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) no Brasil, para controle da lagarta da soja (Moscardi, 1989). Também no Brasil, outras espécies têm sido estudadas, como o *Erinnyis ello* granulovirus, ErelGV (Bellotti, 2002) e *Condylorrhiza vestigialis* multiple nucleopolyhedrovirus (CvMNPV) (Castro et al., 2009) e o baculovírus de *Spodoptera frugiperda* (Valicente et al., 2013). Outros casos de grande importância mundial são o vírus de poliedrose nuclear de *Helicoverpa* spp., nos EUA, China e Austrália (Tang et al., 2011), além de vírus de

poliedrose nuclear de espécies do gênero *Spodoptera* na China, Japão, EUA, Guatemala, Colômbia, e Europa; e o *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) nos EUA, Argentina e Europa (Haase et al., 2015).

A infecção por baculovírus ocorre via ingestão dos corpos proteicos de oclusão (CO) pelos insetos em sua fase larval. A matriz proteica é dissolvida no intestino médio devido ao pH fortemente alcalino, liberando vírions no lúmen digestivo (Moore et al., 1987). As partículas infectivas do vírus em sua forma não-oclusa (BV) penetram nas células epiteliais do intestino médio, os nucleocapsídeos migram através do citoplasma da célula e, no caso de NPV's, penetram através dos poros nucleares, atingindo o núcleo, onde irá ocorrer a transcrição dos genes do vírus e a replicação do seu genoma (Granados, 1980; Granados; Williams, 1986).

Nessa fase primária de infecção são sintetizados no núcleo apenas nucleocapsídeos, que passam pelo núcleo e atravessam a membrana basal das células, adquirindo um novo envelope, formando os budded virions" (BVs). Os BVs, espalham-se e provocam infecções secundárias em outros tecidos do hospedeiro, disseminando-se de célula para célula (Granados, 1980; Granados; Williams, 1986). A forma oclusa é produzida ao final da infecção, onde os vírions são "envelopados" e são produzidos os poliedros, ou corpos poliédricos de oclusão (CO) (Federici, 1997). Quando os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de COs, ocorre a ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de COs na hemolinfa do hospedeiro.

No entanto, apesar das vantagens apresentadas pela alternativa do uso de baculovírus e de seu grande potencial de uso em programas de manejo integrado de pragas, alguns gargalos ainda limitam sua expansão como agentes de controle biológico. Alguns destes aspectos limitantes envolvem fatores ambientais que interferem na eficiência a campo, como temperatura, precipitação pluviométrica, pH, raios UV e umidade (Ignoffo, 1992). Além disso, o tempo letal relativamente longo quando comparado aos inseticidas químicos é um dos fatores que geram resistência ao uso bioinseticidas virais. Este aspecto se torna ainda mais preocupante em situações em que a população da praga está num nível de alta densidade populacional, a partir do qual só existe como opção o controle químico (Szewczik et al., 2006). O tempo entre a ingestão dos poliedros, o início da infecção e a morte do inseto varia entre 4 a 14 dias, sendo que o pico de mortalidade ocorre geralmente entre 6 e 8 dias, para vírus de poliedrose nuclear (NPV) (Federici, 1997). A lagarta permanece no campo se alimentando até 4 dias após a aplicação, causando danos à lavoura. A ação de inseticidas químicos é bem

mais rápida, o que leva os produtores a adotarem preferencialmente o controle químico em detrimento do uso de baculovírus (Inceoglu et al., 2006).

Visando contornar esses gargalos e melhorar a eficiência de baculovirus como bioinseticidas agentes químicos têm sido estudados (Lasa et al., 2007; Okuno et al., 2003; Martínez et al., 2010; Zamora-Áviles et al., 2013). A interação de micro-organismos com produtos químicos pode resultar em efeitos sinérgicos, nulos ou deletérios sobre os agentes de controle biológico (Alves et al., 1998). Branqueadores ópticos derivados do ácido estilbeno podem aumentar a atividade viral, promovendo assim efeito sinérgico na associação com baculovírus isolados de lepidópteros (Morales et al., 2001; Shapiro, 2000). No entanto, resultados conflitantes sobre a ação destes produtos como agentes sinergistas têm sido encontrados na literatura, o que indica que a ação promovida pelos branqueadores ópticos depende do sistema de interação patógeno-planta-inseto (Black et al., 1997). Sendo assim, o uso destes produtos como agentes sinergistas de baculovírus em controle de lagartas ainda requer estudos de validação de seu uso em condições de campo.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral determinar se a atividade viral de ChinNPV e HzNPV pode ser aumentada pelo uso de branqueadores ópticos, potencializando seu efeito inseticida no controle de *C. includens* e de *H. armigera*, respectivamente.

Os seguintes objetivos específicos também foram foco deste estudo:

- Selecionar branqueadores ópticos visando reduzir o tempo médio de mortalidade (TMM) dos isolados de ChinNPV e HzNPV em lagartas de terceiro e quarto ínstar de *C. includens* e de terceiro ínstar de *H. armigera*, respectivamente.
- Determinar o efeito da adição de um branqueador óptico na CL₅₀ e CL₉₀ de ChinNPV para o controle de *C. includens*.
- Avaliar o efeito da adição de um branqueador óptico na produção de corpos poliédricos de oclusão, de ChinNPV inoculado em lagartas de terceiro e quarto ínstar de *C. includens*, sob três diferentes temperaturas em laboratório.
- Avaliar, em casa de vegetação, o efeito de um branqueador óptico já testado em laboratório e combinado com vírus de poliedrose nuclear (NPV) visando controle de *C. includens* e *H. armigera*.
- Avaliar, a campo, o efeito de um branqueador óptico já testado em laboratório e combinado com NPV visando controle de *C. includens* e *H. armigera*.

REFERÊNCIAS

- Alves S. B., Moino JR. A., Almeida J.E.M., 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves S.B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ, 217-238.
- Bellotti A.C., 2002. Arthropod pests. In: Hillocks R.J., Thresh J.M., Bellotti A.C. (Eds) Cassava: Biology, production and utilization. Oxon: CAB International, 332.
- Black B.C., Brennan L.A., Dierks P.M., Gard I.E., 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. In: Miller L.K. (Ed). The Baculoviruses, New York: Plenum Press, 341–388.
- Bueno A.F., Sosa-Gómez D. R., Correa-Ferreira B.S., Moscardi F., Bueno R.C.O.F., 2012. Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffman-Campo C.B., Corrêa-Ferreira B.S., Moscardi F. (Eds) Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Embrapa: Brasília, 493-630.
- Castro M.E., Ribeiro Z.M., Santos A.C., Souza M.L., Machado E.B., Sousa N.J., Moscardi F., 2009. Identificação de um novo nucleopolyhedrovirus de *Condylorrhiza vestigialis* em larvas naturalmente infectadas (Guenee) (Lepidoptera: Crambidae) em plantações de álamo no Sul do Brasil. Journal of Invertebrate Pathology, 102, 149-154.
- Federici B.A., 1997. Baculovirus pathogenesis. In: Miller L.K. (Ed.) The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 33-59.
- Granados R.R., 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. Biotechnology and Bioengineering, 22, 1377-1405.
- Granados R.R., Williams K.A., 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: Granados R.R., Federici B.A. (Eds.) The Biology of Baculoviruses, CRC Press, 89–108.
- Haase S., Sciocco-Cap A., Romanowski V., 2015. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. Viruses, 7(5), 2230-2267.
- Ignoffo C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomologist, 75, 516-525.
- Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hammock B.D., 2006. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. Advances in Virus Research, 68, 323-360.
- Jehle J.A., Blissard G.W., Bonning B.C., Cory J.S., Herniou E.A., Rohrmann G.F., Theilmann D.A., Thiem S.M., Vlak, J. M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Archives of Virology, 151(7), 1257-1266.
- Kriticos D. J., Ota N., Hutchison W.D., Beddow J., Walsh T., Tay W.T., Borchert D. M., Paula-Moreas S.V., Czepak C., Zalucki M.P., 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is it just a matter of time? PLoS ONE 10(3): e0119618.
- Lasa, R., Ruiz-Portero C., Alcázar M.D., Belda J.E., Caballero P., Williams T., 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. Biological Control, 40, 89-96.

- Martínez A., Caballero P., Williams T., 2010. Effects of an optical brightener on the development, body weight and sex ratio of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 14, 193-200.
- Morales L., Moscardi F., Sosa-Gómez D.R., Paro F.E., Soldorio I.L., 2001. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect, *Biological Control*, 20, 247-253.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A.F., Corso, I.C., Yano, S.A.C., 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, C.B., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. (Eds.) *Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Ártropodes-praga*. Embrapa. Londrina, pp. 213-334.
- Moscardi F., 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 509-539.
- Moscardi F., 1989. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 51-56.
- Moore N.F., King L.A., Possee R., 1987. Viruses of insects. *Insect Science and Its Application*, 3, 275-289.
- Okuno S. Takatsuka J., Nakai M., Ototake S., Masui A., Kunimi Y., 2003. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 26, 146-152.
- Rossi-Zalaf L.S., Alves S.B., Lopes R.B., Silveira Neto S., Tanzini M.R., 2008. Interação de microorganismo com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S.B., Lopes R.B. (Eds) *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Fealq, Piracicaba, 279- 302.
- Shapiro M., 2000. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *Journal of Economic Entomology*, 93, (3), 572-576.
- Sosa-Gómez D.R., 2017. Microbial Control of Soybean Pest Insects and Mites In: Lacey L.A. (Ed) *Microbial control of insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier, 199-208.
- Sosa-Gómez, D.R., Omoto, C., 2012. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: Hoffmann-Campo,. C.B., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. *Soja: Manejo Integrado de. Insetos e outros Artrópodes-praga*. Brasília: EMBRAPA, 673-. 724.
- Szewczyk B. Hoyos-Carvajal L., Paluszek M., Skrzecz I., Souza M.L., 2006. Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24, (2), 143-160.
- Tang X.X., Sun X.L., Pu G.Q., Wang W.B., Zhang C.X., Zhu J., 2011. Expression of a neurotoxin gene improves the insecticidal activity of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV). *Virus research*, 159(1), 51-56.
- Valicente F.H., Tuelher E.S., Pena R.C., Andreazza R, Guimarães M.R.F, 2013. Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with *Baculovirus spodoptera*. *Neotropical Entomology*, 42(2), 191-199.

Wang P.,Granados R.R., 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects, *Insect Biochemical Molecular Biology*, 30, 135–143.

CAPÍTULO 1 -Avaliação do potencial sinergista de agentes químicos combinados com isolados de ChinNPV e HzNPV e seu efeito um branqueador óptico na produção de corpos poliédricos de oclusão de ChinNPV em diferentes temperaturas

RESUMO

Vírus entomopatogênicos têm sido utilizados no controle biológico de pragas em diversas regiões do mundo. No entanto, seu uso tem sido limitado em função do tempo letal relativamente lento. Este aspecto pode ser contornado com o uso de branqueadores ópticos em formulações de bioinseticidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de agentes químicos na atividade viral de ChinNPV e HzNPV. Em laboratório, foram testados isolados de NPV de *Chrysodeixis includens* (ChinNPV) e de *Helicoverpa armigera* (HzNPV), combinados com seis produtos (Fluorescent Brightener 28 (FB 28); 4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid; Calcofluor White Stain; ácido bórico; chlorfluazuron e umbeliferona). O produto selecionado nesta etapa foi utilizado nos bioensaios seguintes. FB 28 a 0,1% foi adicionado a diferentes concentrações de ChinNPV e oferecido a lagartas de terceiro e quarto ínstares, visando a estudar seu efeito na CL₅₀, CL₉₀ e no tempo médio de mortalidade de *C. includens*. Para determinar o efeito de FB 28 (0,1%) na produção de corpos de oclusão (CO's) de ChinNPV, foram conduzidos bioensaios em três diferentes temperaturas: 22° C, 26° C e 30° C. A adição de FB 28 (0,1% m/v) apresenta um efeito sinérgico quando associado a ChinNPV e HzNPV, aumentando a atividade dos isolados de NPV ao reduzir o TMM além de promover a incremento da mortalidade. A adição de FB 28 (0,1%) a ChinNPV reduz a CL₅₀ de 4.476,1 CO.ml⁻¹ para 23,1 CO.ml⁻¹ em lagartas de terceiro íntar de *C. includens*, e de 9.962,0 CO.ml⁻¹ para 749,8 CO.ml⁻¹ em lagartas de quarto íntar, assim como também promoveu redução da CL₉₀ de ChinNPV. A produção de CO's foi maior no tratamento controle que no tratamento com adição de FB28, em todas as temperaturas de incubação. Uma significativa redução na produção de CO's por peso larval (CO's/mg) foi observada nos insetos tratados com FB 28 (0,1%). Conclui-se que o uso de FB 28 (0,1%) não promove benefícios para uso em produção massal de ChinNPV. Entretanto, a magnitude da redução da CL₅₀ e redução do TMM em *C. includens*, indica que FB 28 aumenta a eficiência de ChinNPV.

Palavras-chave: *Chrysodeixis includens* nucleopoliedrovírus; *Helicoverpa zea* nucleopoliedrovírus; fluorescent brightener 28; temperatura; produção viral

ABSTRACT

Entomopathogenic viruses have been used as biological pest control in several countries/regions around the world. However, their use has been limited because of their relatively slow action. This bottleneck can be circumvented with synergistic chemical agents, like optical brighteners. This work aimed to evaluate effective of chemical agents additions in ChinNPV and HzNPV viral activity in laboratory. Three concentrations (ranging from 0.025% to 1.5%) of the six products (Fluorescent Brightener 28 - FB 28; 4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid; Calcofluor White Stain; boric acid; chlorfluazuron and umbeliferone), in combination with NPV isolates (ChinNPV e HzNPV) were incorporated into the artificial diet, without formalin. Fluorescent Brightener 28 (0.1%) was added to seven concentrations of ChinNPV. Early 3rd instar larvae feeding on the diet ad libitum were kept in trays in environmental chambers ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$, 14-h photophase). The influence of FB 28 (0.1%) on the growth, survival and occlusion bodies (OB) yield of *Chrysodeixis includens* larvae placed on treated diet in the third and fourth instar, incubated in 22° , 26° e 30°C , was examined. Mortality was assessed daily until the 12th day. Data were submitted to the Competitive Risk Survival Analysis, following the Fine & Gray model, to compare curves of cumulative incidence of mortality. The most efficient brightener was FB28. Laboratory bioassays indicate that NPV/FB 28 (0.1%) combination show synergist effect and the infectivity of ChinNPV and HzNPV. The addition of FB28 (0.1%) greatly increased the activity of NPV, decreasing mean lethal time and increasing mortality. Addition of the selected optical brightener FB 28 (0.1%) to ChinNPV reduced the LC_{50} from 4,476.1 OB.ml⁻¹ to 23.1 OB.ml⁻¹ in 3rd instar larvae and from 9,962.0 OB.ml⁻¹ to 749.8 OB.ml⁻¹ in 4rd instar larvae, as well as reduced the LC_{90} of ChinNPV. The addition of FB 28 (0.1%) to the virus also enhanced mortality in fourth instar larvae. The total yield of ChinNPV OB per larva was greater in controls than FB 28 (0.1%) in all incubation temperatures. A significant decreasing in the yield of OB/mg larval weight was observed in FB 28 (0.1%) treated insects. We conclude that use of FB 28 did not provide benefits for mass production of ChinNPV. However, the magnitude of reduction in LC_{50} and decreasing lethal time in *C. includens* indicated that FB 28 greatly enhanced the virulence of the ChinNPV.

Key-words: *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus; *Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus; fluorescent brightener 28; temperature; viral yield

INTRODUÇÃO

Estratégias atuais para controle de lepidópteros praga na cultura da soja devem incluir, além de inseticidas químicos, uso de tecnologia Bt e inseticidas biológicos. Bioinseticidas virais podem ser uma valiosa adição ao conjunto de estratégias de manejo integrado (Chikhalya et al., 2013).

Inseticidas à base de vírus têm sido amplamente utilizados em programas de controle biológico em diversas regiões do mundo (Moscardi et al., 2011). A família Baculoviridae é a mais pesquisada e utilizada no controle biológico de lepidópteros praga (Jehle et al., 2006). Uma das características de baculovírus é a produção de estruturas denominadas corpos de oclusão (CO's), que são liberados no ambiente após a morte do inseto infectando e gerando uma fonte de inóculo para outros insetos saudáveis (Granados, 1980). São considerados promissores agentes de controle biológico, devido à sua especificidade e segurança a organismos não-alvo (Lacey et al., 2015).

Apesar dos benefícios que podem ser obtidos com o uso de baculovírus em controle biológico de lepidópteros-pragas, alguns aspectos ainda limitam a expansão de seu uso na agricultura. Um dos fatores críticos relacionados à limitação do uso de baculovírus é a ação relativamente lenta desses agentes em matar o inseto alvo, que permanece por mais tempo no campo, causando danos à lavoura (Moscardi, 1999) e limitações no processo de produção (Moscardi et al., 1997; Valicente et al., 2013). Estratégias têm sido pesquisadas para melhorar a atividade dos baculovírus como a adição de substâncias químicas ou biológicas com efeito sinergista às formulações de vírus (Shapiro, 2000; Morales et al., 2001; Wang; Granados, 2000). Os produtos mais estudados são os branqueadores ópticos, principalmente os derivados do ácido estilbeno, que são conhecidos por aumentar a atividade viral, sendo ferramentas potencialmente úteis para o controle de uma grande número de lepidópteros praga, proporcionando aumento de eficácia e redução de tempo letal (Okuno et al., 2003; Morales et al., 2001; Shapiro, 2000)

O Fluorescent Brightener 28 (FB 28) é também conhecido como Calcofluor 28, Tinopal UNPA-GX e Calcofluor M2R. É um branqueador fluorescente que se liga fortemente à quitina e celulose, muito utilizado como corante de parede celular em plantas superiores, algas e fungos, por apresentar fluorescência aumentada ao se ligar à quitina (Herth & Schnepf, 1980). Outro produto conhecido por sua ação como

branqueador óptico é a umbeliferona, uma substância orgânica natural pertencente à família das cumarinas, quimicamente descrita como o composto 7-hidroxycumarina. É utilizada na composição de cosméticos de proteção solar dada a sua forte capacidade de absorver radiação ultravioleta. Assim como estilbenoides, cumarinas revelam uma fluorescência à luz UV (Waksmundzka et al., 2006). Branqueadores ópticos atuam inibindo a síntese de quitina na membrana peritrófica, tornando assim o intestino médio mais suscetível a agentes infecciosos (Sheppard & Shapiro, 1994; Wang & Granados, 2000; Reddy et al., 2008), além de retardar significativamente o desenvolvimento larval (Zhu et al., 2007). Em termos de aumento de atividade viral, bons resultados também têm sido obtidos com ácido bórico (Morales et al., 2001; Cisneros et al., 2002), doses subletais de inseticidas (Liao et al., 2016) e azadiractina (Zamora-Avilés et al. 2013; Mascarin & Delalibera, 2012). No entanto, o resultado da interação entre esses agentes químicos e entomopatógenos depende do inseto hospedeiro, da linhagem destes patógenos, da natureza química dos produtos, de sua concentração e da virulência dos CO's (corpos de oclusão) (Rossi-Zalaf et al., 2008). A virulência dos COs (Liao et al., 2016) é medida em termos concentração-mortalidade, velocidade de morte e produção de CO (Moscardi et al., 2011). O número de CO's produzido por lagarta é aspecto de grande importância para a produção massal de baculovírus para bioinseticidas e para sua dispersão no campo. Diversas técnicas têm sido propostas para aumentar a produção de vírus (CO's), incluindo dose específica de inóculo, estágio de inoculação (Narayanan & Jayaraj, 2002), além de otimização da temperatura de criação e tempo de colheita dos insetos infectados (Cherry et al., 1997; Subramanian et al., 2006). Outros fatores que afetam a produção de baculovírus são a duração de infecção (Takatsuka et al., 2007) e a taxa de crescimento do hospedeiro durante o período entre inoculação e morte (Subramanian et al., 2006), visto que prolongar a duração do estágio larval também pode contribuir para o aumento da produção de CO's (Liao et al., 2016).

O efeito de produtos sinergistas na produção de corpos de oclusão têm sido investigado por Zamora-Aviles et al. (2013), que estudaram o efeito da adição de azadiractina a um isolado de NPV de *S. frugiperda*. Porém, o efeito da adição de branqueadores ópticos sinergistas na produção de CO's carece de investigação.

Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito da adição de branqueadores ópticos como agentes sinergistas associados a ChinNPV e HzNPV, além de investigar o efeito da interação do produto selecionado na CL₅₀ e CL₉₀ e na produção de corpos poliédricos de oclusão de ChinNPV em diferentes temperaturas de incubação.

Portanto, as hipóteses testadas neste estudo foram:

1. A atividade viral de ChinNPV e HzNPV pode ser aumentada em função da adição de agentes químicos com potencial sinergista relatados na literatura?
2. O branqueador óptico testado pode causar redução da CL50 e da CL90 de ChinNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* de terceiro e quarto instares?
3. A adição de branqueador óptico a ChinNPV pode afetar o peso larval e da produção de corpos de oclusão em lagartas de *Chrysodeixis includens* de terceiro e quarto instares?
4. A temperatura de incubação de lagartas de *Chrysodeixis includens* infectadas com ChinNPV, com e sem adição de branqueador óptico, afeta variáveis como tempo e porcentagem de mortalidade, peso larval e produção de poliedros?

MATERIAL E MÉTODOS

Colônia de insetos

Os insetos utilizados neste estudo foram obtidos a partir da criação de manutenção de lagartas da Embrapa Soja. Inicialmente, as colônias de *C. includens* e *H. armigera* utilizadas foram provenientes de coletas realizadas a campo e multiplicadas no em laboratório. Os adultos foram mantidos em gaiolas para oviposição e as lagartas foram criadas em dieta artificial baseada em Greene et al. (1976), modificada por Hoffman Campo et al., (1985), mantidas em câmara climatizada a 26° C, 60%UR, e fotofase de 14 horas.

Obtenção dos isolados de vírus de poliedrose nuclear

Foram testados dois isolados de vírus de poliedrose nuclear (NPV) disponíveis na coleção de vírus entomopatogênicos da Embrapa Soja, armazenados em freezer a -20 °C. ChinNPV (CNPSO-VPN168) foi obtido a partir da coleta de lagartas de *C. includens* infectadas em área de cultivo de soja em Iguaraçu, PR, durante a safra 2005/2006. Em todos os bioensaios, foram utilizados isolados a partir de corpos de inclusão já purificados (Alexandre et al., 2010). HzNPV (CNPSO-VPN 172) foi o isolado e caracterizado anteriormente por Ardisson-Araujo et al., (2015).

Procedimentos para realização dos bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos incorporando-se 10 ml da suspensão viral a 90 ml da dieta artificial, resfriada a 50° C (Morales; Moscardi, 1993), com o auxílio de uma batedeira. As concentrações utilizadas dos isolados foram 1×10^3 CO.ml⁻¹, para HzNPV, e 5×10^3 CO.ml⁻¹, para ChinNPV, com base na CL₅₀ de cada isolado estabelecida em testes anteriores (Alexandre et al., 2010; Ardisson-Araujo et al., 2015). Após a homogeneização, a dieta contendo a suspensão viral foi vertida em bandejas plásticas (32 células de 27 ml; Advento do Brasil, Diadema, SP). Em cada célula da bandeja foi transferida uma lagarta de terceiro ínstar. O delineamento experimental em todos os procedimentos em laboratório foi inteiramente casualizado, com 3 repetições no tempo e número de subamostras (insetos) variável (32 à 64). As bandejas de bioensaios foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ e 14h de fotofase. A mortalidade foi avaliada diariamente do primeiro ao décimo segundo dia.

Seleção de produtos com potencial sinergista associados à vírus de poliedrose nuclear

Em laboratório, seis produtos, em diferentes concentrações, que foram combinados com concentrações padronizadas de ChinNPV ($5,0 \times 10^3$ CO.mL⁻¹) e HzNPV ($1,0 \times 10^3$ CO.mL⁻¹) (Tabela 1). Estes foram incorporados em dieta artificial sem formol, resfriada a 50° C (Morales; Moscardi, 1993) e oferecidos a lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* e *H. armigera*, respectivamente.

Tabela 1. Relação de produtos com potencial sinergista utilizados em combinação com ChinNPV ($5,0 \times 10^3$ CO.mL⁻¹) e HzNPV ($1,0 \times 10^3$ CO.mL⁻¹).

Produto	Fórmula Química	Grupo Químico	Empresa	Concentração
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	Ácido médio	Quimidrol	0,025% e 0,05% (m/v)
Chlorfluazuron	C ₂₀ H ₉ Cl ₃ F ₅ N ₃ O ₃	Regulador de crescimento de insetos	Sigma-Aldrich	5ppm e 10ppm (m/v)
Ácido 4,4'-Diamino-2,2'-estilbeno dissulfônico (DES)	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₆ S ₂	Sal dissódio	Sigma-Aldrich	0,5%, 1,0% e 1,5% (m/v)
Calcofluor White Stain	C ₄₀ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₀ S ₂ + C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄	Derivado do ácido estilbeno (0,1%) + corante (0,05%)	Fluka	0,5%, 1,0% e 1,5% (v/v)
Fluorescent Brightener 28 (FB 28)	C ₄₀ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₀ S ₂	Derivado do ácido estilbeno	Sigma-Aldrich	0,025%, 0,05% e 0,1% (m/v)
Umbeliferona	C ₉ H ₆ O ₃	Derivado de cumarinas: 7-hidroxycumarina	Sigma-Aldrich	0,1% e 0,5% (m/v)

m/v: massa/volume; v/v: volume/volume

Efeito de Fluorescent Brightener 28 na concentração letal dos isolados de vírus de poliedrose nuclear e tempo de sobrevivência

A CL₅₀ do isolado viral foi determinada a partir de seis concentrações de ChinNPV para lagartas de 3º ínstar de *C. includens* (250; 750; 2.250; 6.750; 20.250; 60.750 CO.mL⁻¹) e seis concentrações para lagartas de 4º ínstar (1.875; 3.750; 7.500; 15.000; 30.000; 60.000 CO.mL⁻¹). Mesmo procedimento foi utilizado para determinar o efeito de FB 28 (0,1%) na CL₅₀ concentrações de ChinNPV para lagartas de 3º ínstar de *C. includens* (10; 20; 40; 80; 160; 320 CO.mL⁻¹) e para lagartas de 4º ínstar (440; 660; 980; 1.480; 2.230; 3.330 CO.mL⁻¹). As lagartas foram inoculadas em dieta artificial a 50°C (Morales e Moscardi, 1993) e vertidas em bandejas plásticas de 32 células. Em cada célula foi adicionada uma lagarta (40 lagartas/concentração). A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente.

Efeito de Fluorescent Brightener 28 na produção de corpos poliédricos de oclusão de ChinNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens*

O efeito de Fluorescent Brightener 28 (FB 28) na produção de corpos de oclusão de ChinNPV foi determinado através de bioensaios conduzidos em três temperaturas:

22° C, 26° C e 30° C. Larvas de *C. includens* de 3º e 4º ínstaes foram alimentadas com dieta artificial inoculada com NPV na concentração 5×10^3 CO.ml⁻¹ e 4×10^4 CO.ml⁻¹, respectivamente, combinados com FB 28 a 0,1% (0,1g/100ml). Foram utilizadas lagartas de terceiro e quarto ínstaes, individualizadas em bandeja plástica com tampa (32 células de 27 ml, Advento do Brasil, Diadema- SP) e mantidas em BOD. Os bioensaios foram repetidos quatro vezes, sendo utilizadas em média 30 lagartas por repetição. A mortalidade foi avaliada diariamente. A coleta de lagartas mortas por vírus e a contagem de CO foi feita conforme metodologia descrita por Lasa et al. (2007). Larvas moribundas, que apresentavam sinais claros de infecção por ChinNPV, foram transferidas individualmente para tubos tipo eppendorf (1,5ml), num total de 30 lagartas por tratamento. Quando foi registrada a mortalidade, as larvas foram pesadas e, posteriormente, congeladas a -20 °C. Foi adicionado 1 ml de água destilada e esterilizada a cada eppendorf. Esta suspensão foi descongelada e submetida à agitação em agitador de tubos tipo vortex (2.800 rpm). A suspensão resultante foi diluída e ajustada em uma suspensão final com volume de 10 ml, que foi utilizada para contagem de CO. O número de CO em cada larva foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha), sob microscópio de contraste de fase com aumento de 400X, sendo realizadas duas amostragens para cada larva. A relação entre a produção e CO e o peso das lagartas (CO's/mg) foi estimado baseado no peso larval registrado no dia da morte.

Análise de dados

O tipo de interação entre os produtos e os isolados de NPV foram determinadas em função do fator de cotoxicidade (CTF), calculado a partir da equação proposta por (Mansour et al., 1966):

$$CTF = \frac{(Oc - Oe)}{Oe} * 100$$

Onde:

Oc: porcentagem de mortalidade observada na combinação entre produto e NPV

Oe: porcentagem da mortalidade esperada, isto é, a soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente.

Os resultados foram divididos em três categorias: quando CTF foi positivo, igual ou superior a 20, o efeito foi considerado sinergista; para o CTF negativo igual ou

superior a 20, foi considerado efeito antagônico; e para o CTF entre -20 e +20, o efeito foi considerado aditivo.

O tempo médio de mortalidade foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TMM = \frac{\Sigma(D4*N4 + D5*N5 + \dots + Dn*Nn)}{N \text{ total}}$$

Onde:

D= dia de avaliação

N= número de lagartas mortas no dia D

N total= número total de lagartas mortas no tratamento

Os dados de mortalidade foram submetidos ao método de Análise Sobrevivência de Riscos Competitivos (ASRC) (Colosimo; Giolo, 2006), visto que, além da mortalidade causada pelos isolados de NPV (causa 1), também foi observada mortalidade ocasionada por causas desconhecidas (causa 2). Todas as variáveis de tempo até a ocorrência de um evento foram analisados sob a abordagem não paramétrica na ASRC e os testes para comparar as curvas dos tratamentos foram o teste de Gray (1988) e o de Fine-Gray (1999), que leva em conta todos os tempos t . Na presença de riscos competitivos tem-se que: a) os indivíduos estão sob risco de falha por k causas diferentes; e b) a ocorrência de uma das k causas impede que se observe a ocorrência de qualquer outra. Portanto, $k= 1,2$ denota as causas de falha (1 = morte por vírus e 2 = morte por causa desconhecida). O tempo t denota os dias, ou seja, $t= 0, 1, 2, 3, \dots, 12$ dias. Assim a falha, $F(t| \mathbf{x})=P(T \leq t | \mathbf{x})$, é que denota a probabilidade de um indivíduo sob risco, e com vetor de covariáveis $\mathbf{x}$, apresentar o desfecho até o tempo t . A variável resposta no modelo de sobrevivência é o tempo e as covariáveis são os tratamentos, as datas e as temperaturas estudadas.

Demais variáveis resposta, como peso de lagartas (mg) e número de poliedros (CO/mg e CO/ lagarta) foram analisados por Análise de variância (ANOVA), após serem submetidos aos testes que verificam as pressuposições de normalidade e independência dos resíduos (Shapiro; Wilk, 1965;), a homogeneidade de variância dos tratamentos (Burr & Foster, 1972), não-aditividade do modelo (Tukey, 1949). Após as análises exploratórias e atendidos os pressupostos, foram realizadas Análises de Variâncias (ANOVA) e a comparação múltiplas de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Steel & Torrie, 1960). Quando necessário, os dados foram transformados por log

(x+1) e então submetidos à ANOVA. Dados de mortalidade referentes à determinação da CL₅₀ e CL₉₀ foram analisados utilizando a classe modelos Weibull-2 (Ritz, 2010), que na parametrização utilizada corresponde ao modelo linear generalizado com função de ligação complemento log-log.

Todas as análises e ajustes de modelos foram realizados utilizando o software R, versão 3.4.1 (R CORE TEAM, 2014), por meio dos pacotes cmprsk (Gray, 2014).

RESULTADOS

Seleção de produtos com potencial sinergista associados à ChinNPV e HzNPV

Os efeitos dos diferentes agentes adicionados a ChinNPV e HzNPV estão descritos nas tabelas 2 e 3. O Fluorescente Brightener 28 (FB 28), nas concentrações 0,05% e 0,1%, foi o único produto que apresentou interação sinérgica quando combinado com NPV (Tabelas 2 e 3). O tratamento com FB 28 (0,1%) adicionado a ambos os isolados foi superior a todos os demais tratamentos, promovendo o aumento da porcentagem de mortalidade em larvas de 3º ínstar de *C. includens* e *H. armigera*, de 45,9% para 98,6% e de 53,1% para 97,8%, respectivamente, além da redução do tempo médio de mortalidade de 8,45 dias para 5,93 dias em *C. includens* e de 7,47 dias para 5,30 dias em *H. armigera* (Tabelas 2 e 3).

A mortalidade de lagartas de *C. includens* e *H. armigera* nos tratamentos com a presença de produtos, mas sem NPV, foi superior à testemunha (somente dieta) em todos os casos. Porém, por apresentarem mortalidade de lagartas em taxas relativamente baixas, o efeito de toxicidade destes compostos nestas espécies mostra-se limitado (Tabelas 2 e 3).

A mortalidade foi significativamente diferente entre as combinações, tanto em termos de porcentagem, tempo médio de mortalidade e interações entre vírus e produtos químicos. Um efeito sinérgico foi observado apenas na combinação entre FB 28 a 0,05% e 0,1%, em ambos os isolados. Já para FB 28 a 0,025% foi observado efeito aditivo, assim como com a adição de ácido diamino estilbeno dissulfônico DES a 1,0% adicionado a ChinNPV (1,0%) e DES (0,5%, 1,0% e 1,5%) adicionado a HzNPV. Com relação às demais combinações, em ambos os isolados, foram observados efeitos antagônicos (Tabelas 2 e 3). Essas interações podem ser observadas visualmente ao se

comparar as curvas de função de incidência acumulada de morte entre os tratamentos (Figuras 1 a 10).

Tabela 2. Efeito de agentes químicos adicionados a ChiNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Chrysodeixis includens*. ChinNPV: 5.000 CO.ml⁻¹

Tratamentos	N	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito	Teste de Gray
0 (testemunha)	162	6,8	6,96					C
ChinNPV	172	45,9	8,45					d
FB 28 (0,025%)	178	15,7	7,44					B
FB 28 (0,05%)	96	26,0	8,03					A
Fluorescent Brightener 28 (0,1%)	96	25,0	7,89					A
ChinNPV + FB 28 (0,025%)	166	60,2	7,72	60,2	61,7	-2,30	Aditivo	c
ChinNPV + FB 28 (0,05%)	172	86,6	6,70	86,6	72,0	20,3	Sinergismo	b
ChinNPV + FB 28 (0,1%)	143	98,6	5,93	98,6	70,9	39,0	Sinergismo	a
DES (0,5%)	96	10,4	5,12					C
DES (1,0%)	96	14,6	6,27					BC
DES (1,5%)	96	28,1	7,14					A
ChinNPV + DES (0,5%)	144	36,8	8,37	36,8	56,3	-34,6	Antagônico	e
ChinNPV + DES (1,0%)	163	53,4	8,20	53,4	60,5	-11,8	Aditivo	d
ChinNPV + DES (1,5%)	131	32,1	7,94	32,1	74,1	-56,7	Antagônico	e
Calcofluor (0,5%)	96	9,4	5,62					C
Calcofluor (1,0%)	96	18,8	4,77					B
Calcofluor (1,5%)	88	5,7	5,50					C
ChinNPV + calcofluor (0,5%)	95	29,5	8,17	29,5	55,3	-46,7	Antagônico	ef
ChinNPV + calcofluor (1,0%)	96	47,9	8,32	47,9	64,7	-25,9	Antagônico	d
ChinNPV + calcofluor (1,5%)	99	28,3	8,11	28,3	51,6	-45,2	Antagônico	f
0,025% ácido bórico	30	6,7	4,00					C
0,05% ácido bórico	66	13,6	5,75					C
NPV + 0,025% ácido bórico	32	15,6	9,00	15,6	52,6	-70,3	Antagônico	f
NPV + 0,05% ácido bórico	64	32,8	6,97	32,8	59,6	-44,9	Antagônico	ef
0,1% umbeliferona	96	7,3	7,07					C
0,5% umbeliferona	96	9,4	5,71					C
NPV + 0,1% umbeliferona	89	41,6	7,97	41,6	53,2	-21,9	Antagônico	e
NPV + 0,5% umbeliferona	104	29,8	8,67	29,8	55,3	-46,1	Antagônico	f
5ppm chlorfluazuron	63	14,3	9,00					C
10ppm chlorfluazuron	63	14,3	10,00					C
NPV + 5ppm chlorfluazuron	65	18,5	9,09	18,5	60,2	-69,3	Antagônico	f
NPV + 10ppm chlorfluazuron	63	36,5	8,78	36,5	60,2	-39,4	Antagônico	ef

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Gray. Letras maiúsculas referem-se aos tratamentos testemunha e minúsculas aos tratamentos com vírus. FB 28: Fluorescent Brightener 28; DES: ácido diamino estilbene; Calcofluor: Calcofluor White Stain. CTF: fator de cotoxicidade. Oc: mortalidade observada na combinação entre produto e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

Tabela 3. Efeito de agentes químicos adicionados a HzNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Helicoverpa armigera*. HzNPV: 1.000 CO.ml⁻¹

Tratamentos	n	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito	Teste de Gray
0 (testemunha)	91	15,4	8,00					C
HzNPV	96	53,1	7,47					d
0,025% FB 28	86	36,0	7,83					B
0,05% FB 28	90	16,7	7,47					C
0,1% FB 28	90	12,2	6,76					C
HzNPV + 0,025% FB 28	92	78,3	6,90	78,3	89,2	-12,2	Aditivo	c
HzNPV + 0,05% FB 28	92	89,1	6,41	89,1	69,8	27,7	Sinergista	b
HzNPV + 0,1% FB 28	92	97,8	5,30	97,8	65,3	49,7	Sinergista	a
0,5% DES	94	8,5	6,86					D
1,0% DES	97	8,2	7,00					D
1,5% DES	99	21,2	7,94					BC
HzNPV + 0,5% DES	92	67,4	7,70	67,4	61,6	9,3	Aditivo	d
HzNPV + 1,0% DES	93	63,4	7,79	63,4	61,4	3,4	Aditivo	d
HzNPV + 1,5% DES	54	64,8	8,21	64,8	74,3	-12,8	Aditivo	de
1,5 % Calcofluor	32	6,3	7,33	6,3				D
HzNPV + 1,5 % Calcofluor	30	40,0	8,33	40,0	59,4	-32,6	Antagônico	e
0,05% ácido bórico	31	35,5	6,25	35,5				B
0,1% ácido bórico	32	50,0	6,15	50,0				A
HzNPV + 0,025% ácido bórico	31	22,6	9,00	22,6	89	-74,5	Antagônico	f
HzNPV + 0,05% ácido bórico	32	34,4	8,00	34,4	103,1	-66,7	Antagônico	f
0,1% umbeliferona	33	6,1	7,00	6,1				D
0,5% umbeliferona	32	0,0	0,00	0,0				E
HzNPV + 0,1% umbeliferona	30	40,0	8,33	40,0	59,2	-32,4	Antagônico	e
HzNPV + 0,5% umbeliferona	32	37,5	9,11	37,5	53,1	-29,4	Antagônico	e

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Gray. Letras maiúsculas referem-se aos tratamentos testemunha e minúsculas aos tratamentos com vírus. FB 28: Fluorescent Brightener 28; DES: ácido diamino estilbene; Calcofluor: Calcofluor White Stain. CTF: fator de cototoxicidade. Oc: mortalidade observada na combinação entre produto e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

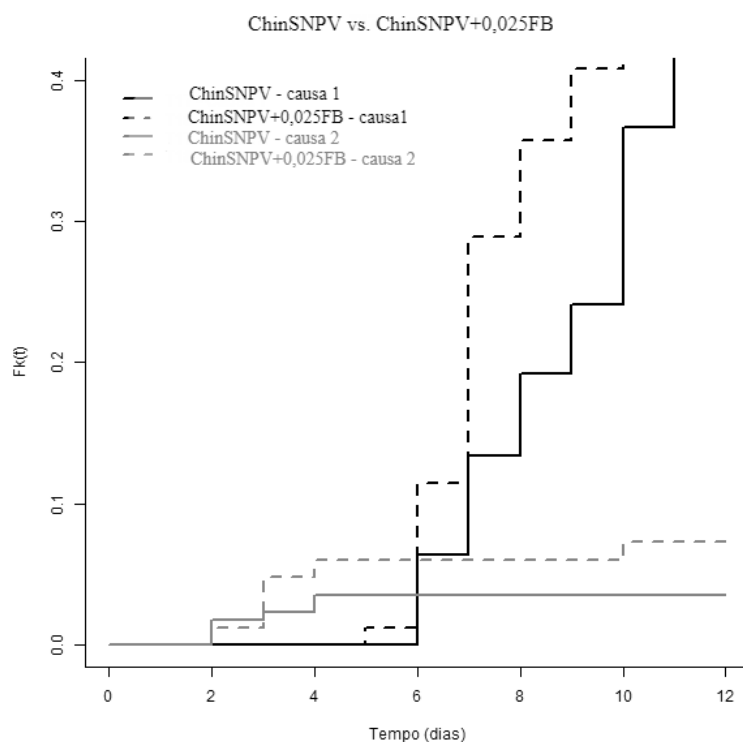


Figura 1. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,025% FB 28, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

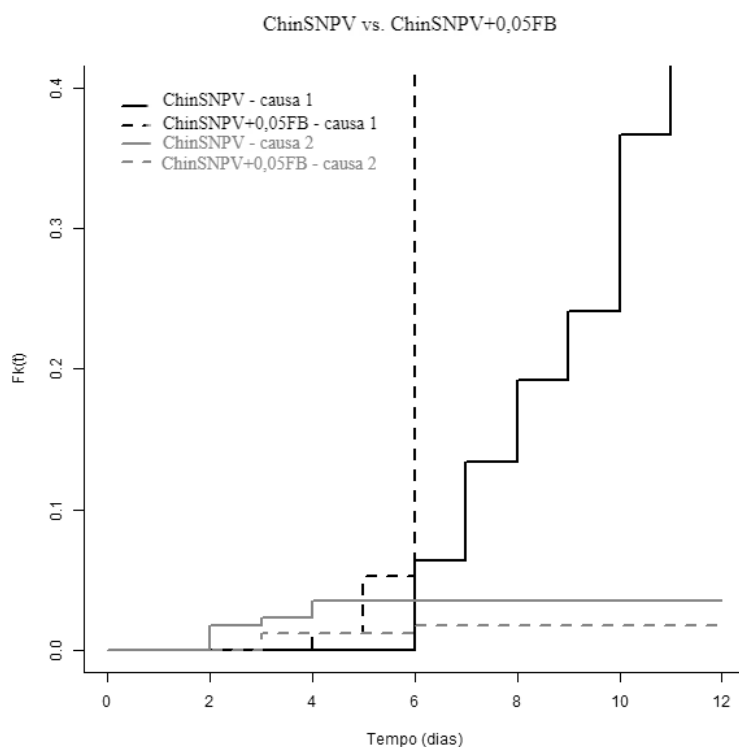


Figura 2. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,05% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

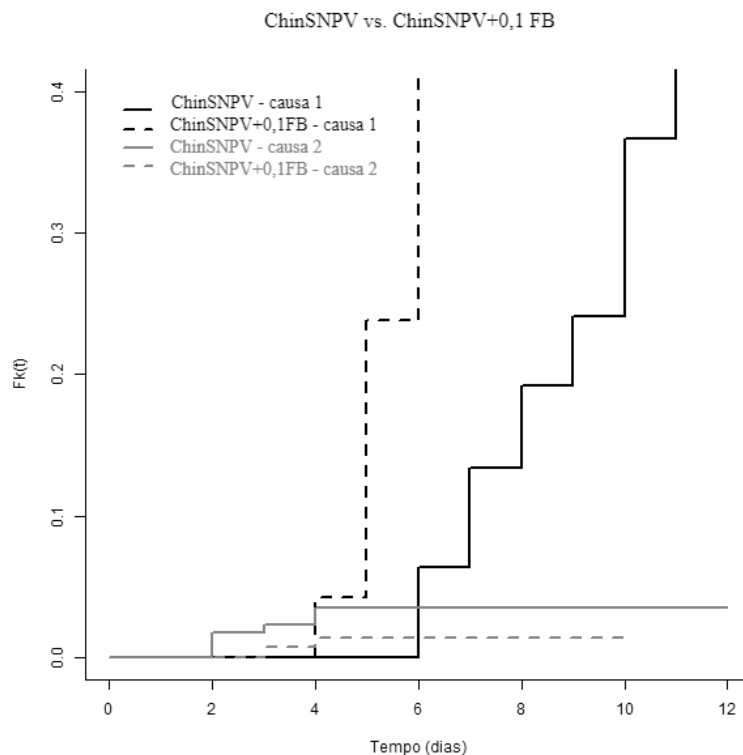


Figura 3. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,1% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

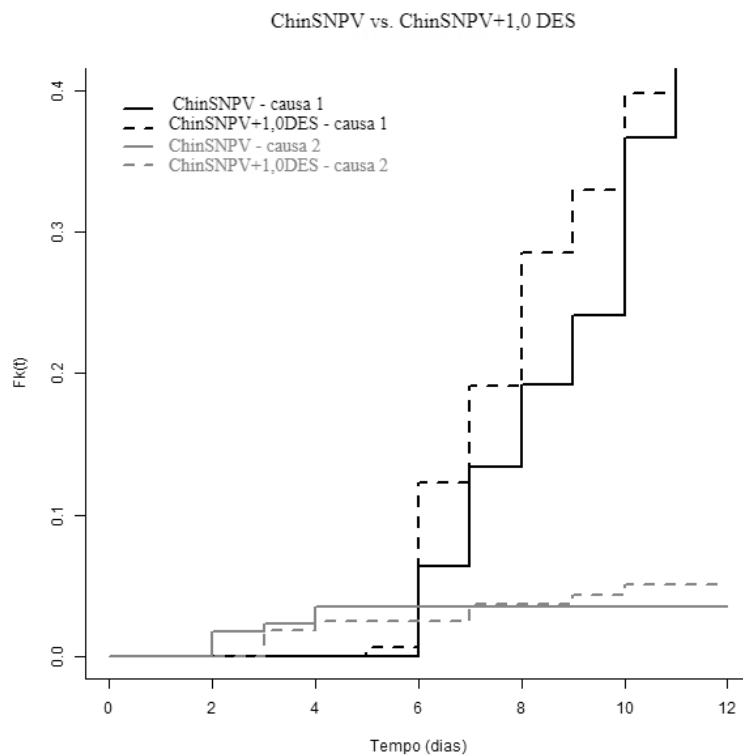


Figura 4. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* entre os tratamentos ChinNPV e ChinNPV + 0,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

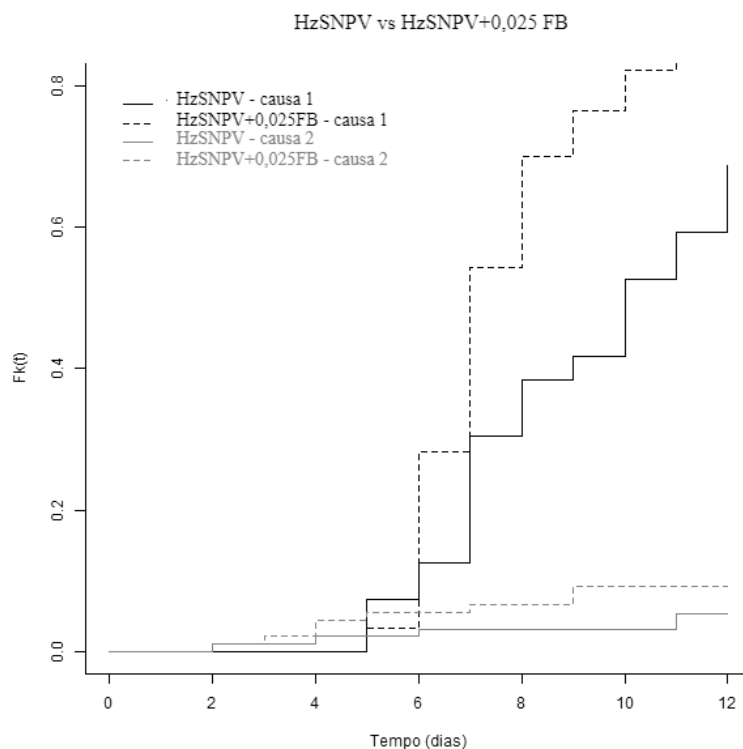


Figura 5. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,025% FB 28, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

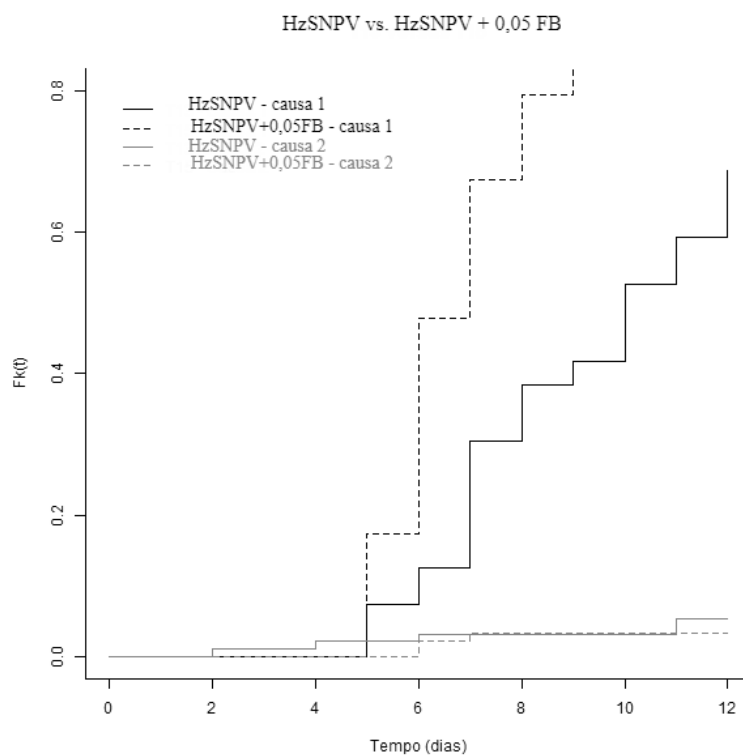


Figura 6. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,05% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

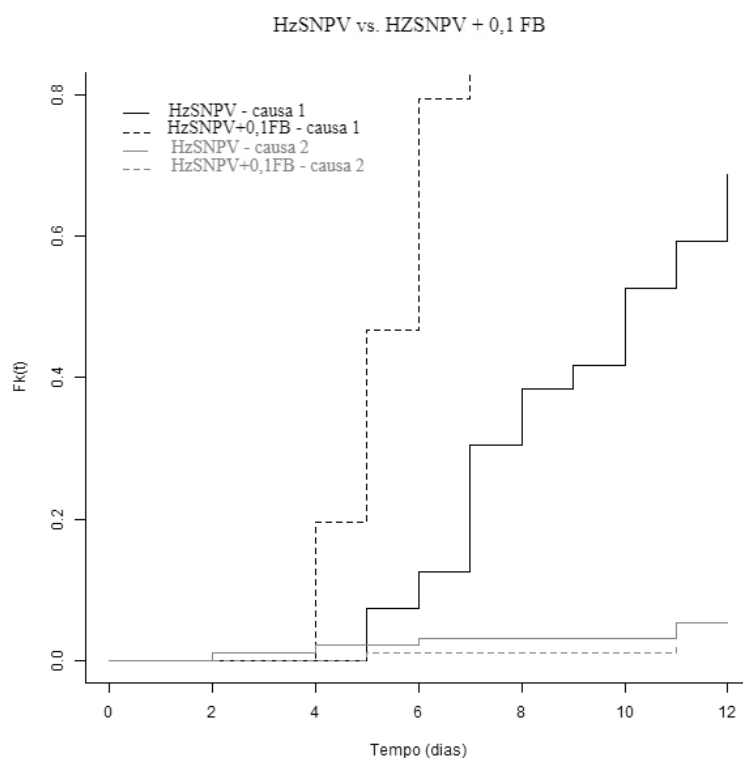


Figura 7. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,1% FB 28, mostrando efeito sinérgico. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

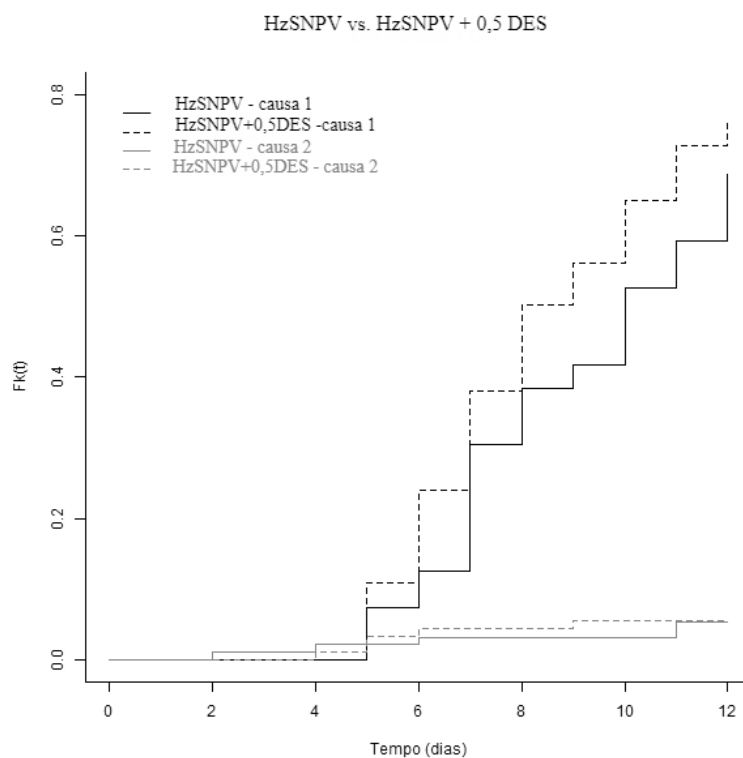


Figura 8. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 0,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

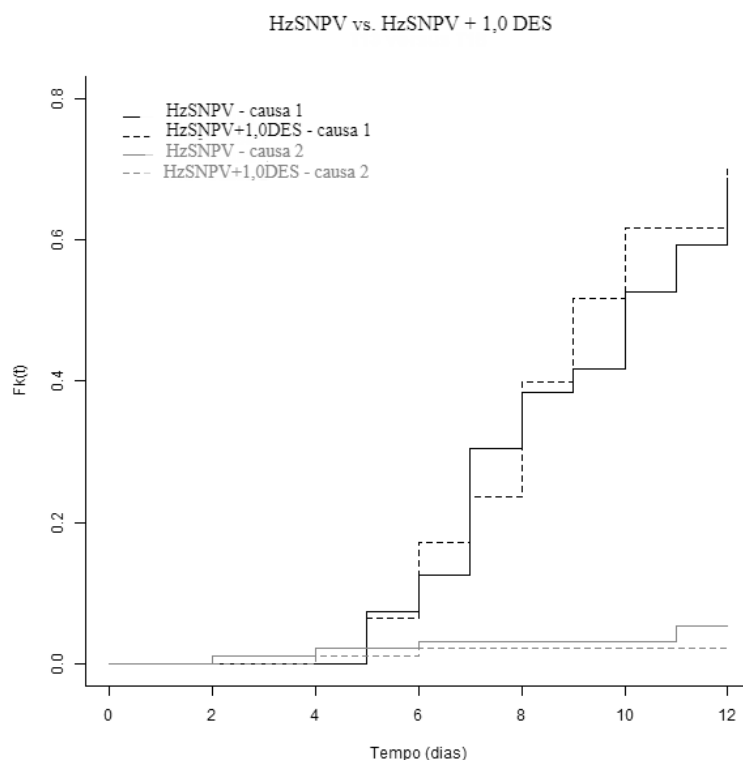


Figura 9. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 1,0% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

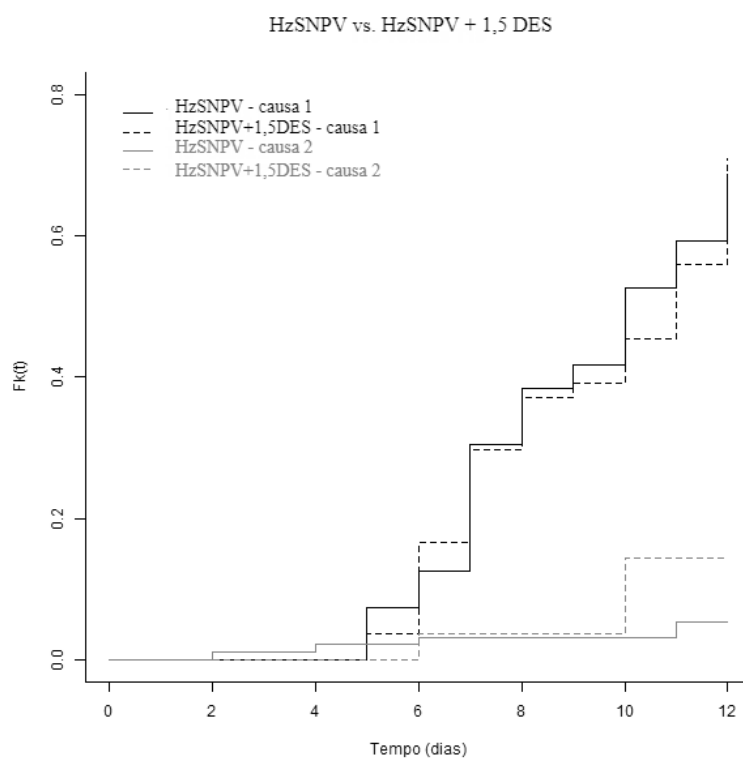


Figura 10. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *H.armigera* entre os tratamentos HzNPV e HzNPV + 1,5% DES, mostrando efeito aditivo. Causa 1: mortalidade por vírus. Causa 2: mortalidade por causa desconhecida.

Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na concentração letal de ChinNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens*

Chrysodeixis includens de 3º ínstar: A CL_{50} de ChinNPV aos 11 dias após a inoculação, foi 4.476 $CO.ml^{-1}$ de dieta. Com a adição de 0,1% de FB 28, aos 8 dias após a inoculação, a CL_{50} foi reduzida para 23 $CO.ml^{-1}$ (Tabela 4; Figura 11). A CL_{90} ChinNPV foi reduzida de 12.292 $CO.ml^{-1}$, aos 11 dias após a inoculação, para 79 $CO.ml^{-1}$ aos 8 dias após a inoculação, com a adição de 0,1% de FB 28 (Tabela 4; Figura 11).

Chrysodeixis includens de 4º ínstar: A CL_{50} de ChinNPV, aos 8 dias após a inoculação, foi 9.692 $CO.ml^{-1}$ de dieta. Com a adição de 0,1% de FB 28, aos 5 dias após a inoculação, a CL_{50} foi reduzida para 750 $CO.ml^{-1}$ (Tabela 5; Figura 11). A CL_{90} ChinNPV, aos 8 dias após a inoculação, não foi possível de ser calculada, sendo que o controle máximo estimado pelo modelo de Weibull-2 foi de 75,3% (Figura 11). Já com a adição de 0,1% de FB 28, a CL_{90} , aos 5 dias após a inoculação foi estimada em 2.794 $CO.ml^{-1}$ (Tabela 5; Figura 11).

Tabela 4. Efeito da adição de FB 28 (0,1%) a ChinNPV na CL_{50} e CL_{90} de lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* obtidas a partir de modelos Weibull-2, com dois parâmetros.

Tratamento	N	DAI	$\hat{b}$	EP	$\hat{e}$	EP	CL_{50}	CV (%)	CL_{90}	CV (%)
ChinNPV	302	11	1,2	0,1	6093,1	676,8	4476,1	46	12291,8	59
ChinNPV + 0,1% FB 28	424	8	1,0	0,2	33,6	2,8	23,1	49	79,1	48

N: número de insetos avaliados; DAI: dias após inoculação; Concentrações letais expressas em $CO.ml^{-1}$
Parâmetros da distribuição de Weibull-2: $\hat{b}$: slope relativo ; $\hat{e}$: ponto de inflexão. EP: erro padrão. CV: Coeficiente de variação.

Tabela 5. Efeito da adição de FB 28 (0,1%) a ChinNPV na CL_{50} e CL_{90} de lagartas de quarto ínstar de *Chrysodeixis includens* obtidas a partir de modelos Weibull-2, com dois parâmetros.

Tratamento	N	DAI	$\hat{b}$	EP	$\hat{e}$	EP	CL_{50}	CV (%)	CL_{90}	CV (%)
ChinNPV	225	8	0,5	0,1	19431,0	3518,8	9692,0	70	-	121
ChinNPV + 0,1% FB 28	210	5	0,9	0,2	1120,3	140,0	749,8	48	2793,5	53

N: número de insetos avaliados; DAI: dias após inoculação; Concentrações letais expressas em $CO.ml^{-1}$
Parâmetros da distribuição de Weibull-2: $\hat{b}$: slope relativo ; $\hat{e}$: ponto de inflexão. EP: erro padrão. CV: Coeficiente de variação.

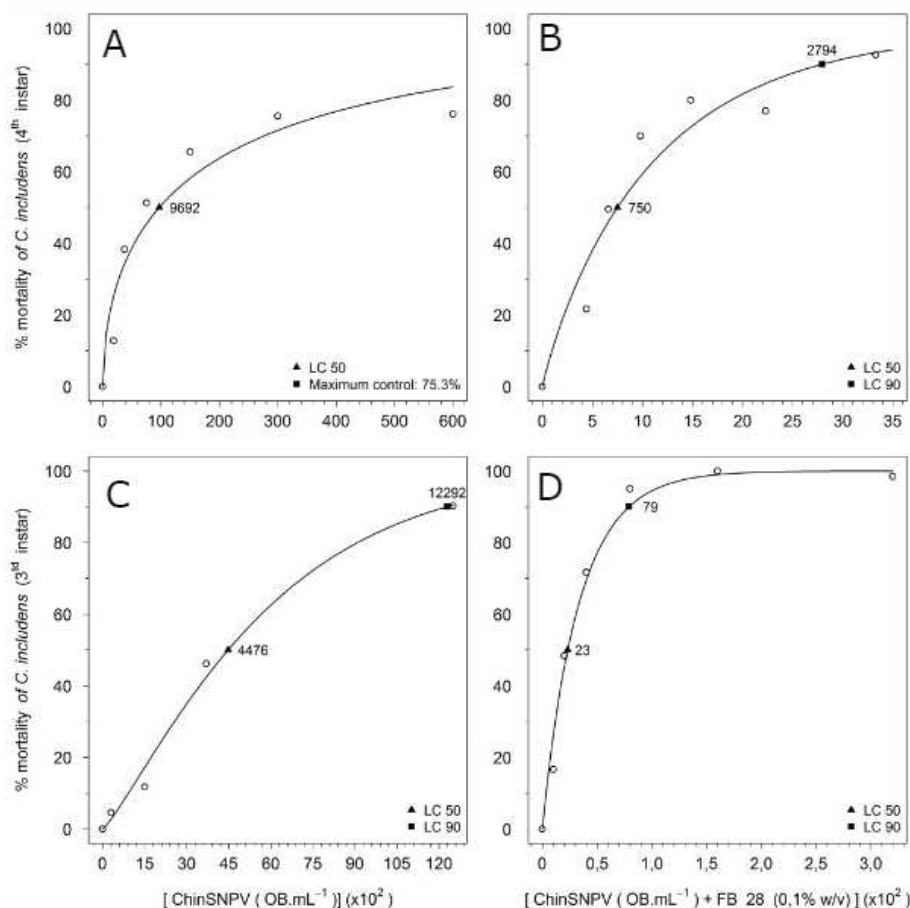


Figura 11. Curvas de mortalidade de lagartas 3^o(C e D) e 4^o (A e B) ínstaes de *C. includens* em resposta à adição de FB 28 (0,1%) a diferentes concentrações de ChinNPV inoculado em dieta artificial.

Determinação do efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de *Chrysodeixis includens* em diferentes temperaturas

A temperatura de incubação afetou o tempo de mortalidade de lagartas de terceiro e quarto ínstaes de *C. includens* (Tabelas 6 e 7; Figuras 14 a 16 e 19 a 21). O aumento da temperatura de incubação resultou em redução do tempo médio de mortalidade (TMM), em ambos os tratamentos estudados, sendo essa redução observada com maior intensidade no tratamento com branqueador óptico (FB 28). A adição de FB 28 (0,1%) ao vírus reduziu o TMM e aumentou a porcentagem de mortalidade em lagartas de 3^o e 4^o ínstar em todas as temperaturas (Tabelas 6 e 7; Figuras 12, 13, 17 e 18). As reduções mais expressivas do TMM em função da ação de FB 28 (0,1%) foram observadas em lagartas incubadas a 30°C. A mortalidade de lagartas de 4^o ínstar de *C. includens* incubadas a 30°C iniciou a partir do terceiro dia após a infecção (DAÍ), sendo que a maioria das lagartas estava morta até o quinto DAÍ, resultando em um tempo médio de mortalidade (TMM) por volta de 3,17 dias (Tabela 7). Com relação a lagartas

de terceiro ínstar incubadas a 30° C, a mortalidade iniciou ao quarto dia após a infecção, resultando em um tempo médio de mortalidade de 4,08 dias (Tabela 6).

O incremento da mortalidade pela adição de FB 28 (0,1%) não foi afetado pela variação da temperatura (Tabelas 6 e 7).

Determinação do efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na produção de corpos poliédricos de oclusão e no peso de lagartas de *Chrysodeixis includens* em três diferentes temperaturas

A produção de poliedros por lagarta (CO/lag) e poliedros por peso de lagarta (CO/mg) foi afetada pela adição de FB 28 (0,1%) em lagartas de 3° e 4° ínstaes em todas as temperaturas. A adição de FB 28 (0,1%) ao ChinNPV causou redução no peso médio das lagartas de 3° e 4° ínstaes, quando comparado ao ChinNPV sozinho, que resultou em uma redução na produção total de CO por lagarta (Tabelas 8 e 9).

Tabela 6. Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) adicionado a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3 ° ínstar de *Chrysodeixis includens*

Tratamento	Temperatura	n	% mortalidade	TMM	Fine-Gray
Testemunha	22°C	112	10,71	8,00	
FB 28 0,1%		112	13,39	8,00	
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹		112	29,46	10,03	Aa
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		112	84,82	6,85	Ab
Testemunha	26°C	112	20,54	8,35	
FB 28 0,1%		112	18,75	9,76	
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹		112	34,82	7,69	Ba
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		112	83,04	5,71	Bb
Testemunha	30°C	112	19,64	8,24	
FB 28 0,1%		112	35,71	8,00	
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹		112	50,89	6,67	Ca
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		112	84,82	4,08	Cb

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Fine-Gray. Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias entre temperaturas; Letras minúsculas referem-se à comparação de médias entre tratamentos. TMM: tempo médio de mortalidade.

Tabela 7. Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) adicionado a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 4^o ínstar de *Chrysodeixis includens*

Tratamento	Temperatura	n	% mortalidade	TMM	Fine-Gray
Testemunha	22°C	40	0,00	-	Aa
FB 28 0,1%		40	15,00	8,17	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹		40	72,50	8,38	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		40	82,50	5,70	
Testemunha	26°C	40	0,00	-	Aa
FB 28 0,1%		40	10,00	10,00	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹		40	70,00	6,72	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		40	80,00	4,75	
Testemunha	30°C	40	15,00	6,00	Ba
FB 28 0,1%		40	15,00	7,33	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹		40	62,50	4,96	
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%		40	72,50	3,17	

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Fine-Gray. Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias entre temperaturas; Letras minúsculas referem-se à comparação de médias entre tratamentos. TMM: tempo médio de mortalidade.

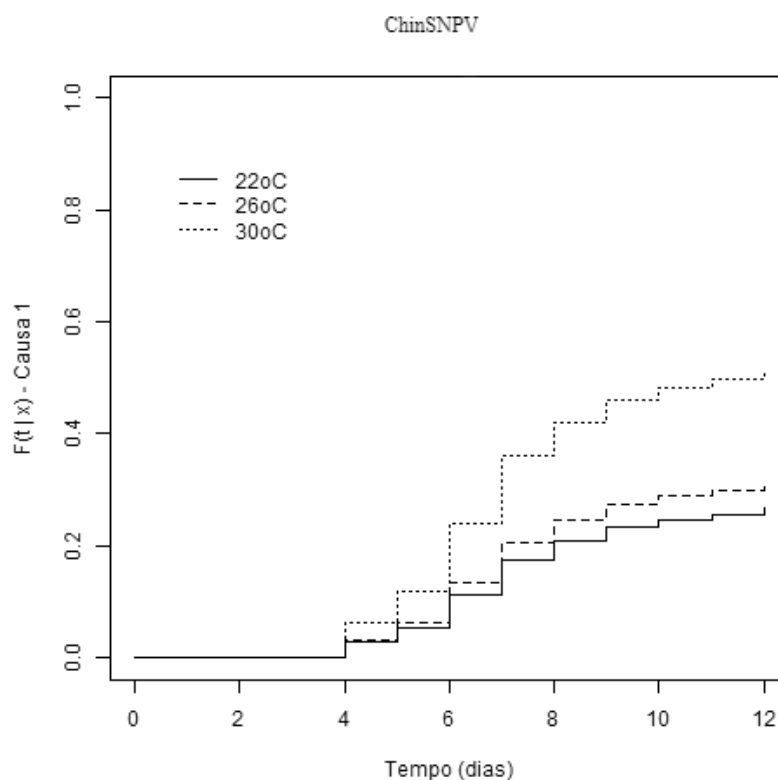


Figura 12. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e incubadas em diferentes temperaturas.

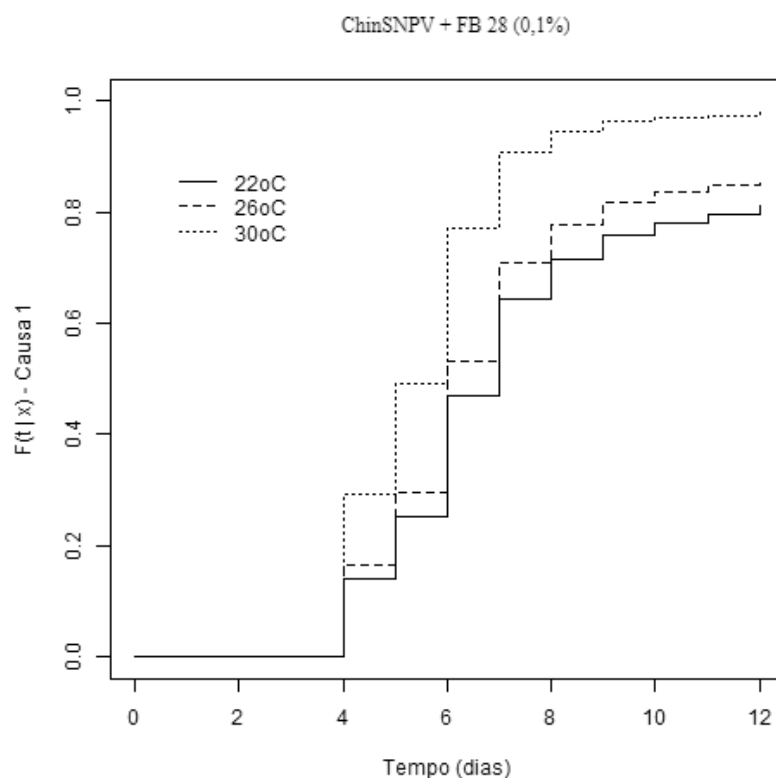


Figura 13. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em diferentes temperaturas.

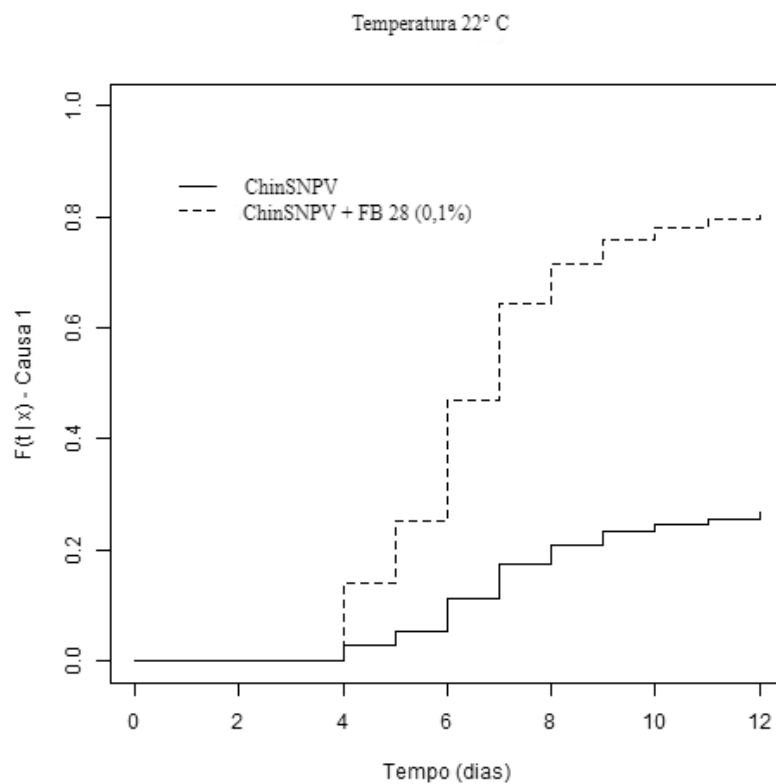


Figura 14. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 22° C.

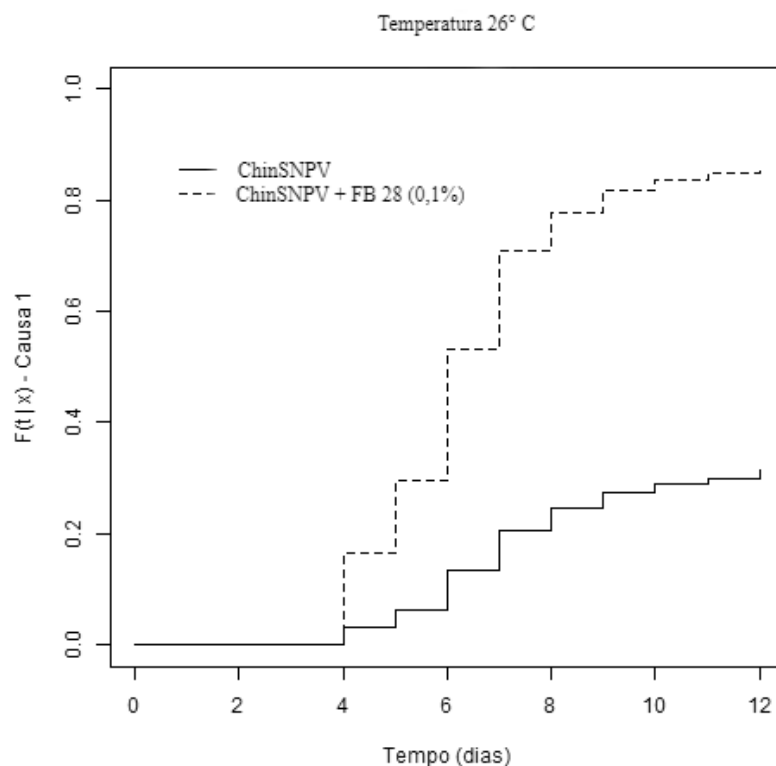


Figura 15. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 26° C.

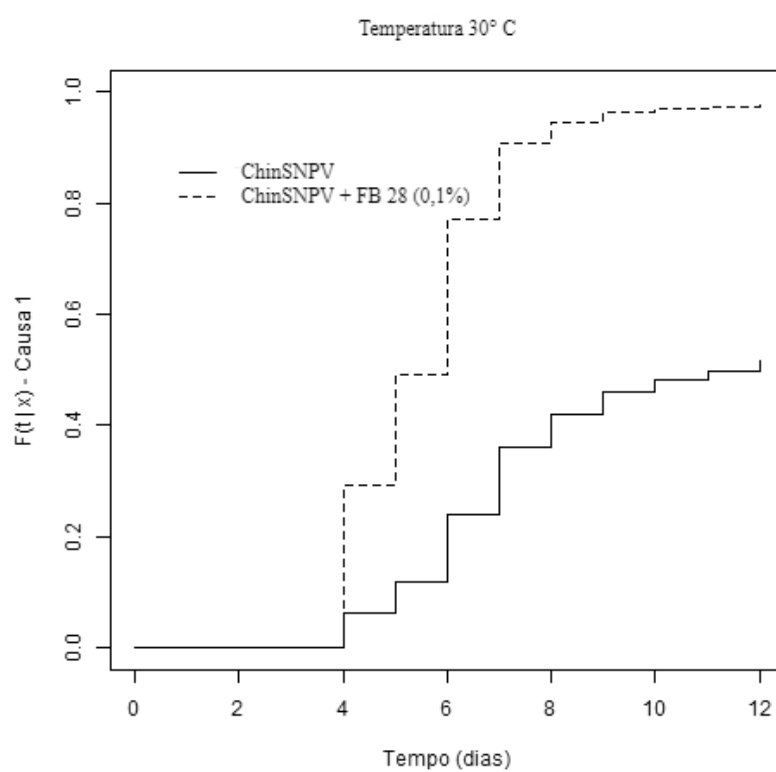


Figura 16. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 30° C.

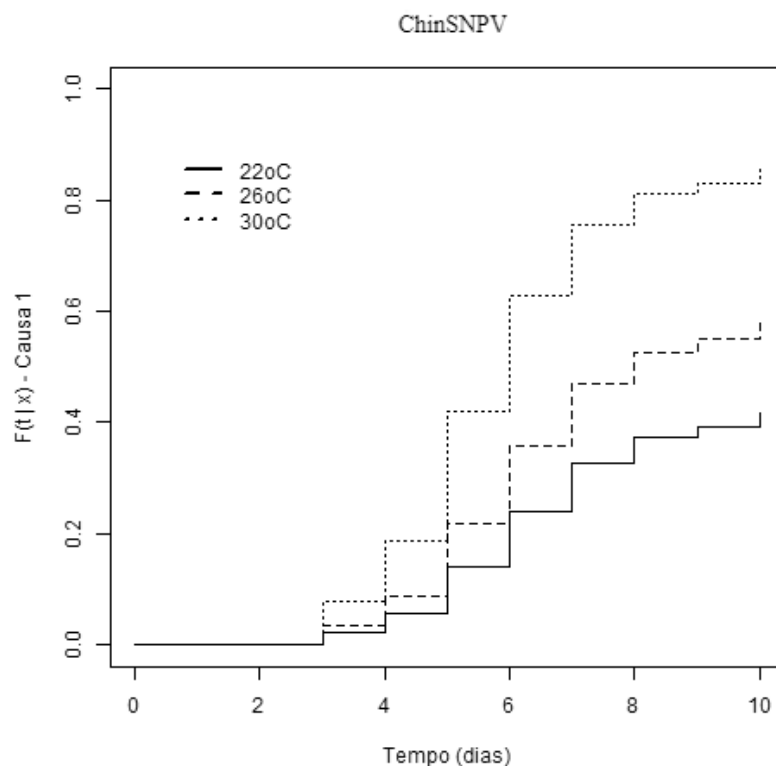


Figura 17. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e incubadas em diferentes temperaturas.

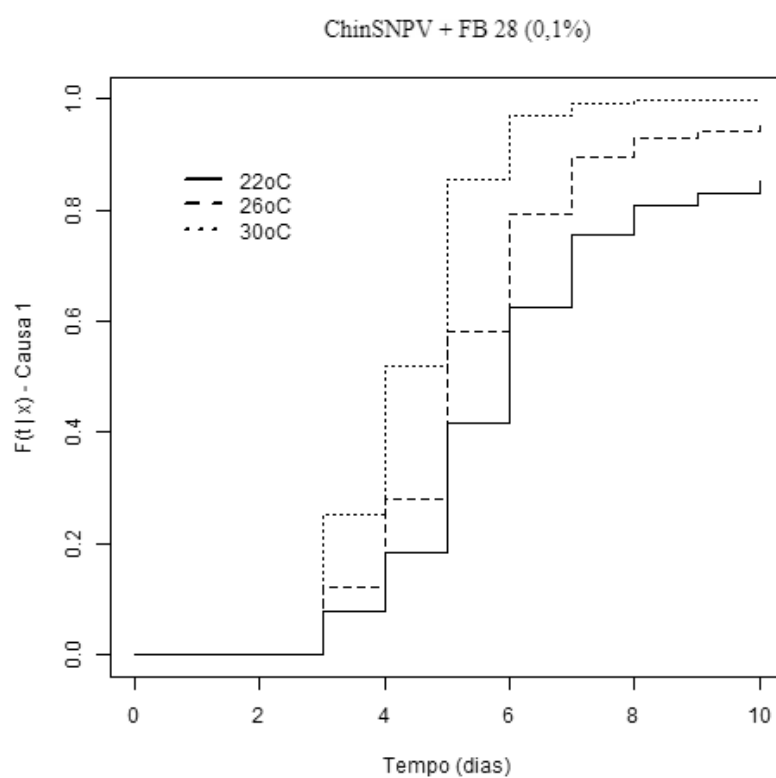


Figura 18. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em diferentes temperaturas.

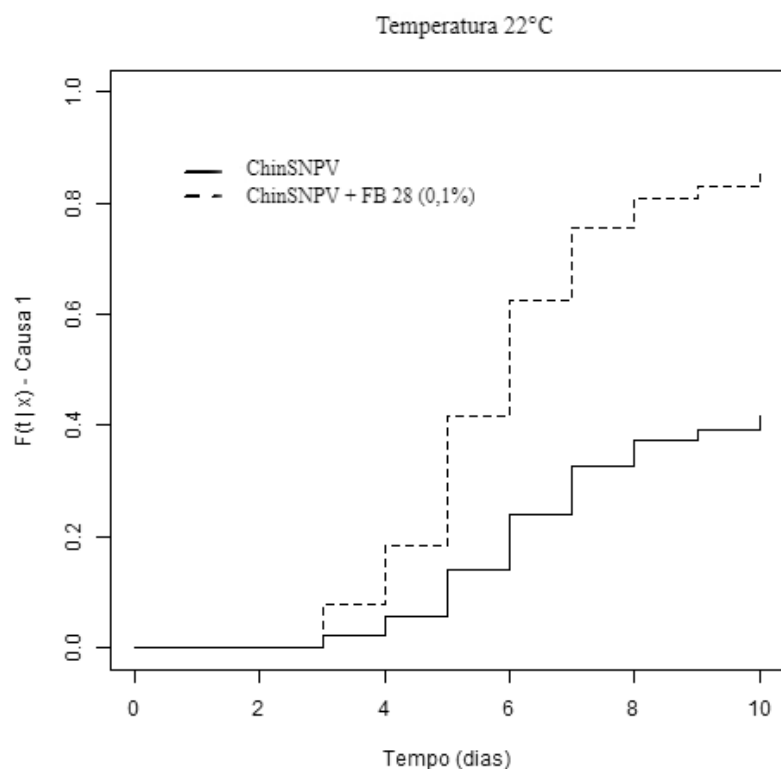


Figura 19. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 22° C.

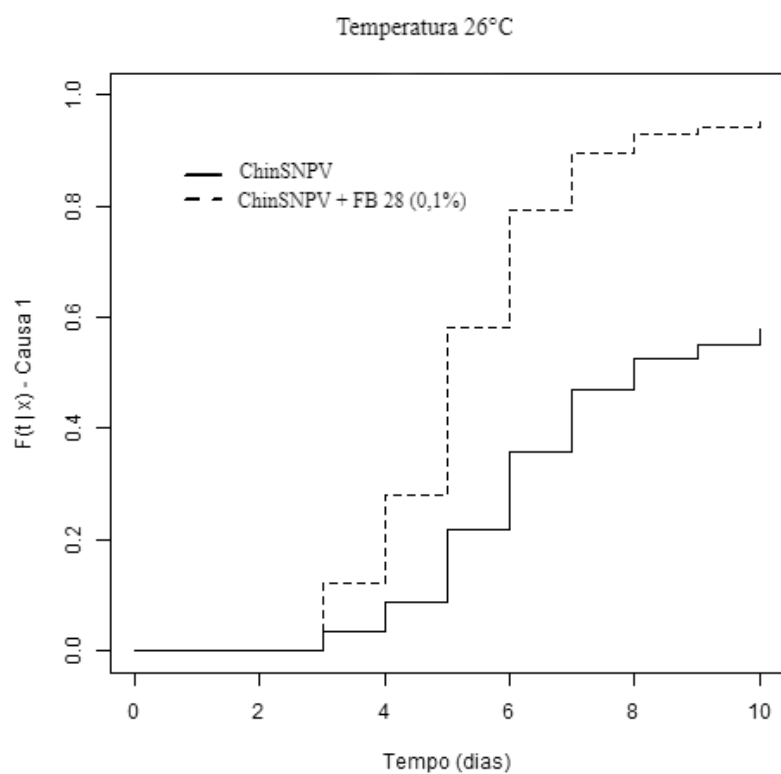


Figura 20. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 26° C.

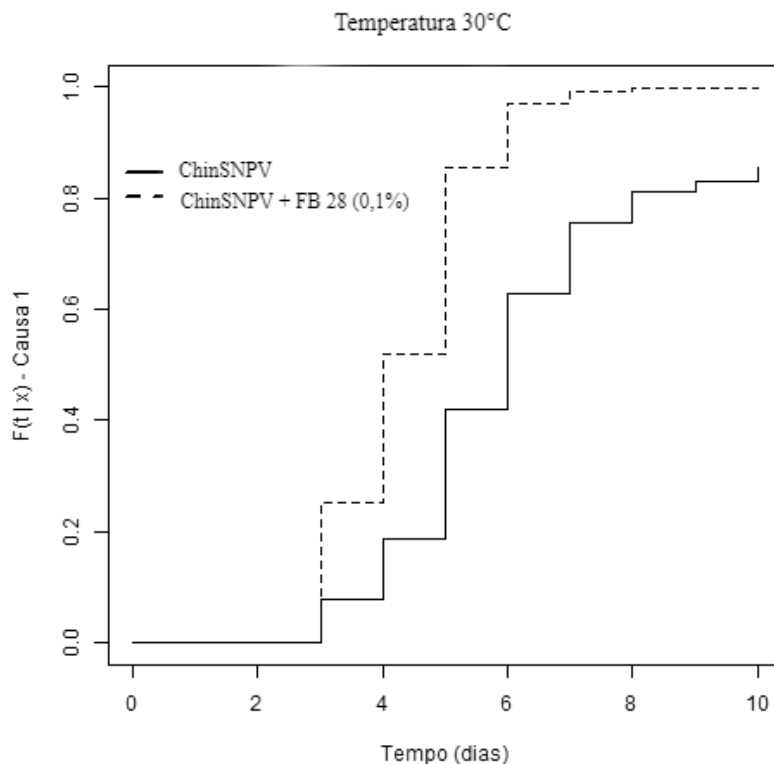


Figura 21. Curvas de incidência acumulada de morte de lagartas de quarto ínstar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV e ChinNPV + FB 28 (0,1%) e incubadas em temperatura de 30° C.

Tabela 8. Efeito de FB 28 no peso larval e na produção de corpos poliédricos de oclusão (CO) em isolado de ChinNPV inoculado em lagartas de 3 ° ínstar de *Chrysodeixis includens* em laboratório. CO: 10⁶. ml⁻¹.

Tratamento	Temperatura	peso (mg)	CO/mg	CO/lagarta
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹	22° C	33,8 Aa	16,9 Aa	572,0Aa
	26° C	43,8 Aa	24,7 Aa	1080,0Aa
	30° C	45,3 Aa	2,06 Ba	935,0Aa
ChinNPV 5.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%	22° C	11,3 Bb	6,51 Bb	73,6Bb
	26° C	7,6 Bb	5,75 Bb	43,7Bb
	30° C	5,4 Bb	4,02 Bb	21,7Bb

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias entre temperaturas; Letras minúsculas referem-se à comparação de médias entre tratamentos. Dados transformados por log(x).

Tabela 9. Efeito de FB 28 no peso larval e na produção de corpos poliédricos de oclusão em isolado de ChinNPV inoculado em lagartas de 4^o ínstar de *Chrysodeixis includens* em laboratório. CO: 10⁶. ml⁻¹.

Tratamento	Temperatura	peso (mg)	CO/ mg	CO./lag.
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹	22° C	71,6 Aa	17,0Aa	1190,0Aa
	26° C	125,3 Aa	5,80Ba	738,0Aa
	30° C	89,7 Aa	4,85Ba	355,0Aa
ChinNPV 40.000 CO.ml ⁻¹ + FB 28 0,1%	22° C	24,9 Bb	3,28Bb	77,2Bb
	26° C	18,3 Bb	9,97Bb	157,0Bb
	30° C	13,6 Bb	2,85Bb	33,5Bb

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias entre temperaturas; Letras minúsculas referem-se à comparação de médias entre tratamentos.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que o efeito sinérgico de FB 28 é concentração-dependente, sendo a concentração 0,1% a que mais aumentou a atividade viral. Isso fica evidenciado pelo expressivo aumento de mortalidade observado quando este produto foi combinado com ambos os isolados de NPV, em relação aos demais tratamentos, bem como pela acentuada redução da CL₅₀ de ChinNPV, tanto em lagartas de terceiro quanto de quarto ínstar. Esse resultado é de grande importância, visto que larvas de últimos ínstares são responsáveis pelo maior dano econômico e são mais dificilmente controladas por inseticidas virais.

No entanto, os demais produtos não causaram efeito potencializador da atividade viral nos isolados testados. No caso do ácido bórico, o resultado encontrado neste estudo difere dos resultados encontrados na literatura para espécies como *Limantria dispar* L. (Shapiro; Bell, 1982), *A. gemmatilis* (Morales et al., 2001), *Spodoptera frugiperda* (Cisneros et al., 2001), que relatam a redução da CL₅₀ de NPV's em combinação com ácido bórico em concentrações que variam de 0,045% a 1% deste composto. Frequentemente, é relatada uma grande variação de resultados obtidos na interação de diferentes produtos químicos, isolados virais e espécies de insetos hospedeiros. Assim, o sucesso da adição de branqueadores ópticos no aumento da atividade viral sofre influência não só da composição química do próprio produto (Bernal et al., 2014; Okuno et al., 2003), como também da complexidade do sistema planta-vírus-hospedeiro ou vírus-hospedeiro (Black et al., 1997). Dessa forma, o efeito potencializador de um mesmo produto observado em um determinado sistema pode não se repetir na mesma intensidade em um sistema diferente.

O modo de ação dos branqueadores ópticos como potencializadores da atividade viral não é totalmente elucidado. O aumento da atividade viral parece estar relacionado à intensidade de fluorescência dos branqueadores ópticos, sendo que, quanto maior a fluorescência, maior a afinidade com quitina e mais significativo é o aumento da atividade viral (Argauer & Shapiro, 1997). A eficiência destes produtos como potencializadores da atividade viral está relacionada aos efeitos destes produtos observados no trato intestinal das lagartas e às alterações na resposta imunológica dos insetos. A resposta imunológica de lepidópteros-pragas depende de barreiras estruturais protetoras contra patógenos (Bulet et al., 1999; Levy et al., 2004; Negreiro et al., 2004). A membrana peritrófica de lepidópteros, composta de quitina e proteínas, é uma barreira chave contra a infecção por agentes patogênicos, como vírus, devido à sua permeabilidade seletiva (Plymale et al., 2008). Branqueadores ópticos atuam inibindo a síntese de quitina na membrana peritrófica tornando-a mais porosa, dessa forma a descontinuidade na formação da membrana permite a penetração de maior número de vírus e tornam a infecção dos tecidos mais rápida e eficiente (Wang & Granados, 2000). A otimização do processo de infecção viral é evidenciada pela expressiva redução da CL_{50} e CL_{90} de ChinNPV em lagartas de terceiro e quarto ínstaes de *C. includens*, observada neste estudo. Mesmo considerando que a permeabilidade da membrana peritrófica é reduzida em ínstaes larvais mais avançados, em função do progressivo espessamento da membrana (Lehane, 1997), FB 28 (0,1%) se mostrou altamente efetivo em reduzir a quantidade de vírus necessária para causar infecção em lagartas de quarto ínstar.

O tempo médio de mortalidade de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* e *H. armigera* foi fortemente afetado pela adição de FB 28 (0,1%), conforme observado pelas curvas de função de incidência acumulada de morte. A redução do tempo médio de mortalidade representa uma aceleração na velocidade da infecção, visto que o tempo de mortalidade é o período de tempo entre a ingestão do vírus e a morte do inseto. A duração deste período é determinada pela concentração/dose do isolado viral, espécie e idade do inseto hospedeiro e por condições ambientais (Ignoffo; Garcia 1996).

Outro efeito de FB 28 se dá na apoptose celular do mesêntero das lagartas. Acredita-se que a apoptose seja uma importante defesa celular do hospedeiro lepidóptero, sugerindo que sua inibição possa acelerar a velocidade da infecção (Wu et al., 2016). Branqueadores ópticos inibem a apoptose de células do intestino médio de lagartas, tornando assim a ação do vírus mais eficiente na fase inicial da infecção

(Washburn et al., 1998; Dougherty et al., 2006). Consequentemente, o tempo médio de mortalidade também é reduzido significativamente, uma vez que a infecção é intensificada.

A produção de corpos de oclusão (poliedros) de ChinNPV em lagartas de *C. includens* foi reduzida pela adição de FB 28 (0,1%), assim como o peso larval, independente da temperatura de incubação. Os fatores que afetam a produção de corpos de oclusão podem ser inerentes ao hospedeiro (ínstar e peso), ou ainda relacionados ao patógeno (isolado viral) e condições de incubação (período e temperatura) (Sherman, 1985). Uma vez que a adição de FB 28 reduz drasticamente o tempo de mortalidade de lagartas, e assim o tempo de incubação, o número de ciclos de replicação será limitado, consequentemente resultando em redução da produção de corpos de oclusão (Bernal et al., 2014). O peso larval também foi reduzido pela adição de FB 28, provavelmente devido à redução do tempo de mortalidade e consequente redução do desenvolvimento larval (Martínez et al., 2004).

A porcentagem de mortalidade de lagartas de terceiro e quarto ínstar de *C. includens* não sofreu variação em função da temperatura de incubação. Já o tempo médio de mortalidade (TMM) foi afetado, sendo que o TMM mais longo foi observado tanto em lagartas de terceiro quanto de quarto ínstar incubadas a 22°C, visto que a replicação viral é mais lenta em baixas temperaturas (Boucias et al., 1980). A taxa de desenvolvimento viral é afetada pela temperatura de incubação, sendo reduzida em uma faixa de temperatura entre 15°C e 20°C e inibida em temperaturas extremas, abaixo de 10°C e acima de 40°C (Johnson et al., 1982), devido à efeitos debilitantes na replicação viral.

Embora FB 28 (0,1%) tenha levado a uma expressiva redução da CL₅₀, a redução da produção de corpos de oclusão observada neste estudo é um efeito negativo deste produto para uso em produção massal de vírus. Outro aspecto a ser considerado é o custo financeiro envolvido (Martínez et al., 2000; Bernal et al., 2014). Trata-se de um produto relativamente caro e de difícil obtenção, visto que é comercializado por poucas empresas e em pequena quantidade. Para serem atrativos para o produtor, branqueadores ópticos devem ser altamente eficientes a campo em baixas concentrações, de até 0,1%, promovendo significativo aumento da mortalidade aliado a expressiva redução da concentração letal. Assim, a viabilidade econômica de seu uso em bioinseticidas formulados está relacionada não só ao aumento da atividade viral, mas também à redução do equivalente larval necessário para controle (Martínez et al.,

2000). Portanto, é importante que concentrações mais baixas de FB 28 sejam estudadas, bem como seu efeito em lagartas dos últimos ínstares larvais e na produção de corpos de oclusão (CO's), visando buscar concentrações mais equilibradas para uso em bioinseticidas comerciais.

CONCLUSÃO

A adição de FB 28 (0,1%) a ambos os isolados resultou em aumento da mortalidade de lagartas de terceiro ínstar, bem como redução da CL₅₀.

O tempo médio de mortalidade de lagartas de terceiro e quarto ínstares de *C. includens* foi reduzido com o aumento de temperatura, tanto no tratamento controle quanto no tratamento com adição de FB 28 (0,1%).

O branqueador óptico FB 28 (0,1%) reduziu a produção de CO's de ChinNPV em lagartas de terceiro e quarto ínstar, independente da temperatura de incubação.

FB 28 pode ser uma opção para uso em formulações de bioinseticidas virais no controle integrado de *H. armigera* e *C. includens*. Por outro lado, a adição de FB 28 (0,1%) não se mostrou útil para a produção em massa ChinNPV, visto que resulta em redução do crescimento larval e redução da produção de CO's. Entretanto, a produção em ínstares mais tardios deve ser estudada.

REFERÊNCIAS

- Alexandre T. M., Ribeiro Z.M.A., Craveiro S.R., Cunha F., Fonseca I.C.B., Moscardi F., Castro M.E.B., 2010. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 98–104.
- Ardisson-Araújo, D.M.P., Sosa-Gómez, D. R., Melo, F. L., Bao, S.N., Ribeiro, B.M., 2015. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. *Virus Reviews and Research*, 20, 1-4.
- Argauer R., Shapiro M., 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus, *Journal Economic Entomology*, 90, 416–420.
- Bernal, A., Simón, O., Williams, T., Caballero, P. (2014). Stage-specific insecticidal characteristics of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Chrysodeixis chalcites* enhanced by optical brighteners. *Pest Management Science*, 70, (5), 798-804.
- Boucias D.G., Johnson D.W., Allen G.E., 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Larvae Environmental Entomology*, 9(1), 59–61.
- Bueno A.F., Sosa-Gómez D. R., Correa-Ferreira B.S., Moscardi F., Bueno R.C.O.F., 2012. Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffman-Campo C.B., Correa-Ferreira B.S., Moscardi F. (Eds) *Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa: Brasília, 493-630.
- Bulet P., Hetru C., DiMarcq J., Hoffmann D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. New York, 23, 329-344.
- Burr I.W., Foster L.A., 1972. A test for equality of variances. University of Purdue, West Lafayette, IN, USA.
- Cherry A.J., Parnell M.A., Grywacz D., Jones K.A., 1997. The optimization of vivo nuclear polyhedrosis virus production of *Spodoptera exempta* and *S. exigua*. *Journal Invertebrate Pathology*, 70, 50-58.
- Chikhalya A., Stephens K. D., Archie J. W., Haas-Stapleton E. J., 2013. Virulence and pathogenesis of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) in *Pseudoplusia includens* larvae. *Biological Control*, 65(1), 101-108.
- Cisneros, J., Pérez, J. A., Penagos, D. I., Ruiz, J., Goulson, D., Caballero, P., ... & Williams, T., 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control*, 23, 87-95.
- Colosimo E.A., Giolo S. R., 2006. *Análise de sobrevivência aplicada*. São Paulo: Editora Blucher, 370p.
- Dougherty E.M., Narang N., Loeb M., Lynn D.E., Shapiro M., 2006. Fluorescent brightener inhibits apoptosis in baculovirus-infected gypsy moth larval midgut cells in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, 16, 157-168.

- Federici B.A., 1997. Baculovirus pathogenesis. In: Miller L.K. (Ed.) The baculoviruses. New York: Plenum Press, 33-59.
- Granados R.R., 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1377-1405.
- Granados R.R., Williams K.A., 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: Granados R.R., Federici B.A. (Eds) The biology of baculoviruses, CRC Press, 89-108.
- Gray B., 2012. cmprsk: Subdistribution analysis of competing risks. R package version 2.2-3. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>
- Gray R. J., 1988. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *The Annals of Statistics*, 16, 1141-1154.
- Greene G.L., Leppla N. C., Dickerson W. A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69, 487-488.
- Herth W., Schnepf E., 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*, 105(1-2), 129-133.
- Hoffmann-Campo C.B., Oiveira E.B., Moscardi F., 1985. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina: Setor de Entomologia Agrícola, 1985. 20p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10).
- Ignoffo C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*, 75, 516-525.
- Ignoffo C.M., Garcia C., 1996. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa/Heliothis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(2), 192-194.
- Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hammock B.D., 2006. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in Virus Research*, 68, 323-360.
- Jehle J.A., Blissard G.W., Bonning B.C., Cory J.S., Herniou E.A., Rohrmann G.F., Theilmann D.A., Thiem S.M., Vlak, J. M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257-1266.
- Johnson D.W., Boucias D.B., Barfield C.S., Allen G.E., 1982. A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2), 292-298.
- Kriticos D. J., Ota N., Hutchison W.D., Beddow J., Walsh T., Tay W.T., Borchert D. M., Paula-Moreas S.V., Czapak C., Zalucki M.P., 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? *PLoS ONE* 10(3): e0119618.
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S., 2015. Insect pathogens as biological controlagents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.
- Lasa R., Ruiz-Portero C., Alcázar M.D., Belda J.E., Caballero P., Williams T., 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. *Biological Control*, 40, 89-96.

- Lehane M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525–550.
- Levy S.M., Falleiros A.M.F., Gregório E.A., Arrebola N.R., Toledo L. A., 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B), 633-638.
- Liao Z.H., Kuo T.C., Shih C.W., Tuan S.J., Kao Y.H., Huang R.N., 2016. Effect of juvenile hormone and pyriproxyfen treatments on the production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 161(2), 112–120.
- Mansour N.A., Eldefrawi M.E., Topozada A., Zeid M., 1966. Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm, *Prodenia litura* VI potentiation and antagonism of carbamate insecticide. *Journal Economic Entomology*, 59, 307–311
- Martínez A., Caballero P., Williams T., 2010. Effects of an optical brightener on the development, body weight and sex ratio of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 14, 193-200.
- Martínez A.M., Goulson D., Chapman J.W., Caballero P., Cave R.D., Williams T., 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica?. *Biological Control*, 17, 174–181.
- Mascarin G.M.; Delalibera I., 2012. Insecticidal activity of the granulosis virus in combination with neem products and talc powder against the potato tuberworm *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 41(3), 223-231.
- Moore N.F. King L.A., Possee R.D., 1987. Viruses of insects. *Insect Science and Its Application*, 3, 275–289.
- Morales L., Moscardi F., 1993. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 22, 535–540.
- Morales L., Moscardi F., Sosa-Gómez D.R., Paro F.E., Soldorio I.L., 2001. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control*, 20, 247–253.
- Moscardi F., Bueno A.F., Sosa-Gómez D.R., Roggia S., Hoffmann-Campo C.B., Pomari A.F., Corso I.C., Yano S.A.C., 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo C.B., Corrêa-Ferreira B.S., Moscardi F. (Eds.) *Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa. Londrina, pp. 213–334.
- Moscardi F., Souza M.L., Castro M.E.B., Moscardi M.L., Szewczyk B., 2011. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. (Eds.) *Microbes and Microbial Technology*. New York. Springer, pp. 415–445.
- Moscardi F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 257-289.
- Moscardi F., 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 509-539.

- Moscardi F., Leite L.G., Zamataro C.E., 1997. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of vírus dosage, host density and age. *Anais Sociedade Entomológica do Brasil*, 26 (1), 121-132.
- Narayanan K., Jayaraj S., 2002. Mass production of polyhedral occlusion bodies of NPV of *Helicoverpa armigera* in relation to dose, age and larval weight. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 846-849.
- Negreiro M. C. C., Andrade F. G., Falleiros A. M. F., 2004. Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), 293–308.
- Okuno S., Takatsuka J., Nakai M., Ototake S., Masui A., Kunimi Y., 2003. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 26, 146-152.
- Plymale R., Grove M.J., Cox-Foster D., Ostiguy N., Hoover K., 2008. Plant mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. *Journal Insect Physiology*, 54, 737–749.
- R Development Core Team, 2014. R A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reddy N. P., Khan A., Akbar P., Devi K. U., Victor J. S., Sharma H. C., 2008. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Management Science*, 64(9), 909-915.
- Ritz C., 2010. Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, (1), 220–229.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, 10, (12).
- Rossi-Zalaf L.S., Alves S.B., Lopes R.B., Silveira Neto S., Tanzini M.R., 2008. Interação de microorganismo com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S.B., Lopes R.B. (Eds) *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Fealq, Piracicaba, 279–302.
- Shapiro S.S., Wilk M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Shapiro M., 2000. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *Journal of Economic Entomology*, 93, (3), 572-576.
- Shapiro M., Bell R. A., 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. *Annals of the Entomological Society of America*, 75(3), 346-349.
- Shapiro, M., Robertson, J. L., 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. *Journal of Economic Entomology*, 85, 1120-1124.
- Sheppard C., Shapiro M., 1994. Physiological and Nutritional effects of a fluorescent brightener on nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* (L.) Larvae (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biological Control*, 4, 404–411.

- Sherman, K.E., 1985. Multiple virus interaction. In: Maramosch, K., Sherman, K.E. (Eds.), *Viral insecticides for biological control*. 735-756.
- Sosa-Gómez D.R., 2017. Microbial control of soybean pest insects and mites In: Lacey L.A. (Ed) *Microbial control of insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier, 199-208.
- Steel R.G.D., Torrie J. H., 1960. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Company, New York. 481.
- Subramanian S., Santhram G., Sathiah N., Kennedy J.S., Rabindra R.J., 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 37, 367-374.
- Szewczyk B., Hoyos-Carvajal L., Paluszek M., Skrzecz I., Souza M.L., 2006. Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24, (2), 143-160.
- Takatsuka J., Okuno S., Ishii T., Nakai M., Kunimi Y., 2007. Productivity and quality of polyhedral occlusion bodies of a nucleopolyhedrovirus harvested from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Applied Entomology and Zoology*, 42, (1), 21-26.
- Tukey J.W., 1949. One degree of freedom for non-additivity. *Biometrics*, 5, 232-242.
- Valicente F.H., Tuelher E.S., Pena R.C., Andreazza R., Guimarães M.R., 2013. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus *Spodoptera*. *Neotropical Entomology*, 42(2), 191-199.
- Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynik A., Hajnos M. Ł., Tuzimski T., Hawrył A., Bogucka-Kocka A., 2006. Two-dimensional thin-layer chromatography of selected coumarins. *Journal of Chromatographic Science*, 44(8), 510-517.
- Wang P., Granados R.R., 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemical Molecular Biology*, 30, 135-143.
- Washburn, J. O., Kirkparick, B.A., Haas-Stapelton, E., and Volkman, L. E., 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biological Control*, 11, 58-69.
- Wu K., Yang B., Huang W., Dobens L., Song H., Ling, E., 2016. Gut immunity in lepidopteran insects. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 65-74.
- Zamora-Avilés N., Alonso-Vargas J., Pineda S., Isaac-Figueroa J., Lobit P., Martínez-Castillo A.M., 2013. Effects of a nucleopolyhedrovirus in mixtures with azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and viral occlusion body production. *Biocontrol Science and Technology*, 23, 521-534.
- Zhu R., Liu K., Peng J., Yang H., Hong H., 2007. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Management Science*, 63(3), 296-300.

CAPÍTULO 2 - Efeito de branqueador óptico na infectividade de ChinNPV e HzNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* em casa de vegetação e campo

RESUMO

Inseticidas à base de baculovírus vêm sendo empregados no controle biológico de pragas em diversas regiões do mundo, principalmente devido à sua especificidade e segurança a organismos não-alvos. No entanto, sua eficiência a campo é afetada pelo seu tempo de ação relativamente lento e sua inativação por raios solares. Visando a aumentar a eficiência de baculovírus a campo, produtos como branqueadores ópticos têm sido estudados. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em casa de vegetação e campo, o efeito do branqueador óptico Fluorescent Brightener 28 (0,1% m/v) combinado com ChinNPV e HzNPV, no manejo de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*. Em casa de vegetação e em campo, plantas de soja foram pulverizadas duas concentrações de cada isolado viral, ChinNPV e HzNPV, e as mesmas concentrações combinadas com FB 28 (0,1%). Folhas foram coletadas em intervalos de 0, 24 e 48 horas após a pulverização, e oferecidas a lagartas em laboratório. Foram realizados dois testes de campo, em plantas de soja, nas safras 2016/17 e 2017/18, utilizando FB 28 (0,1%) combinado com ChinNPV e HzNPV. As folhas foram coletadas no campo em intervalos de 0, 48 e 120 horas após a pulverização e oferecidas às lagartas, em laboratório. Os dados foram analisados por Análise de Sobrevivência no contexto de Riscos Competitivos, seguindo o modelo de Fine-Gray para comparar curvas de incidência de mortalidade acumulada. Embora tenha-se observado redução da mortalidade de lagartas quando alimentadas em folhas coletadas de 48h a 120h após a pulverização, o tratamento com FB 28 aliado a concentrações mais altas de vírus ainda foi superior aos demais, independente da ocorrência de precipitação. O efeito potencializador da atividade viral de FB 28 (0,1%) não foi observado após pulverização em plantas de soja em casa de vegetação. Em pulverização em condições de campo, FB 28 (0,1%) promoveu aumento da mortalidade de lagartas de *C. includens* e *H. armigera*, quando associado a concentrações mais elevadas de vírus, $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ e $1,5 \times 10^{11}$ CO.ha⁻¹, respectivamente, em até 120h após a aplicação. O branqueador óptico (0,1%) aumenta a persistência do vírus a campo, mesmo após um volume de precipitação acumulada de 45mm.

Palavras-chave: *Chrysodeixis includens*; *Helicoverpa armigera*; baculovírus; precipitação

ABSTRACT

Baculovirus insecticides have been used in the biological control of pests in several regions of the world, mainly due to their specificity and safety to non-target organisms. However, their field efficiency is affected by their relatively slow time of action and their inactivation by UV. To increase the efficiency of field baculovirus, products such as optical brighteners have been studied. The objective of this work was to evaluate the effect of Fluorescent Brightener 28 (0.1%) optical brightener combined with ChinNPV and HzNPV on the management of *Chrysodeixis includens* and *Helicoverpa armigera* in greenhouse and field. Experiments on the efficacy of optical brightener formulations of ChinNPV and HzNPV were conducted on soybean in greenhouses and field. The experiment involved two concentrations of ChinNPV and HzNPV applied alone and the same concentrations in addition with FB 28 (0.1%). Leaflets were collected immediately and different periods after applications and offered to soybean loopers. Mortality was assessed daily until the 12th day. Data were submitted to the Competitive Risk Survival Analysis, following the Fine & Gray model, to compare curves of cumulative incidence of mortality. Although a reduction in caterpillar mortality was observed when loopers fed on leaves collected after 48h to 120h of spraying, FB 28 treatment with high virus concentrations was superior to the others, regardless rainfall occurrence. In greenhouse, no significant differences were observed among the curves of cumulative incidence of mortality among the highest virus doses with or without FB 28. Under field conditions, FB 28 (0.1%) promoted enhancement of viral activity of ChinNPV and HzNPV when associated with highest concentrations of NPV, 3.0×10^{12} occlusion bodies (OB).ha⁻¹ e 1.5×10^{11} OB.ha⁻¹, respectively, in up to 120 hours after application. Fluorescent Brightener 28 (0.1%) increase field persistence, even after a accumulated rainfall of 45mm.

Key-words: *Chrysodeixis includens*; *Helicoverpa armigera*; baculovirus; rainfall

INTRODUÇÃO

Inseticidas a base de baculovírus vêm sendo empregados no controle biológico de pragas em diversas regiões do mundo, principalmente devido a sua especificidade e segurança a organismos não-alvo (Moscardi, 1999; Lacey et al., 2017).

Baculovírus isolados de lagartas da subfamília Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae), como os NPVs de *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* possuem grande potencial de aplicação em controle biológico, com destaque para o HzNPV, que tem uma gama relativamente ampla de hospedeiros, infectando outras espécies pertencentes a outros gêneros da subfamília Heliothinae, cujas espécies representam pragas-chave de diversas culturas em todo o mundo (Ignoffo & Couch, 1981; Cunningham, 1999), sendo responsáveis por perdas de milhões de dólares anualmente. No entanto, sua aceitação como bioinseticida é limitada devido ao seu tempo de ação relativamente lento (Moscardi, 1999). Ainda em alguns casos, altas doses do produto são necessárias para se obter um controle eficaz, o que eleva muito o custo final (Lacey et al., 2015), como é o caso de isolados de ChinNPV, que não são utilizados ainda comercialmente devido à baixa virulência dos isolados conhecidos, quando comparados a outros baculovírus ou a falta de estudos relacionados ao momento de aplicação (Sosa-Gómez, 2017).

Alguns fatores ambientais, como temperatura e precipitação, também influenciam negativamente a ação de bioinseticidas virais em condições de campo (Pessoa et al., 2012; Silva; Moscardi, 2002). O principal fator limitante associada à ação de baculovírus é a baixa estabilidade a campo após a aplicação, a qual é influenciada principalmente pela inativação dos corpos poliédricos de oclusão pela ação da radiação solar (Ignoffo et al., 1997), sendo que, em algumas condições, grande parte da atividade viral é comprometida em menos de 24h (Jacques, 1985; Sun et al., 2004). A eficiência de baculovírus a campo ainda pode ser afetada por diversos outros fatores como pH e umidade (Ignoffo, 1992; Pessoa et al., 2014; Tamez-Guerra et al., 2000; Ignoffo et al., 1997; Young, 1990).

Visando a aumentar a persistência de baculovírus a campo, produtos como branqueadores ópticos têm sido estudados como protetores UV (Shapiro 1992), melhorando a persistência do vírus em alguns casos (Webb et al., 1989), além de promoverem redução do tempo letal e aumento da mortalidade. No entanto, em alguns

casos, esse efeito não é observado (Arthurs et al., 2006) e não promove uma melhoria significativa na eficácia no campo para equilibrar com o custo (McGuire et al., 2001).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar, em casa de vegetação e campo, o efeito do branqueador óptico Fluorescente Brightener 28 (0,1%) combinado com ChinNPV e HzNPV, visando ao seu uso futuro em formulação de bioinseticidas para manejo integrado de *C. includens* e *H. armigera*.

Portanto, as hipóteses testadas neste estudo foram:

1. A adição de branqueador óptico a ChinNPV e HzNPV, pulverizados em casa de vegetação e em campo, promove a redução do tempo médio de mortalidade e aumenta a eficiência de controle de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*, respectivamente?

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* em plantas de soja em casa de vegetação

As suspensões utilizadas foram obtidas a partir de cadáveres de lagartas infectadas maceradas com água destilada, coadas em tecido tipo voil e agitadas em agitador tipo vortex 5 minutos, obtendo-se a suspensão que foi diluída nas concentrações estudadas (Tabela 10). Em todas as concentrações foi adicionado 0,01% de surfactante tween 80, para melhor suspensibilidade do FB 28. As suspensões foram aplicadas através da pulverização de diferentes concentrações de ChinNPV e HzNPV (Tabela 10) em plantas de soja cultivar BRS360RR, em estágio V3, em casa de vegetação. A semeadura foi realizada em vasos. Após um desbaste inicial, foram mantidas cinco plantas em cada vaso. Delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e 32 subamostras. Para cada tratamento foram utilizados oito vasos, divididos em quatro repetições. Trinta dias após a semeadura, as plantas foram pulverizadas com os tratamentos (Tabela 10). Os tratamentos foram aplicados com pulverizador pressurizado CO₂, bico tipo leque (Modelo DJ110-VS, Teejet), de vazão 183L/ha; velocidade de pulverização 1m/s e volume de calda 200 ml.

Após a aplicação, foram coletadas folhas do terço superior das plantas de cada tratamento imediatamente após a aplicação (0h), 2 (48h) e 4 dias depois (96h). As folhas foram então oferecidas a lagartas de 3º ínstar de *C. includens* e *H. armigera* em

laboratório. Lagartas foram individualizadas em células de bandejas plásticas (32 células de 27 ml; Advento do Brasil, Diadema- SP). Para cada lagarta, foi oferecido um folíolo de soja. A troca dos folíolos foi realizada a cada dois dias. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente até o décimo segundo dia após a inoculação (infecção). As bandejas foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 2^\circ \text{C}$; UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* em plantas de soja em condições de campo

Para testar o efeito de FB 28 no aumento da atividade viral de ChinNPV e HzNPV em campo, os tratamentos foram aplicados através da pulverização de diferentes concentrações de ChinNPV e HzNPV (Tabela 10) em plantas de soja cultivar BRS 388RR, em estágio V6, durante as safras 2016/17 e 2017/18 em área da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, em Londrina. A unidade Embrapa Soja está localizada na latitude $23^\circ 11' 37'' \text{S}$, longitude $51^\circ 11' 03'' \text{O}$ e altitude de 630 metros (Sibaldelli & Farias, 2016). O clima em Londrina, segundo a classificação de Köppen, é descrito como Cfa, caracterizado como um clima subtropical úmido, com temperatura do ar média do mês mais frio inferior a 18°C e temperatura do ar média no mês mais quente acima de 22°C . Apresenta verões quentes e geadas pouco frequentes, sendo o período de chuvas geralmente concentrado nos meses de verão. Não apresenta estação seca definida (Wrege et. al, 2011; Alvares et. al, 2014).

Os tratamentos (Tabela 10) foram distribuídos em parcelas de 12m^2 . O volume de calda utilizado foi de 1 litro. Os tratamentos foram aplicados sobre as plantas de soja no estágio V6, com auxílio de um pulverizador costal propulsionado a ar comprimido (CO_2), com vazão 150L de volume de calda ha⁻¹ e pressão de 40 libras/pol⁻², adaptado com uma barra composta por quatro bicos tipo leque (Modelo DJ110-VS, Teejet), espaçados 0,5m. Após a aplicação dos tratamentos sobre a área foliar da soja, aguardou-se 30 minutos para as plantas secarem, então trifólios do terço superior das plantas foram coletados. Os trifólios coletadas em campo foram oferecidos à lagartas em momentos distintos: no momento da aplicação (0h) e cinco dias após a aplicação (120h) na Safra 206/2017. Para a Safra 2017/2018, foram coletadas folhas no momento da aplicação (0h) e dois dias após a aplicação (48h).

As folhas coletadas foram oferecidas a lagartas de terceiro ínstar de *H. armigera* e de terceiro e quarto ínstaes de *C. includens*. As lagartas foram individualizadas em células de bandejas plásticas (32 células de 27 ml, Advento do Brasil, Diadema- SP), em laboratório, visando a avaliar a influência da adição de FB 28 no efeito residual dos isolados. Para cada lagarta, foi oferecido um folíolo de soja, cujo pecíolo foi envolvido por algodão umedecido. As lagartas se alimentaram das folhas de soja por um período de 48 horas, em condições controladas de laboratório (UR $70\pm 10\%$, $26\pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 horas). Após o consumo total deste folíolo inicial, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial sem formol (Greene, 1976, modificada por Hoffmann-Campo, 1985) até o final do experimento. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente até o décimo segundo dia após a inoculação. As bandejas foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Os dados climáticos da área da Fazenda Experimental da Embrapa soja foram registrados na estação agrometeorológica da própria unidade e fornecidos pelo Laboratório de Agrometeorologia. A coleta de dados foi realizada através de estação meteorológica automática, durante as safras de 2016/2017 e 2017/2018. Os dados coletados foram os valores diários acumulados de precipitação pluviométrica, temperatura do ar (média, máxima e mínima) e umidade relativa do ar e radiação solar global acumulada (Tabela 11).

Tabela 10. Descrição de tratamentos aplicados em casa de vegetação e campo safra 2016/2017.

Espécie	Tratamentos
<i>Helicoverpa armigera</i> (HzNPV)	$2,0 \times 10^{11}$ CO. ha ⁻¹ de HzNPV
	$4,0 \times 10^{11}$ CO. ha ⁻¹ de HzNPV
	$2,0 \times 10^{11}$ CO. ha ⁻¹ de HzNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)
	$4,0 \times 10^{11}$ CO. ha ⁻¹ de HzNPV + Fluorescent Brigtener 28 (0,1%)
<i>Chrysodeixis includens</i> (ChinNPV)	$1,5 \times 10^{12}$ CO. ha ⁻¹ de ChinNPV
	$3,0 \times 10^{12}$ CO. ha ⁻¹ de ChinNPV
	$1,5 \times 10^{12}$ CO. ha ⁻¹ de ChinNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)
	$3,0 \times 10^{12}$ CO. ha ⁻¹ de ChiNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)

Tabela 11. Dados climáticos registrados na área experimental da Embrapa Soja durante o ano de 2017.

SAFRA	TAP (horas)	Temperatura do ar (°C)			Umidade relativa do ar média (%)	Precipitação pluviométrica acumulada (mm)	Radiação solar global acumulada (MJ m ⁻²)
		Média	Máxima	Mínima			
2016/2017	0	23,7	28,5	17,6	84,3	0,0	26,3
	24	24,5	29,3	20,5	88,4	0,0	19,5
	48	24,9	29,4	20,4	88,1	0,0	22,3
	72	22,9	28,1	19,8	96,1	35,0	16,7
	96	22,5	28,0	19,7	97,4	8,3	18,1
	120	23,8	29,5	21,0	92,8	4,1	20,3
2017/2018	0	22,1	28,2	16,8	88,9	0,1	23,1
	24	22,4	28,9	18,2	93,2	13,7	15,1
	48	21,6	27,7	16,8	75,1	0,0	26,5

Dados da localidade: Latitude: 23°11'37"; Longitude: 51°11'03"; Altitude: 630m

Análise de dados

Os dados de mortalidade foram submetidos ao método de Análise Sobrevivência no contexto de riscos competitivos, visto que, além da mortalidade causada pelos isolados de NPV, também foi observada mortalidade ocasionada por causas desconhecidas. Todas as variáveis de tempo analisadas até a ocorrência de um evento foram analisados sob a abordagem não paramétrica e as curvas de mortalidade foram comparadas pelo Teste de Gray (1988), que leva em conta todos os tempos t. O software R, versão 3.4.1 (R Core Team, 2014) foi utilizado para ajustar os modelos aos dados descritos por meio dos pacotes cmprsk (Gray, 2012).

RESULTADOS

Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* em plantas de soja em casa de vegetação

Efeito do branqueador óptico Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de HzNPV em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera*.

O tempo médio de mortalidade (TMM) foi reduzido em todos os tratamentos com adição de FB 28 até 72h após a aplicação. Após 120h da aplicação, a redução do TMM só foi observada no tratamento $4,0 \times 10^{11}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%). O tratamento

que causou menor porcentagem de mortalidade foi a dose de $2,0 \times 10^{11}$ CO.ha⁻¹ (Tabela 12; Figura 24), em todas as datas de coletas de folhas.

Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de ChinNPV em lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens*

Em casa de vegetação, não foram observadas diferenças significativas entre as curvas da incidência acumulada de mortalidade entre os tratamentos combinados de vírus com adição de FB 28 (0,1%), tanto logo após a aplicação como após 96 horas. Porém, os tratamentos em que o vírus foi aplicado isoladamente apresentaram diferenças entre as curvas de incidência acumulada de morte quando comparados com os tratamentos com adição do branqueador óptico (Figuras 22 e 23). Na concentração de ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ foi observada a menor probabilidade acumulada de morte logo após a pulverização (Tabela 13; Figuras 22 e 23)

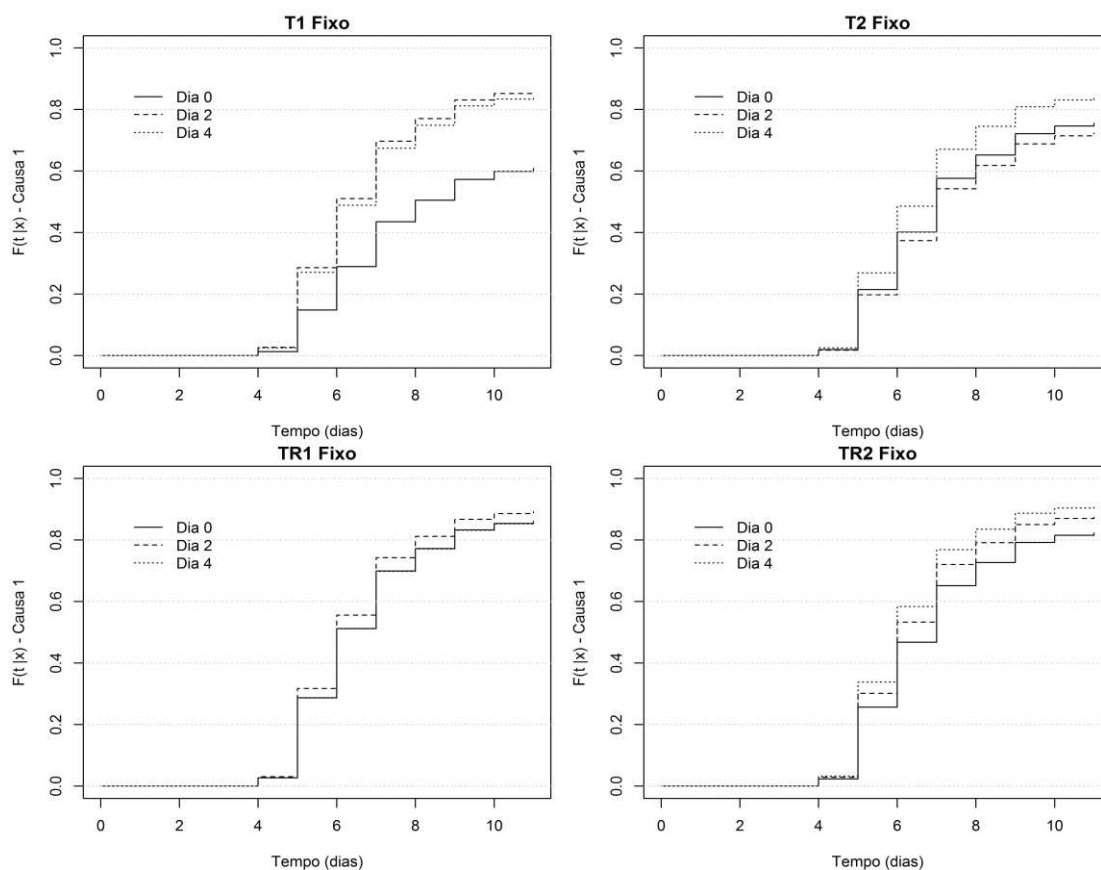


Figura 22. Curvas de incidência acumulada de morte em função do tempo registradas entre os tratamentos aplicados em casa de vegetação e causa de morte de lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Sendo: T1=ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹; T2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹; TR1= ChinNPV $1,5,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + 0,1% FB28; TR2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + 0,1% FB28.

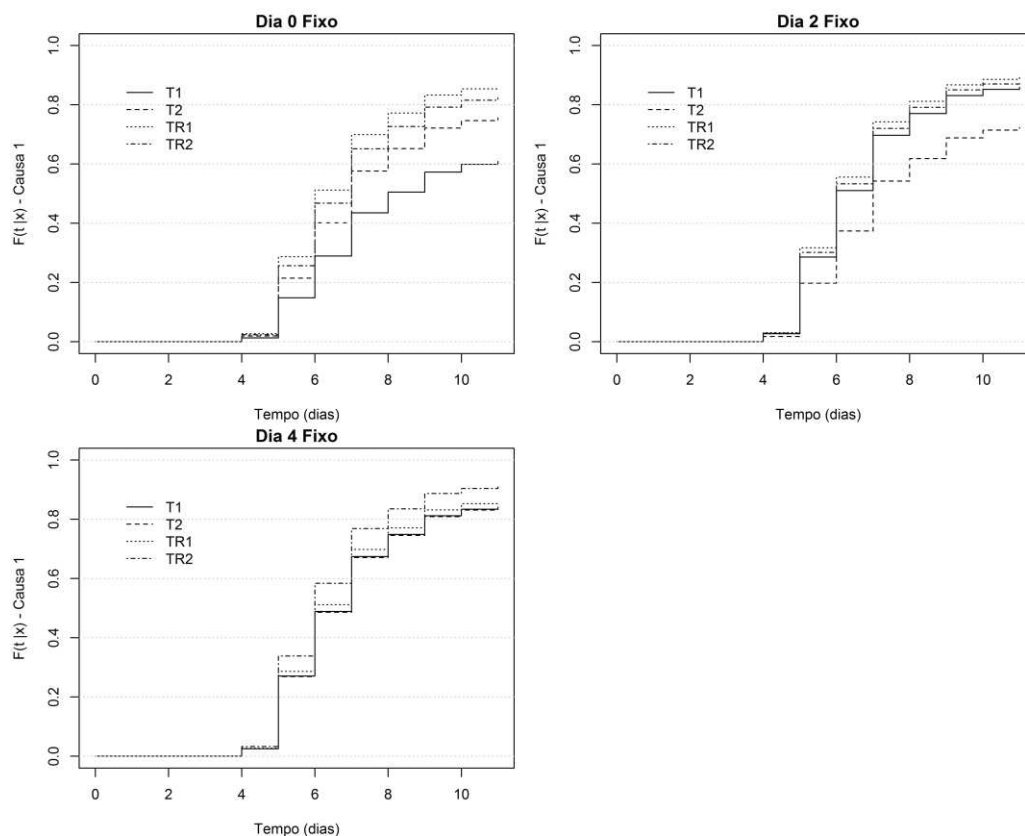


Figura 23. Curvas de incidência acumulada de morte em função do tempo registradas entre as datas de coleta de folhas em casa de vegetação oferecidas a lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Sendo: T1=ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹; T2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹; TR1= ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + 0,1% FB28; TR2= ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + 0,1% FB28.

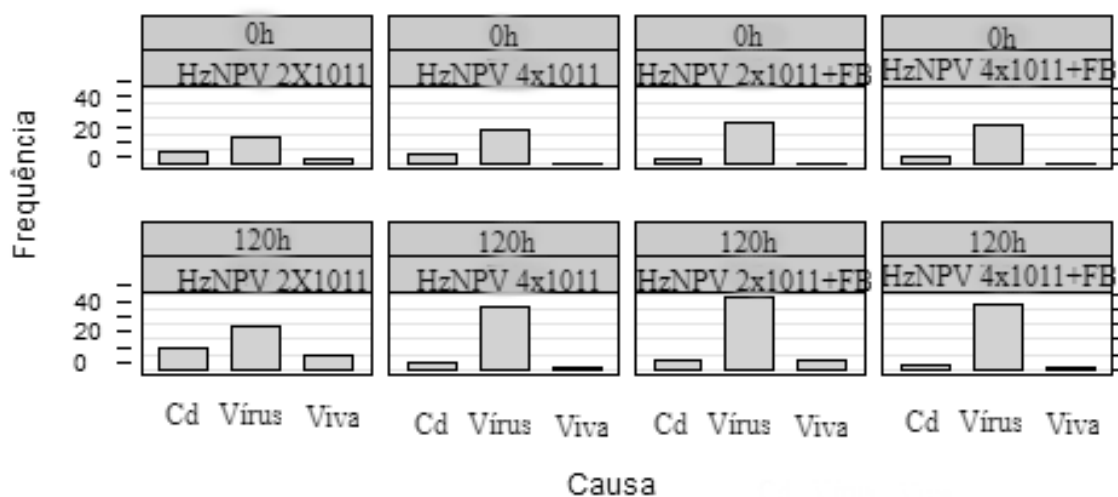


Figura 24. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em casa de vegetação e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera* em condições de laboratório. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.

Tabela 12. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a HzNPV na mortalidade de lagartas de 3º instar de *Helicoverpa armigera*. Pulverização em plantas de soja em casa de vegetação.

Tratamentos	Tempo após a pulverização								
	0h		72h		96h				
	TMM (Dias)	Mort. (%)	TMM (Dias)	Mort. (%)	TMM (Dias)	Mort. (%)			
HzNPV 2,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1	7,52	52,38	A	7,88	55,17	A	5,93	46,67	A
HzNPV 4,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1	7,09	74,58	B	6,41	93,10	B	7,08	81,25	B
HzNPV 2,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1 + 0,1% FB 28	6,78	79,03	B	7,28	90,63	B	7,08	83,87	B
HzNPV 4,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1 + 0,1% FB 28	6,51	88,33	B	5,60	86,21	B	6,62	86,67	B

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Fine-Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade. Mort: mortalidade.

Tabela 13 . Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º instar de *Chrysodeixis includens*. Pulverização em plantas de soja em casa de vegetação.

Tratamentos	Tempo após a pulverização								
	0h		48h		96h				
	TMM (Dias)	Mort. (%)	TMM (Dias)	Mort. (%)	TMM (Dias)	Mort. (%)			
ChinNPV 1,5 X 10 ¹² OB. ml-1	6,42	63,3	Bb	6,69	100	Aa	6,47	93,8	Aa
ChinNPV 3,0 X 10 ¹² OB. ml-1	6,75	87,5	Ca	7,21	87,5	Bb	6,63	96,8	Aa
ChinNPV 1,5 X 10 ¹² OB. ml-1 + 0,1% FB 28	6,35	81,3	Ba	6,03	93,8	Aa	5,5	81,3	Bb
ChinNPV 3,0 X 10 ¹² OB. ml-1 + 0,1% FB 28	6,22	84,4	Ca	5,8	88,2	Ba	5,72	90,6	Aa

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Fine-Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade. Mort: mortalidade.

Avaliação do efeito de branqueador óptico na mortalidade causada por ChinNPV e HzNPV em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* em plantas de soja em condições de campo

Em condições de pulverização a campo, a adição de FB 28 a 0,1% causou aumento da porcentagem de mortalidade quando combinado com as concentrações mais altas de vírus, para ambos os isolados, mesmo 120h depois da aplicação (Figuras 25 e 26).

Safra 2016-2017: Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de ChinNPV em lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens*

A adição de FB 28 somente promoveu incremento da mortalidade quando associado à ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%), em relação aos demais tratamentos logo após a aplicação (0h) (Tabela 14; Figura 25). Após 120h da aplicação, embora a porcentagem de mortalidade tenha sofrido acentuado declínio, FB 28 ainda promoveu uma maior taxa de mortalidade no tratamento $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%), em relação aos demais tratamentos (Tabela 14; Figura 25).

Safra 2016-2017: Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de HzNPV em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera*

O tratamento $4,0 \times 10^{11}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%) apresentou a maior porcentagem de mortalidade e o menor tempo médio de mortalidade (TMM) dentre todos os tratamentos testados, logo após a aplicação (0h) (Tabela 15; Figura 26). Após 120h, o tratamento $4,0 \times 10^{11}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%) ainda apresentava a maior porcentagem de mortalidade, embora o TMM não tenha diferido entre os demais tratamentos (Tabela 15; Figura 26).

Safra 2017-2018: Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de ChinNPV em lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens*

A adição de FB 28 a concentração de $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ proporcionou aumento da porcentagem de mortalidade e redução do tempo médio de mortalidade (TMM) nas duas concentrações testadas, logo após a aplicação (0h) (Tabela 16). No entanto, o aumento da porcentagem de mortalidade foi mais acentuado no tratamento $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%) (Tabela 16; Figura 27).

Após 48h da aplicação, somente a adição de FB 28 continuou a proporcionar aumento da mortalidade no tratamento $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%), em relação à respectiva concentração aplicada sem o produto. Porém, no tratamento $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%), esse mesmo padrão não foi observado após 48 h da aplicação, embora o TMM tenha sido reduzido (Tabela 16; figura 27).

Safra 2017-2018: Efeito de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) na atividade viral de ChinNPV em lagartas de quarto ínstar de *Chrysodeixis includens*

A adição de FB 28 aumentou porcentagem de mortalidade e reduziu tempo médio mortalidade (TMM) logo após a pulverização (0h), em todos os tratamentos testados (Tabela 17; Figura 28). Não foi observada diferença entre a porcentagem de mortalidade e no TMM entre os tratamentos $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ e $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹. Também não foi observada diferença quando se comparam esses mesmos tratamentos com adição de FB 28 a ChinNPV. Ao comparar os tratamentos $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ e $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹+FB 28 (0,1%), observa-se um aumento da mortalidade de lagartas de 81,25% para 87,5% e uma redução do TMM de 5,73 para 5,14. Um efeito mais expressivo na atividade viral é observado entre os tratamentos $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ e $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%), quando a porcentagem de mortalidade passa de 83,33% para 96,88%, no mesmo dia da pulverização. Porém, o TMM praticamente não sofreu alteração (Tabela 17; Figura 28).

Após 48h, a mortalidade foi reduzida em todos os tratamentos, porém os tratamentos $1,5 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹+FB 28 (0,1%) e $3,0 \times 10^{12}$ CO.ha⁻¹ + FB 28 (0,1%) se mostraram mais eficientes que os demais, apesar da redução da mortalidade. O TMM após 48 horas foi mais longo em todos os tratamentos avaliados (Tabela 17; Figura 28).

Tabela 14. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Chrysodeixis includens*. Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2016/2017.

Tratamentos	Tempo após a pulverização					
	0h			120h		
	TMM (Dias)	Mortalidade (%)		TMM (Dias)	Mortalidade (%)	
ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$	8,13	50,00	A	9,75	12,50	A
ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$	9,07	46,88	A	7,00	3,33	A
ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)	8,40	48,39	A	10,00	6,25	A
ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)	8,25	62,50	B	9,63	25,00	B

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade.

Tabela 15. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) aHzNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Helicoverpa armigera*. Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2016/2017.

Tratamentos	Tempo após a pulverização					
	0h			120h		
	TMM (Dias)	Mortalidade (%)		TMM (Dias)	Mortalidade (%)	
HzNPV 2,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1	9,30	31,25	A	9,29	21,88	A
HzNPV 4,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1	9,33	37,50	A	9,29	21,88	A
HzNPV 2,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1 + 0,1% FB 28	9,21	63,33	B	10,33	9,38	A
HzNPV 4,0 X 10 ¹¹ OB.ml-1 + 0,1% FB 28	7,23	96,88	B	9,36	43,75	B

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade.

Tabela 16. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Chrysodeixis includens*. Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2017/2018.

Tratamentos	Tempo após a pulverização			
	0h		48h	
	TMM (Dias)	Mortalidade (%)	TMM (Dias)	Mortalidade (%)
ChinNPV 1,5x10 ¹²	5,56	78,13B	7,03	64,41B
ChinNPV 3,0 x10 ¹²	5,15	84,38B	6,91	78,33A
ChinNPV 1,5x10 ¹² + FB 28 (0,1%)	4,85	81,25B	6,39	71,88B
ChinNPV 3,0x10 ¹² + FB 28 (0,1%)	4,48	96,88A	6,35	75,44A

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade.

Tabela 17. Efeito da adição de Fluorescent Brightener 28 (0,1%) a ChinNPV na mortalidade de lagartas de 4º ínstar de *Chrysodeixis includens*. Pulverização em plantas de soja em condições de campo. Safra 2017/2018.

Tratamentos	Tempo após a pulverização			
	0h		48h	
	TMM (Dias)	Mortalidade (%)	TMM (Dias)	Mortalidade (%)
ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$	5,73	81,25C	7,27	68,75B
ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$	5,16	83,33BC	6,75	59,26B
ChinNPV $1,5 \times 10^{12}$ + FB 28 (0,1%)	5,14	87,50B	7,21	73,08A
ChinNPV $3,0 \times 10^{12}$ + FB 28 (0,1%)	5,13	96,88A	6,21	73,08A

Letras maiúsculas referem-se a diferenças entre datas dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas referem-se a diferenças entre tratamentos dentro de uma mesma data. Teste de Gray a 95%. TMM: tempo médio de mortalidade.

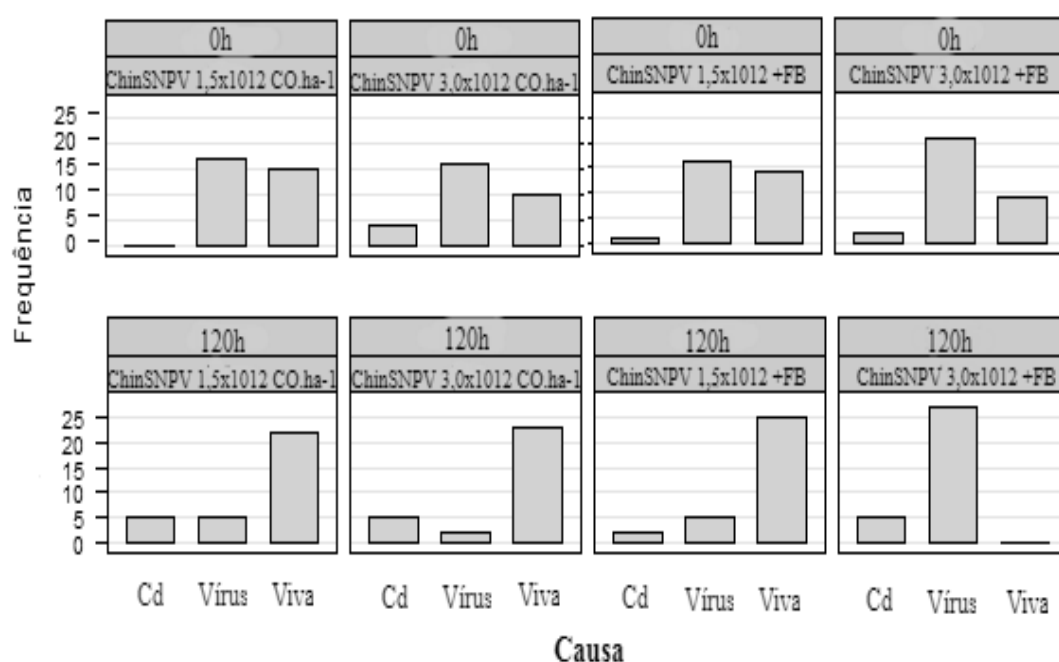


Figura 25. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Safra 2016-2017. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.

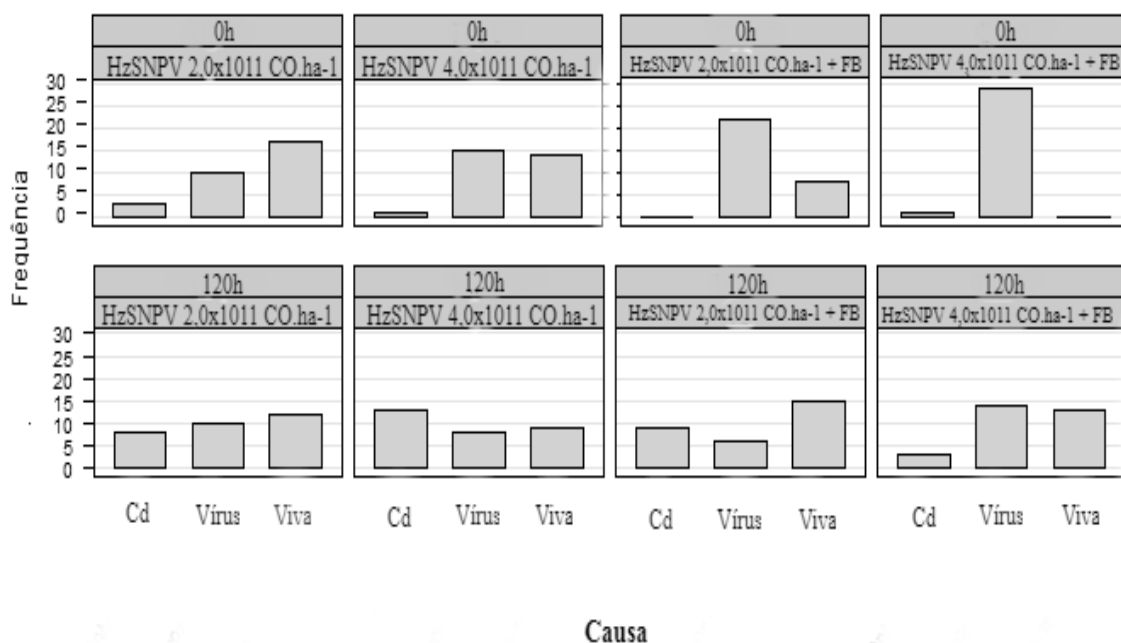


Figura 26. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera* em condições de laboratório. Safra 2016-2017. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.

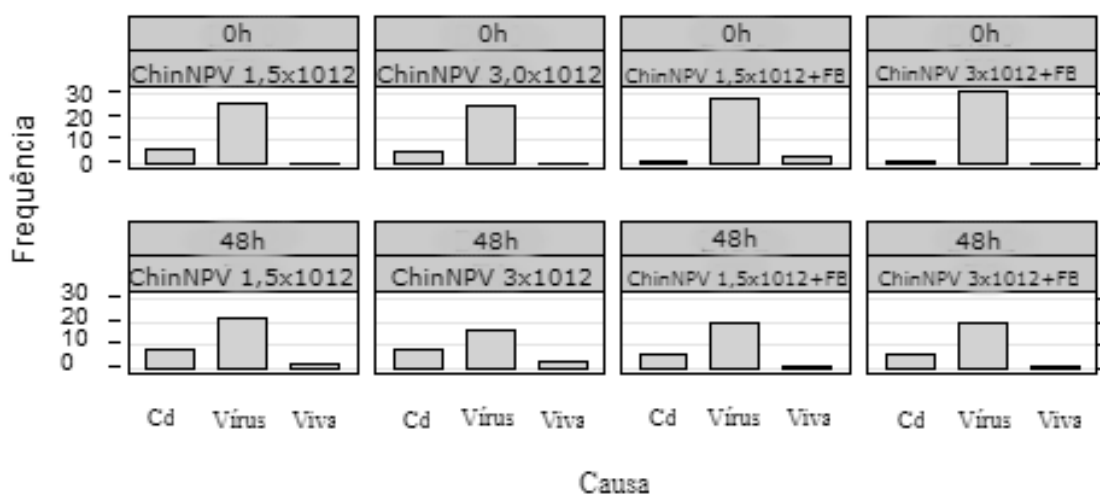


Figura 27. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Safra 2017-2018. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.

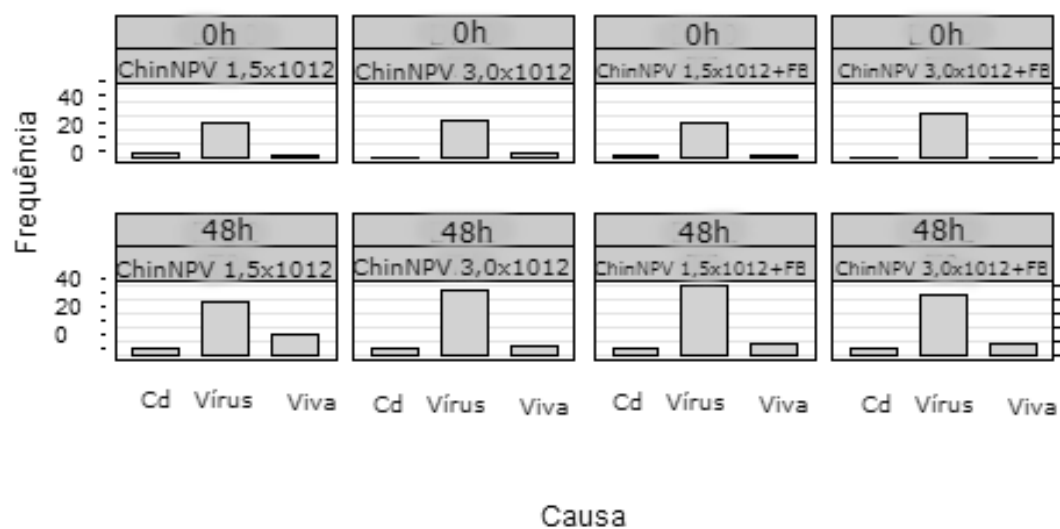


Figura 28. Frequências de mortalidade registradas para as interações entre tratamentos, datas de coleta de folhas em campo e causa de morte em lagartas de quarto ínstar de *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório. Safra 2017-2018. Sendo: Cd: lagarta morta por casua desconhecida; Vírus: lagarta morta por vírus; Viva: lagarta viva.

DISCUSSÃO

Em ambos os isolados, o efeito potencializador da atividade viral por meio da adição de FB 28 não foi evidente em condições de casa de vegetação, mesmo 96h após a pulverização. Em condição de casa de vegetação, o vírus não sofre ação dos raios UV, ou de precipitação, sendo, portanto, protegido da degradação e inativação.

Nos ensaios de campo, foi possível observar que a adição de FB 28 a 0,1% proporcionou aumento da atividade viral quando combinado com as concentrações mais altas de vírus de ambos os isolados, principalmente quando as folhas foram coletadas no mesmo dia da pulverização. O sucesso da infecção por baculovírus é uma função da concentração do isolado e do tempo de exposição do hospedeiro ao patógeno (Sun et al. (2004). Assim, ao ar livre, a eficácia dos bioinseticidas virais é fortemente influenciada pela luz solar (Shapiro, 1995). Por esta razão, usualmente, em condições de campo, são utilizadas concentrações superestimadas numa tentativa de compensar a inativação a campo por raios UV (Moore et al., 2015). Neste sentido, a adição de branqueadores ópticos a bioinseticidas virais deve, além de conferir proteção aos vírus dos danos causados por radiação UV (Zhu et al., 2013; Shapiro, 1992), potencializar a mortalidade e reduzir o volume de vírus utilizado, para que seu uso seja economicamente viável (Martínez et al., 2000).

A necessidade da adição de branqueadores ópticos em inseticidas virais formulados deve levar em conta também o comportamento e distribuição espacial da espécie-praga e a arquitetura da planta hospedeira. (Moore, 2002; Moore et al., 2015). No caso de *C. includens*, as lagartas têm por hábito permanecer nas folhas do terço médio e inferior (Wisch, 2011), região de maior sombreamento, logo, com menor probabilidade de degradação dos poliedros. Assim, a proteção UV, não é considerado o fator mais importante para justificar a adição de branqueadores ópticos a ChinNPV. Nesse caso, o fator crítico é a menor virulência dos isolados conhecidos quando comparados com vírus de outras espécies como AgMNPV e HzNPV (Sosa-Gómez, 2017). Neste estudo, FB 28 (0,1%) se mostrou efetivo no aumento da atividade viral em lagartas de terceiro ínstar de *C. includens*, quando associado à concentração mais alta de ChinNPV após 120h de pulverização, e em lagartas de quarto ínstar, até 48h após a pulverização.

Já no caso de HzNPV, o aumento da atividade viral foi observado tanto no mesmo dia da aplicação quanto em até 120h após, em lagartas de terceiro ínstar de *H.*

armigera. HzNPV apresenta a particularidade de ser patogênico a diferentes espécies da subfamília Heliothinae (Ignoffo; Couch, 1981; Cunningham, 1995), assim o uso de branqueadores ópticos pode aumentar a eficiência do vírus para controle não só *Helicoverpa zea* e *Chloridea virescens*, , mas também de *Helicoverpa armigera*, espécie que adquiriu grande importância devido a seu recente registro em território brasileiro (Spetch et al., 2013).

Após 120h da pulverização foi observada uma redução de mortalidade de lagartas em todos os tratamentos, tanto para ChinNPV quanto para HzNPV, em relação a mortalidade observada no dia da aplicação do vírus em campo. No entanto, a adição de FB 28 0,1% em ambos os isolados promoveu uma maior mortalidade de lagartas, em relação aos demais tratamentos, mesmo após 120h da pulverização. Considerando que a eficiência de vírus de poliedrose nuclear pode ser reduzida em até 50% logo após as primeiras 4 horas de exposição à luz solar (Ignoffo et al., 1997), é possível que FB 28 além de acelerar o processo infectivo, também tenha proporcionado proteção contra a degradação dos poliedros pelos raios solares (Shapiro, 1992).

O efeito da precipitação pluviométrica sobre a ação de baculovírus a campo apresenta diferentes respostas em função da espécie do patógeno (Ignoffo et al., 1997; Young, 1990; Pessoa et al., 2014). Dependendo do isolado viral, os poliedros podem ser removidos da folha após um volume pluviométrico superior a 30mm (Pessoa et al., 2014). O efeito tende a ser mais intenso em pulverização a partir de vírus liofilizado do que em vírus oriundo de cadáveres de lagartas infectadas, uma vez que o produto preparado na forma sem purificar apresenta maior persistência que o liofilizado (Silva; Moscardi, 2002; Pessoa et al., 2014).

A redução da mortalidade de lagartas em todos os tratamentos após 120h da pulverização pode ser atribuída tanto à inativação dos poliedros do vírus pela ação da luz solar quanto à precipitação acumulada durante o período, resultando na redução do número de poliedros na superfície da folha (Pessoa et al., 2014; Young, 1990).

É importante salientar que a precipitação acumulada registrada durante esse período não excedeu 45 mm. Assim, o efeito do FB 28 na atividade viral de ChinNPV e HzNPV em condições de chuvas mais intensas precisa ser investigado, visto que diferentes sistemas vírus-hospedeiro-ambiente podem resultar em respostas diversas (Young, 1990; Tamez-Guerra et al., 2000; Pessoa et al., 2014).

O branqueador óptico FB 28 só apresentou aumento da eficiência quando aliado a concentrações mais elevadas de vírus, em ambos os isolados. No entanto, o aumento

da mortalidade em relação aos demais tratamentos foi percebido mesmo 120h após a aplicação, o que indica que FB 28 aumenta a persistência do vírus a campo, mesmo após um volume de precipitação acumulada de 45mm.

O custo adicional da adição de FB 28 em formulados virais pode ser compensado pela consequente redução do volume de vírus a ser utilizado na aplicação (Martínez et al., 2000). Para serem atrativos para o produtor, branqueadores ópticos devem ser altamente eficientes a campo em baixas concentrações, de até 0,1%, promovendo significativo aumento da mortalidade aliado à expressiva redução da concentração letal. Dessa forma, a viabilidade de seu uso está relacionada não só ao aumento da mortalidade proporcionado, mas também à redução do volume de vírus utilizado para controle (Martínez et al., 2000). A fim de determinar a viabilidade financeira do uso de FB 28 em produtos formulados, são necessários estudos em condições de infestações naturais, a fim de observar seu efeito em lagartas de diferentes instares, bem como o uso de diferentes concentrações do produto combinadas aos isolados virais.

CONCLUSÃO

Adição de FB 28 0,1%, quando associado a concentrações mais elevadas de vírus, aumenta a mortalidade de larvas de terceiro e quarto ínstares de *C. includens* e de terceiro ínstar de *H. armigera*, promovendo assim melhora da atividade viral de ChinNPV e HzNPV pulverizados em campo, mesmo após 120h da pulverização.

Em condições de pulverização em casa de vegetação, não foi observado incremento da atividade viral de ChinNPV e HzNPV com a adição de FB 28 (0,1%).

REFERÊNCIAS

- Alvares C. A., Stape J. L., Sentelhas P.C., Gonçalves J.L.M., Sparovek G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22 (6), 711-728.
- Arthurs S.P., Lacey L.A., Behle R.W., 2006. Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal Invertebrate Pathology*, 93, 88–95.
- Bernal A., Simón O., Williams T., Caballero P., 2014. Stage-specific insecticidal characteristics of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Chrysodeixis chalcites* enhanced by optical brighteners. *Pest Management Science*, 70(5), 798-804.
- Colosimo E.A., Giolo S. R., 2006. Análise de sobrevivência aplicada. São Paulo: Editora Blucher, 370p.
- Cunningham J.P., Zalucki M.P., West S.A., 1999. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research*, 89, (03), 201-207.
- Gray B., 2012 . cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks. R package version 2.2-3. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>
- Gray R.J., 1988. A Class of KK-Sample Tests for Comparing the Cumulative Incidence of a Competing Risk. *Annals of Statistics*, 16(3), 1141--1154.
- Greene G.L., Leppla N. C., Dickerson W. A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69, 487-488.
- Hoffmann-Campo C.B., Oiveira E.B., Moscardi F., 1985. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina: Setor de Entomologia Agrícola, 1985. 20p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10).
- Ignoffo C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*, 75, 516-525.
- Ignoffo C.M., Garcia C., Saathoff S.G., 1997. Sunlight stability and rain-fastness of formulations of baculovirus *Heliothis*. *Environmental Entomology*, 26, 1470-1474.
- Ignoffo C. M., Couch T.L., 1981. Nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticide. In: Burges H.D. (Ed.) *Microbial control of pests and plant diseases*, Academic Press, London, 320-362.
- Ignoffo C.M., Garcia C., Bonning B.C., Herman R., Hammock B.D., 1997. Simulated sunlight UV sensitivity of engineered juvenile hormone esterase and scorpion toxin recombinants of the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica*. *Journal of Kansas Entomology Society*, 70, 149-152.

Jaques R.P., 1985. Stability of insect viruses in the environment, in: Maramorosch K., Sherman K.E. (Eds.), *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York, 285-360.

Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal Invertebrate Pathology*, 132b, 1–41.

Martínez A.M., Goulson D., Chapman J.W., Caballero P., Cave R.D., Williams T., 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica?. *Biological Control*, 17, 174–181.

McGuire M.R., Tamez-Guerra P., Behle R.W., Streett D.A., 2001. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. *Journal of Economic Entomology*, 94(5), 1037-1044.

Moore S.D., 2002. The development and evaluation of *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrleGV) as a biological control agent for the management of false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta*, on citrus (Ph.D. thesis). Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 311.

Moore S.D., Kirkman W., Richards G.I., Stephen P., 2015. The *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus – 10 years of commercial field use. *Viruses*, 7, 1284–1312.

Moscardi F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44, 257-289.

Pessoa V., Cunha F., Bueno A.F., Bortolotto O.C., Monteiro T., Ramos V.M., 2014. Persistência do baculovírus anticarsia após diferentes regimes pluviométricos. *Ciência Rural*, 44, 5-10.

R Development Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Shapiro M., 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal Economic Entomology*, 85, 1682–1686.

Shapiro M., 1995. Radiation protection and activity enhancement of viruses. In: *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society Symposium, 595, 153–164.

Sibaldelli R.N.R., Farias J.R., 2017. Boletim agrometeorológico da Embrapa Soja. Documentos / Embrapa Soja, Londrina, 382, 30.

Silva M.T.B., Moscardi F., 2002. Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of formulations, whater

pH, volume and time of application, and type of nozzle. *Neotropical Entomology*, 31(1), 75-83.

Specht A., Sosa-Gomez D.R., Paula-Moraes S.V., Yano S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(6), 689-692.

Sun X., Sun, X. Werf W.D., Vlak J.M, Hu Z., 2004. Field inactivation of wild-type and genetically modified *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus in cotton. *Biocontrol Science and Technology*, 14(2), 185-192.

Sosa-Gómez D.R., 2017. Microbial control of soybean pest insects and mites In: Lacey L.A. (Ed) *Microbial control of insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier, 199-208.

Tamez-Guerra P., McGuire M.R., Behle R.W., Hamm J.J., Sumner H.R., Shasha B.S., 2000. Sunlight persistence and rainfastness of sprayed-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 210-218.

Webb R.E., Thorpe K.W., Podgwaite J.D., Reardon R.C., White G.B., Talley S.E., 1999. Field evaluation of an improved formulation of Gypchek (a nuclear polyhedrosis virus product) against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Entomological Science*, 34, 72–83.

Wisch L.N., 2011. Flutuação populacional dos principais noctuídeos e distribuição vertical de ovos e larvas na cultura da soja. Dissertação de mestrado. UEPG: Ponta Grossa, 83f.

Wrege M. S., Steinmetz S., Reisser Júnior C., Almeida I.R., 2011. Atlas climático da Região Sul do Brasil: Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Pelotas, RS; Colombo, PR: Embrapa Clima Temperado: Embrapa Florestas, 336p.

Young S.Y., 1990. Influence of sprinkler irrigation on dispersal of nuclear polyhedrosis virus from host cadavers on soybean. *Environmental Entomology*, 19, 717-720.

Zhu Y.C., Lu H.X., He D.H., Yang Z.R., 2013. Synthesis, fluorescence properties and applications of two novel oxadiazole-based stilbene optical brighteners as UV protectants for insect baculovirus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 8–12.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do efeito sinergista observado neste estudo, Fluorescent Brightener 28 pode ser uma opção para uso em formulações de bioinseticidas virais visando ao manejo de *H. armigera* e *C. includens*. No entanto, sua interação com concentrações mais baixas de vírus a campo deve ser estudada bem como seu comportamento em situações de infestação natural de *C. includens* e *H. armigera*, a fim de determinar concentrações de vírus e FB 28 que sejam viáveis economicamente em formulados comerciais. Com relação ao seu uso em produção em massa de baculovírus, é pouco provável que seu uso em grande escala seja útil, uma vez que resulta em redução do peso larval e consequente redução da produção de partículas virais. No entanto, a fim de melhor compreender essas interações, novos estudos precisam ser conduzidos a fim de investigar o efeito de concentrações menores de FB 28 combinado a diferentes concentrações de inóculo viral em diferentes temperaturas, além de lagartas em ínstares larvais mais tardios.

CAPÍTULO 4 - REFERÊNCIAS

- Alexandre T. M., Ribeiro Z.M.A., Craveiro S.R., Cunha F., Fonseca I.C.B., Moscardi F., Castro M.E.B., 2010. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 98–104.
- Alvares C. A., Stape J. L., Sentelhas P.C., Gonçalves J.L.M., Sparovek G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22 (6), 711-728.
- Alves S. B., Moino JR. A., Almeida J.E.M., 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves S.B. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, 217-238.
- Ardisson-Araújo, D.M.P., Sosa-Gómez, D. R., Melo, F. L., Bao, S.N., Ribeiro, B.M., 2015. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. *Virus Reviews and Research*, 20, 1-4.
- Argauer R., Shapiro M., 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus, *Journal Economic Entomology*, 90, 416–420.
- Arthurs S.P., Lacey L.A., Behle R.W., 2006. Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal Invertebrate Pathology*, 93, 88–95.
- Bellotti A.C., 2002. Arthropod pests. In: Hillocks R.J., Thresh J.M., Bellotti A.C. (Eds) *Cassava: Biology, production and utilization*. Oxon: CAB International, 332.
- Bernal A., Simón O., Williams T., Caballero P., 2014. Stage-specific insecticidal characteristics of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Chrysodeixis chalcites* enhanced by optical brighteners. *Pest Management Science*, 70(5), 798-804.
- Black B.C., Brennan L.A., Dierks P.M., Gard I.E., 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. In: Miller L.K. (Ed). *The Baculoviruses*, New York: Plenum Press, 341–388.
- Boucias D.G., Johnson D.W., Allen G.E., 1980. Effects of Host Age, Virus Dosage, and Temperature on the Infectivity of a Nucleopolyhedrosis Virus Against Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Larvae Environmental Entomology*, 9(1), 59–61.
- Bueno A.F., Sosa-Gómez D. R., Correa-Ferreira B.S., Moscardi F., Bueno R.C.O.F., 2012. Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffman-Campo C.B., Corrêa-Ferreira B.S., Moscardi F. (Eds) *Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa: Brasília, 493-630.

Bulet P., Hetru C., DiMarcq J., Hoffmann D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. New York, 23, 329-344.

Burr I.W., Foster L.A., 1972. A test for equality of variances. University of Purdue, West Lafayette, IN, USA.

Castro M.E., Ribeiro Z.M., Santos A.C., Souza M.L., Machado E.B., Sousa N.J., Moscardi F., 2009. Identificação de um novo nucleopolyhedrovirus de *Condylorrhiza vestigialis* em larvas naturalmente infectadas (Guenee) (Lepidoptera: Crambidae) em plantações de álamo no Sul do Brasil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, 149-154.

Cherry A.J., Parnell M.A., Grywacz D., Jones K.A., 1997. The optimization of vivo nuclear polyhedrosis virus production of *Spodoptera exempta* and *S. exigua*. *Journal Invertebrate Pathology*, 70, 50-58.

Chikhalya A., Stephens K. D., Archie J. W., Haas-Stapleton E. J., 2013. Virulence and pathogenesis of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) in *Pseudoplusia includens* larvae. *Biological control*, 65(1), 101-108.

Cisneros, J., Pérez, J. A., Penagos, D. I., Ruiz, J., Goulson, D., Caballero, P., ... & Williams, T., 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control*, 23, 87-95.

Colosimo E.A., Giolo S. R., 2006. Análise de sobrevivência aplicada. São Paulo: Editora Blucher, 370p.

Cunningham J.P. Zalucki M.P., West S.A., 1999. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research*, 89, (03), 201-207.

Dougherty E.M., Narang N., Loeb M., Lynn D.E., Shapiro M., 2006. Fluorescent brightener inhibits apoptosis in baculovirus-infected gypsy moth larval midgut cells in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, 16, 157-168.

Federici B.A., 1997. Baculovirus pathogenesis. In: Miller L.K. (Ed.) *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press, 33-59.

Granados R.R., 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1377-1405.

Granados R.R., Williams K.A., 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: Granados R.R., Federici B.A. (Eds) *The Biology of Baculoviruses*, CRC Press, 89-108.

Gray R. J., 1988. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *The Annals of Statistics*, 16, 1141-1154.

Gray B., 2012 . cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks. R package version 2.2-3. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>

Greene G.L., Leppla N. C., Dickerson W. A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69, 487-488.

Haase S., Sciocco-Cap A., Romanowski V., 2015. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230-2267.

Herth W., Schnepf E., 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*, 105(1-2), 129-133.

Hoffmann-Campo C.B., Oiveira E.B., Moscardi F., 1985. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina: Setor de Entomologia Agrícola, 1985. 20p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10).

Ignoffo C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*, 75, 516-525.

Ignoffo C. M., Couch T.L., 1981. Nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticide. In: Burges H.D. (Ed.) *Microbial control of pests and plant diseases*, Academic Press, London, 320-362.

Ignoffo C.M., Garcia C., 1996. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa/Heliothis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(2), 192-194.

Ignoffo C.M., Garcia C., Saathoff S.G., 1997. Sunlight stability and rain-fastness of formulations of baculovirus *Heliothis*. *Environmental Entomology*, 26, 1470-1474.

Ignoffo C.M., Garcia C., Bonning B.C., Herman R., Hammock B.D., 1997. Simulated sunlight UV sensitivity of engineered juvenile hormone esterase and scorpion toxin recombinants of the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica*. *Journal of Kansas Entomology Society*, 70, 149-152.

Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hammock B.D., 2006. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in virus research*, 68, 323-360.

Jaques R.P., 1985. Stability of insect viruses in the environment, in: Maramorosch K., Sherman K.E. (Eds.), *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York, 285-360.

Jehle J.A., Blissard G.W., Bonning B.C., Cory J.S., Herniou E.A., Rohrmann G.F., Theilmann D.A., Thiem S.M., Vlak, J. M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257-1266.

Johnson D.W., Boucias D.B., Barfield C.S., Allen G.E., 1982. A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar,

Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology, 40(2), 292-298.

Kriticos D. J., Ota N., Hutchison W.D., Beddow J., Walsh T., Tay W.T., Borchert D. M., Paula-Moreas S.V., Czepak C., Zalucki M.P., 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is it just a matter of time? PLoS ONE 10(3): e0119618.

Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. Journal Invertebrate Pathology, 132b,1–41.

Lasa R., Ruiz-Portero C., Alcázar M.D., Belda J.E., Caballero P., Williams T., 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. Biological Control, 40, 89-96.

Lehane M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annual Review of Entomology, 42, 525–550.

Levy S.M., Falleiros A.M.F., Gregório E.A., Arrebola N.R., Toledo L. A., 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. Brazilian Journal of Biology, 64(3B), 633-638.

Liao Z.H., Kuo T.C., Shih C.W., Tuan S.J., Kao Y.H., Huang R.N., 2016. Effect of juvenile hormone and pyriproxyfen treatments on the production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. Entomologia Experimentalis et Applicata, 161(2), 112–120.

Mansour N.A., Eldefrawi M.E., Topozada A., Zeid M., 1966. Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm, *Prodenia litura* VI potentiation and antagonism of carbamate insecticide. Journal Economic Entomology, 59, 307–311

Martínez A., Caballero P., Williams T., 2010. Effects of an optical brightener on the development, body weight and sex ratio of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocontrol science and technology, 14, 193-200.

Martínez A.M., Goulson D., Chapman J.W., Caballero P., Cave R.D., Williams T., 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica?. Biological Control, 17, 174–181.

Mascarin G.M.; Delalibera I., 2012. Insecticidal Activity of the Granulosis Virus in Combination with Neem Products and Talc Powder Against the Potato Tuberworm *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 41(3), 223-231.

McGuire M.R., Tamez-Guerra P., Behle R.W., Streett D.A., 2001. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. Journal of Economic Entomology, 94(5), 1037-1044.

- Moore S.D., 2002. The development and evaluation of *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrleGV) as a biological control agent for the management of false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta*, on citrus (Ph.D. thesis). Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 311.
- Moore N.F., King L.A., Possee R., 1987. Viruses of insects. *Insect Science and Its Application*, 3, 275–289.
- Moore S.D., Kirkman W., Richards G.I., Stephen P., 2015. The *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus – 10 years of commercial field use. *Viruses*, 7, 1284–1312.
- Morales L., Moscardi F., 1993. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 22, 535–540.
- Morales L., Moscardi F., Sosa-Gómez D.R., Paro F.E., Soldorio I.L., 2001. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect, *Biological Control*, 20, 247–253.
- Moscardi F., 1989. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 51-56.
- Moscardi F., 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 509-539.
- Moscardi F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 257-289.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A.F., Corso, I.C., Yano, S.A.C., 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, C.B., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. (Eds.) *Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa. Londrina, 213–334.
- Moscardi F., Leite L.G., Zamataro C.E., 1997. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae): effect of vírus dosage, host density and age. *Anais Sociedade Entomológica do Brasil*, .26 (1),121-132.
- Moscardi F., Souza M.L., Castro M.E.B., Moscardi M.L., Szewczyk B., 2011. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. (Eds.) *Microbes and Microbial Technology*. New York. Springer, 415–445.
- Narayanan K., Jayaraj S., 2002. Mass production of polyhedral occlusion bodies of NPV of *Helicoverpa armigera* in relation to dose, age and larval weight. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 846 849.
- Negreiro M. C. C., Andrade F. G., Falleiros A. M. F., 2004. Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), 293–308.

Okuno S., Takatsuka J., Nakai M., Ototake S., Masui A., Kunimi Y., 2003. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 26, 146-152.

Pessoa V., Cunha F., Bueno A.F., Bortolotto O.C., Monteiro T., Ramos V.M., 2014. Persistência do baculovírus anticarsia após diferentes regimes pluviométricos. *Ciência Rural*, 44, 5-10.

Plymale R., Grove M.J., Cox-Foster D., Ostiguy N., Hoover K., 2008. Plant mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. *Journal Insect Physiology*, 54, 737-749.

R Development Core Team., 2014. R A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reddy N. P., Khan A., Akbar P., Devi K. U., Victor J. S., Sharma H. C., 2008. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Management Science*, 64(9), 909-915.

Ritz C., 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, (1), 220-229.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE*, 10, (12).

Rossi-Zalaf L.S., Alves S.B., Lopes R.B., Silveira Neto S., Tanzini M.R., 2008. Interação de microorganismo com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S.B., Lopes R.B. (Eds) *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Fealq, Piracicaba, 279- 302.

Shapiro S.S., Wilk M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.

Shapiro M., 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal Economic Entomology*, 85, 1682-1686.

Shapiro M., 1995. Radiation protection and activity enhancement of viruses. In: *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society Symposium, 595, 153-164.

Shapiro M., 2000. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *Journal of Economic Entomology*, 93, (3), 572-576.

Shapiro M., Bell R. A., 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. *Annals of the Entomological Society of America*, 75(3), 346-349.

Shapiro, M., Robertson, J. L., 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners, *Journal of Economic Entomology*, 85, 1120-1124.

Sheppard C., Shapiro M., 1994. Physiological and Nutritional effects of a fluorescent brightener on nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* (L.) Larvae (Lepidoptera: Lymantriidae), *Biological Control*, 4, 404-411.

Sherman, K.E., 1985. Multiple virus interaction. In: Maramosch, K., Sherman, K.E. (Eds.), *Viral Insecticides for Biological control*. 735-756.

Sibaldelli R.N.R., Farias J.R., 2017. Boletim agrometeorológico da Embrapa Soja. Documentos / Embrapa Soja, Londrina, 382, 30.

Silva M.T.B., Moscardi F., 2002. Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of formulations, whater pH, volume and time of application, and type of nozzle. *Neotropical Entomology*, 31(1), 75-83.

Sosa-Gómez D.R., 2017. Microbial Control of Soybean Pest Insects and Mites In: Lacey L.A. (Ed) *Microbial control of insect and Mite Pests: From Theory to Praticce*. Elsevier, 199-208.

Sosa-Gómez, D.R., Omoto, C., 2012. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: Hoffmann-Campo, C.B., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. *Soja: Manejo Integrado de. Insetos e outros Artrópodes-praga*. Brasília: EMBRAPA, 673-. 724.

Specht A., Sosa-Gómez D.R., Paula-Moraes S.V., Yano S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropeuária.Brasileira*, 48(6), 689-692.

Steel R.G.D., Torrie J. H., 1960. *Principles and Procedures of Statistics* .McGraw-Hill Book Company, New York. 481.

Subramanian S., Santhram G., Sathiah N., Kennedy J.S., Rabindra R.J., 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 37, 367-374.

Sun X., Sun, X. Werf W.D., Vlak J.M, Hu Z., 2004. Field inactivation of wild-type and genetically modified *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus in cotton. *Biocontrol Science and Technology*, 14(2), 185-192.

Szewczyk B. Hoyos-Carvajal L., Paluszek M., Skrzecz I., Souza M.L., 2006. Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24, (2), 143-160.

Takatsuka J., Okuno S., Ishii T., Nakai M., Kunimi Y., 2007. Productivity and quality of polyhedral occlusion bodies of a Nucleopolyhedrovirus harvested from *Spodoptera*

litura (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Applied Entomology and Zoology, 42, (1), 21-26.

Tamez-Guerra P., McGuire M.R., Behle R.W., Hamm J.J., Sumner H.R., Shasha B.S., 2000. Sunlight persistence and rainfastness of sprayed-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 93(3), 210-218.

Tang X.X., Sun X.L., Pu G.Q., Wang W.B., Zhang C.X., Zhu J., 2011. Expression of a neurotoxin gene improves the insecticidal activity of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV). Virus research, 159(1), 51-56.

Tukey J.W., 1949. One degree of freedom for non-additivity. Biometrics, 5, 232-242.

Valicente F.H., Tuelher E.S., Pena R.C., Andreazza R, Guimarães M.R.F, 2013. Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with Baculovirus *spodoptera*. Neotropical Entomology, 42(2), 191-199.

Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynik A., Hajnos M. Ł., Tuzimski T., Hawrył A., Bogucka-Kocka A., 2006. Two-dimensional thin-layer chromatography of selected coumarins. Journal of Chromatographic Science, 44(8), 510-517.

Wang P., Granados R.R., 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects, Insect Biochemical Molecular Biology, 30, 135–143.

Washburn, J. O., Kirkparick, B.A., Haas-Stapelton, E., and Volkman, L. E., 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. Biological Control, 11, 58–69.

Webb R.E., Thorpe K.W., Podgwaite J.D., Reardon R.C., White G.B., Talley S.E., 1999. Field evaluation of an improved formulation of Gypchek (a nuclear polyhedrosis virus product) against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Journal of Entomological Science, 34, 72–83.

Wisch L.N., 2011. Flutuação populacional dos principais noctuídeos e distribuição vertical de ovos e larvas na cultura da soja. Dissertação de mestrado. UEPG: Ponta Grossa, 83f.

Wrege M. S., Steinmetz S., Reisser Júnior C., Almeida I.R., 2011. Atlas climático da Região Sul do Brasil: Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Pelotas, RS; Colombo, PR: Embrapa Clima Temperado: Embrapa Florestas, 336p.

Wu K., Yang B., Huang W., Dobens L., Song H., Ling, E., 2016. Gut immunity in Lepidopteran insects. Developmental and Comparative Immunology, 64, 65-74.

Young S.Y., 1990. Influence of sprinkler irrigation on dispersal of nuclear polyhedrosis virus from host cadavers on soybean. Environmental Entomology, 19, 717-720.

Zamora-Avilés N., Alonso-Vargas J., Pineda S., Isaac-Figueroa J., Lobit P., Martínez-Castillo A.M., 2013. Effects of a nucleopolyhedrovirus in mixtures with azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and viral occlusion body production. *Biocontrol Science and Technology*, 23, 521-534.

Zhu R., Liu K., Peng J., Yang H., Hong H., 2007. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Management Science*, 63(3), 296-300.

Zhu Y.C., Lu H.X., He D.H., Yang Z.R., 2013. Synthesis, fluorescence properties and applications of two novel oxadiazole-based stilbene optical brighteners as UV protectants for insect baculovirus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 8–12.

ANEXO 1 - LEGENDA DOS TRATAMENTOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL OFERECIDA À LAGARTAS DE *Chrysodeixis includens* EM LABORATÓRIO.

Legenda	Tratamento
1	0 (testemunha)
2	Fluorescent Brightener 28 (0,025%)
3	Fluorescent Brightener 28 (0,05%)
4	Fluorescent Brightener 28 (0,1%)
5	4-4 diamino stilbene (0,5%)
6	4-4 diamino stilbene (1,0%)
7	4-4 diamino stilbene (1,5%)
8	Calcofluor White Stain (0,5%)
9	Calcofluor White Stain (1,0%)
10	Calcofluor White Stain (1,5%)
11	0,025% ácido bórico (0,025%)
12	0,05% ácido bórico (0,05%)
13	5ppm chlorfluazuron
14	10ppm chlorfluazuron
15	0,1% umbeliferona (0,1%)
16	0,5% umbeliferona (0,5%)
17	ChinNPV (5.000 CO.ml ⁻¹)
18	ChinNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,025%)
19	ChinNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,05%)
20	ChinNPV + Fluorescent Brightener 28 (0,1%)
21	ChinNPV + 4-4 diamino stilbene (0,5%)
22	ChinNPV + 4-4 diamino stilbene (1,0%)
23	ChinNPV + 4-4 diamino stilbene (1,5%)
24	ChinNPV + calcofluor white stain (0,5%)
25	ChinNPV + calcofluor white stain (1,0%)
26	ChinNPV + calcofluor white stain (1,5%)
27	ChinNPV + 0,025% ácido bórico
28	ChinNPV + 0,05% ácido bórico
29	ChinNPV + 5ppm chlorfluazuron
30	ChinNPV + 10ppm chlorfluazuron
31	ChinNPV + 0,1% umbeliferona
32	ChinNPV + 0,5% umbeliferona

ANEXO 2 - LEGENDA DOS TRATAMENTOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL OFERECIDA À LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera* EM LABORATÓRIO.

0 (testemunha)	1
0,025% FB	2
0,05% Fluorescent Brightener	3
0,1% Fluorescent Brightener	4
0,5% 4-4 diamino stilbene	5
1,0% 4-4 diamino stilbene	6
1,5% 4-4 diamino stilbene	7
1,5 % Calcofluor White Stain	8
0,05% ácido bórico	9
0,1% ácido bórico	10
0,1% umbeliferona	11
0,5% umbeliferona	12
HzNPV (1.000 CO.ml ⁻¹)	13
HzNPV + 0,025% Fluorescent Brightener	14
HzNPV + 0,05% Fluorescent Brightener	15
HzNPV + 0,1% Fluorescent Brightener	16
HzNPV + 0,5% 4-4 diamino stilbene	17
HzNPV + 1,0% 4-4 diamino stilbene	18
HzNPV + 1,5% 4-4 diamino stilbene	19
HzNPV + 1,5 % Calcofluor White Stain	21
HzNPV + 0,025% ácido bórico	22
HzNPV + 0,05% ácido bórico	23
HzNPV + 0,1% umbeliferona	24
HzNPV + 0,5% umbeliferona	25

ANEXO 3 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM AGENTES QUÍMICOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE *Chrysodeixis includens*.

<i>Tratamentos</i>	<i>St</i>	<i>p-valor</i>	
<i>T1 vs. T2</i>	5,891088	0,01521769	**
<i>T1 vs. T3</i>	1,732277	3,15E+01	**
<i>T1 vs. T4</i>	159,508	6,50E+01	**
<i>T1 vs. T5</i>	0,8980534	0,3433042	NS
<i>T1 vs. T6</i>	416,589	0,04124574	**
<i>T1 vs. T7</i>	2,084161	4,99E+00	**
<i>T1 vs. T8</i>	0,6246807	0,4293132	NS
<i>T1 vs. T9</i>	8,963009	0,002755008	**
<i>T1 vs. T10</i>	0,09122624	0,762624	NS
<i>T1 vs. T11</i>	0,0006348395	0,9798986	NS
<i>T1 vs. T12</i>	2,465593	0,1163638	NS
<i>T1 vs. T13</i>	2,130307	0,1444118	NS
<i>T1 vs. T14</i>	2,796543	0,09446781	NS
<i>T1 vs. T15</i>	0,04188982	0,8378299	NS
<i>T1 vs. T16</i>	0,614522	0,4330903	NS
<i>T2 vs. T3</i>	3,565674	0,05898579	NS
<i>T2 vs. T4</i>	2,918586	0,08756456	NS
<i>T2 vs. T5</i>	1,433962	0,2311189	NS
<i>T2 vs. T6</i>	0,002954692	0,9566507	NS
<i>T2 vs. T7</i>	6,052585	0,01388596	**
<i>T2 vs. T8</i>	1,504983	0,2199062	NS
<i>T2 vs. T9</i>	0,9540069	0,3287015	NS
<i>T2 vs. T10</i>	4,424374	0,0354291	**
<i>T2 vs. T11</i>	1,807149	0,1788506	NS
<i>T2 vs. T12</i>	0,3604815	0,548239	NS
<i>T2 vs. T13</i>	0,1861349	0,6661532	NS
<i>T2 vs. T14</i>	0,04758748	0,8273157	NS
<i>T2 vs. T15</i>	3,265498	0,07075152	NS
<i>T2 vs. T16</i>	1,666651	0,1967078	NS
<i>T3 vs. T4</i>	0,01023156	0,9194305	NS
<i>T3 vs. T5</i>	6,788313	0,009175659	**
<i>T3 vs. T6</i>	2,965367	0,08506515	NS
<i>T3 vs. T7</i>	0,2350691	0,6277904	NS
<i>T3 vs. T8</i>	6,820766	0,009010392	**
<i>T3 vs. T9</i>	0,5753711	0,4481324	NS
<i>T3 vs. T10</i>	10,01606	0,001551808	**
<i>T3 vs. T11</i>	4,77333	0,02890387	**
<i>T3 vs. T12</i>	3,567652	0,05891557	NS
<i>T3 vs. T13</i>	2,727073	0,09865994	NS

<i>T3 vs. T14</i>	2,303407	0,1290906	NS
<i>T3 vs. T15</i>	9,640511	0,001903322	**
<i>T3 vs. T16</i>	6,904732	0,00859679	**
<i>T4 vs. T5</i>	6,233381	0,01253641	**
<i>T4 vs. T6</i>	2,552828	0,110097	NS
<i>T4 vs. T7</i>	0,389699	0,5324577	NS
<i>T4 vs. T8</i>	6,596774	0,01021637	**
<i>T4 vs. T9</i>	0,5567965	0,4555539	NS
<i>T4 vs. T10</i>	10,55331	0,001159801	**
<i>T4 vs. T11</i>	4,327107	0,03750995	**
<i>T4 vs. T12</i>	3,000619	0,08323269	NS
<i>T4 vs. T13</i>	2,562826	0,1094029	NS
<i>T4 vs. T14</i>	2,562826	0,1094029	NS
<i>T4 vs. T15</i>	9,415744	0,002151302	**
<i>T4 vs. T16</i>	7,000942	0,008146685	**
<i>T5 vs. T6</i>	0,9134413	0,339203	NS
<i>T5 vs. T7</i>	9,2193	0,002394771	**
<i>T5 vs. T8</i>	0,0311097	0,8599959	NS
<i>T5 vs. T9</i>	3,013995	0,08254861	NS
<i>T5 vs. T10</i>	1,239834	0,2655031	NS
<i>T5 vs. T11</i>	0,3283463	0,5666345	NS
<i>T5 vs. T12</i>	0,2814603	0,5957457	NS
<i>T5 vs. T13</i>	0,4015386	0,5262957	NS
<i>T5 vs. T14</i>	0,6609006	0,4162422	NS
<i>T5 vs. T15</i>	0,4602444	0,4975098	NS
<i>T5 vs. T16</i>	0,02603227	0,8718215	NS
<i>T6 vs. T7</i>	4,682962	0,03046317	**
<i>T6 vs. T8</i>	1,179207	0,2775174	NS
<i>T6 vs. T9</i>	0,7159964	0,3974603	NS
<i>T6 vs. T10</i>	3,415785	0,0645757	NS
<i>T6 vs. T11</i>	1,403217	0,2361856	NS
<i>T6 vs. T12</i>	0,129421	0,7190331	NS
<i>T6 vs. T13</i>	0,1509561	0,6976233	NS
<i>T6 vs. T14</i>	0,01598606	0,8993868	NS
<i>T6 vs. T15</i>	2,462466	0,1165956	NS
<i>T6 vs. T16</i>	1,129218	0,2879421	NS
<i>T7 vs. T8</i>	9,784396	0,00175999	**
<i>T7 vs. T9</i>	1,701693	0,1920667	NS
<i>T7 vs. T10</i>	1,433766	0,0001527774	**
<i>T7 vs. T11</i>	5,614579	0,01781166	**
<i>T7 vs. T12</i>	4,935381	0,02631227	**
<i>T7 vs. T13</i>	4,643397	0,03117324	**
<i>T7 vs. T14</i>	3,699747	0,05442071	NS
<i>T7 vs. T15</i>	1,296649	0,0003171152	**

<i>T7 vs. T16</i>	9,921427	0,001633657	**
<i>T8 vs. T9</i>	3,420195	0,06440341	NS
<i>T8 vs. T10</i>	0,8337938	0,3611778	NS
<i>T8 vs. T11</i>	0,1919638	0,6612871	NS
<i>T8 vs. T12</i>	0,4750158	0,4906887	NS
<i>T8 vs. T13</i>	0,3262615	0,5678688	NS
<i>T8 vs. T14</i>	0,7298333	0,3929372	NS
<i>T8 vs. T15</i>	0,2514537	0,6160533	NS
<i>T8 vs. T16</i>	0,0002480813	0,9874334	NS
<i>T9 vs. T10</i>	6,709866	0,009588094	**
<i>T9 vs. T11</i>	2,492619	0,1143812	NS
<i>T9 vs. T12</i>	1,089479	0,2965866	NS
<i>T9 vs. T13</i>	1,509111	0,2192748	NS
<i>T9 vs. T14</i>	0,7639204	0,3821044	NS
<i>T9 vs. T15</i>	5,468338	0,01936403	**
<i>T9 vs. T16</i>	3,583002	0,05837356	NS
<i>T10 vs. T11</i>	0,03098309	0,8602781	NS
<i>T10 vs. T12</i>	2,377418	0,1231009	NS
<i>T10 vs. T13</i>	1,746671	0,1862958	NS
<i>T10 vs. T14</i>	2,662104	0,1027647	NS
<i>T10 vs. T15</i>	0,113019	0,7367328	NS
<i>T10 vs. T16</i>	0,7071712	0,4003845	NS
<i>T11 vs. T12</i>	0,9104603	0,3399923	NS
<i>T11 vs. T13</i>	1,210462	0,2712406	NS
<i>T11 vs. T14</i>	1,174004	0,27858	NS
<i>T11 vs. T15</i>	0,03070258	0,8609056	NS
<i>T11 vs. T16</i>	0,2590114	0,6108001	NS
<i>T12 vs. T13</i>	0,07373584	0,7859731	NS
<i>T12 vs. T14</i>	0,08503005	0,7705931	NS
<i>T12 vs. T15</i>	1,297708	0,2546324	NS
<i>T12 vs. T16</i>	0,4744744	0,4909359	NS
<i>T13 vs. T14</i>	0,03285762	0,8561582	NS
<i>T13 vs. T15</i>	1,201801	0,272962	NS
<i>T13 vs. T16</i>	0,3316974	0,5646613	NS
<i>T14 vs. T15</i>	1,765185	0,1839791	NS
<i>T14 vs. T16</i>	0,7066653	0,4005531	NS
<i>T15 vs. T16</i>	0,285487	0,5931272	NS

ANEXO 4 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS A ChinNPV À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE *Chrysodeixis includens*. ChinNPV: 5.000 CO.ml⁻¹

Tratamentos	Causa 1			Causa 2		
	stat	p-valor		Stat	p-valor	
T17 vs. T18	8,011,596	0,004647875	**	2,197,972	0,138192407	NS
T17 vs. T19	11,124,857	0,0000000	**	103,844	0,3081846	NS
T17 vs. T20	-126,910,741	10,000000	**	1,385,234	0,2392117	NS
T17 vs. T21	3,497,394	0,06146547	NS	2,571,222	0,10882365	NS
T17 vs. T22	1,733,537	0,1879598	NS	0,378516	0,5383985	NS
T17 vs. T23	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
T17 vs. T24	4,645,323	0,03113827	**	2,963,280	0,08517499	NS
T17 vs. T25	0,9655561	0,3257909862	NS	139,348,739	0,0001892544	**
T17 vs. T26	7,807,223	0,005203781	**	9,820,494	0,001725780	**
T17 vs. T27	12,880,420	0,0003320378	**	7,795,053	0,0052389485	**
T17 vs. T28	759,899	5,84E+03	**	1,710,226	3,54E+01	**
T17 vs. T29	15,850,674	6,85E+01	**	3,305,595	6,90E+04	**
T17 vs. T30	2,060,311	0,15117931	NS	3,584,549	0,05831924	NS
T17 vs. T31	1,078,242,973	0,2990909	NS	0,006760201	0,9344714	NS
T17 vs. T32	8,511,842	0,003528428	**	3,267,405	0,070669312	NS
T18 vs. T19	61,504,667	4,44E-09	**	6,015,933	1,42E+04	**
T18 vs. T20	-108,600,874	100,000000	**	5,925,493	0,01492336	**
T18 vs. T21	1,845,665,987	1,74E+01	**	0,01696801	8,96E+05	**
T18 vs. T22	21,279,972	0,1446296	NS	0,7737314	0,3790652	NS
T18 vs. T23	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
T18 vs. T24	190,141,816	1,30E+01	**	0,1723878	6,78E+05	**
T18 vs. T25	1,811,044	0,17838307	NS	5,758,619	0,01640796	**
T18 vs. T26	23,513,218	1,24E+00	**	3,102,344	7,82E+04	**
T18 vs. T27	20,562,909	5,77E+00	**	2,605,233	1,07E+05	**
T18 vs. T28	19,480,265	1,02E+01	**	7,604,131	5,82E+03	**
T18 vs. T29	309,261,204	2,68E-02	**	0,3693074	5,43E+05	**
T18 vs. T30	106,716,700	0,001087889	**	0,4368081	0,508667067	NS
T18 vs. T31	10,497,874	0,00119512	**	1,535,341	0,21531264	NS
T18 vs. T32	256,751,531	4,04E-01	**	0,2049513	6,51E+05	**
T19 vs. T20	437,454,814	3,74E-05	**	0,0592177	8,08E+05	**
T19 vs. T21	110,267,708	0,00000000	**	6,430,319	0,01121884	**
T19 vs. T22	82,137,245	0,0000000	**	2,677,425	0,1017802	NS
T19 vs. T23	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
T19 vs. T24	93,190,953	0,000000000	**	7,144,201	0,007520678	**
T19 vs. T25	4,955,937	1,92E-06	**	2,131,212	3,90E+00	**
T19 vs. T26	9,553,456	0,00000e+00	**	1,632,904	5,32E+00	**
T19 vs. T27	4,466,761	2,33E-05	**	1,390,645	1,92E+02	**
T19 vs. T28	6,610,674	4,44E-10	**	2,519,854	5,17E-01	**
T19 vs. T29	88,604,782	0,000000000	**	8,196,453	0,004197238	**
T19 vs. T30	57,510,464	3,36E-08	**	8,259,808	4,05E+03	**

<i>T19 vs. T31</i>	718,582,399	0,0000000	**	0,6922789	0,4053903	NS
<i>T19 vs. T32</i>	107,223,639	0,000000000	**	7,769,278	0,005314228	**
<i>T20 vs. T21</i>	246,677,669	0,00000000	**	6,395,661	0,01143996	**
<i>T20 vs. T22</i>	817,663,154	0,00000000	**	2,988,634	0,08385086	NS
<i>T20 vs. T23</i>	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
<i>T20 vs. T24</i>	183,966,888	0,00000000	**	5,769,726	0,01630458	**
<i>T20 vs. T25</i>	12,956,633	0,000000e+00	**	1,817,514	2,01E+01	**
<i>T20 vs. T26</i>	18,089,020	0,0000000000	**	1,512,042	0,0001008662	**
<i>T20 vs. T27</i>	6,725,512	2,22E-10	**	1,378,735	2,05E+02	**
<i>T20 vs. T28</i>	12,822,822	0,000000e+00	**	2,334,293	1,36E+00	**
<i>T20 vs. T29</i>	143,728,776	0,000000000	**	9,983,223	0,001579729	**
<i>T20 vs. T30</i>	138,745,296	0,000000000	**	8,226,499	0,004128309	**
<i>T20 vs. T31</i>	1,699,499,181	0,0000000	**	0,2257085	0,6347243	NS
<i>T20 vs. T32</i>	211,591,724	0,000000000	**	8,009,051	0,004654411	**
<i>T21 vs. T22</i>	9,624,169	0,001920333	**	0,992166	0,319213554	NS
<i>T21 vs. T23</i>	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
<i>T21 vs. T24</i>	0,51787045	0,4717515	NS	0,06368915	0,8007573	NS
<i>T21 vs. T25</i>	5,358,355	0,02062321	**	4,763,123	0,02907575	**
<i>T21 vs. T26</i>	1,454,129	0,2278665	NS	2,448,477	0,1176390	NS
<i>T21 vs. T27</i>	5,995,865	0,01433945	**	2,115,968	0,14576984	NS
<i>T21 vs. T28</i>	1,206,882	0,27195050	NS	6,453,937	0,01107068	**
<i>T21 vs. T29</i>	66,036,845	0,0101768	**	0,1929402	0,6604807	NS
<i>T21 vs. T30</i>	0,004045316	0,9492865	NS	0,269315946	0,6037910	NS
<i>T21 vs. T31</i>	0,3381732	0,5608856	NS	17,581,543	0,1848549	NS
<i>T21 vs. T32</i>	112,866,695	0,2880599	NS	0,09225407	0,7613309	NS
<i>T22 vs. T23</i>	127,504,493	0,0003559236	**	0,1615919	0,6876950614	NS
<i>T22 vs. T24</i>	10,719,458	0,001060147	**	1,480,416	0,223709523	NS
<i>T22 vs. T25</i>	0,0558965	0,813103359	NS	104,573,074	0,001221652	**
<i>T22 vs. T26</i>	14,971,788	0,0001091306	**	6,739,545	0,0094298664	**
<i>T22 vs. T27</i>	17,229,332	3,31E+01	**	5,128,169	2,35E+04	**
<i>T22 vs. T28</i>	1,357,265	0,0002295051	**	1,273,428	0,0003590136	**
<i>T22 vs. T29</i>	23,616,836	1,18E+00	**	1,711,823	1,91E+05	**
<i>T22 vs. T30</i>	549,877	0,01902985	**	195,579	0,16196428	NS
<i>T22 vs. T31</i>	46,959,090	0,0302345	**	0,3324824	0,5642010	NS
<i>T22 vs. T32</i>	5,890,529	6,71E+01	**	1,585,287	2,08E+05	**
<i>T23 vs. T24</i>	0,008546288	0,9263436	NS	0,005914660	0,9386977	NS
<i>T23 vs. T25</i>	9,064,932	0,002605582	**	3,088,033	0,078870115	NS
<i>T23 vs. T26</i>	0,1815298	0,6700618	NS	12,801,661	0,2578682	NS
<i>T23 vs. T27</i>	3,830,239	0,05033575	NS	1,300,239	0,25416952	NS
<i>T23 vs. T28</i>	0,1199314	0,72910893	NS	43,287,731	0,03747325	**
<i>T23 vs. T29</i>	35,081,604	0,06106723	NS	0,0140937	0,90549965	NS
<i>T23 vs. T30</i>	0,62083660	0,4307366	NS	0,02913336	0,8644715	NS
<i>T23 vs. T31</i>	2,008,328	0,1564377	NS	2,696,269	0,1005834	NS
<i>T23 vs. T32</i>	0,035137217	0,8513084	NS	0,007983198	0,9288048	NS
<i>T24 vs. T25</i>	7,876,616	0,005007811	**	2,983,880	0,084097438	NS
<i>T24 vs. T26</i>	0,2108376	0,6461117	NS	14,236,058	0,2328108	NS

<i>T24 vs. T27</i>	4,753,472	0,02923924	**	1,239,570	1,026,555,400	NS
<i>T24 vs. T28</i>	0,3798018	0,53770930	NS	42,252,074	0,03982775	**
<i>T24 vs. T29</i>	4,099,534,494	0,04289502	**	0,001603435	0,96805891	NS
<i>T24 vs. T30</i>	0,30959455	0,5779291	NS	0,05587654	0,8131361	NS
<i>T24 vs. T31</i>	1,229,027	0,2675963	NS	2,374,682	0,1233167	NS
<i>T24 vs. T32</i>	0,192958919	0,6604653	NS	0,000132046	0,9908316	NS
<i>T25 vs. T26</i>	101,055,704	0,001478218	**	0,3321418	0,564400638	NS
<i>T25 vs. T27</i>	133,462,226	0,0002589437	**	0,0121839	0,9121074567	NS
<i>T25 vs. T28</i>	89,653,770	0,002751439	**	0,2066176	0,649431507	NS
<i>T25 vs. T29</i>	17,634,167	2,68E+01	**	2,194,316	1,39E+05	**
<i>T25 vs. T30</i>	3,614,247	0,05728666	NS	1,553,029	0,21268887	NS
<i>T25 vs. T31</i>	2,932,251	0,086826359	NS	9,182,831	0,002442958	**
<i>T25 vs. T32</i>	10,510,674	0,00118687	**	3,119,883	0,07734236	NS
<i>T26 vs. T27</i>	30,067,141	0,08292023	NS	0,1181249	0,73107717	NS
<i>T26 vs. T28</i>	0,002890417	0,9571243	NS	1,007,417,670	0,3155223	NS
<i>T26 vs. T29</i>	23,862,850	0,1224042	NS	0,9065531	0,3410306	NS
<i>T26 vs. T30</i>	10,719,509	0,3005052	NS	0,6221297	0,4302570	NS
<i>T26 vs. T31</i>	2,596,508	0,10709944	NS	6,406,627	0,01136952	**
<i>T26 vs. T32</i>	0,01215129	0,9122247	NS	139,387,256	0,2377522	NS
<i>T27 vs. T28</i>	28,345,527	0,09225649	NS	0,1634377	0,68601099	NS
<i>T27 vs. T29</i>	0,4369379	0,5086041	NS	0,7852452	0,3755418	NS
<i>T27 vs. T30</i>	7,330,132	0,006780808	**	0,700670	0,402558671	NS
<i>T27 vs. T31</i>	8,499,936	0,00355159	**	5,561,199	0,01836283	**
<i>T27 vs. T32</i>	4,382,418	0,03631146	**	1,355,200	0,24437108	NS
<i>T28 vs. T29</i>	1,810,967	0,17839232	NS	3,065,009	0,07999471	NS
<i>T28 vs. T30</i>	1,636,882	0,2007539	NS	2,604,073	0,1065895	NS
<i>T28 vs. T31</i>	2,928,547	0,0870258016	NS	10,936,288	0,0009429891	**
<i>T28 vs. T32</i>	0,1713056	0,67895408	NS	44,557,288	0,03478437	**
<i>T29 vs. T30</i>	649,311,827	0,01082929	**	0,02248868	0,88079438	NS
<i>T29 vs. T31</i>	9,057,817	0,00261574	**	2,512,676	2,011,293,404	NS
<i>T30 vs. T31</i>	315,169,223	0,07584827	NS	0,01469334	0,90351989	NS
<i>T30 vs. T32</i>	0,1371542	0,71112667	NS	27,156,784	0,09936672	NS
<i>T31 vs. T32</i>	118,632,197	0,2760727	NS	0,06738013	0,7951902	NS

ANEXO 5 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM AGENTES QUÍMICOS ADICIONADOS À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE *Helicoverpa armigera*.

<i>Tratamentos</i>	<i>St</i>	<i>p-valor</i>	
<i>T1 vs. T2</i>	7,391681	0,006552623	**
<i>T1 vs. T3</i>	9,15E+01	0,9923684	NS
<i>T1 vs. T4</i>	0,7140608	0,398099	NS
<i>T1 vs. T5</i>	0,9208566	0,3372502	NS
<i>T1 vs. T6</i>	110,807	0,2925019	NS
<i>T1 vs. T7</i>	2,352464	0,1250852	NS
<i>T1 vs. T8</i>	2,744328	0,09760008	NS
<i>T1 vs. T9</i>	2,757653	0,09679012	NS
<i>T1 vs. T10</i>	1,142612	0,0007241889	**
<i>T1 vs. T11</i>	1,658975	0,1977417	NS
<i>T1 vs. T12</i>	6,079145	0,0136787	**
<i>T2 vs. T3</i>	7,259551	0,007052492	**
<i>T2 vs. T4</i>	1,299105	0,0003129835	**
<i>T2 vs. T5</i>	1,285421	0,000336721	**
<i>T2 vs. T6</i>	1,360628	0,0002254297	**
<i>T2 vs. T7</i>	1,486576	0,2227485	NS
<i>T2 vs. T8</i>	1,107688	0,0008741074	**
<i>T2 vs. T9</i>	0,09776467	0,7545288	NS
<i>T2 vs. T10</i>	1,838398	0,1751389	NS
<i>T2 vs. T11</i>	8,166665	0,004266729	**
<i>T2 vs. T12</i>	1,838398	0,1751389	NS
<i>T3 vs. T4</i>	0,8385634	0,359808	NS
<i>T3 vs. T5</i>	0,8317062	0,3617796	NS
<i>T3 vs. T6</i>	1,141077	0,2854249	NS
<i>T3 vs. T7</i>	2,439798	0,1182915	NS
<i>T3 vs. T8</i>	2,884611	0,08942959	NS
<i>T3 vs. T9</i>	3,045752	0,0809486	NS
<i>T3 vs. T10</i>	1,238522	0,0004327447	**
<i>T3 vs. T11</i>	1,811811	0,1782912	NS
<i>T3 vs. T12</i>	6,178601	0,01293045	**
<i>T4 vs. T5</i>	0,1096022	0,7405975	NS
<i>T4 vs. T6</i>	0,239435	0,6246145	NS
<i>T4 vs. T7</i>	6,314,623	0,01197462	**
<i>T4 vs. T8</i>	1,043,953	0,3069039	NS
<i>T4 vs. T9</i>	745,334	0,006331886	**
<i>T4 vs. T10</i>	1,945972	1,03E+01	**
<i>T4 vs. T11</i>	0,6899933	0,4061667	NS
<i>T4 vs. T12</i>	4,112369	0,0425707	**
<i>T5 vs. T6</i>	0,03750685	0,8464368	NS
<i>T5 vs. T7</i>	4,180553	0,04089036	**
<i>T5 vs. T8</i>	1,667566	0,1965848	NS
<i>T5 vs. T9</i>	4,792409	0,02858541	**
<i>T5 vs. T10</i>	16,70168	4,374217e-05	**
<i>T5 vs. T11</i>	0,8815704	0,3477719	NS
<i>T5 vs. T12</i>	4,354544	0,03691034	**
<i>T6 vs. T7</i>	5,262663	0,02178766	**
<i>T6 vs. T8</i>	107,789	0,2991701	NS
<i>T6 vs. T9</i>	6,318568	0,01194801	**
<i>T6 vs. T10</i>	1,949789	1,01E+01	**

<i>T6 vs. T11</i>	0,5354747	0,4643142	NS
<i>T6 vs. T12</i>	4,134135	0,04202654	**
<i>T7 vs. T8</i>	8,843555	0,002941257	**
<i>T7 vs. T9</i>	0,003563656	0,9523975	NS
<i>T7 vs. T10</i>	3,851599	0,04969858	**?NS
<i>T7 vs. T11</i>	6,284563	0,01217941	**
<i>T7 vs. T12</i>	1,265583	0,000374396	**
<i>T8 vs. T9</i>	6,995661	0,008170752	**
<i>T8 vs. T10</i>	1,407041	0,0001760926	**
<i>T8 vs. T11</i>	0,08314419	0,7730809	NS
<i>T8 vs. T12</i>	1,669386	0,1963408	NS
<i>T9 vs. T10</i>	1,651378	0,1987715	NS
<i>T9 vs. T11</i>	6,025887	0,01409755	**
<i>T9 vs. T12</i>	118,643	0,0005722013	**
<i>T10 vs. T11</i>	1,277856	0,0003506146	**
<i>T10 vs. T12</i>	193,963	1,06E+01	**
<i>T11 vs. T12</i>	2,629674	0,1048833	NS

ANEXO 6 - RELAÇÃO COMPLETA DAS INTERAÇÕES ENTRE TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS A HzNPV À DIETA ARTIFICIAL E SEU EFEITO NA MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE *Helicoverpa armigera*. HzNPV: 1.000 CO.ml⁻¹

Tratamentos	Causa 1			Causa 2		
	stat	p-valor		stat	p-valor	
T13 vs. T14	1,867,531	1,55E+01	**	147,806	2,24E+05	**
T13 vs. T15	414,465,795	1,21E-04	**	0,1441192	7,04E+05	**
T13 vs. T16	92,167,573	0,0000000	**	1,188,629	0,2756064	NS
T13 vs. T17	331,233,353	0,06876179	NS	0,09543815	0,75737427	NS
T13 vs. T18	0,2442365	0,6211629	NS	0,7182623	0,3967145	NS
T13 vs. T19	0,00853431	0,9263951	NS	2,222,101,103	0,1360478	NS
T13 vs. T20	9,065,078	0,002605374	**	1,352,931	0,244766282	NS
T13 vs. T21	3,164,274	0,07526588	NS	1,355,740	0,24427712	NS
T13 vs. T22	175,649,961	2,78E+01	**	0,1242723	7,24E+05	**
T13 vs. T23	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
T13 vs. T24	3,956,184	0,04669945	**	1,258,714	0,26189461	NS
T13 vs. T25	64,584,070	0,01104286	**	0,7877454	0,37478273	NS
T14 vs. T15	6,849,028	0,008868949	**	2,434,698	0,118676730	NS
T14 vs. T16	42,544,435	6,91E-05	**	4,717,903	2,99E+04	**
T14 vs. T17	57,352,761	0,01662745	**	0,8517261	0,35606448	NS
T14 vs. T18	1,512,565	0,000100587	**	409,318	0,0430565620	NS
T14 vs. T19	127,900,692	0,000348464	**	0,01845712	0,8919343564	NS
T14 vs. T20	28,431,113	9,71E-02	**	2,901,667	8,85E+04	**
T14 vs. T21	17,542,103	2,81E+01	**	2,902,123	8,85E+04	**
T14 vs. T22	36,090,150	1,88E-03	**	0,202723	6,53E+05	**
T14 vs. T23	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
T14 vs. T24	181,880,519	2,00E+01	**	0,03536778	8,51E+05	**
T14 vs. T25	2,33E+05	1,39E+00	**	5,37E+02	9,82E+05	**
T15 vs. T16	217,984,753	3,03E+00	**	0,3282145	5,67E+05	**
T15 vs. T17	205,411,401	5,84E+00	**	0,5095808	4,75E+05	**
T15 vs. T18	365,423,455	1,49E-03	**	0,2061384	6,50E+05	**
T15 vs. T19	26,401,626	2,77E-01	**	4,070,817	4,36E+04	**
T15 vs. T20	379,061,541	7,42E-04	**	0,9955548	3,18E+05	**
T15 vs. T21	261,941,942	3,09E-01	**	0,9950711	3,19E+05	**
T15 vs. T22	480,134,712	4,23E-06	**	0,6312353	4,27E+05	**
T15 vs. T23	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
T15 vs. T24	27,319,396	1,72E-01	**	2,171,865	1,41E+05	**
T15 vs. T25	32,766,215	1,04E-02	**	1,737,071	1,88E+05	**
T16 vs. T17	57,543,906	3,31E-08	**	1,653,922	1,98E+05	**
T16 vs. T18	767,484,061	0,0000000	**	0,01204195	0,9126189	NS
T16 vs. T19	54,248,720	1,77E-07	**	6,844,372	8,89E+03	**
T16 vs. T20	518,746,834	5,92E-07	**	0,5078984	4,76E+05	**
T16 vs. T21	405,216,340	1,94E-04	**	0,5094451	4,75E+05	**
T16 vs. T22	6,614,755	4,44E-10	**	133,196	2,48E+05	**
T16 vs. T23	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
T16 vs. T24	47,104,878	6,73E-06	**	3,928,911	4,75E+04	**
T16 vs. T25	50,774,048	1,04E-06	**	3,554,577	5,94E+04	**
T17 vs. T18	1,565,786	0,2108200	NS	1,386,104	0,2390642	NS
T17 vs. T19	2,985,371	0,08402004	NS	1,929,633	0,16479862	NS
T17 vs. T20	15,860,733	6,82E+01	**	1,709,762	1,91E+05	**
T17 vs. T21	8,131,036	0,004351389	**	1,709,551	0,191043649	NS
T17 vs. T22	252,654,285	5,00E-01	**	0,03703456	8,47E+05	**
T17 vs. T23	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS

<i>T17 vs. T24</i>	92,691,422	0,002330468	**	0,7704681	0,380072277	NS
<i>T17 vs. T25</i>	128,163,005	0,000343612	**	0,5016714	0,4787666277	NS
<i>T18 vs. T19</i>	0,3125616	0,57611252	NS	59,569,946	0,01465901	**
<i>T18 vs. T20</i>	123,809,347	0,00043374	**	0,6503427	0,41999019	NS
<i>T18 vs. T21</i>	48,287,903	0,02798826	**	0,6502663	0,42001748	NS
<i>T18 vs. T22</i>	2,040,404	6,27E+00	**	135,563	2,44E+05	**
<i>T18 vs. T23</i>	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
<i>T18 vs. T24</i>	4,996,424	0,02539974	**	3,496,809	0,06148721	NS
<i>T18 vs. T25</i>	7,981,748	0,00472513	**	2,940,270	0,08639627	NS
<i>T19 vs. T20</i>	7,842,370	0,005103564	**	3,890,392	0,048563085	**
<i>T19 vs. T21</i>	2,459,290	0,1168316	NS	4,322,117	0,0376201	**
<i>T19 vs. T22</i>	178,955,164	2,33E+01	**	0,9404312	3,32E+05	**
<i>T19 vs. T23</i>	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
<i>T19 vs. T24</i>	344,817,617	0,06332161	NS	0,07370096	0,78602249	NS
<i>T19 vs. T25</i>	58,561,235	0,01552295	**	0,1837525	0,66816806	NS
<i>T21 vs. T22</i>	4,422,140	0,03547552	**	1,968,433	0,16061433	NS
<i>T21 vs. T23</i>	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
<i>T21 vs. T24</i>	0,0358264	0,84987443	NS	31,019,330	0,07819939	NS
<i>T21 vs. T25</i>	0,3972724	0,5285013	NS	26,274,836	0,1050280	NS
<i>T22 vs. T23</i>	796,252,606	0,004775572	**	0,09238964	0,761160920	NS
<i>T22 vs. T24</i>	50,991,486	0,02393759	**	0,2292607	0,63207253	NS
<i>T22 vs. T25</i>	33,347,396	0,06783114	**	0,2181367	0,64046331	NS
<i>T23 vs. T24</i>	20,231,107	0,1549215	NS	0,2851592	0,5933394	NS
<i>T23 vs. T25</i>	0,8779964	0,3487510	NS	0,2676027	0,6049444	NS
<i>T24 vs. T25</i>	0,300619451	0,5834943	NS	0,009189848	0,9236288	NS

ANEXO 7 – COMPARATIVO DE MODELOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE COMPLEMENTO LOG-LOG

Tabela comparativa dos parâmetros estimados em diferentes classes de modelos

Concentração Letal (CL) 50% e 90%, Erro Padrão (EP), e Coeficiente de Variação (CV) obtidas a partir de diferentes classes de modelos: log-logístico com dois parâmetros (LL.2), Weibull tipo 1 com dois parâmetros (W1.2) e Weibull tipo 2 com dois parâmetros (W2.2).

Espécie/ínstar	Tratamento	Modelo	CL ₅₀	SE	CV (%)	CL ₉₀	SE	CV (%)	R ² (Y,Ŷ)
<i>C. includens</i> - 3º ínstar	ChinNPV	LL.2	3939	1923	49	14738	14080	96	96
		W1.2	3584	2433	68	41954	68479	163	90
		W2.2	4476	2046	46	12292	7249	59	96
	ChinNPV+FB 28	LL.2	22	8	36	65	38	58	98
		W1.2	20	6	32	69	45	65	98
		W2.2	23	11	49	79	38	48	98
<i>C. includens</i> - 4º ínstar	ChinNPV	LL.2	8733	5549	64	123116	196348	159	90
		W1.2	7946	4661	59	160821	295758	184	91
		W2.2	9692	6818	70	94603	114242	121	87
	ChinNPV+FB 28	LL.2	738	277	38	2826	1942	69	85
		W1.2	718	227	32	2944	2231	76	86
		W2.2	750	361	48	2794	1469	53	83