



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS LUIZ MENEGHEL**  
**MESTRADO EM AGRONOMIA**

**DOUGLAS MARTINS CECCONELLO**

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO PERCEVEJO**  
***Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

**BANDEIRANTES**

**2020**



DOUGLAS MARTINS CECCONELLO

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO PERCEVEJO**

***Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em  
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do  
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Viviane Sandra Alves

BANDEIRANTES

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

MC387n Martins Ceconello, Douglas  
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO  
PERCEVEJO *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera:  
Pentatomidae) / Douglas Martins Ceconello;  
orientadora Viviane Sandra Alves - Bandeirantes,  
2020.  
58 p. :il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade  
Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Controle Biológico. 2. Heterorhabditis. 3.  
Percevejo-marrom. I. Sandra Alves, Viviane, orient.  
II. Título.

DOUGLAS MARTINS CECCONELLO

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO PERCEVEJO**  
***Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em  
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do  
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Viviane Sandra Alves	UENP
Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto	UENP
Dr. Samuel Roggia	EMBRAPA
Profa. Dra. Bruna Aparecida Guide (Suplente)	UEL
Profa. Dra. Jael Simões Santos Rando (Suplente)	UENP

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a minha amada esposa Myrian Hidalgo que me incentivou a fazer o mestrado e ficou sempre ao meu lado nos momentos difíceis e felizes da vida, te amo eternamente. Agradeço a meus familiares e amigos que me deram apoio nas horas difíceis, principalmente a meus pais e irmãos. Agradeço a minha orientadora Viviane Sandra Alves por sua sabedoria e paciência. Aos colegas do LECOM em Cornélio Procópio que contribuíram com auxílio e dedicação meu muito obrigado a todos.

*“Viver é sofrer e sobreviver é encontrar um significado no sofrimento. O que não me faz morrer me torna mais forte.” – Friedrich Nietzsche.*

CECCONELLO, Douglas M. **Nematoides entomopatogênicos no controle do percevejo *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2019. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019.

## RESUMO

A cultura da soja é extremamente importante para a nutrição humana e animal, porém muitos fatores podem limitar sua produção, como a ocorrência de pragas fitófagas causadoras de injúrias às plantas, sendo necessário controlar estes insetos quando sua população sai de controle. Dentre estas pragas, o percevejo-marrom (*Euschistus heros*) destaca-se como uma das principais para esta cultura, e visando o controle sustentável deste inseto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) sobre o *E. heros* em condições de laboratório e campo. Primeiramente foi realizado ensaio de seleção de isolados, onde foram avaliadas oito cepas, todas do gênero *Heterorhabditis*. Os testes de seleção foram conduzidos usando populações de percevejo proveniente de campo e de laboratório. Além da seleção, foram também realizados testes de compatibilidade de isolados com Azadiractina, testes de sinergismo da Azadiractina com o nematoide e testes de controle a campo. Os isolados IBCB-n 46 e NEPET 11 foram os que causaram mortalidade de até 100% dos adultos de *E. heros*, e o isolado regional que mais se destacou foi o UENP 05 atingindo até 52,5% de controle, sendo selecionado para a etapa a campo os isolados IBCB-n 46 e UENP 05. O isolado IBCB-n 46 não apresentou compatibilidade com Azadiractina, que foi considerado levemente nocivo e reduziu sua viabilidade e infectividade. Quanto ao teste de sinergismo, os resultados foram negativos. O primeiro ensaio em condição de campo, não apresentou resultado significativo de controle, devido à falta de umidade no solo, e ao alto índice de parasitismo que os insetos apresentaram. No segundo ensaio a campo, os valores de controle do *E. heros* criado em laboratório pelo UENP 05 foi de 18% e para IBCB-n 46 de 11% e para população coletada em campo de 12% e 15%, respectivamente.

**Palavra-chave:** Controle biológico, *Heterorhabditis amazonensis*, manejo integrado, percevejo-marrom, soja.

CECCONELLO, Douglas M. **Entomopathogenic nematodes in the control of the stink bug *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2019. Master's Degree in Agronomy - State University of Northern Paraná, Luiz Meneghel Campus, Bandeirantes, 2019.

## ABSTRACT

The cultivation of soy is extremely important for human and animal nutrition, however many factors can limit its production, such as the occurrence of phytophagous pests that cause injury to plants, and it is necessary to control these insects when their population goes out of control. Among these pests, the brown stink bug (*Euschistus heros*) stands out as one of the main for this culture, and aiming at the sustainable control of this insect, this work aimed to evaluate the potential of entomopathogenic nematodes (NEPs) on *E. heros* under laboratory and field conditions. Firstly, an isolation selection test was carried out, in which eight strains were evaluated, all of the *Heterorhabditis* genus. Selection tests were conducted using stink bug populations from the field and laboratory. In addition to the selection, compatibility tests of isolates with Azadiractin, synergism tests of Azadiractin with the nematode and field control tests were also carried out. The isolates IBCB-n 46 and NEPET 11 were the ones that caused mortality of up to 100% of adults of *E. heros*, and the regional isolate that stood out the most was UENP 05 reaching up to 52.5% of control, being selected for the step by field the isolates IBCB-n 46 and UENP 05. The isolate IBCB-n 46 did not present compatibility with Azadiractin, which was considered slightly harmful and reduced its viability and infectivity. As for the synergism test, the results were negative. The first test in field condition, did not present a significant control result, due to the lack of moisture in the soil, and the high rate of parasitism that the insects presented. In the second field trial, the control values of *E. heros* created in the laboratory by UENP 05 was 18% and for IBCB-n 46 11% and for the population collected in the field 12% and 15%, respectively.

**Keywords:** Biological control, *Heterorhabditis*, integrated management, compatibility, soy.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Composição da dieta de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) adaptada de Parra (1998).....	29
<b>Tabela 02.</b> Isolados de nematoides entomopatogênicos utilizados no teste de seleção sobre adultos de <i>Euschistus heros</i> em condições de laboratório.....	30
<b>Tabela 03.</b> Porcentagem média de mortalidade de adultos de <i>Euschistos heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae) provenientes de criação em laboratório e coletados a campo, após aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos do gênero <i>Heterorhabditis</i> .....	36
<b>Tabela 04.</b> Porcentagem média de viabilidade, infectividade, seu efeito sobre a infectividade (E%) e classificação da Azadiractina após exposição ao isolado IBCB-n 46 em condições de laboratório, avaliadas de acordo com o protocolo da IOBC modificado por Negrisoni et al. (2008).....	39
<b>Tabela 05.</b> Porcentagem de mortalidade de <i>Euschistus heros</i> após aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos em gerbox com palhada mista, simulando de condição de campo para avaliar ação sinérgica do nematoide com Azadiractina.....	40
<b>Tabela 06.</b> Porcentagem de mortalidade de adultos de <i>Euschistus heros</i> provenientes do campo causada naturalmente e por isolados de nematoides entomopatogênicos.....	41
<b>Tabela 07.</b> Porcentagem média de mortalidade não confirmada e confirmada de <i>Euschistus heros</i> provenientes de campo e de criação em laboratório causada por isolados de nematoides entomopatogênicos UENP 05 e IBCB-n 46 em condições de campo.....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i> .....	21
<b>Figura 02.</b> Ensaio de seleção de nematoides entomopatogênicos sobre adultos de <i>Euschistus heros</i> em condições de laboratório. A: detalhe da unidade experimental; B: insetos provenientes de campo; C: insetos provenientes de laboratório.....	30
<b>Figura 03.</b> Ensaio em gerbox com simulação de condições de campo. A: unidade experimental utilizada no ensaio de compatibilidade do isolado IBCB-n46 com <i>Azadiractina</i> .....	33
<b>Figura 04.</b> Unidade experimental do ensaio feito a campo para avaliar a mortalidade de <i>Euschistus heros</i> após aplicação de nematoides entomopatogênicos.....	35
<b>Figura 05.</b> Imagem de <i>Euschistus heros</i> adulto parasitado por nematoides entomopatogênicos do isolado IBCB-n 46 <i>Heterorhabditis amazonensis</i> . A: percevejo-marrom com nematoides saindo de seu interior. B: dissecação de inseto e confirmação da presença de nematoides entomatogenicos em seu interior.....	37
<b>Figura 06.</b> Adulto de <i>Euschistus heros</i> parasitado por <i>Hexacladia smithii</i> . A: forma adulta do parasitoide <i>H. smithii</i> mortos dentro do percevejo-marrom. B: percevejo adulto com sintoma de saída de parasitoide.....	42
<b>Figura 07.</b> Comparativo de mortalidade de adultos do <i>Euschistus heros</i> em condições de laboratório e em condições de campo com os isolados de nematoides entomopatogênicos IBCB-n 46 e UENP 5.....	44

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Biologia de <i>Euschistus heros</i> .....	14
2.2 Danos de <i>Euschistos heros</i> .....	15
2.3 Monitoramento de <i>Euschistos heros</i> .....	16
2.4 Manejo de <i>Euschistos heros</i> .....	16
2.4.1 Controle Convencional.....	16
2.5 Controle Biológico.....	18
2.6 Nematoides Entomopatogênicos.....	19
2.6.1 Nematoides Entomopatogênicos no Controle de Pragas.....	22
3 ARTIGO A: NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO PERCEVEJO <i>Euschistus heros</i> (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae).....	25
3.1.1 Resumo.....	25
3.1.2 Abstract.....	25
3.2 Introdução.....	26
3.3 Material e Métodos.....	28
3.3.1 Obtenção dos insetos e isolados de nematoides entomopatogênicos.....	28
3.3.2 Criação de <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidóptera: Pyralidae).....	28
3.3.3 Multiplicação e Manutenção dos Nematoides Entomopatogênicos.....	29
3.3.4 Ensaio de seleção de isolados.....	29
3.3.5 Ensaio de Compatibilidade com Azadiractina.....	31
3.3.6 Avaliação da Viabilidade e Infectividade do isolado IBCB-n 46 após exposição ao Azadiractina.....	31
3.3.8 Ensaio em condições de campo.....	34
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.4.1 Seleção de isolados.....	36

3.4.2 Compatibilidade com Azadiractina .....	38
3.4.3 Azadiractina em simulação de condições de campo com IBCB-n46.....	39
3.4.5 Primeiro ensaio de campo .....	40
3.4.6 Segundo ensaio de campo .....	43
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, *Glycine max* (Linnaeus) Merrill, responsável por uma produção de mais de 122 milhões de toneladas na safra 2019/20, com 78% deste total sendo proveniente da região Centro-Oeste e Sul (CONAB, 2020). Entre os desafios enfrentados para a constante melhora da produção, a ocorrência de pragas nessa cultura está entre os principais fatores de redução de produtividade.

Os percevejos estão entre as principais pragas que atacam a cultura da soja, e causam prejuízos relacionados a produtividade e a qualidade do produto colhido, uma vez que se alimentam tanto das partes vegetativa, quanto dos grãos (GOLIN et al., 2014). O percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), é uma das espécies encontrada em maior quantidade dentro do complexo de percevejos praga da soja (PANIZZI; SLANSKY, 1985), cujos danos podem ser considerados diretos, e que quando não controlados, levam a perdas econômicas de até 30% (VIVAN; DEGRANDE, 2011).

No decorrer dos anos, vem se observando um considerável aumento da incidência do percevejo-marrom em áreas produtoras de soja, devido à sua adaptação às regiões de temperaturas elevadas, sendo encontrado desde o norte do Paraná até as regiões centrais do Brasil (CIVIDANES; PARRA, 1994), com registros de expansão para as regiões subtropicais como Argentina e sul do Brasil (SALUSO et al., 2011).

O controle de *E. heros* é realizado principalmente por meio de aplicações de inseticidas químicos (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010). Porém, este método ocasiona diversos problemas, como contaminação ambiental e humana, além da seleção de populações resistentes, tornando mais difícil o controle e reduzindo a quantidade de inimigos naturais pela aplicação de inseticidas não seletivos (SOSA-GOMEZ et al., 2001; BUENO et al., 2011).

Estudos que visam o controle de *E. heros* na soja, com métodos alternativos ao químico são necessários e, o controle biológico pode ser uma ferramenta de manejo viável. No entanto, há uma carência de trabalhos na área e controle biológico de *E. heros* ainda é pouco explorado, porém, pode ser uma alternativa a mais no manejo desse inseto (GOLIN et al., 2014). Os NEPs possuem um elevado número de insetos hospedeiros e alcançaram resultado satisfatório com o controle de insetos pertencentes aos Hemípteros (ALVES et al. 2009<sup>a</sup>; GUIDE et al., 2019), porem poucos estudos saem do laboratório e são aplicados a campo.

Com base no exposto acima, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização dos nematoides entomopatogênicos visando o controle do percevejo *E. heros* com testes realizados em laboratório e campo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, a cultura da soja foi introduzida em 1882 no estado da Bahia, porém sem sucesso de cultivo. Somente em 1892 com variedades trazidas por imigrantes japoneses no município de Campinas é que foi possível o cultivo. No entanto, apenas no período de 1908 a 1923, em São Paulo, quando Henrique Löbbe trouxe diversas variedades norte-americanas, enfim tiveram boa adaptabilidade ao Brasil (CÂMERA, 2015).

No estado do Paraná o cultivo da soja iniciou em 1954, a fim de substituir lavouras de café mortas por geadas (MIYASAKA; MEDINA, 1977) e desde então vem crescendo no estado e no país. O grão é rico em proteína, óleo, minerais e carboidrato (CARRÃO-PANIZZI, 1988), o que faz com que a soja tenha um amplo uso no mercado alimentício, podendo se extrair o óleo que é utilizado na alimentação humana e no biodiesel. Além disso, o farelo pode ser utilizado na alimentação animal devido ao seu alto índice proteico, chegando a possuir de 44 a 48% de proteína. É uma alternativa para os seres humanos intolerantes a lactose que podem consumir o leite de soja e para pessoas que buscam uma fonte de proteína não animal (MISSÃO, 2006). Atualmente a soja é cultivada em 35,657 milhões de ha, o estado do Paraná, destaca-se como o terceiro estado em produção, perdendo apenas para Mato Grosso e Rio Grande do Sul (CONAB, 2019).

Como a grande maioria das culturas cultivadas em sistema de monocultivo, durante todo o ciclo da soja fica exposta a ataques de diferentes espécies de insetos pragas que podem afetar a produtividade da lavoura (EMBRAPA, 2010). A sucessão das mesma culturas que ocorre nas grandes lavouras favorece a manutenção de pragas polífagas como os percevejos, associada ao cultivo de milho em segunda safra fornecem uma quantidade maior de alimentos para pragas, contribuindo para o seu crescimento populacional (PANIZZI et al., 2015; CHOCOROSQUI, 2001; PANIZZI, 1997).

Os percevejos fitófagos são considerados as principais pragas da cultura da soja, podendo afetar as culturas como milho, algodão, trigo e feijão, o dano pode ser causado por ninfas e adultos desses insetos, causando danos durante sua alimentação (PANIZZI; SLANSKY JR., 1985; CHOCOROSQUI, 2001; SORIA et al., 2009). O primeiro registro da ocorrência de

ataque da espécie *E. heros* no Brasil foi realizado por Williams et al. (1973) no cultivo de soja em São Paulo. Era considerado relativamente raro na década de 1970, mas este cenário mudou atualmente, pois este percevejo é considerado uma das principais e mais abundantes pragas da soja no Brasil (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010; DEGRANDE; VIVAN, 2005;)

O percevejo *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) é a espécie encontrada em maior quantidade nas lavouras do Norte do Paraná até a Região Central do Brasil (CORRÊA-FERREIRA, SOSA-GÓMEZ, 2017; BUENO, et al., 2015; CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Além de ser encontrado em grande quantidade, este percevejo afeta diretamente o produto exportado da lavoura de soja, uma vez que seu dano consiste na sucção das vagens, danificando os grãos assim prejudicando a produtividade (SILVA et al., 2014).

## 2.1 Biologia de *Euschistus heros*

O percevejo-marrom, possui um aparelho bucal sugador, se alimenta principalmente do grão de soja, e após a colheita desta cultura, o percevejo pode sobreviver alimentando-se de outras plantas hospedeiras, daninhas ou cultivadas em sequência a soja. O percevejo *E. heros* quando adulto apresenta coloração marrom escura, com dois prolongamentos laterais do pronoto em formato de espinhos e que no verão, apresenta uma coloração mais escura e um comprimento maior, quando comparados com os adultos coletados no inverno (MOURÃO, 1999; MOURÃO; PANIZZI, 2000a; PANIZZI; NIVA, 1994).

As fêmeas ovipositam nas folhas massas com cinco a sete ovos amarelados. Segundo Moreira e Aragão (2009), a fase de ovo dura em média 4,4 dias. As ninfas recém eclodidas permanecem sobre os ovos em média 3,2 dias e mudam para o segundo instar em 4,8 dias, quando iniciam o processo alimentar. A partir do terceiro instar são mais ativas e iniciam a dispersão, tornando-se mais vorazes, passando pelo 4º e 5º instar em cerca 10 dias. O período ninfal até a fase adulta leva em média 26 dias, sendo que os adultos apresentam longevidade média de 116 dias, podendo viver por mais de 300 dias (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

O percevejo-marrom é encontrado na cultura da soja nos meses de novembro a abril, e durante este período pode produzir em média três gerações, podendo atingir até quatro gerações no Paraná, onde a última geração completa seu ciclo em plantas hospedeiras (PANIZZI et al., 2012). Após a colheita da soja, pode se alimentar de outras plantas, como o carrapicho-de-carneiro *Acanthospermum hispidum* (D.C.) (Asteraceae), o girassol *Helianthus annuus* (L.)

(Asteraceae), e o guandu *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Fabaceae), nesta última planta completa a quarta geração antes de entrar em dormência (diapausa) sob folhas mortas caídas no solo e restos de cultura, onde permanece até a próxima primavera (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Os percevejos na diapausa apresentam pouca ou nenhuma mobilidade, permanecendo no interior das folhas ou até mesmo estáticos com o ventre voltado para cima (PANIZZI; NIVA, 1994; MOURÃO; PANIZZI, 2000b). Durante a diapausa, o metabolismo do inseto é bastante reduzido, o que permite atravessar o período desfavorável (maio a novembro). O fato do percevejo-marrom permanecer sob a vegetação por cerca de sete meses, permite escapar do ataque de parasitoides e predadores na maior parte do ano, resultando em maior sobrevivência e favorecendo a sua abundância (HOFFMAN et al., 2000).

## **2.2 Danos de *Euschistos heros***

Na cultura da soja, os percevejos estão presentes desde a fase vegetativa, porém só causam danos a partir do início da formação das vagens, (R3) até a maturação dos grãos (R7). Atingem as sementes nas vagens, através da introdução do aparelho bucal tornando-as chochas e enrugadas, e conseqüentemente afetando a produção e a qualidade dos grãos (GALILEO; HEINRICHS 1978). Além disso, o local da picada pode ser porta de entrada para patógenos como o fungo *Nematospora coryli* Peglion que causa a mancha-fermento. O ataque por patógenos pode causar distúrbios fisiológicos (GALILEO; HEINRICHS, 1978), retardando a maturação da soja, podendo causar dificuldades durante a colheita, devido ao fenômeno da "soja louca", caracterizado pela presença de hastes verdes e retenção foliar (VILLAS BOAS et al., 1985).

Dentre os estádios de desenvolvimento do percevejo o maior dano, cerca de 72% a 85%, é causado pelas ninfas de terceiro a quinto instares (CORRÊA-FERREIRA et al., 2009). Na hora da alimentação o percevejo insere o estilete (aparelho bucal) na planta e injeta a saliva para avaliar a adequabilidade do hospedeiro (BACKUS, 1988). Em seguida, realiza a prova do alimento (teste de prova) e depois prova exploratória (penetração mais profunda dos estiletos). Quando o alimento é considerado “adequado”, os percevejos permanecem sugando a planta, de onde retiram nutrientes causando danos nos tecidos (VENTURA; PANIZZI, 2005).

Quando o ataque ocorre durante a fase de formação de grãos, causam danos tanto no rendimento como na qualidade das sementes ou grãos produzidos (GAZZONI, 1996). Nos ataques iniciais, pode ocorrer abortamento de vagens. Além da redução na qualidade, na

viabilidade e no vigor, as sementes de soja danificadas por percevejos sofrem alterações nos teores de proteína e de óleo (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

### **2.3 Monitoramento de *Euschistos heros***

Na cultura da soja, é comum o uso do “pano de batida” para estimar a quantidade de percevejos. Esse método consiste em forrar com um pano ou plástico branco, de 1m<sup>2</sup> o espaço entre as fileiras de soja, contendo um suporte de madeira nas bordas laterais. O pano é colocado em uma fileira, com cuidado para não perturbar os insetos, as plantas de soja são inclinadas sobre o pano batendo-as vigorosamente para que os insetos caiam e, em seguida é feita a contagem (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; CORRÊA-FERREIRA; PAVÃO, 2005).

A vistoria na lavoura deve ser executada, no mínimo, uma vez por semana nas horas mais frescas do dia, a partir do início do desenvolvimento de vagens – R3 até o enchimento de grãos – R6, caso haja ocorrência de percevejos na fase vegetativa ou florescimento não é necessário o controle, por não causarem dano significativo (PANIZZI et al., 1979; EMBRAPA, 1996; CORRÊA-FERREIRA, 2005; CORRÊA-FERREIRA et al., 2009). Nas amostragens deve-se identificar as formas jovens dos percevejos (ninfas), as quais a partir do terceiro instar são registradas nas fichas junto com os adultos (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; CORRÊA-FERREIRA et al., 2009). De acordo com a Corrêa-Ferreira et al., (2009) para se entrar com controle o nível populacional dos percevejos fitófagos deve ser de dois percevejos por pano de batida para soja grão e de um percevejo por pano de batida para soja destinada a produção de sementes.

### **2.4 Manejo de *Euschistos heros***

#### **2.4.1 Controle Convencional**

Os principais grupos químicos destinados ao controle do percevejo *E. heros* são os carbamatos, organofosforados, piretroides e neonicotinoides (AGROFIT, 2020; SOSA-GOMEZ; ROGGIA, 2013), muitas vezes estes produtos são usados sem considerar o nível de dano e/ou utilizando o inseticida na mesma calda com outros defensivos (herbicidas e fungicidas), o que pode reduzir a eficiência de controle (HOFFMAN-CAMPO et al., 2012; PANIZZI et al., 2012).

Os piretroides possuem um efeito “knock-down” (rápida paralisia nos insetos) e seu mecanismo de ação é por contato ou ingestão, afetando o sistema nervoso central e periférico dos insetos, mesmo em doses reduzidas (DOMINGUES, 2005). Os neonicotinóides atuam

como antagonista da acetilcolina, interrompendo a transmissão de impulsos nervosos, causando a paralisia e a morte do inseto (AGROFIT, 2020).

Foi testado um produto comercial com os ingredientes ativos Tiametoxan (141g/L) + Lambda-Cialotrina (106 g/L) para manejo do percevejo-marrom, em testes realizados em Lucas do Rio Verde, MT, houve controle de 100% dos percevejos na safra 2016/2017 de soja após 3 dias da aplicação (DI BELLO et al., 2017). Em sua composição há uma combinação de Piretroide + Neonicotinóide (AGROFIT, 2020).

Por mais eficiente que o controle químico seja seu uso inadequado pode acarretar diversos problemas, como morte de inimigos naturais e seleção de populações de pragas resistentes, cuja multiplicação acelerada pode resultar em populações inteiras apresentando resistência (SOSA-GOMEZ; ROGGIA, 2013; BACCI et al., 2009).

Os programas de manejo integrado de pragas ou controle biológico representam uma reação ao uso unilateral de inseticidas para controle de insetos, que ocasionam em efeitos colaterais indesejáveis, como desenvolvimento de resistência de insetos a inseticidas e aumento do custo de produção, entre outros problemas (GAZZONI, 2012). Medidas de controle biológico podem ajudar a prolongar a vida útil das moléculas de inseticidas pois esta alternância de modo de controle inibe pressão de seleção que o uso contínuo de inseticida ocasiona, consequentemente reduzir seu uso, tornando o controle biológico uma alternativa interessante.

Outro ponto a se destacar, é que durante o período de entressafra da soja, os adultos do percevejo deslocam-se para áreas adjacentes as lavouras, onde permanecem em diapausa, até o início de novo ciclo da cultura (GODOY et al., 2010). Estes locais de refúgio, comumente ficam em áreas de proteção ambiental, como nascentes ou áreas de mata nativa, onde é proibida a realização de controle químico pelos métodos convencionais, por outro lado seria um local propício a aplicação de inseticidas biológicos.

Embora não se tenha estudos dizendo que a Azadiractina controle o percevejo-marrom, Santos et al (2019), testou a campo a Azadiractina em duas aplicações com bomba costal em plantas de algodão e obteve controle satisfatório na redução da população dos seguintes insetos sugadores *Aphis gossypii* Glöver (Hemiptera: Aphididae), *Bemisia tabaci* biótipo B Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), e *Planococcus minor* Maskell (Hemiptera: Pseudococcidae), o trabalho também demonstrou que o produto possui seletividade com os inimigos naturais sendo indicado para o manejo agroecológico. Apesar do produto possuir propriedades nematicidas (AGROLINK, 2020) não houve até então estudos publicados a respeito de uma

incompatibilidade do produto com os NEPs nem quanto seu possível controle que possa exercer na população de *E. heros*.

## 2.5 Controle Biológico

Controle Biológico consiste na regulação populacional de praga por meio de inimigos naturais, que são os agentes bióticos de mortalidade. Envolve o mecanismo da densidade recíproca (ou densidade-dependente), o qual atua de tal forma que uma população é regulada por outra população (PARRA et al., 2002).

Através da liberação, incremento e conservação de inimigos naturais (parasitoides, predadores e microrganismos), é possível impedir as pragas de atingirem nível de dano econômico nas lavouras, obtendo diversas vantagens em comparação ao controle convencional como, não ser tóxico ao homem, não deixar resíduo no ambiente e ser específico sem afetar as populações de inimigos naturais na área (OLIVEIRA; ÁVILA, 2010).

O uso de parasitoides merece destaque na cultura da soja, sendo que em sua maioria pertencem à ordem Hymenoptera, e são pequenas vespas que ovipositam e se desenvolvem em diversos estágios dos insetos. As vespas possuem grande vantagem em relação aos inseticidas químicos, a capacidade de parasitar ovos em locais onde a calda pulverizada não costuma atingir, como o baixeiro da cultura, aumentando a eficiência de controle de pragas, como exemplo a lagarta falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) (SIMONATO et al., 2014).

Dentre as 20 espécies de parasitoides de ovos identificadas para a cultura da soja, podemos destacar três, que são *Trissolcus basalis*, *Telenomus podisi* (mais abundantes) e *Trichogramma pretiosum* (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Ovos de percevejos são hospedeiros de muitas espécies de parasitoides, como *T. basalis* (CORRÊA-FERREIRA, 2002) e *T. podisi*, que se destacam pela eficiência e abundância na soja. Em geral, as maiores taxas de parasitismo ocorrem entre novembro e dezembro e no final dos ciclos da cultura, entre março e abril, cada fêmea do parasitoide coloca em média 200 ovos (MOSCARDI et al., 2006).

O parasitismo durante a safra de soja pode variar de 30% a 70%, sendo os ovos de *E. heros* os mais parasitados, especialmente por *T. podisi*. No caso do percevejo adulto o principal parasitoide responsável pelo controle do percevejo-marrom é o *Hexacladia smithii* Ashmead

(Hymenoptera: Encyrtidae) que pode atingir até 91,1% de controle, reduzindo significativamente a reprodução das fêmeas do *E. heros* (MOSCARDI et al., 2006; CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GÓMEZ, 2017), porém entre janeiro e março o índice de parasitismo é menor, aumentando na entressafra nos percevejos que entram na diapausa em meados de maio até o fim de setembro (CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GÓMEZ, 2017; GODOY et al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos também representam parte importante para o controle de pragas, Zambiazzi et al. (2011), em testes *in vitro* utilizou o fungo *Bauveria bassiana* para controle do *E. heros* em diferentes concentrações de conídios, obtendo 100% de mortalidade dos percevejos na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>, porém Alves e Lecuona (1998) alertam que para o fungo obter conidiogênese é necessário que haja uma umidade relativa entre 50 a 100%.

Um dos principais problemas que o controle biológico enfrenta é a aceitação de seu potencial e a utilização por parte dos agricultores, a falta de conhecimento de sua eficácia no controle de pragas aliado ao fato do tamanho dos organismos utilizados serem pequenos (SIMONATO et al., 2014) e por não haver um efeito “knock down”, o que faz com que muitas vezes o produtor não dê credibilidade a esta forma de manejo.

Dolinski et al., (2017) destaca o grande potencial do uso de NEPs para o controle de pragas agrícolas no Brasil. Neste sentido, os estudos com nematoides entomopatogênicos no Brasil tem ganhado destaque, principalmente buscando o controle de insetos que estão associados ao solo em pelo menos parte do seu ciclo de vida.

## 2.6 Nematoides Entomopatogênicos

Existem diversas famílias de nematoides que apresentam ação patogênica sobre os insetos. Famílias como Mermithidae e Phaenopsitylenchidae possuem espécies capazes de infectar e matar seus hospedeiros. No entanto, as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, são consideradas com maior potencial para uso no controle biológico, e por isso são as mais estudadas (ALVES; LOPES, 2008; VOSS, et al., 2009).

Os nematoides das famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae*, também conhecidos como nematoides entomopatogênicos (NEPs) possuem associação simbiótica com bactérias patogênicas, e ao penetrar no inseto por orifícios naturais como boca, anus e espiráculos, liberam estas bactérias na hemolinfa do hospedeiro, onde estas se multiplicam, excretam toxinas e causam a morte do inseto por septicemia e toxicidade em um período de 24 a 72 horas (ALVES; LOPES, 2008). A proliferação das bactérias altera a coloração do inseto, deixando-o

marrom-escuro, para a bactéria *Photorhabdus* que é associada a *Heterorhabditis*, e marrom claro ou amarelado para a bactéria *Xenorhabdus* associada aos nematoides do gênero *Steinernema*. Após a morte do hospedeiro, o nematoide se alimenta das substâncias do interior do inseto junto com as próprias bactérias (ALVES; LOPES, 2008).

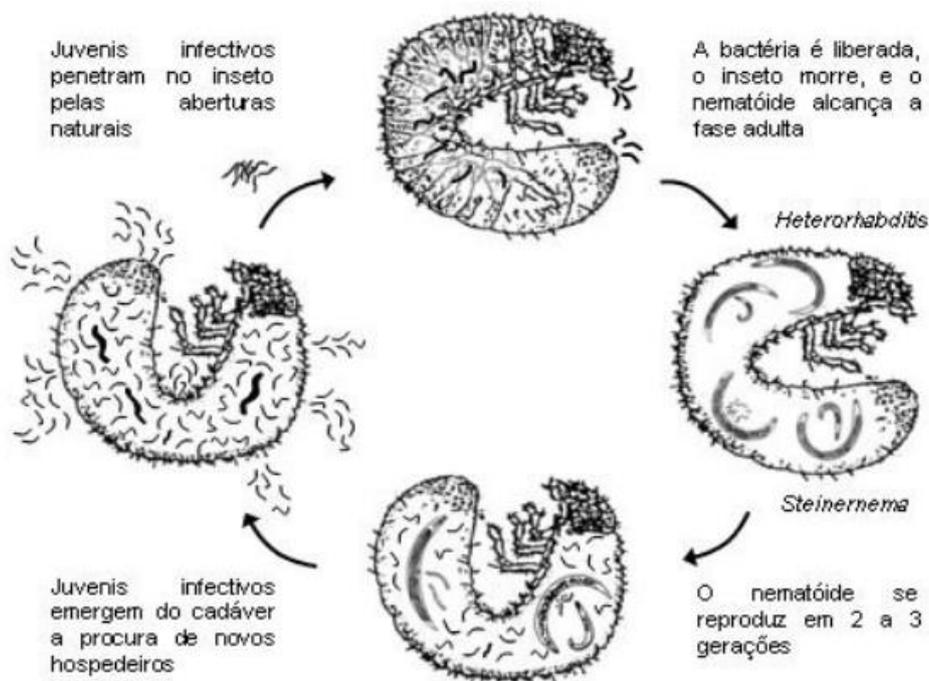
*Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus luminescens* apresentam um comportamento semelhante dentro do ciclo de vida dos NEPs, com algumas diferenças entre as espécies, a maioria das linhagens de *P. luminescens* como o próprio nome indica é bioluminescente, propriedade observada devido a produção da enzima luciferase, semelhante a produzida por microorganismos marinhos bioluminescentes e vaga-lumes (PARACER; AHMADJIAN, 2000; VIVIANI et al., 2016). *P. luminescens* também sintetiza um pigmento do tipo antraquinona e antibióticos da classe dos estilbenos fazendo com que o cadáver do inseto se mantenha por mais tempo (BRACHMANN et al., 2007; JOYCE et al., 2008; CLARKE, 2008). *Xenorhabdus nematophila* não apresenta bioluminescência nem síntese de pigmentos, e seus metabólitos secundários são antibióticos de diferentes classes: xenocumarinas e xenorhabdinas (PARACER; AHMADJIAN, 2000).

As primeiras toxinas de *Photorhabdus* são proteínas envolvidas na resposta imunológica dos insetos infectados (AU et al., 2004; DOWLING et al., 2004, WATERFIELD et al., 2005). Brugirard-Ricaud et al., (2004) comprovou que a proteína é capaz de impedir processos fagocíticos fundamentais do sistema imune do inseto hospedeiro. Estas bactérias podem produzir compostos que inibem a enzima fosfolipase do inseto que está envolvida na biossíntese de reguladores da resposta imunológica celular (KIM et al., 2005; STANLEY, 2006). Desta forma as bactérias simbiotes são de suma importância para a elevada letalidade dos NEPs, pois estas são responsáveis pela morte do hospedeiro (HAN; EHLERS, 2000).

Durante seu ciclo de vida, os NEPs possuem quatro fases larvais (juvenis), uma fase adulta e ovo, que ocorrem dentro do inseto hospedeiro. Isso é possível porque a decomposição do inseto é retardada devido a liberação de antibióticos pelas bactérias simbióticas, o que proporciona alimento abundante para no mínimo um ciclo do nematoide dentro do hospedeiro (VOSS, et al., 2009). Quando há pouco alimento dentro do inseto infestado os juvenis da terceira fase larval saem em busca de outro inseto para infectar. Estes são denominados juvenis infectantes (JIs), possuindo o tamanho entre 400 a 900  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie (POINAR, 1990). No estágio de JI, os NEPs são encontrados no solo em busca de hospedeiros e podem ser armazenados em água ou criopreservados (BOFF, et al., 2000; VOSS, et al., 2009; GUIDE, et al., 2016a).

O ciclo de vida de NEPs do gênero *Steinernema* (figura 01) se inicia com a entrada do JI pelas aberturas naturais do inseto, ao chegar no hemoceloma libera as bactérias, este então retoma seu desenvolvimento e se alimenta ativamente das bactérias que estão se multiplicando no cadáver do inseto. Os juvenis passam para adultos de primeira geração (machos ou fêmeas). Havendo machos e fêmeas no mesmo cadáver, ocorre a cópula. Inicialmente, os ovos fertilizados são postos e, mais tarde, alguns são retidos no interior do abdômen da fêmea até a eclosão dos juvenis de estágio 1 (J1), quando rompem a parede do corpo da mãe e atingem também o inseto, onde há alimento, alguns J1 vão mudar para o estágio J2 futuramente em J3 (juvenis infectantes). Outros J1 vão completar o ciclo de desenvolvimento, passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração, que são menores que os de primeira geração. Estes adultos copulam e novos ovos e juvenis são liberados. Quando não houver mais alimento os ciclos de reprodução cessam e os JIs migram para o ambiente externo em busca de outro hospedeiro para reiniciar o ciclo (NGUYEN; SMART, 1992; POINAR, 1990).

**Figura 01.** Ciclo de vida de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*.



Fonte: (LEITE; MACHADO; GINARTE, 2004).

O ciclo de *Heterorhabditis* se assemelha ao do *Steinernema*, porém os vermes adultos de primeira geração são hermafroditas com morfologia de fêmeas, estes indivíduos produzem espermatozoides que ficam armazenados na espermateca à espera dos ovócitos que irão ser produzidos (POINAR, 1990). As infecções de um inseto por *Heterorhabditis* podem ter sucesso mesmo quando há penetração de um único JI, pois não há necessidade de cópula entre adultos de primeira geração para a produção de ovos fertilizados. Ao contrário do que ocorre em *Steinernema*, os JI de *Heterorhabditis* não necessita de orifícios naturais do inseto para penetração pois possuem um dente córneo permite que os JIs perfurem a cutícula do inseto, especialmente nas regiões mais finas e flexíveis, como entre os segmentos apendiculares (FORST; CLARKE, 2002). Há, também, no ciclo de *Heterorhabditis*, predominância do fenômeno de endotoquia matricida, quando os ovos eclodem no interior do corpo da mãe e os juvenis rompem a parede para serem liberados, matando a fêmea ou o hermafrodita, assim a segunda geração de *Heterorhabditis* surgem machos e fêmeas e a reprodução agora ocorre por fertilização cruzada entre eles (ALMENARA, et al., 2012).

Em alguns casos, a liberação das bactérias pelos NEPs ocorre de 30 minutos a até 6 horas após a infecção, os *Heterorhabditis* apresentam no geral a liberação em menor período (LI et al., 2009). O inseto parasitado inicia a resposta do sistema imunológico após a entrada do JI na hemocele, os NEPs podem ser presos em cápsulas celulares ou não celulares (formadas por melanina) (DOWDS; PETERS, 2002; ALMENARA, et al., 2012). NEPs podem resistir à resposta imune através da evasão, tolerância e supressão. A evasão seria o não reconhecimento do nematoide pelas defesas do inseto, a tolerância é a capacidade de alguns nematoides escaparem do encapsulamento geralmente alguns JIs escapam liberando proteínas de superfície dos nematoides permitem a modulação da resposta imunológica e fim a supressão resultado de uma infecção com grande número de indivíduos: quando muitos JIs invadem o mesmo inseto, o sistema imunológico acaba sobrecarregado (ALMENARA, 2012; MAIZELS et al., 2001). As bactérias simbiotes também sofrem com a ação da imunidade dos insetos por meio de atividades enzimáticas (CALDAS et al., 2002; COWLES; GOODRICH-BLAIR, 2005).

### **2.6.1 Nematoides Entomopatogênicos no Controle de Pragas**

Os NEPs apresentam diversas vantagens para o controle de pragas, pois matam rapidamente o inseto, os JIs podem ser reproduzidos nos hospedeiros, não afetam plantas, não são nocivos a vertebrados, não poluem a água, podem ser aplicados com pulverizadores ou

sistema de irrigação sem a necessidade de alteração, deslocam-se no solo em busca de insetos hospedeiros e se estabelecem no solo (ALVES; LOPES, 2008; VOSS, et al., 2009).

Esses nematoides são comumente aplicados em suspensões aquosas com pulverizadores pressurizados, sopradores de névoa, pulverizadores eletrostáticos e sistemas de irrigação (DOLINSKI et al, 2017). Por permanecerem no solo, os NEPs apresentam afinidade com insetos que passam pelo menos uma fase de seu ciclo de vida neste ambiente, como o percevejo-marrom da soja, que na entressafra, quando há escassez de alimentos, tende a entrar em diapausa e se refugia na palhada da última cultura (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Embora ainda não se tenha muitos estudos correlacionando a utilização de nematoides para controle dos percevejos em diapausa ou oligopausa, esta seria a fase com o maior potencial de controle, devido ao fato dos percevejos permanecerem no solo com baixa mobilidade o que pode favorecer o ataque dos NEPs.

Não há muitos trabalhos na literatura, quanto ao uso de NEPs no controle de hemípteros da família Pentatomidae, mas sim para outros insetos desta ordem, como o desenvolvido por Alves et al. (2009a) que realizaram avaliação em condições de laboratório para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae), avaliando 11 diferentes isolados pertencem aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* em três concentrações diferentes (25, 50 e 100 JIs/inseto), no qual observou-se que os isolados pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* foram mais virulentos, atingindo até 100% de mortalidade. Guide et al. (2016b) testaram a patogenicidade de 15 diferentes isolados no controle de *Dysmicoccus* sp., onde sete isolados se destacaram com os melhores índices de mortalidade, ALHO (*Heterorhabditis amazonensis*, hoje conhecido como GL) 86,66%, RSC 05 (*Heterorhabditis amazonensis*) 90,00%, DIBCB-n 08 (*Steinernema* sp.) 90,00%, DIBCB-n 10 (*Heterorhabditis* sp.) 93,33% e NEPET11 (*Heterorhabditis* sp.) com 93,33%.

Em condições de casa de vegetação e campo, Alves et al. (2009b) avaliaram o potencial de dois isolados (CCA e JPM3, ambos pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*) em casa de vegetação (com plantas de café infestadas artificialmente) e em campo (plantas com infestação natural), obtendo resultados de 68% em casa de vegetação e 65% de controle em campo para o isolado JPM3 aplicado em suspensão aquosa.

Outro estudo foi desenvolvido por Leite et al., (2002) visando o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae) utilizando os seguintes isolados de NEPs: *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n 5), *Steinernema* sp. (IBCB-n 6) e *Heterorhabditis* sp. (CCA), e

obtiveram resultados de 100%, 98% e 96% para cada isolado, respectivamente. Leite et al., (2005) levaram este estudo a campo e utilizando os mesmos isolados obtiveram um controle de até 70% da população de cigarrinha das pastagens.

Com relação a trabalhos relatando o uso de NEPs sobre insetos da família Pentatomidae, Guide et al. (2019), realizaram trabalho para determinar patogenicidade e virulência de NEPs sobre percevejo barriga-verde, avaliaram 15 isolados dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* no controle do *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae), em condições de laboratório. Dentre os isolados testados os seguintes obtiveram elevados índices de mortalidade de percevejos: RSC 05 88%, IBCB-n 27 (*Steinernema* sp.) 82%, GL 80%, AM 163 (*Steinernema diaprepesi*) 78%, IBCB-n 46 (*Heterorhabditis* sp.) 76%, IBCB-n 01 (*Steinernema glaseri*) 74%, IBCB-n 47 (*Steinernema feltiae*) 72%, HP 88 (*Heterorhabditis bacteriophora*) 70%, CER-n 125 (*Steinernema puertoricense*) 70%, IBCB-n 40 (*Heterorhabditis* sp.) 68% e NEPET 11 68% demonstrando o potencial destes agentes no controle de percevejos, o trabalho foi realizado em condições de laboratório e o trabalho sugere estudos quanto a persistência dos NEPs em condições de campo.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de nematoides entomopatogênicos no controle de *E. heros*, o percevejo-marrom da soja, em condições de laboratório e campo.

### **3 ARTIGO A: NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO PERCEVEJO *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

#### **3.1.1 Resumo**

O percevejo-marrom (*Euschistus heros*) é uma das pragas mais importantes na cultura da soja, devido ao seu ataque direto às vagens e grãos e pelo fato da soja tolerar baixos níveis de densidade populacionais da praga. Visando a busca de alternativas de seu controle, este trabalho teve como objetivo avaliar o controle exercido por nematoides entomopatogênicos (NEPs) sobre *E. heros* em condições de laboratório e campo. Foram avaliados sete isolados de NEPs (IBCB-n 46, IBCB-n 40, GL, UENP 02, UENP 05, UENP 06, UEL 08 e NEPET 11), todos do gênero *Heterorhabditis*, sobre populações do inseto proveniente de campo e de criação em laboratório. Foram também realizados testes de compatibilidade de isolados com a Azadiractina, testes de sinergismo com os nematoides. Os isolados IBCB-n 46 e NEPET 11 causaram mortalidade de até 100% dos adultos de *E. heros* em condições de laboratório, e como o isolado IBCB-n 46 apresentou uma maior produção em laboratório, este foi selecionado para os demais ensaios. O isolado IBCB-n 46 não apresentou compatibilidade com Azadiractina, que foi considerado levemente nocivo ao isolado comprometendo a infectividade e virulência. Quanto ao teste de sinergismo, os resultados foram negativos. Com relação aos testes de controle em condições de campo, o primeiro ensaio não apresentou resultado significativo de controle, devido a falta de umidade no solo, e ao alto índice de parasitismo que os insetos apresentaram (uma vez que foi utilizada apenas população proveniente de campo). No segundo ensaio em campo, obteve-se valores para UENP 05 de 18% e 11% e IBCB-n 46 de 12% e 15% de mortalidade para população criada em laboratório e coletada do campo, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Heterorhabditis amazonensis*, controle biológico, manejo integrado, percevejo-marrom, soja.

#### **3.1.2 Abstract**

The brown stink bug (*Euschistus heros*) stands out as one of the main pests of today in soybean culture, whose damage is aggravated by being direct in the pods and by the fact that the insect occurs in large quantities. Aiming to search for control alternatives for this insect, this work aimed to evaluate the control exercised by entomopathogenic nematodes (NEPs) on *E. heros* in laboratory and field conditions. Seven NEPs isolates (IBCB-n 46, IBCB-n 40, GL, UENP 02, UENP 05, UENP 06, UEL 08 and NEPET 11) were evaluated, all of the *Heterorhabditis* genus,

on insect populations from the field and rearing in the laboratory. Isolation compatibility tests with the Azadiractina product, synergism tests with the nematode. The isolates IBCB-n 46 and NEPET 11 caused mortality of up to 100% of adults of *E. heros* under laboratory conditions, and since the isolate IBCB-n 46 had easier production, it was selected for the other tests. The isolate IBCB-n 46 was not compatible with the product Azadiractina, which was considered slightly harmful to the isolate compromising infectivity and virulence. As for the synergism test, the results were negative. Regarding the control tests in field conditions, the first test did not show a significant control result, due to the lack of moisture in the soil, and the high rate of parasitism that the insects presented (since only a population from the field was used). In the second field trial, values for UENP 05 of 18% and 11% and for IBCB-n 46 of 12% and 15% of mortality were obtained for a population created in the laboratory and collected from the field, respectively.

**Key-Words:** *Heterorhabditis amazonensis*, biological control, integrated management, compatibility, soy.

### 3.2 Introdução

Os percevejos estão entre as principais pragas que atacam a cultura da soja, e causam prejuízos relacionados a produtividade e a qualidade do produto colhido, uma vez que se alimentam dos grãos (GOLIN et al., 2014). O percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), se destaca, por ser uma das espécies mais encontradas dentro do complexo de percevejos praga da soja (PANIZZI; SLANSKY, 1985), sendo que os danos podem ser considerados diretos, e que quando não controlados, levam a perdas econômicas de até 30% da produção (VIVAN; DEGRANDE, 2011).

Neste contexto, o controle de *E. heros* é crucial, sendo realizado principalmente por meio de aplicações de inseticidas químicos (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010). Porém, a utilização deste método, pode ocasionar contaminação ambiental e humana, além da seleção de populações resistentes, tornando mais difícil o controle e reduzindo a quantidade de inimigos naturais pela aplicação de inseticidas não seletivos (SOSA-GOMEZ et al., 2001; BUENO et al., 2011).

Assim, estudos que visam o controle de *E. heros* na soja, com métodos alternativos ao químico são necessários, sendo o Controle Biológico considerado uma ferramenta de manejo viável. No entanto, trabalhos na área e controle biológico de *E. heros* ainda são escassos e pouco

explorados, porém, pode ser uma alternativa a mais no manejo desse inseto (GOLIN et al., 2014).

Dentre os agentes de controle biológico os NEPs possuem características que contribuem para sua utilização em potencial controle de pragas como o percevejo-marrom, estas possuem elevada resistência a diversos produtos fitossanitários empregados na cultivo, os NEPs possuem estratégias de caça, podendo enquadrar em dois tipos, “ambusher” onde o nematoide fica imóvel para preservar sua reserva energética e “cruiser” que buscam pelo seu hospedeiro no solo, esta estratégia é comum para os *Heterorhabditis* (FERRAZ, 1998; LEWIS et al. 2006; SOUZA et al, 2012).

Os NEPs possuem um elevado número de insetos hospedeiros, alguns da ordem hemíptera, Alves et al. (2009a), utilizaram NEPS para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em condições de laboratório, foram testados 11 diferentes isolados pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, testados em 3 concentrações diferentes (25, 50 e 100 JIs/inseto), no qual os isolados pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* se mostraram mais virulentos, atingindo até 100% de mortalidade em alguns casos. Assim como, em outro estudo realizado posteriormente, em casa de vegetação com plantas de café, foram testados os isolados CCA e JPM3, que no estudo anterior mostraram resultados superiores, ambos pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, no controle da *D. texensis*, obtendo assim 70% de controle com o isolado JPM3 sendo aplicado em suspensão aquosa Alves et al. (2009b).

Em estudos realizados, para determinar patogenicidade e virulência de NEPs sobre hemípteros, Guide et al. (2019), avaliaram 15 isolados dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* no controle do percevejo barriga-verde, *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae), em condições de laboratório, todos os isolados obtiveram virulência ao percevejo barriga-verde porem 11 apresentaram a mesma eficiência estatística: RSC 05 88%, IBCB-n 27 (*Steinernema* sp.) 82%, GL 80%, AM 163 (*Steinernema diaprepesi*) 78%, IBCB-n 46 (*Heterorhabditis* sp.) 76%, IBCB-n 01 (*Steinernema glaseri*) 74%, IBCB-n 47 (*Steinernema feltiae*) 72%, HP 88 (*Heterorhabditis bacteriophora*) 70%, CER-n 125 (*Steinernema puertoricense*) 70%, IBCB-n 40 (*Heterorhabditis* sp.) 68% e NEPET 11 68%, o trabalho também sugere testes a campo para avaliar se o controle de pragas se manterá em porcentagem elevada.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de nematoides entomopatogênicos no controle de *E. heros*, o percevejo-marrom da soja, em condições de laboratório e campo.

### **3.3 Material e Métodos**

#### **3.3.1 Obtenção dos insetos e isolados de nematoides entomopatogênicos**

Os insetos de *E. heros* foram cedidos pela Embrapa Soja, Londrina, PR. Foram utilizados adultos provenientes de criações de laboratório e adultos coletados em campo.

Os nematoides utilizados foram provenientes do Banco de Nematoides do Instituto Biológico de São Paulo, e do Laboratório de Entomologia e Microbiologia (LECOM) da Universidade Estadual do Norte do Paraná – *Campus* Cornélio Procópio, PR.

A manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos foi feita pelo método *in vivo*, de acordo com a metodologia de Molina e Lopes (2001), utilizando-se lagartas de último instar de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) provenientes de criação estabelecida.

#### **3.3.2 Criação de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)**

As lagartas foram obtidas da criação de *G. mellonella* do Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano da UENP e mantidas em sala de criação, acondicionadas em potes plásticos com tampas providas de tela e sob temperatura ambiente. A manutenção e alimentação foram realizadas diariamente com dieta artificial adaptada de Parra (1998), preparada com os ingredientes da Tabela 01.

**Tabela 01.** Composição da dieta de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) adaptada de Parra (1998).

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Farelo de trigo	200g
Gérmen de trigo	200g
Farinha de trigo	200g
Leite em pó	400g
Levedura de cerveja	120g
Glicerina	130g
Mel	240g
Água Destilada	20 ml

**Fonte:** Parra (1998, p. 1015-1037).

### 3.3.3 Multiplicação e Manutenção dos Nematoides Entomopatogênicos

Foram utilizadas dez lagartas de último instar de *G. mellonella* foram dispostas em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo dois papéis filtro secos. Posteriormente inoculou-se 2mL de suspensão do nematoide (aproximadamente 20 JIs/lagarta) nas placas e estas foram armazenadas por 72 horas, em BOD a  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro. Após este período as lagartas mortas foram transferidas para câmara seca, na qual permaneceram por cinco dias, em condições semelhantes às citadas anteriormente, para multiplicação dos NEPs (MOLINA; LOPES, 2001).

Em seguida, as lagartas foram colocadas em armadilha de White (White, 1927), método utilizado para coleta dos JIs, sendo as armadilhas mantidas sob as mesmas condições já mencionadas. Os JIs em suspensão aquosa (água destilada + Juvenis Infectantes) foram coletados diariamente e armazenados em recipientes plásticos, mantidos em câmara climatizada à temperatura de  $18\pm 1^\circ\text{C}$  sem fotofase, por um período de até sete dias após a produção para, posteriormente, serem utilizados nos experimentos.

### 3.3.4 Ensaio de seleção de isolados

Foi realizado teste de seleção com oito isolados (Tabela 02), que foram multiplicados de acordo com a metodologia descrita acima, e avaliados quanto à patogenicidade e virulência sobre adultos de *E. heros* conforme metodologia de Guide et al. (2019).

**Tabela 02.** Nome, espécie e origem dos isolados de nematoides entomopatogênicos utilizados no teste de seleção sobre adultos de *Euschistus heros* em condições de laboratório.

Isolado	Espécie	Origem
NEPET 11	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Palmeira das Missões, RS, Brasil
GL	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Lavras, MG, Brasil
IBCB-n 40	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Tabaporã, SP, Brasil
IBCB-n 46	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Santo Antônio de Posse, SP, Brasil
UENP 2	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Ribeirão Claro, PR, Brasil
UENP 5	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Ribeirão Claro, PR, Brasil
UENP 6	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Ribeirão Claro, PR, Brasil
UEL 8	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Londrina, PR, Brasil

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 2 x 8 (duas populações do inseto e oito isolados de nematoide) com quatro repetições por tratamento, e a unidade experimental constituiu de uma placa de Petri de vidro 9cm de diâmetro, contendo dois papéis filtro secos, uma vagem de soja e 10 indivíduos adultos de *E. heros* não sexados, provenientes de criação em laboratório e também do campo (separados em tratamentos diferentes). Em seguida, com auxílio de micropipeta foi aplicado sobre o papel filtro, suspensão aquosa com os isolados na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup> (aproximadamente 2000 JIs/mL) e mais 1mL de água destilada para manter a umidade (figura 02).

**Figura 02.** Ensaio de seleção de nematoides entomopatogênicos sobre adultos de *Euschistus heros* em condições de laboratório. A: detalhe da unidade experimental; B: insetos provenientes do campo; C: insetos provenientes do laboratório.



Fonte: Douglas Martins Ceconello (2018).

As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada na temperatura de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa (UR) de  $60\pm 10\%$  e fotoperíodo 14h) por cinco dias. Foi também realizado um tratamento controle (testemunha) que recebeu apenas 2mL de água destilada.

A avaliação ocorreu cinco dias após a aplicação, contando-se os insetos mortos. A confirmação da morte por nematoide foi feita por meio da dissecação, com auxílio de microscópio estereoscópio para observação da presença de NEPs no interior do corpo do inseto.

Os dados foram submetidos à correção de mortalidade através da fórmula de Scheider-Orelli's, e em seguida foi feita a análise de Variância (teste F) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ), com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

### **3.3.5 Ensaio de Compatibilidade com Azadiractina**

Após o teste de seleção, o isolado IBCB-n 46 apresentou maior virulência sobre o percevejo-marrom, foi submetido ao teste de compatibilidade com o inseticida biológico Azadiractina 12g/L, produto comercial Azamax®, E.I.D. Parry (Índia) Limited, visando posterior aplicação conjunta em áreas de refúgio de insetos em diapausa.

### **3.3.6 Avaliação da Viabilidade e Infectividade do isolado IBCB-n 46 após exposição ao Azadiractina**

O ensaio utilizou a metodologia da IOBC (International Organization for Biological Control) modificada por Magnabosco et al. (2019). Por tanto, foram preparadas caldas em Beckers com 250mL de solução da Azadiractina no dobro da dose comercial de 400mL/ha com volume de calda de 100L/ha (como não há recomendação para utilização contra percevejo-marrom foi usado o dobro da dose recomendada para a mosca branca na cultura da soja), conforme indicação do fabricante (AGROFIT, 2020). Em seguida, foram preparados tubos de vidro de fundo chato com a mistura de 1mL de calda do produto, adicionando-se 1mL da suspensão do nematoide em água destilada, na concentração de 2000JIs/mL. Como resultado da mistura, cada tubo continha 2mL de NEPs em concentração de 1000 JIs/mL em suspensão na calda do produto, conforme recomendação para a cultura da soja.

Como testemunha foi utilizada apenas a suspensão com a mesma quantidade de JIs em 2 mL de água destilada. Tanto para o tratamento com os produtos, como para a testemunha foram preparados cinco tubos, sendo cada um considerado uma repetição. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, e os tubos foram mantidos em câmara climática a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, após este período foi realizada a avaliação da viabilidade e infectividade.

A avaliação de viabilidade foi realizada após 48 horas, com a agitação da suspensão e retirada de cada tubo de cinco alíquotas de 50µL, que foram transferidas individualmente para fossos de uma placa de Elisa, totalizando 5 fossos, contando-se o número de JIs vivos e mortos dos fossos até chegar no total de 100 JIs, utilizando um microscópio estereoscópio, considerando-se indivíduos mortos aqueles que não se movimentaram ao estímulo do toque com um estilete.

Para avaliação da infectividade, foram adicionados 3mL de água destilada em cada tubo, agitados e deixados para decantar por 30 minutos à 10 °C em geladeira. Em seguida o volume de 3 mL do sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por três vezes para eliminação dos resíduos do produto. Após a terceira lavagem foram retiradas cinco alíquotas de 0,2 mL da suspensão, de cada tubo, e aplicadas individualmente em cinco placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo dois papéis filtro e 10 lagartas vivas de *G. mellonella*. As placas foram mantidas a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  por cinco dias. Após este período, a mortalidade das lagartas foi avaliada, e estas foram transferidas para câmara seca, onde permaneceram por mais três dias, sendo então submetidas à dissecação em microscópio estereoscópio para observação da presença de nematoides vivos, confirmando a causa da morte.

Após a obtenção dos dados foi calculado o efeito sobre a infectividade (E%) a partir de uma adaptação da fórmula proposta pela IOBC/WPRS (West Palearctic Regional Section) de Peters e Poullot (2004), e modificada por Magnabosco et al. (2019), sendo:

$$E\% = 100 - (100 - Mc\% - Red\%)$$

Onde:

$$\text{Mortalidade corrigida} = (Mt - Mc/100 - Mc) \times 100,$$

Mt: porcentagem de mortalidade no tratamento,

Mc: mortalidade na testemunha (controle) (ABBOTT, 1925).

$$Red = (1 - It/Ic) \times 100,$$

Red: porcentagem de redução da infectividade no tratamento,

It: mortalidade nos tratamentos,

Ic: mortalidade na testemunha (controle).

A Azadiractina foi classificado quanto à toxicidade de acordo com IOBC/WPRS, onde: E% < 30% (Inóculo); E% = 30% a 79% (levemente nocivo); E% = 80% a 99% (moderadamente

nocivo) e  $E\% > 99\%$  (nocivo) (NEGRISOLI et al., 2010; VOSS, 2009; PETERS; POULLOT, 2004).

Os dados de viabilidade e infectividade foram submetidos à Análise de Variância (teste F) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 3.3.7 Avaliação de sinergismo do isolado IBCBn46 com Azadiractina simulando condições de campo

Para avaliar a possibilidade de ação sinérgica entre a Azadiractina com o nematoide em condições de campo foi elaborado o ensaio para simular estas condições. A unidade experimental consistiu de um gerbox medindo 11 x 11 x 3,5 cm que foi preenchido com palhada seca mista de gramíneas e oleaginosas até o topo, uma vagem de leguminosa e 10 percevejos adultos de *E. heros* (figura 03). Foram avaliados quatro tratamentos (T): T1 recebeu aplicação apenas de 5mL de água destilada (controle), T2 recebeu aplicação apenas da Azadiractina na dose de 400mL de p.c./ha (AGROLINK, 2020) aplicado segundo a medida do gearbox (11cm<sup>2</sup>), T3 recebeu aplicação do isolado IBCB-n 46 na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup> em 5mL de suspensão e o T4, onde foi aplicado Azadiractina na dose de 400mL de p.c./ha junto do isolado IBCB-n 46 na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup> em 5mL de suspensão, sendo que cada tratamento possuiu quatro repetições. A avaliação foi feita após cinco dias, quando os insetos mortos foram coletados e dissecados para confirmar a causa da morte.

**Figura 03.** Ensaio em gerbox com simulação de condições de campo. A: unidade experimental utilizada no ensaio de compatibilidade do isolado IBCB-n46 com Azadiractina.



Fonte: Douglas Martins Ceconello (2018).

Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $P \leq 5\%$ ), por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### **3.3.8 Ensaios em condições de campo**

Os ensaios em condições de campo foram realizados na fazenda experimental da Embrapa Soja, Londrina, Paraná, na (Latitude 23° 11' 25,14S Longitude 51° 10' 16,61W) e foram realizados separados no tempo conforme descrito a seguir:

#### **3.3.8.1 Ensaio em condições de campo**

O primeiro ensaio foi realizado em 19 de maio de 2019, e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo 10 repetições por tratamento. A unidade experimental consistiu de uma gaiola feita com cano de PVC de 10 cm de diâmetro e cinco cm de altura fixadas no solo por duas hastes de aço, onde foi colada 10 percevejos adultos de *E. heros* coletados em campo e em cima do inseto foi posto palha da área de preservação permanente (Figura 04). Neste ensaio, foram aplicados nove tratamentos sendo: T1 apenas água destilada (testemunha), T2 25 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado IBCB-n 46), T3 50 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado IBCB-n 46), T4 75 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado IBCB-n 46), T5 100 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado IBCB-n 46), T6 100 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado UEL08), T7 100 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado UENP 02), T8 100 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado UENP 05) e T9 100 JIs/cm<sup>2</sup> (isolado UENP 06).

Após a aplicação, cada gaiola foi tampada com uma tela de tecido do tipo voil presa por dois elásticos para evitar a fuga dos insetos.

**Figura 04.** Unidade experimental do ensaio feito a campo para avaliar a mortalidade de *Euschistus heros* após aplicação de nematoides entomopatogênicos.



Fonte: Douglas Martins Ceconello (2019).

### 3.3.8.2 Segundo ensaio em condições de campo

O segundo ensaio em condições de campo foi realizado no dia 26 de setembro de 2019 após uma chuva de 5,3mm (IAPAR, 2019) desta forma o solo estava naturalmente umedecido. Neste experimento, usou-se a mesma unidade experimental descrita no ensaio anterior, com 10 repetições para cada tratamento. Foram utilizados os isolados de melhor desempenho e o isolado regional de melhor desempenho, IBCB-n 46 e UENP05, aplicados apenas na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup>. Por outro lado, neste ensaio foram utilizadas duas populações de percevejos adultos de *E. heros*: insetos criados em laboratório com a diapausa induzida por meio de exposição a fotoperíodo inferior a 12h, metodologia semelhante a utilizada por Mourão e Panizzi (2000b) insetos provenientes de população coletados a campo. Foi também realizado um tratamento controle para cada população de insetos, onde foi aplicado apenas 10mL de água destilada, totalizando seis tratamentos.

As avaliações foram feitas cinco dias após a aplicação, na qual foi contabilizado o número de percevejos mortos, e estes foram coletados e transportados até o laboratório LECOM para confirmação da mortalidade por NEPs, por meio de dissecação com ajuda de uma lupa estereoscópica.

Os dados de ambos os ensaios foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $P \leq 5\%$ ), por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Seleção de isolados

Todos os isolados testados apresentaram patogenicidade aos adultos de *E. heros* provenientes da população criada em condições de laboratório e os isolados IBCB-n 40, NEPET 11 e IBCB-n 46 foram os que apresentaram maior virulência (80,51; 94,45, e 100% respectivamente) e não diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ) (Tabela 03 e Figura 05).

Os isolados IBCB-n 46 e NEPET 11, foram os que causaram maior mortalidade, com valores de 47,3% e 71,04% respectivamente, nos tratamentos usando insetos provenientes de população coletada em campo, os isolados UENP 02 e UEL08 não apresentaram patogenicidade sobre insetos adultos de *E. heros* (Tabela 03 e Figura 05).

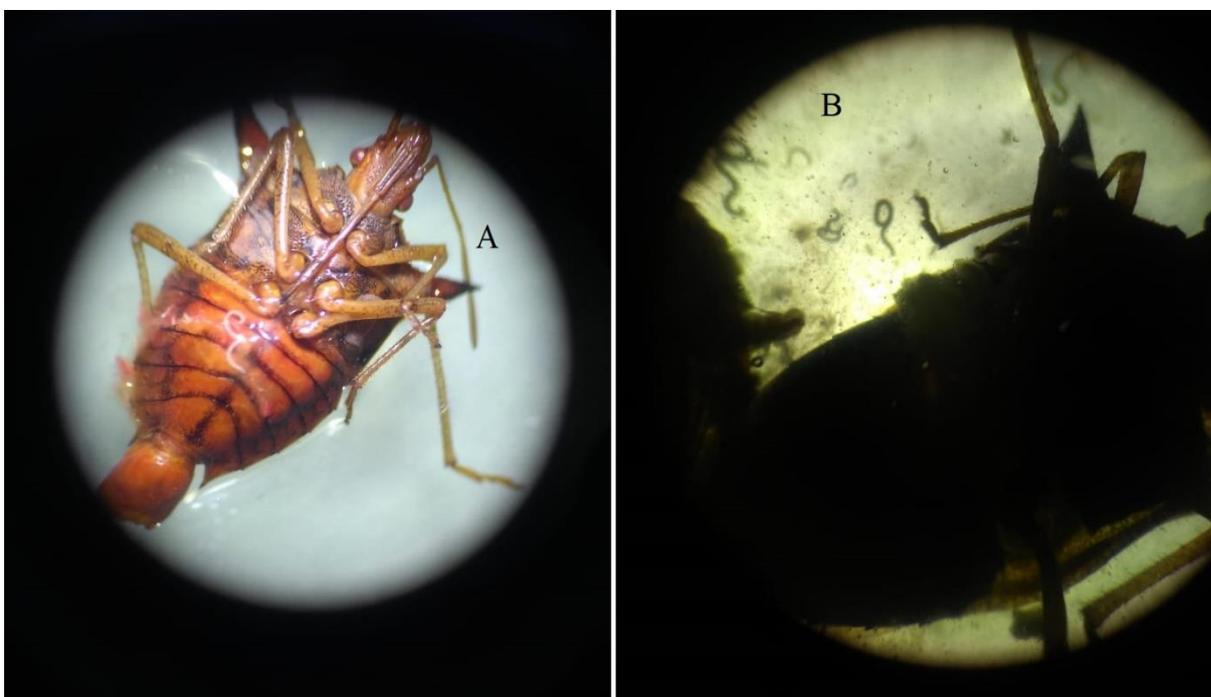
**Tabela 03.** Porcentagem média de mortalidade de adultos de *Euschistos heros* (Hemiptera: Pentaomidae) provenientes de criação em laboratório e coletados a campo, após aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis*.

Isolados	População	
	Laboratório	Campo
NEPET 11	94,45 ±10,00 Aa	47,3 ±18,25 Bab*
IBCB-n 40	80,57 ±15,00 Aa	36,85 ±35,59 Bbc
IBCB-n 46	100,00 ±0 Aa	71,04 ±10,00 Ba
GL	32,37 ±9,57 Abc	28,92 ±9,57 Abcd
UENP 02	2,42 ±8,16 Ad	0,00 ±5,00 Ad
UENP 05	41,95 ±5,00 Ab	11,45 ±9,57 Bcd
UENP 06	8,07 ±9,57 Acd	5,00 ±14,14 Ad
UEL 08	2,42 ±8,16 Ad	0,00 ±5,78 Ad
C.V. (%)	36,43	38,33

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

Também Guide et al., (2019), em teste similar para o controle do *D. melacanthus* observaram que os isolados IBCB-n 46, NEPET 11 e IBCB-n 40 foram os que apresentaram os melhores resultados de controle dos adultos do percevejo, e obtiveram controle de 76%, 68% e 68% respectivamente em condições de laboratório, comprovando o potencial destes isolados no controle destes dois percevejos fitófagos causadores de injurias.

**Figura 05.** Imagem de *Euschistus heros* adulto parasitado pelo isolado de nematoide entomopatogênico IBCB-n 46 *Heterorhabditis amazonensis*. A: percevejo-marrom com nematoides saindo de seu interior. B: dissecação de inseto e confirmação da presença de nematoides entomatogênicos em seu interior.



Fonte: Douglas Martins Ceconello (2018).

A utilização dos isolados pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* sp., e em sua maioria pertencentes a espécie *H. amazonensis*, se deu com base no trabalho de Guide et al. (2019), que avaliaram vários isolados quanto a patogenicidade sobre *D. melacanthus*, e observaram que os isolados dessa espécie foram os mais eficientes no controle daquela espécie de percevejo.

Entretanto, neste trabalho, foi possível observar, que isolados de mesma espécie podem apresentar alta taxa de variabilidade quanto a virulência sobre determinadas espécies de pragas, justificando a necessidade de realizarem-se testes de seleção de isolados para a adoção destes como táticas no manejo integrado de pragas.

Após penetrar no inseto, os NEPs podem demorar de 30 minutos a 6 horas para liberar as bactérias. Apesar dos *Heterorhabditis* apresentarem na maioria dos casos uma liberação das bactérias *Photorhabdus* em menos tempo (AU et al., 2004; DOWLING et al., 2004; LI et al., 2009), o inseto poderá resistir a contaminação dos NEPs e a contaminação bacteriana por meio de cápsulas celulares ou não celulares (formadas por melanina) (DOWDS; PETERS, 2002; ALMENARA, et al., 2012). Em contrapartida os NEPs, possuem mecanismo para tentar subjugar o sistema imune do inseto, há três formas de fazer isso: evasão onde os nematoides não são notados pelo sistema imune, tolerância seria a capacidade dos nematoides escapar do encapsulamento oriundo das células de defesa do inseto e supressão é quando há um elevado número de nematoides no inseto onde o sistema imune do mesmo não é capaz de conter a infecção (ALMENARA, 2012; CALDAS et al., 2002; MAIZELS et al., 2001).

A população de *E. heros* criada em laboratório apresentou maior suscetibilidade aos isolados de NEPs em relação a população coletada em campo, pode ter acontecido devido ao fato dos insetos coletados em campo estarem expostos ao meio ambiente onde existem diversos patógenos, possivelmente deixando o sistema imune do inseto em alerta, assim, no ensaio a população coletada a campo ao serem parasitados podem já ter ativa sua resposta imune a outros patógenos facilitando assim o controle dos JI's.

O isolado de melhor desempenho no ensaio de seleção foi o IBCB-n 46, tanto para a população proveniente de laboratório, quanto para a população proveniente de campo, e por isso foi usado nos testes subsequentes, nos ensaios de campo foi também utilizado o isolado UENP 05 por se tratar do isolado regional com melhor desempenho.

Os NEPs apesar de serem quase todos *H. amazonensis*, com exceção do NEPET 11, apresentaram variação em suas virulências, esta relação é muito comum em diversos outros trabalhos de seleção de isolados (ANDALÓ et al.; 2004b, ALVES et al., 2009<sup>a</sup>; GUIDE et al., 2019), possivelmente o local de onde a espécie foi coletada tem relação em seu efeito virulento contra o diferentes inseto.

### **3.4.2 Compatibilidade com Azadiractina**

No ensaio para avaliar a compatibilidade com Azadiractina, os NEPs apresentaram redução significativa quanto a viabilidade, com média de sobrevivência de apenas 24,8% (Tabela 04).

Apesar do baixo nível de viabilidade dos JIs após a exposição a Azadiractina, sua infectividade sobre lagartas de *G. mellonella* foi afetada, comprovando que os JIs que sobreviveram a exposição ao inseticida tiveram sua virulência afetada. Isso pode ser justificado pelo fato da Azadiractina possuí propriedades nematicidas e embora sua bula especifique apenas o controle do *Meloidogyne incognita* Goeldi (1887) (Tylenchida: Heteroderidae) (AGROLINK, 2020), esta propriedade pode ter afetado a viabilidade e infectividade ao entrar em contato com o isolado IBCB-n 46.

**Tabela 04.** Porcentagem média de viabilidade, infectividade, efeito do produto sobre a infectividade (E%) e classificação da Azadiractina após exposição do isolado IBCB-n 46 em condições de laboratório, avaliadas de acordo com o protocolo da IOBC adaptado por Magnabosco et al. (2019).

Tratamentos	Viabilidade	Infectividade	E%	Classificação
IBCB-n 46+ Azadiractina	24,80 ±10,64a	57,50 ±12,58a	48,88**	Levemente Nocivo
IBCB-n 46 + água	81,20 ±6,57b*	87,50 ±5,00b	-	-
CV (%)	16,69	13,21		

\* Médias seguidas pelo mesmo letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

\*\* IOBC/WPRS, onde: E% < 30% (Inóculo); E% = 30% a 79% (levemente nocivo); E% = 80% a 99% (moderadamente nocivo) e E% > 99% (nocivo) (ANDALÓ et al., 2004a; PETERS; POULLOT, 2004; VOSS, 2009).

### 3.4.3 Azadiractina em simulação de condições de campo com IBCB-n46

No teste simulando condições de campo, para avaliar o sinergismo entre Azadiractina e o isolado IBCB-n 46, observou-se que o tratamento com a Azadiractina não reduziu significativamente a população do percevejo-marrom, e não diferiu do tratamento controle (Tabela 05). Por outro lado, os dois tratamentos contendo o isolado IBCB-n 46 causaram mortalidade significativa em adultos de *E. heros*, mas não diferiram entre si, o que prova que não houve uma ação de incremento entre a Azadiractina e o NEP, e o controle do percevejo-marrom foi causado apenas pela ação do nematoide.

Wagner e Urich-Merzenich (2009) definem como interação sinérgica, quando o efeito produzido pela combinação de substâncias for superior ao esperado com base na contribuição individual de seus componentes, neste caso a Azadiractina não contribuiu de forma significativa com a mortalidade do percevejo-marrom, e o único agente responsável pelo controle do *E. heros* foi o isolado IBCB-n 46, logo está interação não apresenta características de sinergismo.

**Tabela 05.** Porcentagem de mortalidade de *Euschistus heros* após aplicação do isolado IBCB-n 46 e Azadiractina, em arena com palhada mista, simulando condição de campo para avaliar ação sinérgica dos agentes de controle.

Tratamentos	Mortalidade (%)
Testemunha	15,00 ±12,91a*
Azadiractina	22,50 ±22,17a
IBCB-n 46	65,00 ±10,00b
IBCB-n 46 + Azadiractina	72,50 ±12,58b
C.V. (%)	34,60

\* As médias seguidas pelo mesmo número na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

Devido redução drástica na viabilidade do isolado IBCB-n 46 no item anterior e a falta de acréscimo na mortalidade do *E. heros*, a Azadiractina não foi utilizado nas etapas a campo.

### 3.4.5 Primeiro ensaio de campo

Embora tenha havido mortalidade, nenhum dos tratamentos avaliados teve mortalidade confirmada por NEPs no primeiro ensaio realizado em campo (Tabela 06).

**Tabela 06.** Porcentagem de mortalidade de adultos de *Euschistus heros* provenientes do campo causada naturalmente e por isolados de nematoides entomopatogênicos.

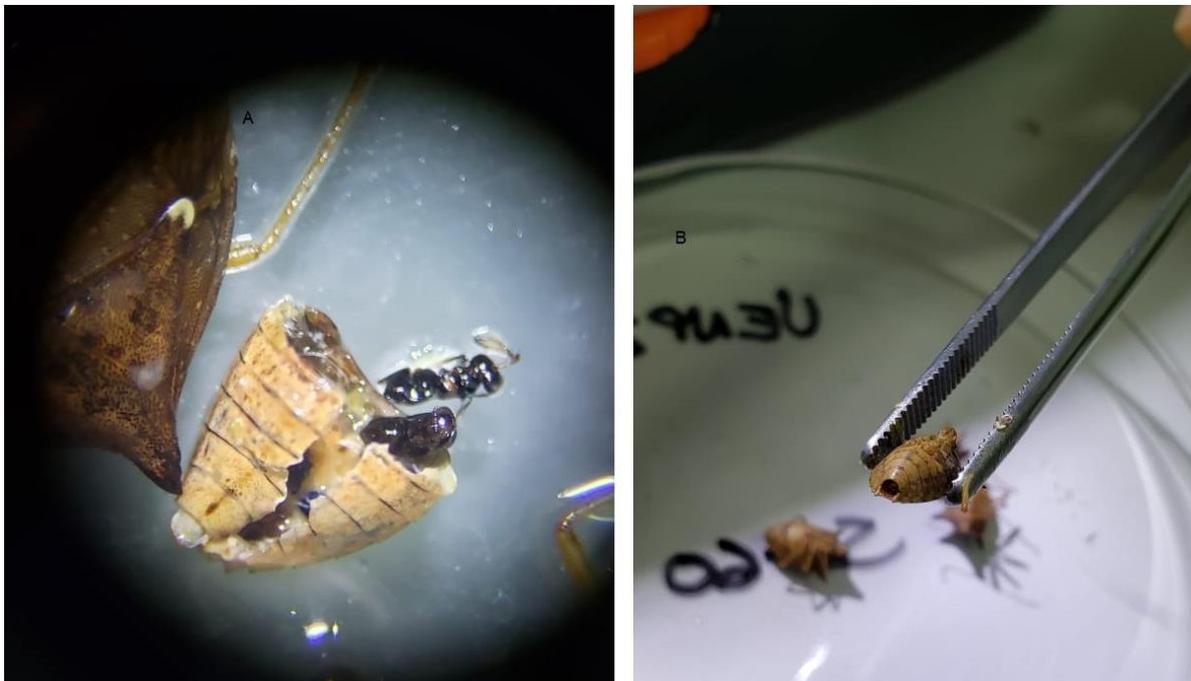
Tratamentos	Mortalidade no campo	Mortalidade confirmada
Testemunha	24,29 ±9,76a	0,00
IBCB-n 46 25% da concentração	17,14 ±12,53a	0,00
IBCB-n 46 50% da concentração	24,29 ±5,34a	0,00
IBCB-n 46 75% da concentração	31,43 ±19,52a	0,00
IBCB-n 46 100% da concentração	22,86 ±24,98a	0,00
UENP 02	22,72 ±9,76a	0,00
UENP 05	20,00 ±19,76a	0,00
UENP 06	10,00 ±15,27a	0,00
UEL 08	25,72 ±7,07a	0,00
Média Total	22,86±5,98	-
C.V. (%)	68,28	

\* As médias seguidas pelo mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

Como citado acima, observou-se que houve mortalidade em alguns tratamentos a campo. No entanto, após a dissecação dos percevejos em laboratório constatou-se que não houve confirmação de morte por nenhum dos isolados de NEPs, e que toda a mortalidade foi causada por agentes externos ao ensaio, principalmente por um parasitoide, que foi coletado e enviado a especialista da Universidade Estadual de Londrina, e foi identificado como pertencendo a espécie *Hexacladia smithii* (Figura 06).

O alto índice de parasitismo nos percevejos, se deveu ao fato dos insetos utilizados neste experimento serem provenientes do campo, e estes adultos já estavam parasitados quando foram postos nas armadilhas.

**Figura 06.** Adulto de *Euschistus heros* parasitado por *Hexacladia smithii*. A: forma adulta do parasitoide *H. smithii* mortos dentro do percevejo-marrom. B: percevejo adulto com sintoma de saída de parasitoide.



Fonte: Douglas Martins Cecconello (2019).

A opção de trabalhar com insetos provenientes de população do campo, se deveu ao fato desta ter se mostrado mais resistente a infecção pelo nematoide no teste de seleção de isolados, e por esta apresentar um índice de mortalidade menor que a população criada em laboratório.

Por outro lado, os dados de mortalidade dos percevejos causados por *H. smithii* conferem com trabalho realizado por Corrêa-Ferreira e Sosa-Gómez (2017) onde foi monitorado os índices de parasitismo no período de 24 meses de 2015 á 2016 em Ibitiporã, Paraná, e o microhimenóptero *H. smithii* junto de moscas da família Tachinidae foram os principais responsáveis pelo parasitismo de percevejos *E. heros*, atingindo em maio, mesmo mês em que foi instalado o primeiro ensaio a campo do presente trabalho, uma mortalidade por parasitismo próxima dos 25%, semelhante a média total de 22,86%.

Outro fator que pode ter interferido na baixa virulência dos NEPs foi o fato do solo não estar úmido no momento da aplicação dos tratamentos, e a falta de umidade no solo formou um ambiente desfavorável que pode ter corroborado para a ineficácia no controle do percevejo-marrom pelos isolados de nematoides. Os NEPs buscam sinais dissolvidos na água, como rastros deixados por seus hospedeiros, seja exsudados liberados pelas plantas atacadas ou seja

vestígios químicos (como fezes) deixados por insetos, a falta de umidade no ambiente pode ter nublado o sentido dos NEPs prejudicando assim sua patogenicidade (LEWIS et al., 1993; KUNKEL et al., 2006; LEWIS et al., 2006; FUGA et al., 2012), além disso a falta de água pode fazer com que os NEPs entrem em anidrobiose quiescente (WOMERSELY, 1990).

### 3.4.6 Segundo ensaio de campo

Tentando resolver os problemas enfrentados no primeiro ensaio em campo, no segundo ensaio foram utilizadas duas populações do inseto: indivíduos adultos provenientes de população de percevejo-marrom criada em laboratório (para que não houvesse indivíduos já parasitados por outros agentes de controle biológico) e insetos provenientes do campo. Além disso, o ensaio foi realizado logo após uma chuva, para contar também com maior umidade no solo, favorecendo assim, a ação dos NEPs.

Os dois isolados avaliados foram virulentos sobre insetos adultos de *E. heros*, tanto na população proveniente de criação em laboratório, quanto na população proveniente de campo (Tabela 07), mas apenas o isolado UENP 05 diferiu significativamente da testemunha para as duas populações do inseto.

Não houve significância na análise que avaliou a diferença de suscetibilidade das duas populações do inseto para cada um dos isolados, diferindo do observado no ensaio de seleção de isolados.

**Tabela 07.** Porcentagem média de mortalidade não confirmada e confirmada de *Euschistus heros* provenientes de campo e de criação em laboratório causada por isolados de nematoides entomopatogênicos UENP 05 e IBCB-n 46 em condições de campo.

Tratamentos	Mortalidade não confirmada		Mortalidade confirmada	
	População de Campo (%)	População de Laboratório (%)	População de Campo (%)	População de Laboratório (%)
Testemunha	31,43 ±15,73Aa	2,86 ±4,88Bb	-	-
UENP 05	52,86 ±17,99Aa	21,43 ±10,69Ba	18,57 ±6,90Aa	11,43 ±6,90ABa
IBCB-n 46	55,71 ±30,47Aa	21,86 ±10,69Ba	12,86 ±11,12Aa	15,71 ±5,34Ab
C.V. (%)	59,56		60,10	

\* As médias seguidas pelo mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

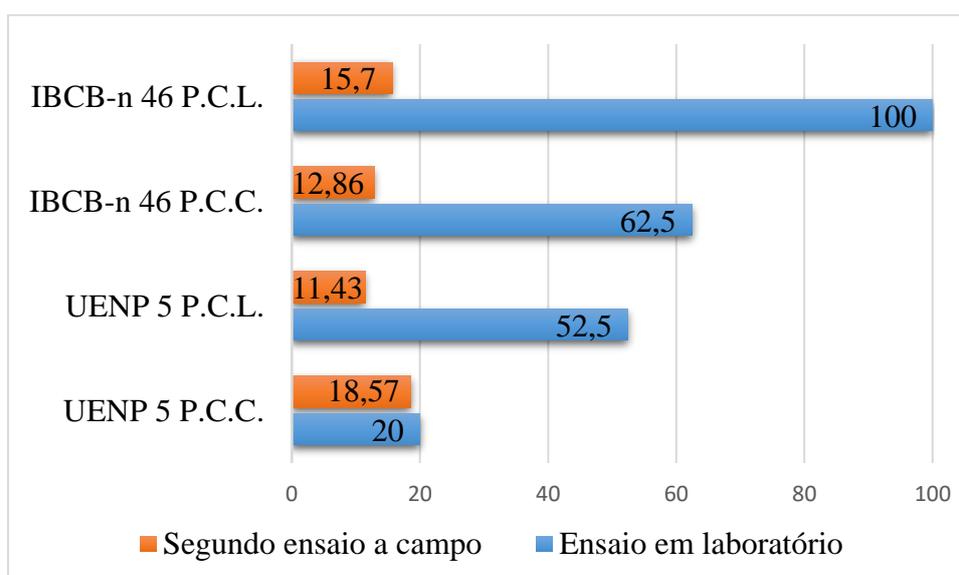
O controle exercido pelos isolados IBCB-n 46 e UENP 05 na população de percevejos coletados a campo não diferenciaram do tratamento controle, em que houve 31,43% de controle sem a presença dos NEPs (não houve mortalidade confirmada por NEPs neste tratamento).

Porém, os isolados de NEPs incrementaram em mais de 20% o índice de mortalidade, atingindo 55,71% com o isolado IBCB-n 46, mostrando que o controle é efetivo faltando apenas aperfeiçoar a forma de aplicação, provavelmente em ambiente com mais umidade os isolados teriam desempenho melhor.

Quando a população é proveniente de laboratório o índice de mortalidade na testemunha foi menor do que a população coletada em campo provavelmente por estarem menos expostos a patógenos e outros inimigos naturais que ocorrem no ambiente, neste caso houve diferença significativa entre a testemunha e os isolados IBCB-n 46 e UENP 05, porem os mesmo não diferiram entre si como visto no teste em condições de laboratório (Tabela 03).

Assim, é possível observar que embora os estudos de seleção de isolados em condições de laboratório demonstram que os NEPs são promissores como agentes de controle do percevejo-marrom, quando avaliado o seu desempenho em condições de campo, ocorre uma queda no índice de mortalidade (Figura 07).

**Figura 07.** Comparativo de mortalidade de adultos do *Euschistus heros* em condições de laboratório e em condições de campo causada pelos isolados de nematoides entomopatogênicos IBCB-n 46 e UENP 5.



P.C.C.: População coletada a campo

P.C.L.: População criada em laboratório

A principal redução na porcentagem de mortalidade está associada ao isolado IBCB-n 46, o que pode ser justificado pelas condições ideais de umidade que o laboratório oferece, e que são essenciais para que o isolado possa infectar o inseto hospedeiro.

Também Leite et al. (2012) ao avaliarem a eficiência de isolados de NEPs contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus sp.* em cana-de-açúcar destacam em sua metodologia que as aplicações deveriam ser realizadas no máximo três dias após uma chuva para que o solo forneça as condições propícias para atuação dos NEPs.

Os insetos coletados do campo muitas vezes já estão sofrendo ataques por outros agentes patológicos de ocorrência natural podendo fazer com que o inseto esteja com o sistema imune em alerta, isso pode ter tornado o inseto tolerante aos NEPs. Ao NEP penetrar em um hospedeiro não susceptível isso pode ser fatal pois o sistema imunológico do inseto age contra o nematoide e a bactéria (DOWDS; PETERS, 2002; FUGA et al., 2012).

O isolado UENP 05 no segundo ensaio em campo, embora tenha sofrido menor variação menor do controle em laboratório quando comparado ao controle a campo, também foi influenciado pelas condições adversas, isso demonstra que outros isolados podem sofrer quedas de virulência devido a condições desfavoráveis, por se tratar de um isolado proveniente região possivelmente mais adaptado ao clima local conferindo resiliência.

Para comprovar a eficácia dos NEPs como agentes de controle biológico contra o *E. heros*, cabe estudar uma melhor forma de se aplicar e utilizar o isolado para o controle em campo. Leite et al., (2002) (2005) em condições de laboratório utilizando os isolados: *Heterorhabditis sp.* (IBCB-n 5), *Steinernema sp.* (IBCB-n 6) e *Heterorhabditis sp.* (CCA) causou a mortalidade da *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae) em 100%, 98% e 96%, respectivamente. Já em condições de campo com mesmo isolado Leite et al., (2005) utilizando a dosagem de  $6,6 \times 10^7$  JI/ha promoveu um controle de até 70% da população de cigarrinha das pastagens.

Também Alves et al. (2009a) observaram que em condições de laboratório obtiveram até 100% de mortalidade do inseto *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae), mas ao levar o trabalho para casa de vegetação e campo, a porcentagem de controle caiu para 70% (Alves et al., 2009b).

A maior tolerância aos NEPs das populações de *E. heros* coletadas em campo devem ser estudadas, pois se utilizar em trabalhos futuros apenas população de insetos criados em laboratório os dados podem sofrer interferências nos valores apresentados.

O ensaio em campo elucidou alguns entraves para o controle eficaz do percevejo-marrom, como a umidade do solo é crucial para efetividade do parasita e no meio ambiente não se pode controlar esta variável, talvez seja mais propício atrair o inseto até um local onde o nematoide esteja convenientemente abrigado em condições ideais e não tentar aplicá-lo sobre o *E. heros*, mais trabalhos devem ser desenvolvidos alterando sua forma de aplicação para encontrar uma forma mais adequada de utilizar estes agentes do controle biológico de elevado potencial.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Todos os isolados testados apresentaram patogenicidade contra o percevejo *E. heros*, e os isolados de NEPs com maior potencial de controle foram IBCB-n 46, NEPET 11 e IBCB-n 40.

A Azadiractina embora reduza a viabilidade do isolado IBCB-n 46 não acrescenta ou reduz a virulência do mesmo em larvas de *G. mellonella* e adultos de *E. heros*.

A população de *E. heros* coletadas em campo possui propensão de estar parasitada por outros agentes de controle biológico.

Em condições de campo os isolados IBCB-n 46 e UENP 05 apresentam o mesmo desempenho de controle contra adultos de *E. heros*.

O controle a campo não foi satisfatório, sendo a umidade do solo um provável limitante para sua eficácia de controle, requerendo mais estudos para obter a melhor forma de utilização dos isolados para manejo do percevejo-marrom.

#### **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-267, 1925.

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 03 de janeiro de 2020.

ALMENARA, D.P. ROSSI, C.; NEVES, M.R.C.; WINTER, E. Nematoides entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, p. 01-40, 2012.

AGROLINK. **Bula Azamax.** Disponível em <[https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/Azadiractina\\_7627.html](https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/Azadiractina_7627.html)> acessado 23 de janeiro de 2020.

ALVES, S. B.; LECUONA, R.E. Controle microbiano de insetos: Epizootiologia aplicada ao controle microbiano. **Controle Microbiano de Insetos**, 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 97-170, 1998.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle Microbiano de pragas na América Latina. FEALQ, **Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz**, volume 14, Piracicaba, SP, cap. 6, p. 171-202, 2008.

ALVES, V. S.; MOINO, A. J.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; ANDALÓ, V. SOUZA, G. C. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n.1, p. 67-73, janeiro/fevereiro, 2009a.

ALVES, V. S.; MOINO, A. J.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; ROHDE, C.; TRAMONTINA, M. A. S. Testes em condições para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera, Pseudococcidae) em cafeeiro com nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida, Heterorhabditidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, p. 139-143, março 2009b.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA L. V. R. S.; Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, 28 (2): 149-158, 2004a.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do instituto Biológico**, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2004b.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LUNA-ALVES E. A. L. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para controle de carrapato bovino *Boophilus microlus*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 21, p. 12-15, 2001.

AU, C.; DEAN, P.; REYNOLDS, S.E.; FRENCH-CONSTANT, R. H. Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. **Cellular Microbiology**. 6, 89-95, 2004.

BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, E. M.; MARTINS, J. C.; CHEDIAK, M. SENA, M. E. Seletividade fisiológica de inseticidas aos inimigos naturais de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Brassicae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol. 33, 2009.

BACKUS, E. A. Sensory systems and behaviours which mediate hemipteran plant-feeding: a taxonomic overview. **Journal of Insect Physiology**. v. 34. p.151-165. 1988.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. p. 1-18.

BOFF, M. I. C.; WIEGERS, G. L.; GERRITSEN, L. J. M.; SMITS, P. H. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**. V. 2, p. 303-308, 2000.

BRACHMANN, A.O.; JOYCE, S.A.; JENKE-KODAMA, H.; SCHWÄR, G.; CLARKE, D.J.; BODE, H.B. A type II Polyketide Synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. **ChemBioChem**. 14, 1721-1728, 2007.

BRUGIRARD-RICHAUD, K.; GIVAUDAN, A.; PARKHILL, J.; BOEMARE, N., KUNST, F.; ZUMBIHL, R.; DUCHAUD, E. Variation in the effectors of the type III secretion system among *Photorhabdus* species as revealed by genomic analysis. **Journal of Bacteriology**, 186, 4376-4381, 2004.

BUENO, A.F.; BATISTELA, M.J.; BUENO, R.C.O.F.; FRANÇA-NETO, J.B.; NISHIKAWA, M.A.N.; FILHO, A. L. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. **Crop Protection**, v. 30, n. 7, p. 937-945, 2011.

BUENO, A. F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; ROGGIA, S.; BIANCO, R. Silenciosos e daninhos. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. 6, p. 25-27, 2015.

BUNDY, C. S.; MCPHERSON, R. M. Morphological examination of stink bug (Heteroptera, Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to genera. *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 616-624, 2000.

CALDAS, C.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.1297–1304, 2002.

CÂMARA G. **Produção de Cana, Mandioca e Soja: Introdução ao Agronegócio soja**. USP/ESALQ – Departamento de Produção vegetal, Piracicaba, 16 de novembro de 2015.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. **Valor nutritivo da soja e potencial de utilização na dieta brasileira**. Londrina: EMBRAPA, Documentos 29, 13 p., 1988.

CHOCOROSQUI, V. R. **Bioecologia de espécies de *Dichelops (Diceraeus)* (Heteroptera: Pentatomidae) e danos em soja, milho e trigo no Norte do Paraná**. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 158 f., 2001.

CIVIDANES, F. J.; PARRA J. R. P. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja do Brasil. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, v. 23, p. 219-226, 1994.

CLARKE, D.J. Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*, v.10, p. 2159-2167, 2008.

CONAB – Companhia de Abastecimento. 2020. **Acompanhamento de safra brasileira: Grãos, agosto de 2019**. Brasília-DF: Conab. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em 22 de janeiro de 2020.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. Ocorrência, no Brasil, de *Trissolcus basal*, parasita de ovos de *Nezara viridula*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.15, p.127-128, 1980.

CORRÊA-FERREIRA B. S.; PANIZZI A. R. Percevejo da soja e seu manejo. Londrina: Embrapa Soja. **Circular técnica 24**, janeiro de 1999.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. *Trissolcus basal* para o controle de percevejos da soja. In: PARRA et. al. (Eds). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 449-476, 2002.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1067- 1072, 2005.

CORRÊA-FERREIRA, B S.; PAVÃO, A L. **Monitoramento de percevejos da soja: maior eficiência no uso do pano-de-batida**. Embrapa Soja, Londrina, Documentos 257, p. 152-153, 2005.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; KRZYZANOWSKI, F.C.; MINAMI, C.A. Percevejos e a qualidade da semente de soja – série sementes. Londrina: Embrapa Soja, **Circular técnica 67**, 15 p., 2009.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; ALEXANDRE, T.M.; PELLIZZARO, E.C.; MOSCARDI, F.; BUENO, A.F. Práticas de manejo de pragas utilizadas na soja e seu impacto sobre a cultura. Londrina: Embrapa Soja, **Circular Técnica 78**, 16 p., 2010.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. **Percevejos e o sistema de produção soja-milho**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos 397, 98 p., novembro 2017.

COWLES, K.N., GOODRICH-BLAIR, H. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. **Cellular Microbiology**, v.2, p.209–219, 2005.

DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. Pragas da soja. **Fundação MT**, p. 3, 2005.

DI BELLO, M. M.; BELUFI, L. M. R.; PITTELKOW, F. K.; PASQUALLI, R. M. **Avaliação de eficiência de inseticidas para controle de percevejo-marrom (*Euschistus heros*) na cultura da soja em Lucas do Rio Verde – MT**. Boletim técnico n° 2 e segunda safra 2017.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Brazilian Nematological Society**, Nematoda, p.102-117, 2017.

DOMINGUES, V. M. F.; Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretróides em águas. 224 f. Dissertação (Doutor em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia, **Universidade do Porto**, Porto, Portugal, 2005.

DOWDS, B.C.; PETERS, A. Virulence mechanisms. **Entomopathogenic Nematology**, ed. Gaugler, R. CABI Publishing, p. 79–98, 2002.

DOWLING, A.J.; DABORN, P.J.; WATERFIELD, N.R.; WANG, P.; STREULI, C.H.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**. 6, 345-353, 2004.

EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná 1996/97**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos 97, 187p., 1996.

EMBRAPA. Sistema de Produção: Tecnologia de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2011. **Embrapa Soja**, Londrina, PR, 2010.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2018/19)**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> acessado dia 29 de outubro de 2019.

Ferraz, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. p. 551– 567. In: S. B. Alves. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ-USP, 1163 p., 1998.

FORST, S.; CLARKE, D. J. **Nematode-bacterium symbiosis. Entomopathogenic Nematology**. ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 57–77, 2002.

FUGA, C. A. G.; FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A. Nematoides Entomopatogênicos. **Revista Tropical: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 56- 75, 2012.

GALILEO, M. H. M.; HEINRICHS E. A. Efeito dos danos causados *por Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera, Pentatomidae), em diferentes níveis e épocas de infestação, no rendimento de grãos de soja *Glycine max* (L.) Merrill. **Anais da Sociedade De Entomologia Brasileira**. v. 7: p. 20-25, 1978.

GAZZONI, D. L. Efeito de três populações de percevejos sobre a produtividade, qualidade da semente e características agrônômicas de três cultivares de soja. **Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja**, 8 p., 1996.

GAZZONI, D. L. Perspectivas do manejo de pragas. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Primeira edição, Brasília, DF: Embrapa, p.789-829. 859p., 2012.

GODOY, K. B.; ÁVILA C. J.; DUARTE M. M.; ARCE C. C. M. Parasitismo e sítios de diapausa de adultos do percevejo-marrom, *Euschistus heros* na região da Grande Dourados, MS. **Ciência Rural Santa Maria Online**, 2010. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2010nahead/a567cr1917.pdf>> acessado em 23 de março de 2019.

GOLIN, V.; FOERSTER, L. A.; BUTNARIU, A. R. **Incidência natural, biologia, seletividade e efeito de liberações inoculavas de parasitoides de ovos (Hymenoptera: Platygasteridae) no controle de Euschistus heros (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) no Mato Grosso.** 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GUIDE, B. A.; ALVES, V. S.; FERNANDES, T. A. P.; FERREIRA, F. P.; NEVES, P. M. O. J. Glicerol como agente crioprotetor dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis* spp e *Steinernema* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3017–3026, 2016a.

GUIDE, B. A.; SOARES, E. A.; ITIMURA, C. R. B.; ALVES, V. S. Entomopathogenic nematodes in the control of cassava root mealybug *Dysmicoccus* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, p. 16-21, junho, 2016b.

GUIDE, B. A.; ALVES, V. S.; FERNANDES, T. A. P.; MARCOMINI, M. C.; MENEGHIN, A. M.; NEVES, P. M. O. J. Pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes against *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae). **Semina: Ciência Agrária**, v. 40, n. 4, p. 1417- 1426, jul/ago. 2019.

HAN, R.C.; EHLERS, R.U. Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. **Journal Invertebrate Pathology**. 75, 55-58, janeiro, 2000.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR). **Agrometeorologia: Dados diários de Londrina.** Disponível em <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2603> acessado dia 18 de outubro de 2019.

JOYCE, S.A.; BRACHMANN, A.O.; GLAZER, I.; LANGO, L.; SCHWÄR, G.; CLARKE, D.J.; BODE, H. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. **Angewandte Chemie**. 47, 1942-1945, 2008.

KIM, Y.; JI, D.; CHO, S; PARK, Y. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. **Journal Invertebrate Pathology**, 89, 258-264, 2005.

KUNKEL, B. A.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; CAMPBELL, J. F.; LEWIS, E. E. Effect of *Steinernema glaseri*-infected host exudates on movement of conspecific infective juveniles. **Journal of Invertebrate Pathology** 93, 42–49, 2006.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GINARTE, C.M.A. Nematoides contra os insetos. **Cultivar**, v.64, p.12-15, 2004.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JUNIOR, A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Agricultura**, v.78, n.1, p.139-148, 2002.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; FILHO, A. B. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, vol. 34, n. 5, Londrina, 2005.

LEITE, G. L.; TAVARES, F. M.; BOTELHO, P. S. M.; FILHO, A. B.; POLANEZYK, R. A.; SCHMIDT, F. S. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 40-48, 2012.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae*) in host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, v. 71, p. 765–769, 1993.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. F.; GRIFFIN, C.; KAYA, H. K.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, 38, 66–79, 2006.

LI, X. Y.; COWLES, E. A.; COWLES, R. S.; GAUGLER, R.; COX-FOSTER, D. L. Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. **Molecular Biochemical Parasitology**, 165, 162-169, 2009.

MAGNABOSCO, MEB, ANDALÓ, V, FARIA, L.S. Compatibility between entomopathogenic nematodes and crop protection products used in maize seed treatment. **Semina**, 40(6): 2487-2496, 2019.

AIZELS, R.M.; BLAXTER, M.L.; SCOTT, A.L. Immunological genomics of *Brugia malayi* filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity. **Parasite Immunology**. 23, 327-344, 2001.

MISSÃO, M. R. Soja: Origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Maringá Management: **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n.1,p. 7-15, . 2006.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. A soja no Brasil. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1062 p., 1977.

MOLINA, J. P. A.; LÓPEZ, N. J. C. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-78, 2001.

MOREIRA, H. J. C.; ARAGÃO, F; D. Manual de Pragas da soja. **FMC Agricultural Products**. Campinas, SP, p. 118 – 121, 2009.

MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PARRA, J. R. P. O controle biológico das pragas da soja. **Visão Agrícola**, n 5, p. 89-92, jan/jun 2006.

MOURÃO, A. P. M. **Influência do fotoperíodo na indução da diapausa do percevejo-marrom, Euschistus heros (F.) (Heteroptera: Pentatomidae)**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. **Estágios ninfais fotossensíveis à indução da diapausa em Euschistus heros (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae)**. Sociedade entomológica do Brasil, Londrina, vol. 29, no. 2, junho de 2000a.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A.R. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no Norte do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 205-218, 2000b.

NEGRISOLI JR, A. S.; BARBOSA, C. R. C.; MOINO JÚNIOR, A. Avaliação de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernema) utilizado no protocolo da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 111- 116, 2008.

NEGRISOLI JR, A. S.; GARCIA, M. S.; NEGRISOLI C. R. C. B. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) under laboratory condiction. **Crop Protection**, v. 29, p. 545–549, 2010.

NGUYEN, K.B; SMART, G.C. Life cycle of *Steinernema scapterisci*. Nguyen & Smart, 1990. **Journal Nematology**. 24, 160-169, 1992.

OLIVEIRA, H. N.; ÁVILA, C. J. Controle biológico de pragas no Centro-Oeste brasileiro. In: **Controle Biológico**, Revista de Controle Biológico, p. 11-13, abr. 2010.

PANIZZI, A. R. Wild host of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 99-122, 1997.

PANIZZI, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; SMANIOTTO, L. F.; PEREIRA, P. R. V. S. **Manejo Integrado dos Percevejos Barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo**. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Boletim técnico 114, 2015.

PANIZZI, A. R.; BUENO A. F.; SILVA, F. A. C. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 1º edição, Embrapa. Capítulo 5, p. 335-420, 2012.

PANIZZI, A.R.; NIVA, C.C. Overwintering strategy of the bown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n. 3, p.509-511, 1994.

PANIZZI, A.R.; SLANSKY JR, F. Review of Phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in Americas. **Florida Entomologist**, v.68, p.184-214, 1985.

PARACER, S.; AHMADJIAN, V. Symbiosis: An Introduction to Biological Associations. Oxford: **Oxford University Press**, segunda edição, 2000.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos, p. 1015-1037. In S.B. Alves (ed.), **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, FEALQ, 1163p, 1998.

PETERS, A.; POULLOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. **IOBC/WPRS Bulletin**, Montfavet, v. 27, n. 6, p. 67-72, 2004.

POINAR, G.O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. p. 23-60 Boca Raton, Florida, 1990.

POINAR, JR., G. O. Biology and taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boston: **CRC Press**, p. 23-62, 1990.

SALUSO, A.; XAVIER, L.; SILVA, F.A.C.; PANIZZI, A.R. An invasive pentatomid pest in Argentina: the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.40, p.704-705, 2011.

SANTOS, C. A. M.; AZEVEDO, F. R.; ALBURQUERQUE, F. A.; ARAÚJO, G. P.; SILVA, W. I. D.; MESQUITA, F. O. Intervalo de aplicação do Azadiractina® sobre pragas sugadoras do algodoeiro e seus inimigos naturais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 14, n. 3, 2019.

SILVA, E. H.; LINS L. C. P.; HIROSE E. Avaliação do dano causado pelo percevejo-marrom *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) em duas cultivares de soja. **XXV Congresso Brasileiro de Entomologia**. Goiânia, GO, setembro de 2014.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. de. Controle biológico de insetos-praga na soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; ROSCOE, R. (Ed.). Tecnologia e produção: Soja 2013/2014. Maracaju, MS: **Fundação MS**, p. 178-193, 2014.

SORIA, M. F.; THOMAZONI, D.; MARTINS, R. R.; DEGRANDE, P. E. Stink bugs incidence on Bt cotton in Brazil. In: **Beltwide Cotton Conferences**, 2009, San Antonio, Texas, p. 813-819, 2009.

SOSA-GOMEZ, D. R.; ROGGIA, S. Manejo da resistência do percevejo-marrom a inseticidas. Embrapa Soja, Londrina, **Folder 18**, junho, 2013.

SOSA-GOMEZ, D.R. CORSO, I.C.; MORALES, L. 2001. Insecticide resistance to Endosulfan, Monocrotophos and Metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.317-320.

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efeito do contato dos fungos *Bauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, p. 84-87, 1999.

SOUZA, L. M.; MOINO JR, A.; MERTZ, N. R.; SILVA, M. A. T.; SOARES, F. M. FILHO, R. Z. B. Nematoides entomopatogênicos e compatibilidade com imidaclopridevisando ao controle de *spodoptera frugiperda* em viveiro florestal. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, vol. 36 (1-2), p. 32-41, 2012.

STANLEY, D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 25-44, 2006.

TAVARES, F. M.; FILHO, A. B.; LEITE, L. G. ALMEIDA, L. C.; GOULART T. M. Efeitos Sinérgicos de Combinações entre Nematóides Entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e Inseticidas Químicos na Mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, v. 4, 2009.

VENTURA, M. U.; PANIZZI, A. R. Morphology of Olfactory sensilla and its role in Host plant Recognition by *Neomegalotomus parvus* (Westwood) (Heteroptera: Alydidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48 n.4 p.589-597, 2005.

VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; PANIZZI, A. R. **Indicações ao manejo de pragas para percevejos**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, Boletim n. 5, 11 p., 1985.

VIVAN, L.M.; DEGRANDE, P.E. Pragas da soja. **Fundação MT**. Boletim de Pesquisa de Soja, v.11, p.239-297, 2011.

VIVIANI, V.R.; SIMÕES, A.; BEVILAQUA, V.R.; GABRIEL, G. V. M.; ARNOLDI, F.G.C.; HIRANO, T. Glu311 and Arg337 Stabilize a Closed Active-site Conformation and Provide a Critical Catalytic Base and Countercation for Green Bioluminescence in Beetle Luciferases. **Biochemistry**, v. 55, n. 34, p. 4764-4776, 2016.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI, A. S. J.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2009.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p.97-110, 2009.

WATERFIELD, N. R.; HARES, M.; YANG, G.; DOWLING, A.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. **Cellular Microbiology**, 7, 373-382, 2005.

WILLRICH, M. M.; LEONARD, B. R.; TEMPLE, J. Injury to preflowering and flowering cotton by brown stink bug and southern green stink bug. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 924-933, 2004.

ZAMBIAZZI, E. V.; CORASSA, J. N.; GUILHERME, S. R.; BONALDO, S. M. Controle biológico in-vitro do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, p. 43, 2011.