

PRECIPITAÇÕES PLUVIOMÉTRICAS NA EFICIÊNCIA DO BACULOVÍRUS
Anticarsia gemmatilis NPV NA CULTURA DA SOJA

VALTER MARTINS PESSÔA

PRECIPITAÇÕES PLUVIOMÉTRICAS NA EFICIÊNCIA DO BACULOVÍRUS
Anticarsia gemmatalis NPV NA CULTURA DA SOJA

VALTER MARTINS PESSÔA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Dr. Flávio Moscardi (*In Memoriam*)

Co-Orientador: Dr. Adeney de Freitas Bueno

633.348
P475p

Pessôa, Valter Martins.

Precipitações pluviométricas na eficiência do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV na cultura da soja / Valter Martins Pessôa. – Presidente Prudente, 2012.

36 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Flavio Moscardi.

Co-orientador: Adeney de Freitas Bueno, Fabiane Cunha.

1. Soja. 2. Controle biológico. 3. Fatores abióticos. 4. Vírus. 5. *Glycine max.* I. Título.

VALTER MARTINS PESSÔA

**PRECIPITAÇÕES PLUVIOMÉTRICAS NA EFICIÊNCIA DO BACULOVÍRUS
Anticarsia gemmatalis MNPV NA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Presidente Prudente, 19 de outubro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiane Cunha
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Vânia Maria Ramos
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Londrina - PR

DEDICATÓRIA

Ao meu pai João Pessôa de Lira (In memoriam), a minha mãe Dirce Martins de Lira,
a minha esposa Eliane Andreo de Oliveira Pessôa, aos meus Filhos Vinícius e
Matheus pelo amor, carinho, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Ao Instituto Emater, pela oportunidade oferecida e apoio para a realização deste curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade do Oeste Paulista, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos Co-orientadores, Dr. Adeney de Freitas Bueno, e Dra. Fabiane Cunha, pelos ensinamentos transmitidos, dedicação e compreensão.

Ao Dr. Flavio Moscardi (In memoriam), pelo apoio, e lição de vida que nos transmitiu.

À EMBRAPA Soja, pelo fornecimento de suas instalações para a execução deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Unoeste, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas da Emater pela ajuda na condução dos trabalhos.

Aos colegas de turma da UNOESTE, pela amizade, companheirismo e solidariedade.

Aos colegas da EMBRAPA Soja de Londrina, Carneiro, Ivanilda, Gustavo pelos ensinamentos, incentivo, apoio técnico e equipamentos para condução dos trabalhos.

A Dra. Talita Moretto Alexandre pela colaboração e disponibilidade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Uma coisa lançou profundas raízes em mim: a convicção de que a moral é o fundamento das coisas, e a verdade, a substância de qualquer moral. A verdade tornou-se meu único objetivo. Ganhou importância a cada dia. E também a minha definição dela se foi constantemente ampliando.” (*Mahatma Gandhi*).

RESUMO

Precipitações pluviométricas na eficiência do Baculovírus *Anticarsia gemmatalis* NPV na cultura da soja

O nucleopoliedrovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) é importante no controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Entretanto, fatores ambientais, como as precipitações após as aplicações, podem reduzir sua eficiência. Este trabalho avaliou o impacto de precipitações pluviométricas, com diferentes intensidades 0; 10; 20; 30 mm, respectivamente, utilizando um tempo de 20 minutos para a precipitação de 10 mm, 40 minutos para a precipitação de 20 mm e 60 minutos quando a precipitação foi de 30 mm. As precipitações foram realizadas com o auxílio de micro-aspersores, em casa-de-vegetação, sobre a eficiência de AgMNPV produzidos de forma macerada e liofilizada no controle de *A. gemmatalis*. Os bioensaios para eficiência do vírus foram conduzidos em condições de laboratório (UR $70 \pm 10\%$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (intensidades de precipitações pluviométricas) x 2 (formulações de vírus, macerada e liofilizada) com 4 repetições. A unidade experimental foi constituída por um vaso com plantas de soja. Os resultados obtidos comprovam que precipitações pluviométricas até 30 mm não reduziram a mortalidade das lagartas causada por AgMNPV em ambas as formas de produção, macerada e liofilizada. A diferença foi constatada quanto a forma de produção do baculovírus, sendo que o produto macerado provocou maior mortalidade das lagartas, a partir do terceiro dia após a aplicação, com mortalidade acima de 90%, até o sexto dia da aplicação do vírus. Já o baculovírus na forma liofilizada, após o terceiro dia da aplicação do vírus, houve uma redução acentuada na mortalidade das lagartas chegando a 40% no sexto dia.

Palavras chave: Controle biológico, fatores abióticos, vírus, *Glycine max*.

ABSTRACT

Rainfall in the efficiency of Baculovirus *Anticarsia gemmatalis* NPV in soybean

The *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) is important in controlling the caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. However, environmental factors such as rainfall after application may reduce its efficiency. This study evaluated the impact of rainfall, with different intensities 0, 10, 20, and 30 mm, respectively, using a time of 20 minutes for precipitation of 10 mm, 40 minutes for precipitation of 20 mm and 60 minutes when precipitation was 30 mm. The precipitations were carried out with the aid of micro-sprinklers in a green house on the efficiency AgMNPV produced in lyophilized form and macerated in control of *A. gemmatalis*. Bioassays for efficiency of virus were conducted under laboratory conditions ($70 \pm 10\%$, $25 \pm 20\text{C}$) in a completely randomized in a factorial 4 (rainfall intensities) x 2 (virus formulations, lyophilized and macerated) with 4 repetitions. The experimental unit consisted of a bowl of soybean plants. The results show that rainfall up to 30 mm did not reduce the mortality of larvae caused by AgMNPV in both forms of production, macerated and lyophilized. The difference was reported as the shape of production of baculovirus, and the mash product caused higher mortality of larvae from the third day after the application, with a mortality rate above 90% by the sixth day of application of the virus. Since the baculovirus in lyophilized form, after the third day of the application of the virus, there was a marked reduction in mortality of larvae reaching 40% on the sixth day.

Keywords: Biological control, abiotic factors, virus, *Glycine max*.

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 Composição da dieta artificial para alimentação de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* utilizada no experimento (g/1.000g de dieta). 23

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Número de lagartas mortas (média \pm EP) e mortalidade (%) de *Anticarsia gemmatalis* por baculovírus *Anticarsia* (AgMNPV) ao longo do tempo sob diferentes precipitações pluviométricas (n=32). 27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	14
2.1 Aspectos econômicos da cultura da soja.	14
2.2 Importância e danos da lagarta da soja.....	14
2.3 Controle Biológico.	15
2.4 Baculovírus: Características gerais.	16
2.5 Efeitos subletais de baculovírus nos seus hospedeiros.	18
2.6 Baculovírus AgMNPV.	19
2.7 Fatores limitantes para o uso do baculovírus.	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.	22
3.1 Semeadura e tratos culturais da soja.	22
3.2 Criação da lagarta-da-soja	22
3.3 Preparo da dieta artificial.....	23
3.4 Modos de preparação do vírus.....	24
3.5 Concentração de baculovírus utilizada.....	24
3.6 Aplicação do baculovírus.....	24
3.7 Simulação de precipitação.	24
3.8 Bioensaios.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5 CONCLUSÕES.	30
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

No cenário agrícola atual, a pressão da sociedade por alimentos isentos de agrotóxicos, a preocupação com a poluição ambiental, a exigência de boas práticas de manejo, tem levado os consumidores a uma forte preferência por produtos que são cultivados em ambientes com menor exposição a inseticidas químicos (LISANSKI, 1994). Exemplo disto é o aumento do mercado de produtos orgânicos que estão livres de inseticidas químicos, ou, até mesmo, ausentes de defensivos agrícolas (LEVIDOW; BIJMAN, 2002). Segundo Hamilton et al.(2003), a utilização de inseticidas químicos é o problema mais sério em relação à qualidade dos alimentos consumidos mundialmente. Nesse sentido abrem-se oportunidades para o emprego de inseticidas biológicos à base de vírus entomopatogênicos dentro do contexto de agricultura sustentável, como mais uma ferramenta na regulação de lepidopteros-praga (MOSCARDI, 1999). Entre esses vírus os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus patogênicos a artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera, Hymenoptera e Díptera (THEILMANN et al., 2005). Muitos desses são considerados ou realmente usados como agentes de controle biológico de insetos praga, como é o exemplo do Baculovirus *Anticarsia* (AgMNPV) (MOSCARDI, 1999).

AgMNPV foi detectado pela primeira vez no início da década de 1970 e isolado de lagartas mortas de *A. gemmatalis*, coletadas em soja no município de Campinas, SP (ALLEN; KNELL, 1977), e posteriormente detectado em várias outras regiões do Brasil (CARNER; TURNIPSEED, 1977; CORSO et al., 1977). Os primeiros ensaios em campo já demonstraram que esse vírus era eficiente para uso como inseticida microbiano contra a lagarta-da-soja (CARNER; TURNIPSEED 1977; MOSCARDI et al., 1981). Sendo assim, o seu uso teve um aumento progressivo desde a safra de 1982/83 (2.000 ha), registrando-se um crescimento significativo na safra 1984/85 (200.000 ha), com a implementação de unidades regionais de produção no sul do país. Na safra 1989/90, a área tratada atingiu cerca de 1.000.000 ha (MOSCARDI; SOSA-GOMES, 1992), alcançando uma extensão de aproximadamente 1,8 milhões de hectares na safra 2003-2004 (MOSCARDI et al., 2011), também sendo utilizado em outros países, como a Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, e Uruguai. Além disso, AgMNPV teve uso expressivo em cerca de 150.000 ha, no Paraguai (MOSCARDI, 1999).

O Programa de controle biológico aplicado, utilizando-se o AgMNPV, sempre foi caracterizado pela eficiência no controle da praga e principalmente pela facilidade de aplicação do vírus pelo sojicultor que, em geral, coletava na cultura lagartas-da-soja infectadas pelo vírus e, após macerá-las em água realizava a pulverização da suspensão, ou, em alguns casos, utilizavam o pó liofilizado (formulações comerciais) (MOSCARDI, 1999). Apesar do grande sucesso desse programa, nos últimos anos, a área onde esse vírus é aplicado vem sendo reduzida gradativamente. Isso pode ser considerado um grande erro por parte dos sojicultores, porque o AgMNPV para o controle da *A. gemmatalis* constitui-se em um componente fundamental para ser incorporado em programas de manejo integrado de pragas da soja (MIP-Soja), visando a redução da aplicação de agrotóxicos com maior impacto ambiental e não seletivos aos inimigos naturais. Entretanto, é importante salientar que esses patógenos tem ação lenta (aproximadamente sete a oito dias) e são muito sensíveis a fatores climáticos, como precipitações que podem ocorrer após sua aplicação, gerando sempre a dúvida se a intensidade e a quantidade da precipitação pluviométrica foi o suficiente para afetar a eficiência do vírus na folha tratada, e com isso reduzir sua eficiência no controle da praga alvo.

Desta maneira o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de diferentes intensidades pluviométricas de reduzirem ou não a eficiência desse patógeno no controle de *A. gemmatalis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos econômicos da cultura da soja

A produção mundial de soja na safra 2010/2011 foi de aproximadamente 264 milhões de toneladas, com uma área de aproximadamente 104 milhões de hectares (USDA, 2011). Somente atrás dos Estados Unidos, o Brasil é o seu segundo maior produtor, sendo responsável por 28% da produção mundial, produzindo 75 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 24 milhões de hectares (CONAB, 2011).

Os teores altos de óleo (20%) e proteína (40%), somado aos níveis adequados de produtividade de grãos, nos mais diversos ambientes, fazem da soja uma das leguminosas mais importantes de todo mundo, sendo atualmente a principal fonte de proteína vegetal disponível (VELLO; SILVA, 2006). De alto valor nutricional e muito versátil, a soja dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos, e seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto (EMBRAPA SOJA, 2009). Além disso, a soja possui diversos compostos, tais como: minerais, vitaminas e compostos bioativos (isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de proteases) que fazem dela uma opção alimentar saudável e popular entre as pessoas preocupadas em melhorar a qualidade de vida (CARRÃO-PANIZZI, 2006) e também como fonte de energia renovável através de utilização desta como biodiesel.

Dentre as pragas, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) é uma das principais pragas que afetam o desenvolvimento e produção de soja. A lagarta-da-soja é encontrada em todos os locais de cultivo, sendo o desfolhador mais comum da soja no Brasil. O desfolhamento pode chegar a 100% e, durante a fase larval com duração de 12 a 15 dias, cada lagarta pode consumir de 100 a 150 cm² de área foliar (HOFFMANN-CAMPO, 2000).

2.2 Importância e danos da lagarta-da-soja

A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a

qualidade de ambas, causando perdas significativas na produção da cultura (ANDRADE et al., 2004).

Dentre as pragas mais importantes, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), apresenta-se como a lagarta desfolhadora que acarreta maiores prejuízos para a cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000) considerada uma das principais pragas da soja no hemisfério ocidental (HERZOG; TOOD, 1980). Sua época de ocorrência está correlacionada à latitude onde se encontra a lavoura tendo sido observado que os ataques mais precoces ocorrem em latitudes mais baixas (GAZZONI et al., 1988). Inicialmente as lagartas mais novas raspam as folhas, produzindo pequenos danos, mas à medida que crescem, ficam mais vorazes, destruindo as folhas até hastes mais finas. Para completar seu desenvolvimento, cada lagarta consome cerca de 100 a 150 cm² de área foliar (HOFFMANN-CAMPO, 2000); desta forma, altas infestações desse inseto em lavouras de soja podem comprometer a produção em função do nível de infestação e do estágio fenológico da cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

2.3 Controle biológico com Baculovírus

Os Baculovírus têm sido isolados de uma ampla gama de invertebrados. O interesse em desenvolver esses patógenos em inseticida biológico existe há mais de 40 anos. Nessa categoria, enquadram-se os vírus envoltos por uma capa, denominados de Baculovírus, cuja família é Baculoviridae (THEILMANN et al., 2005). Esses vírus são os mais estudados por serem mais facilmente encontrados na natureza e devido a sua notável capacidade de causar epizootias no campo, contribuindo para manter o nível populacional de insetos abaixo do nível de dano econômico. Logo, são considerados promissores para o desenvolvimento de produtos microbianos. Os baculovírus possuem inúmeras vantagens sobre os inseticidas químicos convencionais, possibilitando o seu uso em programas de manejo integrado de pragas (MIP). Provavelmente a mais importante delas é sua alta especificidade em relação ao hospedeiro, não sendo nocivo aos insetos benéficos. Além disso, esses patógenos apresentam alta persistência no ambiente. Outro aspecto relevante é que podem ser produzidos no próprio inseto-hospedeiro, dispensando mão-de-obra intensiva e, portanto, sem grandes custos (CORY; BISHOP, 1997). A segurança dos vírus entomopatogênicos ao homem e a outros

animais vertebrados está bem relatada na literatura. Mais de vinte espécies de vertebrados, incluindo o homem, já foram sistematicamente expostas à maioria desses vírus. Não foram detectados casos de toxicidade viral ou patogenicidade em animais vertebrados. No Brasil, a eficiência de vírus no controle de insetos-pragas é uma realidade para algumas culturas como soja, milho e mandioca com o uso dos baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfNPV) e *Erinnyis ello* granulovirus EeGV, respectivamente (RIBEIRO et al., 1998). E o controle da lagarta-da-soja pelo AgMNPV, desenvolvido e coordenado pelo Centro Nacional de Pesquisas da Soja/Embrapa, em Londrina PR, iniciado na década de 1980, foi o maior programa mundial de uso de vírus de insetos, onde os resultados desse trabalho promoveram a redução de 70% dos custos de controle, quando comparado ao uso de agrotóxicos, além das vantagens ecológicas atribuídas à alta especificidade do produto e inocuidade ao ambiente. Para cada 1 milhão de hectares tratados com o vírus, cerca de 1,6 milhão de litros de inseticidas não eram aplicados anualmente, e conseqüentemente, houve uma economia de milhões de dólares (RIBEIRO et al., 1998; MOSCARDI, 1999). Estimulados por esse sucesso, outros vírus com potencial de uso foram isolados de pragas importantes de culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestais (RIBEIRO et al., 1998).

2.4 Baculovírus: Características gerais

Os baculovírus estão subdivididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) devido ao tamanho, morfologia e formação protéica dos seus corpos de oclusão. As proteínas de oclusão, principalmente a poliedrina para os NPV e granulina para GV, correspondem cerca de 95% do conteúdo protéico das partículas OB, variando de 25-33 Quilo Dalton (kDa) (THEILMANN et al., 2005).

Nos *Nucleopolyhedrovirus*, os corpos de oclusão possuem formato poliédrico e podem medir de 0,15 a 15 μm (ROHRMANN, 1999). Essas partículas OB são comumente chamadas de poliedros e podem conter vírions com um único nucleocapsídeo (*single* – SNPV) ou com dois ou mais nucleocapsídeos por envelope, sendo do tipo múltiplo (*multiple* – MNPV). O envelopamento e montagem

dos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo das células hospedeiras (THEILMANN et al., 2005).

Nos *Granulovirus*, os corpos de oclusão são pequenos grânulos com formato oval, variando em tamanho de 0,3 a 0,5 μm , geralmente, contendo em seu interior uma partícula viral (ou, mais raramente, duas). Estas partículas são montadas entre os conteúdos nuclear e citoplasmáticos da célula após a ruptura da membrana.

Trabalhos mais recentes têm mostrado que a divisão dos baculovírus baseada na morfologia das partículas de oclusão não reflete a história evolucionária dos NPV (HERNIOU et al., 2004; JEHLE et al., 2006). Estudos filogenéticos revelaram que o gênero NPV da família *Baculoviridae* pode ser subdividido em dois grupos: NPV do grupo I e NPV do grupo II. Partículas *Budded virus* do grupo I de NPV contêm a glicoproteína GP64 como a principal proteína do envelope, no entanto, outra proteína de fusão do envelope denominada proteína F (*open Reading frame* – ORF *id-130*) é característica de NPV do grupo II (PEARSON et al., 2000; HERNIOU et al., 2001). Subdivisões desses grupos foram propostas com base na análise filogenética das sequências dos aminoácidos da poliedrina e da DNA polimerase (ZANOTTO et al., 1993; BULACH et al., 1999; DALMOLIN et al., 2005).

HERNIOU et al. (2004) demonstraram uma clara divisão dos dois novos gêneros. Determinaram então que NPV de Diptera e Hymenoptera são grupos filogeneticamente separados dos grupos NPV e GV de Lepidoptera. Recentemente, JEHLE et al. (2006), utilizando-se de uma análise filogenética comparativa entre 29 genomas de baculovírus, propuseram uma nova classificação e nomenclatura para a família *Baculoviridae*, que foi subdividida em quatro gêneros de acordo com o tipo de inseto hospedeiro:

1. Alfabaculovírus: compreendem os SNPV e MNPV de lepidópteros que produzem ambos os fenótipos virais, *Budded Virus* (BV) e *Occluded Derived Virus* (ODV).
2. Betabaculovírus: compreendem os GV de lepidópteros que produzem ambos os fenótipos virais, BV e ODV.
3. Gamabaculovírus: compreendem os SNPV de himenópteros que não possuem genes para a formação da partícula BV, sugerindo sua ausência.
4. Deltabaculovírus: compreendem os NPV de dípteros que produzem ambos os fenótipos virais, BV e ODV.

Em estudos com larvas de lepidópteros infectadas com NPV, observou-se que, em geral, a infecção leva a uma série de mudanças comportamentais e morfológicas que culminam na morte da larva após alguns dias. Há uma redução na alimentação larval e retardo do crescimento do inseto, sendo que na maioria das vezes não ocorre a mudança de instar. Além disso, o inseto perde a coloração original do tegumento, tornando-se mais claro. No estágio terminal da infecção, duas proteínas virais, catepsina e quitinase, atuam em conjunto para facilitar a desintegração da cutícula do hospedeiro (HAWTIN et al, 1997). Após a morte, a cutícula da larva se desintegra e rompe, liberando grandes quantidades de OB (occlusion body) no ambiente. Estes servem de inóculo para infectar novas populações do inseto hospedeiro (GRANADOS; FREDERICI, 1986; VOLKMAN; KEDDIE, 1990). Os OB são responsáveis pela transmissão horizontal do vírus (inseto – inseto). Devido ao fato da partícula viral ODV (occluded derived vírus) ser a responsável pela infecção primária de células do intestino médio da lagarta, o estudo da quantidade e qualidade dessas partículas na formação dos OB, assim como da quantidade e qualidade dos OB, são de fundamental importância para a investigação da virulência do Baculovírus.

2.5 Efeitos subletais de baculovírus nos seus hospedeiros

Muitos estudos com patógenos em populações de Lepidoptera focam principalmente a mortalidade e suas causas diretas. Todavia, as doenças podem também reduzir a capacidade reprodutiva do hospedeiro e aumentar a sua suscetibilidade a outros agentes de mortalidade, afetando o valor adaptativo da praga (ROTHMAN; MYERS, 1996). Os efeitos subletais ou secundários das infecções virais devem ser considerados como relevantes na dinâmica populacional de lepidópteros, bem como os mecanismos fisiológicos onde interferem quando se está avaliando o potencial da doença ao controle de um inseto praga. Baculovírus podem afetar o ciclo do inseto, reduzindo sua capacidade adaptativa e, conseqüentemente, diminuindo suas chances de sobrevivência e multiplicação num determinado ambiente (ROTHMAN; MYERS, 1996; MOSCARDI, 1999). Esses efeitos podem ocorrer devido ao desvio das reservas energéticas do hospedeiro para suportar ou combater o patógeno, distúrbios no desenvolvimento de oócitos

nas fêmeas ou mudanças hormonais induzidas pelo patógeno (O'REILLY; MILLER; 1989; BURAND; PARK, 1992).

2.6 Baculovírus AgMNPV

O baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é um vírus de DNA circular de fita dupla e genoma com 132.239 pb, patogênico em lepidopteros e pertencente ao gênero alfabaculovírus (JOHNSON; MARUNIAK, 1989; OLIVEIRA et al., 2006; JEHLE et al., 2006). O AgMNPV foi isolado de larvas de *A. gemmatalis* coletadas em Campinas/SP (ALLEN; KNELL, 1977), a partir daí, vários isolados foram identificados e caracterizados, dentre eles destaca-se o isolado de AgMNPV (LD-79) obtido em 1979, a partir de larvas de *A. gemmatalis* infectadas no campo de cultivo de soja perto de Londrina/PR. Este isolado é rotineiramente produzido *in vivo* para uso como um bioinseticida no Brasil (MOSCARDI, 1989) e aplicados na cultura de soja, para o controle biológico do seu hospedeiro natural *A. gemmatalis*.

Geralmente, uma aplicação bem sucedida de baculovírus é suficiente para manter o controle durante todo o ciclo da cultura, porque há uma reposição e redistribuição do vírus, devido aos focos deixados pelas lagartas mortas e pela grande quantidade de inóculos lançados na lavoura (SECCHI, 2002).

A utilização do Baculovírus AgMNPV no Brasil, já representou o maior programa mundial de aplicação de inseticida biológico viral como controle de pragas. sendo aplicado anualmente para o controle da lagarta-da-soja, em mais de um milhão de hectares de soja (MOSCARDI, 1999) o que proporcionava anualmente ao país, uma economia de 13 milhões de reais ao ano, uma vez que eliminava a aplicação de cerca de 1,5 milhão de litros de inseticidas nas lavouras brasileiras (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

O uso desse vírus aumentou de um milhão de hectares em 1990, para aproximadamente 1,5 milhões de hectares em 1995, com seu uso aumentando a cada safra. O pico de utilização do AgMNPV ocorreu na safra 2003/2004, onde aproximadamente dois milhões de hectares foram tratados com o vírus (MOSCARDI et al, 2011). Entretanto, devido a mudanças nas práticas culturais pelos sojicultores, o uso do AgMNPV apresentou um drástico declínio nos últimos oito anos, para aproximadamente 300.000 ha por ano (MOSCARDI et al., 2011).

O retrocesso no programa de manejo integrado de pragas (MIP Soja) nesses últimos anos se deve ao abandono da amostragem de pragas e de outros procedimentos recomendados pelo programa. Isso levou a práticas equivocadas pelos sojicultores, como o “aproveitamento” de operações, tais como mistura de inseticida de amplo espectro com herbicidas utilizados na dessecação e pós-emergentes. Essas práticas são prejudiciais aos inimigos naturais, causando desequilíbrio no sistema de produção, promovendo insetos/organismos outrora secundários na cultura como insetos de importância econômica, a exemplo da lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera spp.*, ácaros, mosca - branca, dentre outros. Os sojicultores, com isso, entram num círculo vicioso, o que gera mais aplicações. Passam a aplicar inseticidas contra essas pragas, não sendo possível utilizar um produto biológico, como o AgMNPV, que só controla a lagarta-da-soja, levando a uma redução drástica no uso desse inseticida biológico (MOSCARDI et al., 2011).

2.7 Fatores limitantes para o uso do Baculovírus

O sucesso de um programa de uso de baculovírus depende de uma combinação de fatores, incluindo a seleção do isolado mais virulento, momento adequado da aplicação (uma vez que os estágios iniciais são os mais suscetíveis e as larvas podem levar de sete a dez dias para morrerem), monitoramento populacional frequente, tecnologia apropriada de aplicação, condições climáticas, dentre outros (MOSCARDI et al., 2011).

Dois fatores ambientais como a radiação da luz solar e precipitação pluviométrica podem afetar significativamente a persistência de inseticidas microbianos (IGNOFFO 1992). Contudo a radiação da luz solar é fator que mais afeta a persistência do Baculovírus no campo, onde a exposição do vírus à luz solar do ambiente de campo ou à luz UV, prejudicam atividade viral devido à desidratação e inativação do seu DNA (SZWECZYK et al., 2006). A atividade viral pode ser completamente comprometida em menos de 24 horas, mas a meia vida varia de 2 a 5 dias. Radiação ultravioleta (UV-B) na região do espectro (280-310 nm) inativa baculovírus. No entanto, (UV-A) na região do espectro (320-400 nm) também pode ser crítica na desativação do Baculovírus (IGNOFFO, 1966; BULLOCK, 1967; JAQUES, 1968; IGNOFFO; BATZER, 1971).

Em relação aos efeitos da precipitação pluviométrica sobre a ação dos baculovírus, é surpreendente que tão pouca pesquisa tem sido realizada neste sentido (IGNOFFO et al., 1997). Estes autores pesquisaram o efeito de precipitação pluviométrica sobre ação do *Baculovirus heliothis* na cultura da soja, utilizando chuva simulada de 12,5 mm em 30 segundos, e concluíram que menos de 6% da atividade do baculovírus foi prejudicado com a simulação da precipitação pluviométrica.

Experimentos de laboratório mostraram que quando o granulovírus de *Pieris brassicae*, na sua formulação bruta ou parcialmente purificada foram aplicadas nas folhas de repolho, os materiais não foram significativamente removidos pela exposição por cinco horas de chuva simulada, ou por lavagem com detergente (DAVID; GARDINER, 1966). No entanto YOUNG (1990), relatou que vírus (corpos de inclusão) de cadáveres de *A. gemmatalis* e *C. includens*, foram dispersados e lavados das folhas de soja após serem submetidas a 62,5 mm de irrigação por aspersão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Semeadura e tratos culturais da soja

Utilizou-se sementes de soja variedade BRS 284, semeadas em 36 vasos de plástico (volume = 3,0L), medindo 21 cm de diâmetro e 17 cm de altura. A adubação da cultura ocorreu de acordo com o resultado da análise de solo, seguindo as recomendações da cultura (RAIJ et al., 1999). Posteriormente, esses vasos foram acondicionados em casa-de-vegetação, onde a irrigação por gotejamento foi realizada de forma contínua, para manter a umidade do solo. O desbaste foi realizado no estágio V1 da cultura (escala fenológica de FEHR et al., 1971), aos oito dias após a emergência das plantas, mantendo-se quatro plantas/vaso.

3.2 Criação da Lagarta-da-soja

Os espécimes utilizados no experimento foram provenientes de pupas oriundas da criação de insetos do laboratório da Embrapa Soja. Esses insetos são criados a sucessivas gerações em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotofase de 14h.

Para a obtenção de adultos, as pupas de lagarta-da-soja foram mantidas sob as mesmas condições controladas descritas acima, colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50 cm revestida com folhas de papel sulfite (para os adultos ovipositarem). Após a emergência, as mariposas foram alimentadas com solução nutritiva composta de cerveja (200ml) e solução vitamínica (300ml), embebida em um chumaço de algodão colocado sobre uma placa de Petri, dentro da gaiola.

As coletas de posturas de *A. gemmatalis* foram realizadas, removendo-se os ovos da superfície do papel sulfite. As folhas de papel foram retiradas e cortadas em tiras (2,0 x 3,0 cm de largura e comprimento, respectivamente), sendo posteriormente colocadas em copos plásticos de 300,0 mL, e fechados com tampa plástica. Os copos foram transferidos para uma câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Imediatamente após a eclosão das lagartas (dois a três dias), as mesmas desenvolveram-se em dieta

artificial (GREENE, 1976; HOFFMANN-CAMPO, 1985), até atingirem o terceiro instar, quando então foram destinadas ao estudo do experimento.

3.3 Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi elaborada com a seguinte composição (Quadro 1)

Quadro 1: Composição da dieta artificial para alimentação de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, utilizada no experimento (g/1.000g de dieta).

Ingredientes	Controle
Feijão	62,5
Germe de trigo	50,0
Proteína de soja	25,0
Caseína	25,0
Levedo de cerveja	31,2
Agar – Agar	20,0
Ácido ascórbico	3,0
Ácido sórbico	1,5
Nipagin	2,5
Antibiótico	0,125
Solução vitamínica	7,5
Formol 40%	3,0

Estes ingredientes foram processados e misturados com água destilada, nesta ordem. Com o auxílio de um liquidificador. Em seguida a mistura foi ao fogo em um fogão industrial por 50 minutos em agitação. O ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin antibiótico, solução vitamínica e o formol foram adicionados após o resfriamento da mistura e agitada até formar uma pasta homogênea, a qual foi transferida para copos plásticos de 50 ml, na quantidade de 15 ml de dieta por copo. Em seguida os copos foram colocados sob luz ultravioleta por 40 minutos para desinfecção e conservada a temperatura de 4^o C.

3.4 Modos de preparação do vírus

Baculovírus liofilizado: foi utilizado um produto comercial (Coopervírus®) com a composição de 73% de caulinita e 26,4% de matéria orgânica. A concentração do baculovírus foi de $7,0 \times 10^9$ corpos de poliedros de inclusão (cpi)/g do produto.

Baculovírus macerado: foi obtido com o esmagamento de lagartas contaminadas com vírus. As lagartas de terceiro instar foram alimentadas com dieta artificial contendo o AgMNPV, onde após sete dias do início da alimentação as lagartas morreram devido a infecção provocada pelo vírus. Imediatamente após a morte, as lagartas foram maceradas, e posteriormente coadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min, obtendo-se uma suspensão na concentração de $3,0 \times 10^9$ cpi/mL de solução.

3.5 Concentração de Baculovírus utilizada

Para os bioensaios padronizou-se a concentração de $2,0 \times 10^{11}$ cpi/ha, a qual é a concentração recomendada para o AgMNPV. Como as concentrações dos vírus foram de $7,0 \times 10^9$ para o liofilizado e $3,0 \times 10^9$ para o macerado, padronizou-se as doses de 0,19g e 0,44mL de inseticida biológico/L de água para o liofilizado e macerado respectivamente. O volume de calda utilizado foi de um litro, aplicado em uma área de 66,67 m², o que corresponde a 150,0 L de volume de calda /ha.

3.6 Aplicação do baculovírus

O baculovírus AgMNPV foi aplicado em plantas de soja estágio V5 (FEHR et al., 1971), com auxílio de um pulverizador costal propulsado a ar comprimido (CO₂), com vazão de 150 L/ha e pressão de 50 libras pol⁻² adaptado com uma barra composta por quatro bicos tipo cone JD 14-1, espaçados de 0,5 metros.

3.7 Simulações de precipitação

A simulação da precipitação pluviométrica foi realizada em casa-de vegetação, por meio de sistema de irrigação por aspersão. Os volumes de chuva utilizados no estudo foram de 10mm (20min), 20mm (40min) e 30mm (60min).

3.8 Bioensaios

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial fatorial 4 (intensidades de precipitação pluviométrica; 0 mm, 10 mm, 20 mm e 30 mm) x 2 (formulações de vírus; macerado e liofilizado), e uma testemunha com 4 repetições, totalizando 36 unidades experimentais (vasos).

Após a aplicação do AgMNPV sobre a área foliar da soja, aguardou-se 30min para as plantas secarem, sendo que posteriormente foram submetidas às precipitações pluviométricas. Em sequência à chuva artificial, aguardou-se novamente por 30 min, para a evaporação da água superficial das folhas. Após isso, foram retirados dois trifólios do terço superior das plantas e fornecidas para as 30 lagartas de *A. gemmatalis* de 3^o instar. Este procedimento foi realizado logo após a aplicação e aos 3, 6 e 9 dias, posteriormente as lagartas foram acondicionadas em caixas de acrílico tipo gerbox, totalizando 36 caixas.

As lagartas se alimentaram das folhas de soja por um período de 48 h, em condições controladas de laboratório (UR $70 \pm 10\%$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 h). Após este período os espécimes foram transferidos para copos plásticos (volume de 50,0 mL), onde se alimentaram com dieta artificial (GREENE, 1976; HOFFMANN-CAMPO, 1985), trocada a cada três dias. Dentro de cada copo foram colocadas três lagartas, com 10 copos/unidade experimental. As avaliações de mortalidade ocorreram diariamente até a morte da praga ou emergência do adulto. Este procedimento, visando avaliar o efeito residual do AgMNPV, foi realizado aos três, seis e nove dias após a aplicação do vírus.

Os resultados obtidos foram submetidos às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos, homogeneidade de variância dos tratamentos e aditividade do modelo, para permitir a aplicação da ANOVA (BURR & FOSTER, 1972; SHAPIRO & WILKS, 1965). Quando necessário, os dados foram transformados em \sqrt{x} e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro (SAS INSTITUTE, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos nesse estudo, verificou-se que de forma geral, o Baculovírus não perdeu eficiência quando as plantas foram molhadas nas diferentes precipitações. Entretanto, o resultado foi diferente quanto ao Baculovirus na sua forma marecada e liofilizada para o efeito residual do vírus ao longo do tempo.

Quando a avaliação foi realizada no mesmo dia da aplicação do baculovírus *Anticarsia*, a precipitação simulada não afetou o desempenho do baculovírus, obtendo-se controle populacional de *A. gemmatalis* em ambas as formas de aplicação do produto (macerado ou liofilizado) (Tabela 1).

Tabela 1. Número de lagartas mortas (média \pm EP) e mortalidade (%) de *Anticarsia gemmatalis* por Baculovírus *Anticarsia* (AgMNPV) macerado e liofilizado, após diferentes níveis de precipitações pluviométricas (n=32), diferentes dias da aplicação do vírus.

Precipitação (mm)	Mesmo dia da aplicação do vírus		3 dias após aplicação do vírus		6 dias após aplicação do vírus		9 dias após aplicação do vírus	
	Macerado	Liofilizado	Macerado	Liofilizado	Macerado	Liofilizado	Macerado	Liofilizado
0	29,50 \pm 0,29 aA (98,33%)	26,75 \pm 0,75 aA (89,17%)	28,75 \pm 0,48 aA (95,83%)	25,25 \pm 1,60 aA (84,17%)	28,00 \pm 0,41 aA (93,33%)	22,50 \pm 1,32 aB (75,00%)	27,50 \pm 0,50 aA (91,67%)	14,25 \pm 1,11 aB (47,50%)
10	29,75 \pm 0,25 aA (99,17%)	25,00 \pm 1,78 aB (83,33%)	29,00 \pm 0,41 aA (96,67%)	24,75 \pm 1,65 aA (82,50%)	27,50 \pm 0,65 aA (91,67%)	14,00 \pm 0,41 bB (46,67%)	20,75 \pm 0,48 bA (69,17%)	12,75 \pm 2,05 aB (42,50%)
20	27,25 \pm 1,11 aA (90,83%)	27,50 \pm 0,29 aA (91,67%)	28,75 \pm 0,63 aA (95,83%)	22,50 \pm 1,04 aB (75,00%)	28,50 \pm 0,65 aA (95,00%)	12,00 \pm 0,81 bB (40,00%)	16,75 \pm 1,93 bA (55,83%)	11,50 \pm 0,65 aB (38,33%)
30	27,25 \pm 1,32 aA (90,83)	27,50 \pm 0,87 aA (91,67%)	27,75 \pm 0,25 aA (92,50%)	23,00 \pm 1,23 aB (76,67%)	27,25 \pm 0,75 aA (90,83%)	13,00 \pm 1,29 bB (43,33%)	21,75 \pm 1,75 bA (72,50%)	10,25 \pm 0,63 aB (34,17%)

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas , e maiúsculas nas linhas em cada dia após a aplicação do vírus, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Alguns estudos demonstram que uma precipitação de 20 mm por 10 min foi suficiente para reduzir expressivamente o número de poliedros da área foliar aplicada, assim como, a eficácia do produto (JANKEVICA et al., 1998). Similarmente, Tamez-Guerra et al. (2000) verificaram que a aplicação de Baculovírus, sem aditivos resistentes à chuva, tem impacto inexpressivo sobre a população de *Trichoplusia ni* após uma simulação de precipitação de 50 mm durante 50 min.

Outros estudos abrangendo uma ampla variação na intensidade de precipitação (12,5 mm em 0,5 min e 121 mm em 30 min) não demonstraram perda na eficácia de Baculovírus *Heliothis* (TUAN et al., 1989; IGNOFFO et al., 1997), assemelhando-se assim, aos resultados do presente trabalho. Desse modo, embora os resultados aqui obtidos sejam consistentes (Tabela 1), deve-se salientar que tais generalizações do efeito da precipitação sobre a ação do Baculovírus devem ser tomadas com precaução, devido a diversa variabilidade de resultados nos diferentes trabalhos. Assim, para uma adequada indicação em condições de campo, sugere-se que deva ser considerado o táxon estudado, produto aplicado (macerado ou liofilizado), formulação do produto (com ou sem aditivos de resistência à chuva) e intensidade de precipitação (mm/h) utilizada na pesquisa.

Quando se faz uma analogia com produtos agrotóxicos, acredita-se que o Baculovírus pode ter vantagens em relação ao curto espaço de tempo que precisa para que a chuva não “lave” o produto. Alguns estudos demonstram que pouco tempo de chuva pode ser suficiente para reduzir expressivamente a eficácia de agrotóxicos aplicados sobre a área foliar, mesmo considerando o intervalo de uma hora após a aplicação (IPOR; PRICE, 1992; THACKER; YOUNG, 1999). Similarmente à esses autores, recentemente FORTUNATO et al. (2011), verificaram que a simulação de precipitação (intensidade de 30 mm/h) após a aplicação de flonicamid (Turbine® 500 WG) interferiu negativamente na eficácia do produto para o controle de *Aphis gossypii*. Desse modo, os resultados apresentados permitem sugerir que, independente da forma de produção (macerado ou liofilizado), o Baculovírus *Anticarsia* tende a apresentar uma maior eficiência à chuva, comparativamente aos agrotóxicos utilizados no combate as pragas.

Comparando as duas formas de preparo do Baculovírus ou seja o macerado e o liofilizado, o Baculovírus na forma macerada apresentarem melhor desempenho

comparativamente ao vírus liofilizado, com manutenção da mortalidade da lagarta acima de 90% até o sexto dia após aplicação. Foi verificada queda na mortalidade de *A. gemmatalis* apenas aos nove dias após a aplicação do Baculovírus *Anticarsia* (Tabela 1). Silva e Moscardi (2002) verificaram que o desempenho da forma de preparação macerada foi superior à todas as formulações liofilizadas testadas, o que foi confirmado no presente estudo. Dentre as possíveis razões para esta diferença, existem duas que merecem destaque: 1) as características físicas da hemolinfa, que apresentam um aspecto de pegajosidade, podem funcionar como uma cola, aumentando a aderência sobre a superfície foliar e, 2) as características dos compostos químicos da hemolinfa podem proporcionar maior proteção aos raios UV (CHERRY et al., 2000), que é o fator climático com maior poder de desativação de Baculovírus (SHAPIRO et al., 2002). Por tais razões, recomenda-se que a aplicação de lagarta macerada é a mais apropriada para obter melhores resultados no controle da lagarta-da-soja, porém, caso o produtor tenha preferência por adotar formulações comerciais (liofilizadas), é indicado que utilize adjuvantes para aumentar a aderência do produto sobre as folhas da cultura.

Outros experimentos mostram que o uso do granulovírus de *Pieris brassicae*, em sua formulação bruta ou parcialmente purificada, aplicado nas folhas de repolho, apresenta elevada resistência de lavagem pela chuva, mesmo em condições de cinco horas de exposição à chuva simulada, assim como, lavagem por detergente (DAVID; GARNIER, 1966). Esses resultados ratificam os resultados aqui apresentados, indicando que o baculovírus apresenta uma grande resistência à lavagem pela chuva, o que demonstra que este método de controle apresenta destacada importância e eficácia na regulação populacional da lagarta-da-soja, apresentando uma boa capacidade de resistência à chuva, principalmente quando comparado aos inseticidas convencionais.

5 CONCLUSÕES

A precipitação pluviométrica até 30 mm, em 60 min, não interfere na eficiência do Baculovírus AgMNPV, para lagartas que se alimentarem no mesmo dia da aplicação, porém o efeito residual é reduzido ao longo do tempo, principalmente para a forma de preparação liofilizada.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, G.; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. **Florida Entomologist**. v. 60, p. 233-240, 1977.
- ANDRADE, F.G; NEGREIRO, M.C. C; FALLEIROS, A.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) relacionados ao controle biológico por Baculovirus anticarsia (AgMNPV). **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 71, p. 391-398, 2004.
- BULACH, D. M. et al. Group II *nucleopolyhedrovirus* subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedron and DNA polymerase gene sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 73, p. 59-73, 1999.
- BULLOCK, H. R. Persistence of *Heliothis* nuclearpolyhedrosis virus on cotton foliage. **J. Invertebr. Pathol.** v. 9, p. 434-436, 1967.
- BURAND, J.P.; PARK, E.J. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 60, p. 171-175, 1992.
- BURR, I. W.; L.A. FOSTER. 1972. **A test for equality of variances**. West Lafayette: University of Purdue, 1972.
- CARNER G.R.; TURNIPSEED, S.G. Potential of a nuclear polyhedrosis vírus for controlo f the velvetbean caterpillar in soybean. **Journal of Economic Entomology**. v. 70, p. 608-610, 1977.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C. Saudável, consumo direto da soja cresce entre brasileiros. **Visão Agrícola**. Piracicaba, n. 5, p. 136-139, 2006.
- CHERRY, A.J. et al. Field avaluation of *Helicoverpa armigera* nucleopolyedrovirus formulations for control of the chickpea pod-borer, *H. armigera* (Hubn.), on chickpea (*Cicer arietinum* var. Shoba) in southern India. **Crop Protection**. v. 19, p. 51-60, 2000.
- CONAB. **Dados safra 2010/2011**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 11 abr. 2012.
- CORSO, I. C.; GAZZONI, D.L.; DE OLIVEIRA E.B.; GATTI, I. M. Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, na Região Sul do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 6, p. 312-314, 1977.
- CORY, J.S.; BISHOP, D.H.L. Use of baculoviruses as biological insecticides. **Molecular Biotechnology**. Totowa, v. 7, p. 303-313, 1997.

- DALMOLIN, C. et al. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. **Virus Research**. v. 110, p. 99-109, 2005.
- DAVID, W. A. L.; GARDINER. Persistence of a granulosis virus of *Pieris brassicae* on Cabbage leaves. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 8, p. 180-183, 1966.
- EMBRAPA SOJA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná 2009/2010**. Londrina, p. 193-248, 2009. (Embrapa Soja. Documentos, 131),
- FEHR, W.R. et al. Stage of development description for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**. v. 11, p. 929-930, 1971.
- FORTUNATO, R.P. et al. Simulate rain about action inseticideflonicamid in the control of the cotton aphid. **Acta Scientiarum**. v. 33, p. 603-606, 2011.
- GAZZONI, D.L. et. al, **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa, CNPSo, 1988. (Circular técnica, 5).
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**. Baltimore, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.
- GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. **The biology of baculoviroses**. CRC Press, v. 1, p.89-108, 1986.
- HAMILTON, S.F.; SUNDING, D.L.; ZILBERMAN, D. Public goods and the value of product quality regulations: the case of food safety. **Journal of Public Economics**. v. 87, n. 3-4 p. 799-817, 2003.
- HAWTIN, R.E. et al. Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* – infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**. v. 238, p. 243-253, 1997.
- HERNIOU, E. A. et al. Use of the whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. **Journal of Virology**. v. 75, p. 8117-8126, 2001.
- HERNIOU, E. A. et al. Ancient co-evolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**. v. 78, p. 3244-3251, 2004.
- HERZOG, D. C.; TODD, J.W. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C., ed. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, Verlag, 1980. p. 107-40.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10).

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10).

HOFFMANN-CAMPO, C.B. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. (Circular técnica, n. 30).

IGNOFFO, C. M. Insect viruses, In. SMITH C. N. Insect colonization and mass production. **Academic**. New York, p. 501-530, 1966.

IGNOFFO, C. M., BATZER, O. F. Microencapsulation and ultravioleta protectants to increase sunlight stability of na insect vírus. **Journal of Economic Entomology**. College Park, v. 64, n. 4, p. 850-853, 1971.

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

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; SAATHOFF, S. G. Sunlight stability and rain-fastness of formulations of *Baculovirus heliothis*. **Environmental Entomology**. v. 26, p. 1470-1474, 1997.

IPOR, I.B.; PRICE, C.E. The effect of simulated rain on the activity uptake of imazapyr on *Mikania micrantha* H.B.K. **Pertanika**. v. 15, p. 99-103, 1992.

JANKEVICA, L. et al. Biological control of the European tent caterpillar *Malacosoma Neustria* L. (Lepidoptera, Lasiocampidae) population with different virus formulations, **Latvijas Entomologs**. v. 36, p.11-16, 1998.

JAQUES, R. P. The inactivation of the nucleopolyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by gamma and ultra-violet radiation. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 14, p. 1161-1163, 1968.

JEHLE J. A. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. **Virology**. v. 346, p. 180-193, 2006.

JOHNSON, D. W., MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology**. v. 70, p. 1877-1883, 1989.

LEVIDOW, L.; BIJMAN, J. Farm inputs under pressure from the European food industry. **Food Policy**. v. 27, n. 1, p. 31-45, 2002.

LISANSKI, S. G. The potencial for biopesticides. In: Monsour, C.J.; Reid, S.; Teackle, R.E., (editors). **Biopesticides: opportunities for Australian Industry**. Brisbane, Australia: 1994. p. 1-7

MOSCARDI, F.; ALLEN, G.E.; GREENE, G.L. Control of velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and inseticides and impact of treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Economic Entomology**. v. 74, p. 480-485, 1981.

MOSCARDI, F. Use of viruses for pest-control in Brazil – the case of the nuclear polyhedrosis-virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84, p. 51-56, 1989.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, I.G.; GREEN, M.; REEDS, R. T. **Pest management in soybean**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 98-109.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1., Ames, Iowa, 1992. **International crop science I**. Madison: Crop Science Society of America, 1993, p. 115-119.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F., SOUZA, M. L. Baculovirus para o controle de pragas: Panacéia ou realidade? **Biologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 24, p. 22-29, 2002.

MOSCARDI, F. et al. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL. **Microbes and Microbial technology**. New York: Springer, 2011. p. 415-445.

OLIVEIRA, J. V. C. et al. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** 87: 01-18, 2006.

O'REILLY, K.R.; MILLER L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP- glucosyl transferase. **Science**. New York, v. 245, p.1110-1112, 1989.

PEARSON, M. N., GROTEN, C., HOHRMANN, G. H. Identification of the *Lymnantria dispar nucleopolyhedrovirus* envelope fusion protein provides evidence for a phyloetic division of the *Baculoviridae*. **Journal of Virology**. v. 74, p. 6126-6131, 2000.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1999.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 14, p. 481-508.

ROHRMANN, G. F. Nucleopolyhedrovirus. In: **Encyclopedia of virology**. GRANOFF, A.; WEBSTER, R. G. (ed). New York: [s.n.], 1999. p. 146-152.

ROTHMAN, L.D.; MYERS, J.H. Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera. **Jornal of Invertebrate Pathology**. San Diego, v. 67, p. 1-10, 1996.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**; statistics, version 8e. Cary, NC: [s.n], 2001.

SECCHI, V. A. Baculovirus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v. 3, n. 3, 2002.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**. v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SHAPIRO, M. et al. Effects of virus concentration and ultraviolet irradiation on the activity of corn earworm and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis. **Journal of Economic Entomology**. v. 95, n. 2, p. 243-249, 2002.

SILVA, M.T.B.; MOSCARDI, F. Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of formulations, water pH, volume and time of application, and type of nozzle. **Neotropical Entomology**. v. 31, n. 1, p. 75-83, 2002.

SZEWCZYK, B., et al. Baculoviruses re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**. v. 24, p. 143-160, 2006.

TAMEZ-GUERRA, et al. Sunlight persistence and rainfastness of sprayed-dried formulations of Baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 93, n. 3, p. 210-218, 2000.

THACKER, J.R.M.; YOUNG, R.D.F. The effects of six adjuvants on the rainfastness of chlorpyrifos formulated as an emulsifiable concentrated. **Pest Management Science**. v. 55, p. 197-218, 1999.

THEILMANN, D.A. et al. Family Baculoviridae. In : FAUQUET, C.M, et al. **Vírus Taxonomy: eight report of international committee on taxonomy of viruses**. [s.l.]: [s.n.], 2005. p. 177-185.

THUAN, S.J. et al. Factors affecting pathogenicity of NPV preparations to the corn earworm, *heliothis armigera*. **Entomophaga**. v. 34, p. 541-59, 1989.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://usdabrazil.org.br>. Acesso em: 8 mar. 2012.

VELLO, N.A.; SILVA, L.A.S. Genética busca atender ao consumo humano crescente. **Visão Agrícola**. Piracicaba, n. 5, p. 60-62, 2006.

VOLKMAN, L. E., KEDDIE, B. A. nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**. v. 1, p. 249-256, 1990.

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

ZANOTTO, P. M. A.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculovirus: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 62, p. 147-1643, 1993.