



Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho

Samanta Letícia Lopes Nanzer

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho

Samanta Letícia Lopes Nanzer

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

São Paulo
2021

Samanta Letícia Lopes Nanzer

Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Prof. Dr. Luis Garrigós Leite

São Paulo
2021

Eu **Samanta Letícia Lopes Nanzer**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Samanta Letícia L. Nanzer Data 15/07/2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Nanzer, Samanta Letícia Lopes.

Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho. / Samanta Letícia Lopes Nanzer. - São Paulo, 2021.

64 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.SN003

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luís Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Assessment of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria to control the stink bugs *Euschistus heros* and *Dichelops melacanthus* in the soybean-corn succession system.

1. Manejo integrado de pragas 2. Controle biológico 3. Pentatomidae
Steinernema 4. *Heterorhabditis* I. Nanzer, Samanta Letícia Lopes II. Leite,
Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2021/003

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Samanta Letícia Lopes Nanzer

Título: Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho


Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

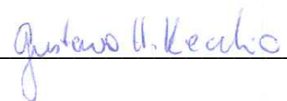
Aprovado em:

Banca Examinadora

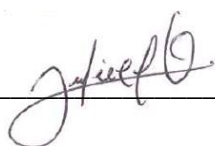
Prof. Dr. Luís Garrigós Leite Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Aprovada _____ Assinatura: _____ 

Prof. Dr. Gustavo Henrique Recchia Instituição: Gênica Inovação Biotecnológica

Julgamento: _____ Aprovada _____ Assinatura: _____ 

Profª. Dra. Julie Chacon Orozco: Instituto Biológico/ APTA

Julgamento: _____ Aprovada _____ Assinatura: _____ 

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a oportunidade de realização do mestrado na pós-graduação do Instituto Biológico, especialmente:

Ao meu orientador Dr. Luís Garrigós Leite, pelos ensinamentos, acolhimento e empenho na realização deste trabalho;

A agência de fomento FAPESP por financiar esse projeto (2020/04676-2);

A agência de fomento CAPES por financiar o programa de pós-graduação;

A empresa Gênica pela oportunidade da realização do mestrado enquanto sua colaboradora. Agradeço em especial o colaborador Gustavo H. Recchia, que esteve presente em várias etapas desse projeto, propondo soluções e sugestões que enriqueceram o trabalho;

A empresa Oxitec do Brasil por possibilitar que eu fizesse parte do quadro de colaboradores finalizando o mestrado;

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico: Raphael, Julie, Fernando, Jorge e Mateus, pela convivência e ajuda que disponibilizaram para o desenvolvimento desse trabalho;

A Ester M. Sousa que dividiu o alojamento comigo durante os meses que morei no Instituto Biológico, pela sua amizade e ajuda durante todo o percurso;

Ao Marvin Pec, pelo auxílio nas análises estatísticas desse trabalho;

Aos membros da banca pela extensa revisão e contribuição para o trabalho;

Aos meus pais: Maria Leonor Lopes Nanzer e Marco Antônio Nanzer que sempre apoiaram as minhas escolhas, e que possibilitaram que eu me tornasse o que sou hoje;

Aos meus irmãos: Gabriel e Pedro, por me animarem todos os finais de semana que voltava para casa;

Ao meu amor: Lucas P. Cavion, por sempre se fazer presente, e me animar em todos os momentos;

A minha família e amigos, agradeço de coração por toda a positividade durante o percurso;

Agradeço a Deus por possibilitar a realização de mais esse sonho;

Obrigada!

Pedras no caminho? Eu guardo todas. Um dia vou construir um castelo.

(Fernando Pessoa)

NANZER, Samanta Letícia Lopes. 2021. 64 f. Potencial de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas para o controle dos percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja-milho. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2020.

RESUMO

Os percevejos *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* são as pragas mais importantes na atualidade para o sistema de sucessão soja-milho no Brasil. *Dichelops melacanthus* ataca as plantas de milho na fase de plântula de seu desenvolvimento, permanecendo e se reproduzindo na palha ao longo de gerações. Enquanto o *E. heros* se alimenta principalmente dos grãos de soja e se aloja sob as folhas caídas após a colheita, devido à ausência de outra cultura hospedeira. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) têm a capacidade de matar insetos devido à sua capacidade de buscar o hospedeiro no solo e às suas associações com bactérias simbióticas que causam a patogênese. Este trabalho teve como objetivo avaliar isolados de nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbióticas quanto ao seu potencial para controlar adultos de *E. heros* e *D. melacanthus*. Nematoides entomopatogênicos podem ser usados para controlar os percevejos adultos que ficam sobre a palhada, enquanto a bactéria simbiótica pode ser usada para controlar esses insetos acima do solo, sendo muito mais fáceis de produzir em comparação com os NEPs. Para avaliar as NEPs e suas bactérias simbióticas, os testes foram realizados em laboratório e em casa de vegetação. Os nematoides: *S. diaprepesi* AM163, *S. carpocapsae* All e *S. carpocapsae* IP1 causaram 100% de mortalidade no *E. heros* no substrato areia, a uma concentração de 140 JIs/cm² (1000 JIs/ inseto). As bactérias simbióticas testadas topicamente forneceram baixa mortalidade para *E. heros* (< 40,3%). No teste com *S. diaprepesi* AM163 aplicado no substrato de areia em cinco concentrações diferentes e avaliação no sétimo dia após a inoculação dos NEPs, a mortalidade de *E. heros* permaneceu abaixo de 50%, exceto nas altas concentrações de 24 JIs / cm² (50%) e 256 JIs / cm² (80%), respectivamente. Maiores proporções de mortalidade também resultaram no aumento do número de JIs produzidos por inseto, até a concentração de 88,4 JIs / cm² (5.400 JIs). O nematoide *S. diaprepesi* AM163 aplicado em *E. heros* em dois substratos (areia e palha) com espessuras de duas camadas, a uma concentração de 88,4 JIs / cm², causou altos índices de mortalidade de insetos (≥ 69%), independente do substrato e sua espessura de camada. O nematoide *S. diaprepesi* AM163 foi duas vezes mais virulento para *E. heros* (69,1% de mortalidade) do que para *D. melacanthus* (28,8%). *Dichelops melacanthus* foi igualmente resistente a ambos os nematoides *S. diaprepesi* AM163 e *S. carpocapsae* IP1. No teste de casa de vegetação, *S. diaprepesi* AM163 causou

novamente um alto nível de mortalidade para *E. heros* (72,5%) na alta concentração de 88,4 JIs / cm². Assim, Os NEPs podem ser uma alternativa para o controle de *E. heros* se altas concentrações de produção e uso se tornarem lucrativas e viáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Manejo Integrado de Pragas, Controle Biológico, Pentatomidae, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

NANZER, Samanta Letícia Lopes. Assessment of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria to control the stink bugs *Euschistus heros* and *Dichelops melacanthus* in the soybean-corn succession system. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2020.

ABSTRACT

The Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* and the green-belly stink bug *Dichelops melacanthus* are the most important pests today for the succession system soy-corn in Brazil. *Dichelops melacanthus* attacks the emerging shoot (epicotyl) of corn plants at the seedling stage of their development, remaining and reproducing on the straw over generations. *Euschistus heros*, on the other hand, feeds directly on the grains and lodge under fallen leaves after the soybean harvest, due to the absence of another crop host. Entomopathogenic nematodes (EPNs) are capable of killing insects due to their ability to search for the host in the soil and to their associations with symbiotic bacteria that cause pathogenesis. This work aimed to assess strains of EPNs and their symbiotic bacteria regarding their potential to control adults of *E. heros* and *D. melacanthus*. Entomopathogenic nematodes could be used to kill the stink bugs adults remaining over the straws, while the symbiotic bacteria could be used to kill these insects above ground, being much easier to produce compared to the EPNs. To assess EPNs and their simbiotic bactéria, tests were conducted in the laboratory and under greenhouse conditions. The nematodes *S. diaprepesi* AM163, *S. carpocapsae* All and *S. carpocapsae* IP1 caused 100% mortality of *E. heros* on the sand substrate, at the rate of 140 IJs/cm² (1000 IJs/insect). The symbiotic bacteria tested topically provided low mortality of *E. heros* (< 40.3%). In a test with *S. diaprepesi* AM163 applied on the sand substrate at five different rates, after 7 days, mortality of *E. heros* remained below 50%, except at the high rates of 24 IJs/cm² (50%) and 256 IJs/cm² (80%), respectively. Higher lethality rates also resulted in the increases of the number of IJs produced per insect, up to 88.4 IJs/cm² (5,400 IJs). The nematode *S. diaprepesi* AM163 applied to *E. heros* on two substrates (sand and straw) with two-layer thicknesses, at a rate of 88.4 IJs/cm², caused high insect mortality levels (≥ 69%), regardless of the substrate and its layer thickness. The nematode *S. diaprepesi* AM163 was twice more virulent to *E. heros* (69.1% mortality) than to *D. melacanthus* (28.8%). *Dichelops melacanthus* was equally resistant to both nematodes *S. diaprepesi* AM163 and *S. carpocapsae* IP1. In a greenhouse test, *S. diaprepesi* AM163 caused again a high mortality level to *E. heros* (72.5%) at the high rate of 88.4 IJs/cm². Thus, EPNs may turn up an alternative to control *E. heros*

if high rates of production and use become profitable and viable.

KEYWORDS: Integrated Pest Management, Biological control, Pentatomidae, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Criação de <i>E. heros</i> e <i>D. melacanthus</i> no Laboratório de Controle Biológico. (B) Ninfas do 1º instar de <i>Euschistus heros</i> nas bandejas da criação. (C) Bandejas com adultos de <i>Euschistus heros</i>	28
Figura 2. (A) Banco de nematoides entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico. (B) Criação de <i>Galleria mellonella</i> . (C) Armadilhas White para coleta de juvenis infectivos.....	29
Figura 3. Repetição do experimento de virulência de NEPs no <i>E. heros</i>	31
Figura 4. (A) Repetição do experimento de virulência de bactérias simbiótica de NEPs no <i>E. heros</i>	32
Figura 5. (A) Repetições do bioensaio de diferentes concentrações de <i>Steinernema diaprepesi</i> . (B) Repetições vedadas após a inoculação. (C) Armadilhas White	33
Figura 6. Tratamento do bioensaio realizado em dois substratos com duas espessuras de camadas: (A) areia 200g - 1 cm de espessura da camada; B) areia 1000g - 5 cm de espessura da camada; C) palha 4g – 1 cm de espessura da camada; D) palha 20g – 5 cm de espessura da camada.....	34
Figura 7. Experimento de diferença de virulência do nematoide <i>Steinernema diaprepesi</i> entre percevejos. (A) Repetição do <i>E. heros</i> . (B) Repetição do <i>D. melacanthus</i>	35
Figura 8. Experimento realizado em casa de vegetação com o <i>S. diaprepesi</i> visando o controle do <i>E. heros</i>	37
Figura 9. (A) Percevejos adultos de <i>E. heros</i> mortos pelo nematoide <i>Steinernema diaprepesi</i> . (B) Nematoides emergindo do cadáver do inseto	39
Figura 10. Curva obtida por regressão logarítmica entre as diferentes concentrações (0,7; 3,5; 17,6; 88,4; 442,4 JI/ cm ²) aplicadas do nematoide <i>S. diaprepesi</i> e a mortalidade (%) corrigida (fórmula de Abbott) do <i>Euschistus heros</i> , após sete dias de aplicação dos JIs	40
Figura 11. Reprodução do <i>S. diaprepesi</i> AM163 em <i>E. heros</i> expostos a diferentes concentrações de juvenis infectivos	41
Figura 12. Mortalidade (%) corrigida de <i>Euschistus heros</i> (fórmula de Abbott) após 7 dias da aplicação do <i>Steinernema diaprepesi</i> na concentração de 88,4 JI/cm ² , em dois substratos com duas espessuras de camadas.....	41
Figura 13. Mortalidade (%) corrigida de <i>E. heros</i> e <i>D. melacanthus</i> (fórmula de Abbott) sete dias após a aplicação de <i>Steinernema diaprepesi</i> AM163 no substrato palha sobre areia na concentração 88,4 JIs/cm ²	42

Figura 14. Mortalidade (%) corrigida de <i>Dichelops melacanthus</i> (fórmula de Abbott) sete dias depois da aplicação de <i>Steinernema diaprepesi</i> AM163 e <i>Steinernema carpocapsae</i> IP1 no substrato palha sobre areia na concentração 88,4 JIs/cm ²	43
Figura 15. Mortalidade (%) de <i>Euschistus heros</i> sete dias após aplicação do nematoide <i>Steinernema diaprepesi</i> AM163 no substrato palha sobre solo, na concentração 88,4 JIs/cm ²	43
Figura 16. Mortalidade de <i>E. heros</i> com aplicação do nematoide <i>S. diaprepesi</i> na concentração 88,4 JI/cm ² em tubos de PVC.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de NEPs testados quanto a virulência para <i>Euschistus heros</i> em substrato areia.....	30
Tabela 2. Isolados de bactérias simbióticas e seus nematoides, testados quanto a virulência para <i>Euschistus heros</i>	32
Tabela 3. Mortalidade (%) do <i>E. heros</i> sete dias depois da aplicação dos 16 isolados de NEPs no substrato areia, na concentração de 140 JIs/cm ²	38
Tabela 4. Mortalidade (%) de <i>E. heros</i> após sete dias da inoculação com culturas de bactérias simbióticas.	39

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2.OBJETIVOS.....	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos.....	19
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Cultura da soja.....	20
3.2. Percevejos do complexo da soja.....	20
3.2.1. <i>Euschistus heros</i> (Percevejo-marrom)	21
3.2.2. <i>Dichelops melacanthus</i> (Percevejo-barriga-verde)	22
3.2.3. Manejo dos percevejos.....	23
3.2.4. Controle Biológico.....	24
3.3. Nematoides entomopatogênicos.....	25
3.3.1. Bactérias simbióticas.....	26
3.3.2. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Local do experimento.....	28
4.2. Criação de insetos.....	28
4.3. Multiplicação dos nematoides entomopatogênicos.....	29
4.4. Multiplicação das bactérias simbióticas	29
4.5. Virulência de nematoides entomopatogênicos contra <i>Euschistus heros</i>	30
4.6. Virulência de bactérias simbióticas para <i>Euschistus heros</i>	31
4.7. Virulência de <i>Steinernema diaprepsi</i> em diferentes concentrações para <i>Euschistus heros</i> ...32	
4.8. Virulência de <i>Steinernema diaprepsi</i> para <i>Euschistus heros</i> em dois substratos com duas espessuras de camadas.....	33
4.9. Suscetibilidade comparativa de <i>Dichelops melacanthus</i> e <i>Euschistus heros</i> ao nematoide <i>Steinernema diaprepsi</i>	34
4.10. Virulência comparativa de <i>Steinernema diaprepsi</i> e <i>Steinernema carpocapsae</i> ao percevejo <i>Dichelops melacanthus</i>	35
4.11. Eficácia de <i>Steinernema diaprepsi</i> no controle de <i>Euschistus heros</i> em casa de vegetação.....	36
4.12. Análises estatísticas.....	37

5. RESULTADOS	38
5.1. Virulência de nematoides entomopatogênicos contra <i>Euschistus heros</i>	38
5.2. Virulência de bactérias simbióticas para <i>Euschistus heros</i>	39
5.3. Virulência de <i>Steinernema diaprepsi</i> em diferentes concentrações para <i>Euschistus heros</i>	40
5.4. Virulência de <i>Steinernema diaprepsi</i> para <i>Euschistus heros</i> em dois substratos com duas espessuras de camadas.....	41
5.5. Suscetibilidade comparativa de <i>Dichelops melacanthus</i> e <i>Euschistus heros</i> ao nematoide <i>Steinernema diaprepsi</i>	42
5.6. Virulência comparativa de <i>Steinernema diaprepsi</i> e <i>Steinernema carpocapsae</i> ao percevejo <i>Dichelops melacanthus</i>	42
5.7. Eficácia de <i>Steinernema diaprepsi</i> no controle de <i>Euschistus heros</i> em casa de vegetação.....	43
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a agricultura é um dos setores mais importantes para a economia do país. Dentro desse setor, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a cultura com maior valor de produção (IBGE, 2017). Inovações nos sistemas de plantio, como o plantio direto, a sucessão das lavouras soja-milho e o uso de cultivares superprecoce, têm possibilitado maior oferta de alimentos (CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017), porém proporcionam também melhores condições para a proliferação de diversos insetos-praga (HOFFMANN CAMPO et al., 2000). Nos últimos anos, tem havido um aumento nas populações de percevejos devido à sua crescente resistência a inseticidas químicos, a sucessão de culturas suscetíveis a esses hospedeiros (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012), a quebra de barreiras geográficas (SOARES et al., 2018) e poucas alternativas para utilização de controle biológico. Até o momento, os estudos têm se concentrado principalmente no uso de microhimenópteros parasitoides (CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017) e fungos entomopatogênicos (RESQUÍN-ROMERO et al., 2020).

Entre os percevejos que atacam as plantas de soja, o percevejo-marrom *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) é o mais importante (CORRÊA-FERREIRA, 2009; PANIZZI et al., 2012; BUENO et al., 2015; CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017), pois se alimenta diretamente dos grãos (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; PANIZZI et al., 2012), causando redução de peso de até 25% e morte de 20% dos grãos (NUNES; CORRÊA-FERREIRA, 2002).

A sucessão das lavouras de soja-milho tem levado ao aumento das populações do percevejo *Dichelops melacanthus* (DALLAS, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), que é uma das mais importantes pragas das lavouras de milho. O sistema de sucessão da cultura resulta no acúmulo de restos culturais, como a palha, no solo, beneficiando a proliferação de *D. melacanthus* e *E. heros*. *Dichelops melacanthus* ataca as plantas de milho na fase de plântula do seu desenvolvimento, permanecendo e reproduzindo-se na palha ao longo de gerações. *Euschistus heros*, por outro lado, pode se alojar sob as folhas caídas após a colheita da soja, devido à ausência de outra cultura hospedeira (CHOCOROSQUI, 2001). Em regiões de clima frio, durante os períodos de inverno, *E. heros* também pode ser encontrada em torno de plantações de soja e sob plantas perenes: como mangueiras, cafeeiros e feijão-guandu (PANIZZI; NIVA, 1994; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), permanecendo em diapausa por até sete meses (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; CORRÊA-FERREIRA et al., 2009).

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernmatidae e Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) têm a capacidade de matar ou causar patogênese em insetos, e

permanecem ativos no solo quando não estão dentro dos hospedeiros (POINAR, 1990). Esses nematoides têm uma relação simbiótica altamente específica com bactérias que causam a morte rápida do inseto hospedeiro. Para ambos os gêneros, o ciclo de vida começa com um infeccioso juvenil (JI) que carrega a bactéria entomopatogênica dentro de seu intestino, em uma vesícula especial para os pertencentes a família Steinernatidae (BOEMARE, 2002) e a libera na hemocele de um hospedeiro adequado. Os nematoides e as bactérias simbióticas agem juntos para superar o sistema imunológico do inseto (GOTZ et al., 1981), causando sua morte em 24 a 48 horas (DOWDS; PETERS, 2002). Em seguida, as bactérias se multiplicam dentro do inseto e o nematoide se reproduz alimentando-se de ambos. Quando o alimento se esgota, o nematoide é induzido à forma de JI e emerge do cadáver do inseto em busca de um novo hospedeiro (BROWN; GAUGLER, 1997).

Portanto, os NEPs podem ser uma alternativa para o controle de *E. heros* e *D. melacanthus* quando os percevejos estão em contato com os restos culturais, como a palhada que recobre o solo. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial de NEPs e algumas de suas bactérias simbióticas no controle de *E. heros* e *D. melacanthus* no sistema de sucessão soja-milho.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a virulência de nematoides entomopatogênicos e algumas de suas bactérias simbióticas quanto ao potencial para o controle de *E. heros* e *D. melacanthus*.

2.2. Específicos

- Avaliar a virulência de NEPs e algumas de suas bactérias simbióticas a *E. heros*;
- Avaliar *S. diaprepesi* AM163 em diferentes concentrações sobre a mortalidade de *E. heros* e sobre a reprodução do nematoide no inseto;
- Avaliar a virulência do nematoide *S. diaprepesi* em dois substratos, com duas espessuras de camada, visando o controle de *E. heros* logo após a colheita da soja;
- Comparar a virulência de *S. diaprepesi* entre os percevejos *E. heros* e *D. melacanthus*;
- Comparar a virulência entre *S. diaprepesi* e *S. carpocapsae* no percevejo *D. melacanthus*;
- Confirmar a eficácia de *S. diaprepesi* na mortalidade de *E. heros* em condições de casa de vegetação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa que foi a base alimentar do povo chinês há mais de 5.000 anos. No Brasil foi introduzida em 1882 na Bahia e sua produção foi impulsionada nos anos 1960/70 com o início do cultivo sucessivo trigo/soja. Atualmente a soja é cultivada, praticamente, em todo território nacional, sendo que o estado do Mato Grosso é o maior produtor de soja do Brasil (EMBRAPA, 2018/2019). Essa cultura ocupou nessa última safra uma área de 36.944,9 mil hectares e uma produção de 120.883,2 mil toneladas (CONAB, 2020).

A planta de soja possui porte ereto (0,50 e 1,5 m), às folhas são grandes e trifoliadas, as flores são pequenas e vagens curtas (RIDNER, 2006). A soja serve de alimento para uma grande quantidade de insetos, que atacam: folhas, vagens, grãos, plântulas, hastes, pecíolos e raízes. Estando, portanto, essa cultura sujeita ao ataque de insetos, desde a germinação até a colheita (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). E como destacado anteriormente os percevejos fitófagos são considerados uma das principais pragas dessa cultura no Brasil (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; PANIZZI et al., 2012).

Devido a importância que a soja tem para o agronegócio brasileiro, existe uma preocupação para o desenvolvimento de tecnologias e de um manejo integrado de pragas que possibilite que essa cultura continue sendo produtiva, de forma a competir em um mercado cada vez mais concorrido (SEIXAS et al., 2020).

3.2. Percevejos do complexo da soja

Os percevejos fitófagos são conhecidos como percevejos do complexo da soja, e pertencem a família Pentatomidae, uma das maiores famílias dos Heteroptera (PANIZZI et al., 2000). Os principais percevejos desse complexo são: percevejo-verde-pequeno, *Piezodorus guildinii* (W.); percevejo-verde, *Nezara viridula* (L.); percevejo-marrom, *Euschistus heros* (F.); e os percevejos chamados de barriga-verde, *Dichelops melacanthus* (D.) e *D. furcatus* (F.). E a abundância das espécies varia em função do ano, do local e das plantas (CORRÊA-FERREIRA, 2009), porém o percevejo-marrom, tem aparecido com maior abundância na cultura da soja nos últimos anos (CORRÊA-FERREIRA, 2009; PANIZZI et al., 2012; BUENO et al., 2015; CORRÊA-FERREIRA; SOSÁ-GOMEZ, 2017).

O ciclo de vida desses insetos dura em média de 30 a 40 dias, possuem uma fase de ovo, cinco

estágios ninfais e depois se tornam adultos (Figura 1 e 2) (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). São responsáveis pela redução na qualidade e no rendimento das sementes, podendo transmitir doenças devido a inserção direta do seu aparelho bucal, o estilete. Como resultado, podem tornar os grãos pequenos, chocos, enrugados e com manchas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000) e a planta de soja pode não amadurecer normalmente (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

3.2.1. *Euschistus heros* (Percevejo-marrom)

O percevejo-marrom é encontrado com maior abundância na cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA, 2009; PANIZZI et al., 2012; BUENO et al., 2015; CORRÊA-FERREIRA; SOSÁ-GOMEZ, 2017) e apresenta hábito alimentar menos polífago do que os outros percevejos fitófagos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Nativo da Região Neotropical, se destaca na região do Norte do Paraná ao Brasil Central, sendo bastante adaptado a regiões quentes (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

O percevejo *E. heros*, quando se torna adulto, possui a coloração marrom e dois prolongamentos laterais em forma de espinhos, suas posturas são depositadas principalmente em folhas e vagens. Possui cinco estágios de desenvolvimento, as ninfas recém eclodidas possuem 1 mm e seus ovos apresentam coloração amarela. Começam a causar danos na cultura a partir do terceiro estágio de desenvolvimento, se locomovendo na cultura e se alimentando dela, atingindo o tamanho de 5 a 10 mm (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

No ciclo da soja completa três gerações, de novembro a abril (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; CÔRREA-FERREIRA et al., 2009). E o momento de infestação da cultura pelos percevejos, ocorre no final do período vegetativo ou no início do reprodutivo, aumentando a densidade populacional com desenvolvimento das vagens. Período esse que ocorre os maiores danos econômicos, sendo composto principalmente por ninfas a partir do terceiro ínstar (72%) (CÔRREA-FERREIRA et al., 2009). Essas são mais difíceis de visualização, pois procuram locais mais frescos durante os períodos mais quentes do dia (CORRÊA-FERREIRA; SOSÁ-GOMEZ, 2017).

Após a colheita da soja, esses insetos passam a se alimentar de plantas hospedeiras, completando a quarta geração. Em seguida, podem entrar em dormência (diapausa) na palhada da cultura anterior. Possuem a capacidade de passar até sete meses sem se alimentar, sobrevivendo de reservas de lipídeos, obtidas na safra anterior, o que ocorre em regiões mais frias, como no Paraná (PANIZZI; VIVAN, 1997; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; CÔRREA-FERREIRA et.

al., 2009). Nesse período esses insetos também podem permanecer, entorno das lavouras de soja, embaixo de folhas caídas de plantas perenes: mangueiras, cafeeiros e feijão - guandu (PANIZZI; NIVA, 1994). Esse também é um dos motivos, que dificultam o controle dessa praga, pois durante esse período de quiescência, eles se protegem de parasitas e predadores (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

3.2.2. *Dichelops melacanthus* (Percevejo-barriga-verde)

Existem duas espécies de *Dichelops.*, o *D. furcatus* e *D. melacanthus*, esses são conhecidos como os percevejos-barriga-verde, porém apresentam diferenças morfológicas como coloração, tamanho do corpo, comprimento e forma dos espinhos pronotais. Também apresentam distribuição geográfica diferenciada: a espécie *D. furcatus* tem sua maior ocorrência concentrada no sul do Paraná e nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, enquanto a espécie *D. melacanthus* tem como áreas de maior ocorrência a Região Centro-Oeste, Sudeste (São Paulo) e norte do Paraná (PANIZZI et al., 2015).

Esses percevejos têm se destacado por causar perdas na cultura do milho e do trigo (PANIZZI et al., 2012; PANIZZI et al., 2015). Porém principalmente os danos que ocorrem nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (V1 a V3) na cultura do milho, repercutem negativamente no potencial produtivo da cultura (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Segundo Duarte et al. (2015), o nível de dano econômico do percevejo-barriga-verde para a cultura do milho é de 0,8 percevejo por m² quando a praga estiver presente no estádio de desenvolvimento de uma folha (V1).

O percevejo-barriga-verde que era considerado praga secundária, tem ganhado importância devido a seu ataque na cultura do milho em sucessão a cultura da soja (GOMEZ E ÁVILA, 2001; GRIGOLLI et al., 2016; CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017), principalmente devido as mudanças relacionadas ao sistema de plantio direto e do cultivo do milho de segunda safra (CORRÊA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017). Por tanto, é importante levar em consideração esse sistema de sucessão para conseguir realizar o controle desse inseto-praga de forma eficiente.

O ciclo de vida é parecido com o do *E. heros*, inclusive as ninfas dessas duas espécies podem ser confundidas. Mas os adultos de *D. melacanthus* apresentam características bem diferenciadas, medem de 9 a 11 mm e sua coloração varia entre castanho amarelado ao acinzentado, apresentando o abdome verde, mas nos meses mais frios do ano, a coloração ventral pode se tornar marrom- acinzentada. Outra característica é que os ovos de *D.*

melacanthus são verdes, enquanto os de *E. heros* são amarelos (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; PANIZZI et al., 2012; PANIZZI et al., 2015).

3.2.3. Manejo dos percevejos

A principal medida do Manejo Integrado de Pragas aplicado ao complexo de pentatomídeos presentes na soja, é o monitoramento periódico através da amostragem dos insetos pelo “pano de batida”, este método consiste em um pano com suporte de madeira nas laterais, colocado entre duas fileiras da soja. E para a amostragem dos insetos, as plantas são batidas vigorosamente, os insetos caem no pano, sendo contados e anotados. O recomendado é que as amostragens ocorram semanalmente, principalmente no período reprodutivo da soja (R3 e R7). O controle químico deve ser realizado apenas quando a população atingir quatro percevejos (adultos ou ninfas a partir do terceiro ínstar) por pano de batida (2 m de fileira) em áreas de produção de grãos, e dois percevejos na área de produção de sementes. (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Segundo o banco de produtos registrados do Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2020), existem 57 produtos químicos registrados para o controle do percevejo-marrom na cultura da soja, e 31 para o controle do percevejo-barriga-verde na cultura do milho. Para ambos os percevejos, apesar da grande quantidade de produtos, de diferentes marcas, esses são compostos por principalmente três grupos químicos: organofosforados, neocotinóides e piretroides. Os três grupos apresentam modo de ação neurotóxico para insetos (ROGGIA et. al., 2018). Esse pequeno número de grupos químicos usados nesses produtos, possibilita uma maior probabilidade de desenvolvimento de resistência nos percevejos.

No Brasil, em maio de 1997, houve a criação do IRAC-BR (Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas), com o objetivo de se obter mais informações sobre o manejo de populações resistentes e o desenvolvimento de produtos fitossanitários. Um dos grupos que tem sido monitorado pelo IRAC-BR são as populações de *E. heros*, monitorando os três grupos químicos citados anteriormente: organofosforados, neocotinóides e piretroides. Segundo a última avaliação realizada nas principais regiões produtoras de soja entre os meses de janeiro a abril de 2019, as populações de Luís Eduardo Magalhães – BA, Rio Verde – GO, Cafelândia – PR e Paranapanema – SP apresentaram sobrevivência acima de 20% para os neocotinóides, enquanto os dois outros grupos químicos estudados, demonstraram alta mortalidade para todas as populações de percevejos (IRAC-BR, 2020).

Como citado anteriormente o percevejo-barriga-verde tem se tornado uma praga importante na cultura do milho, devido principalmente à sucessão recorrente que ocorre entre a

cultura da soja para a do milho (GOMEZ E ÁVILA, 2001; GRIGOLLI et al., 2016; CÔRREA-FERREIRA; SOSA-GOMEZ, 2017). Por isso já existem trabalhos que procuram alternativas para esse sistema atual, como o trabalho de Grigolli et al. (2016) que demonstrou que aplicação de inseticidas na dessecação pré-colheita de soja e imediatamente após a semeadura do milho reduz o ataque de *D. melacanthus* em plantas de milho. E o trabalho Côrrea-Ferreira e Sosa-Gomez (2017), que trouxe como alternativa o uso de cultivares-armadilhas no milho, indicando um retardo na evolução da população de *D. melacanthus*, e a necessidade de um menor uso de inseticidas quando esta estratégia foi utilizada.

3.2.4. Controle Biológico

Existem oito produtos biológicos registrados para o controle do *E. heros*, indicados para serem utilizados em todas as culturas agrícolas, segundo o banco de dados do Ministério da Agricultura. Porém do mesmo modo como ocorre com os produtos químicos, esses oito produtos se referem apenas a três organismos diferentes. Dois são fungos entomopatogênicos: *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, alguns produtos contém conídios desses microrganismos separados, enquanto outros produtos utilizam os dois juntos. E o terceiro organismo é a micro-vespa *Telenomus podisi* Ashmead. Enquanto para *D. melacanthus* não existe nenhum produto biológico indicado para o seu controle no banco do Ministério da Agricultura.

Existem trabalhos demonstrando resultados promissores sobre o controle do percevejo-marrom com a utilização de fungos em laboratório (MULLER et al., 2017; NORA, 2019) e unidades experimentais (ZAMBIAZZI et al., 2012). Porém os fungos entomopatogênicos, necessitam de condições específicas de temperatura e a umidade para o seu desenvolvimento (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; MULLER et al., 2017), o que dificulta a eficiência desses fungos em trabalhos no campo. Além disso, os percevejos apresentam defesas naturais contra fungos entomopatogênicos (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999): composição química da cutícula (SOSA-GOMEZ et al., 1997; OLIVEIRA, 2014), voláteis produzidos por glândulas metatorácicas (LOPES et al., 2015).

Os percevejos fitófagos possuem como principais inimigos naturais os parasitoides de ovos (PANIZZI; SLANSKY, 1985), sendo constatados 20 espécies de microhimenópteros capazes de realizar o parasitismo, a maioria desses parasitoides tem a capacidade de parasitar ovos de vários percevejos, porém podem ter preferência por determinada espécie (CÔRREA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). O trabalho de Côrrea-ferreira e Sosa-gomez (2017) realizou o monitoramento em uma lavoura comercial de um produtor do município de Ibiporã, na região norte do Paraná, nos

anos entre 2014/2016, foi registrado duas espécies principais parasitando os ovos. Sendo *T. podisi* a mais abundante e responsável pelo parasitismo em 97,9% dos ovos de *E. heros* e 92% em ovos de *D. melacanthus*, e a segunda espécie foi do gênero *Trissolcus*, mas apresentando um parasitismo bem inferior que *T. podisi*. Foram registrados também adultos do percevejo-marrom parasitados pelo microhimenóptero *Hexacladia smithii* (Ashmead) e por moscas da família *Tachinidae*.

A empresa Koppert possui em seu catálogo o produto Podisibug, que tem como ingrediente ativo o *Telenomus podisi*. Essas microvespas encontram os ovos de percevejos no campo, e depositam nele seus ovos, interrompendo o desenvolvimento da praga logo no início do seu ciclo, dando origem a novas vespas ao invés de ninfas de percevejos (KOPPERT, 2020).

3.3. Nematoides entomopatogênicos

Os nematoides são vermes muito comuns no solo (VOSS,2009), possuem o corpo alongado, cilíndrico e um pseudoceloma (WOOD,1998). Existe uma variedade de tipos de nematoides, desde os fitopatógenos, aos que se alimentam de animais, microrganismos, resíduos orgânicos (VOSS, 2009). Devido essa variedade, estes possuem estruturas especializadas: aparelhos bucais e ornamentações na cutícula. Os nematoides entomopatogênicos, possuem a capacidade de matar ou causar patologia em um inseto (ALMENARA et al., 2012), especificamente os que pertencem as famílias: Heterorhabditidae e Steinernematidae, da ordem Rhabditida (DOLINSKI, 2006). Existem dois motivos principais, para o interesse maior nessas famílias de nematoides, a possibilidade de produção comercial e por causarem patologia em determinados insetos específicos, sendo seguros ao meio ambiente (JUNIOR, 2015).

A virulência de nematoides entomopatogênicos a diferentes insetos foi comprovada com o passar dos anos em diferentes estudos (LEITE et. al., 2005; CAVALCANTI, 2006; LEITE et. al., 2007; MINAS, 2008; CANESIN, 2011; LEITE et.al., 2012; ANDALÓ et. al., 2018; MARTINS, 2019), os principais alvos são insetos de solo (VOSS, 2009), pois os NEPs permanecem no solo quando não estão dentro dos hospedeiros.

Estudos e indicações para o uso de NEPs para controle biológico em percevejos foram realizados principalmente com o percevejo-castanho (*Scaptocoris castânea*) (ROSA et al., 2002; MIRANDA, 2006; VOSS, 2009), já que este ataca as raízes, sendo um alvo mais fácil para os NEPs. Porém recentemente foram realizados estudos com NEPs visando o controle de diferentes percevejos: *E. heros* (BORGES, 2020; MARTINS-CECCONELLO, 2020), *D. melacanthus* (GUIDE et al., 2015; 2019), *P. guildinii* e *N. viridula* (MARRERO et al., 2015). No estudo conduzido por Marrero et al. (2015), *H. bacteriophora* (POINAR, 1975) causou 100% de

mortalidade em *P. guildinii* e *N. viridula*, enquanto em estudo conduzido por Guide et al. (2019), o nematoide *H. amazonensis* (ANDALÓ; NGUYEN; MOINO, 2006) causou 88% de mortalidade em *D. melacanthus*, e ambos os nematoides foram testados em placas de Petri (9 cm) contendo um papel filtro colocado na placa de fundo.

Essas famílias de NEPs possuem uma associação com bactérias simbióticas, que tem uma relação estreita com o seu nematoide, ao nível de gênero e espécie (VOSS, 2009). Os nematoides são essenciais para possibilitar que as bactérias atinjam a hemocele do inseto e afetam principalmente o sistema imunológico inato celular dos mesmos (GOTZ et al., 1981; BALASUBRAMANIAN et al., 2009; TOUBARRO et al., 2013; ONO; YOSHIGA, 2018), ou seja, afetam a atividade dos hemócitos, que são responsáveis pelo encapsulamento de organismos invasores nos insetos.

3.3.1. Bactérias simbióticas

As bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* estão presentes no intestino dos NEPs das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. Os da família Steinernematidae levam as células bacterianas na vesícula intestinal especializada, denominada receptáculo. Essas bactérias pertencem a família Enterobacteriaceae (BOEMARE, 2002), apresentando um período simbiótico com o NEP, e um período patogênico, quando o nematoide atinge o inseto (FORST et al., 1997). Essas bactérias produzem bacteriocinas, proteínas e diversos metabólitos secundários (BODE, 2009), possuindo um extenso repertório de genes relacionado a essas toxinas (CLARKE, 2008). Suas toxinas são capazes de resultar em apoptose nas células essenciais do sistema imunológico dos insetos, dificultando processos de encapsulação, nodulação e fagocitose, por tanto, causando a morte do inseto (CLARKE, 2008).

As bactérias simbióticas têm sido isoladas dos nematoides, a fim, de conhecer melhor suas possibilidades para o manejo de pragas e doenças. Existem estudos utilizando essas bactérias visando o controle insetos pragas (GOTZ et al., 1981; ANSARI et al., 2003; DE PAULA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2008; SALVADORI, 2011; CHACON-OROZCO, 2014), de ácaros predadores (EROGLU et al., 2019; CEVIZCI et al., 2020) e como alternativas para o manejo de doenças com fungos fitopatogênicos (LI et al., 1995; CHEN et al., 1994; CHACON-OROZCO et al., 2020).

O estudo de Martin et al. (2007) foi utilizada a cultura da bactéria *Chromobacterium subtsugae* contra diferentes pragas, incluindo o percevejo *N. viridula*, causando mortalidade nesse percevejo e em outras pragas. E diferentes bactérias: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus thuringiensis kurstaki*,

Bacillus atrophaeus, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio hollisae* e *Pseudomonas fluorescens* causaram de 75-100% de mortalidade no *Halyomorpha halys* (TOZLU et al., 2019). Os resultados são promissores, demonstrando a importância de estudar essas bactérias, para compreender a melhor maneira de utilizá-las no MIP.

3.3.2. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos

A infecção dos insetos por nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae ocorre através de juvenis infectivos que estão adaptados em permanecer no solo até encontrarem um hospedeiro, pois nesse período não se alimentam e sua sobrevivência depende das condições ambientais, principalmente temperatura e umidade (POINAR, 1990). Os juvenis infectivos penetram os insetos por aberturas naturais, como: boca, anus e espiráculo. Os que pertencem a família Heterorhabditidae, possuem a capacidade de penetrar também através da cutícula do inseto, pois possuem um dente quitinoso (POINAR, 1990; DOLINSKI, 2006).

Quando os nematoides entomopatogênicos atingem a hemocele, esses liberam as bactérias simbióticas, que produzem metabólitos e toxinas (DOWDS; PETERS, 2002) e se multiplicam rapidamente, causando a morte dos insetos entre 24/48h (POINAR, 1990). Após a morte do inseto, os nematoides se reproduzem, se alimentando dos nutrientes derivados do inseto e das células simbiotes (EHLERS, 2001; BODE, 2009).

Uma das diferenças entre as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, é que enquanto nos Steinernematidae os juvenis infectivos se desenvolvem em machos e fêmeas, os Heterorhabditidae se tornam hermafroditas na primeira geração. Com a formação dos adultos, ocorre a cópula e a postura de ovos, que podem se desenvolver em juvenis (J1, J2, J3, J4) e posteriormente adultos. Os J3 se referem aos juvenis infectivos, que migram de volta para o solo quando tiverem esgotados os nutrientes do cadáver do inseto (ADAMS e NGUYEN, 2002). Os NEPs podem passar duas ou três gerações dentro do cadáver dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis (DOLINSKI, 2006), antes de deixar o cadáver, recuperam as bactérias simbióticas para recomeçar o seu ciclo de vida (BODE, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico, localizado no Centro Avançado em Proteção de Plantas e Sanidade Animal do Instituto Biológico, em Campinas, São Paulo.

4.2. Criação de insetos

Os insetos usados nos bioensaios foram provenientes da criação de *E. heros* e *Dichelops melacanthus* do Laboratório de Controle Biológico de Pragas. Mantidos em bandejas de plástico (20 X 30) (Figura 1A), acondicionados em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12 horas) e alimentados com dieta natural: vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) e água filtrada (Figura 1C). Para as ninfas de 1º instar era disponibilizado água filtrada e vagem de feijão (Figura 1B), nessa fase as ninfas permanecem sobre o córion, com comportamento gregário, não iniciando a alimentação (LOCKWOOD; STORY, 1986). Todos os ensaios foram realizados com insetos adultos, após uma semana de emergência.

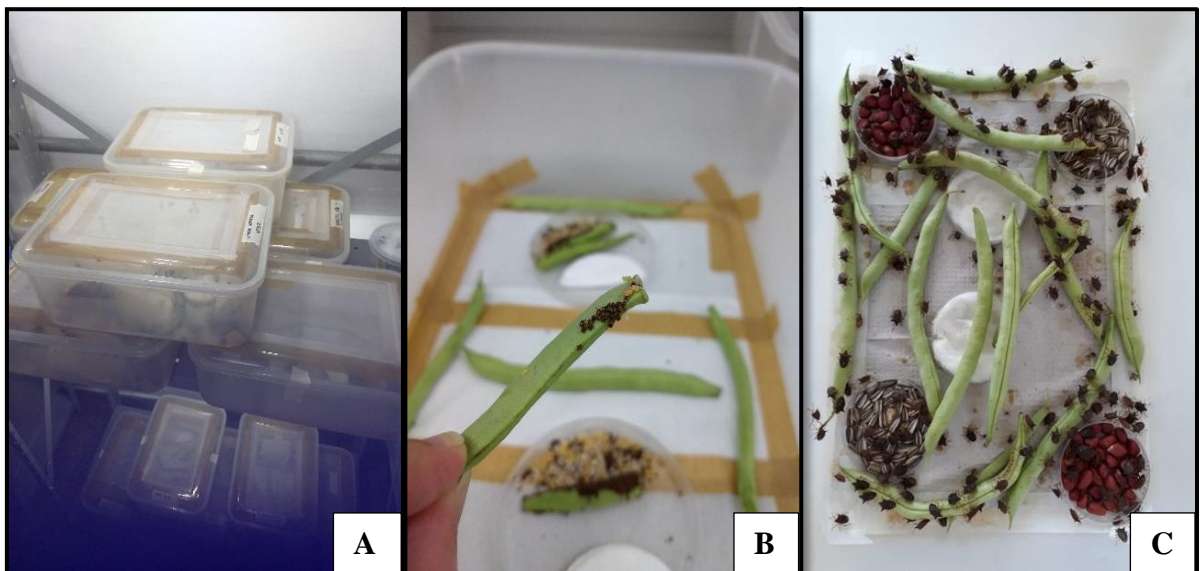


Figura 1. (A) Criação de *E. heros* e *D. melacanthus* no Laboratório de Controle Biológico. (B) Ninfas do 1º instar de *Euschistus heros* nas bandejas da criação. (C) Bandejas com adultos de *Euschistus heros*.

4.3. Multiplicação dos nematoides entomopatogênicos

Os NEPs foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* L. (3° ao 5° instar), mais conhecida como “traça dos favos”. A criação de *G. mellonella* foi mantida em dieta artificial à base de soja e cera de abelha, em estufa (32°C), segundo metodologia citada por Cruz (1988) (Figura 2B). Os juvenis infectivos foram colhidos em armadilha de White (WHITE, 1927), de acordo com os procedimentos descritos por Kaya e Stock (1997) (Figura 2C). Após a colheita, os JI foram mantidos suspensos em água, em sala climatizada sob 14°C, no banco de nematoides entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico (Figura 2A). Esses foram usados nos testes com no máximo sete dias após a colheita.

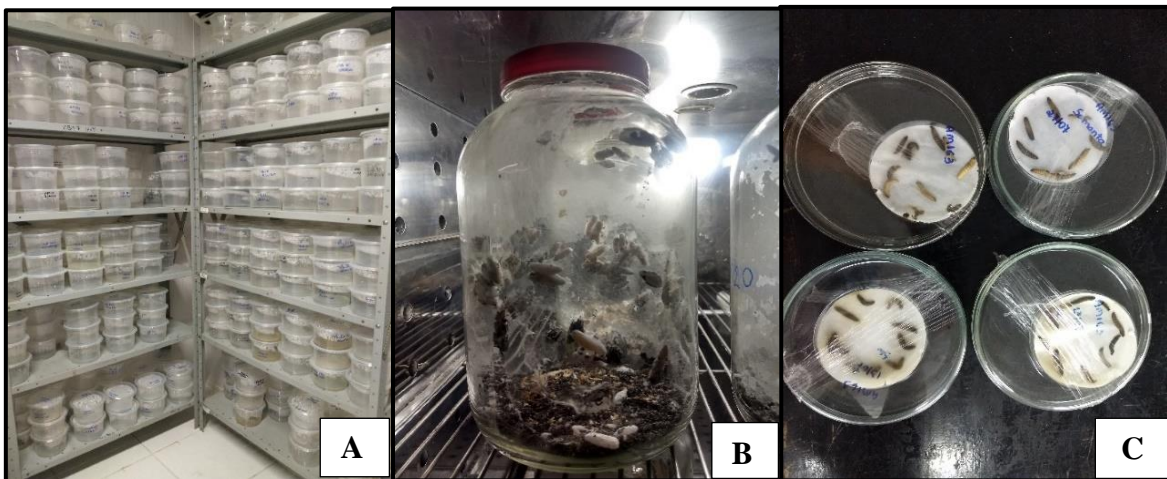


Figura 2. (A) Banco de nematoides entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico. (B) Criação de *Galleria mellonella*. (C) Armadilhas White para coleta de juvenis infectivos.

4.4. Multiplicação das bactérias simbióticas

Os isolados das bactérias simbiotes de NEPs estão preservados em glicerol 15%, mantidos a -80 °C na coleção do banco de bactérias presente no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico. Para a ativação dos isolados das bactérias, esses foram cultivados em frasco de Erlenmeyer de 100 ml contendo 20 ml de meio líquido TSB, mantido em agitação (150 rpm) por 24 h, sob 27 °C. Para confirmação da fase variante I (fase ativa), 100 µl de cada isolado das bactérias simbiotes de NEPs foram plaqueados em meio NBTA (ágar nutritivo + 0.004 % (p/v) cloreto de trifetil tetrazólio + 0.025 % (p/v) azul de bromotimol) (BOEMARE; AKHURST, 1988). Para a multiplicação dessas bactérias, cada isolado (obtido de uma colônia) foi cultivado em

frascos de Erlenmeyer (500ml) contendo 300 ml de meio de cultura LB mantido sob agitação (150 rpm) por 72 h a 27 °C.

4.5. Virulência dos nematoides entomopatogênicos contra *Euschistus heros*

Foram avaliados 16 isolados (Tabela 1) de NEPs quanto a virulência para adultos de *E. heros*. Para cada isolado, foram estabelecidas 3 repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico de 500 ml (9,5 cm Ø) contendo 100g de areia (14% de umidade), uma vagem de feijão e 10 insetos (Figura 3).

Os nematoides foram aplicados sobre o solo com pipeta, gerando a concentração de 140 JIs/cm² (1000 JIs/inseto). O tratamento controle foi inoculado com água. Os potes foram incubados em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12 horas). A avaliação foi realizada no 7º dia após a inoculação, com base na mortalidade dos insetos. Os insetos foram separados em armadilhas White visando a confirmação de infecção por nematoides entomopatogênicos. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.

Tabela 1. Isolados de NEPs testados quanto a virulência para *Euschistus heros* em substrato areia.

Nematoide	Isolado	Local/Origem
<i>H. amazonensis</i>	IBCB n10	Santa Fé do Sul- SP
<i>H. amazonensis</i>	IBCB n44	Santa Adélia – SP
<i>H. bacteriophora</i>	HB EN01	Germany*
<i>S. brazilense</i>	PONTO 2C	Porto Murtinho- MS
<i>S. brazilense</i>	IBCB n06	Porto Murtinho- MS
<i>S. carpocapsae</i>	All	USA
<i>S. carpocapsae</i>	IL1	São João da Boa Vista- SP
<i>S. carpocapsae</i>	IL2	São João da Boa Vista- SP
<i>S. carpocapsae</i>	IP1	São João da Boa Vista- SP
<i>S. diaprepesi</i>	AM163	Sinop-MT
<i>S. feltiae</i>	IBCB n47	Germany**
<i>S. glaseri</i>	CER21	Rio Verde- GO
<i>Steinernema</i> sp.	IBCBn20	Itirapina-SP
<i>S. rarum</i>	PAM 11	Bagé-RS
<i>S. rarum</i>	PAM 13	Bagé-RS
<i>S. rarum</i>	PAM 25	Bagé-RS

* Isolado híbrido, originado a partir de cross-breeding entre *H. bacteriophora* (Nova Jersey) e os isolados HK1 e HD01 (Alemanha).

** Isolado híbrido, originado a partir de *cross-breeding* entre 10 isolados europeus de *S. feltiae* (Alemanha, Noruega, Suécia, Finlândia, Itália e Holanda).

S.: *Steinernema* e H.: *Heterorhabditis*.



Figura 3. Repetição do experimento de virulência de NEPs no *E. heros*.

4.6. Virulência de bactérias simbióticas para *Euschistus heros*

Este experimento teve como objetivo avaliar bactérias simbiotes de NEPs quanto a virulência para adultos de *E. heros*. Os tratamentos foram constituídos de 9 isolados de bactérias simbiotes de NEPs dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* (Tabela 2) e um controle. Essas bactérias foram escolhidas pelo fato dos seus nematoides terem apresentado resultados variados no experimento anterior. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando três repetições para cada tratamento. Cada repetição foi representada por um pote plástico de 500 ml (9,5 cm Ø) forrado com papel filtro, contendo uma vagem de feijão e 10 insetos (Figura 4).

Os insetos foram mergulhados nos caldos bacterianos não diluídos, após três dias de crescimento da bactéria. O tratamento controle foi mergulhado no meio de cultura TSB sem a bactéria. Caso essas bactérias não causassem mortalidade dos insetos com altas concentrações, dificilmente apresentarão eficácia no campo, por aspersão. O experimento foi mantido em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12 horas) e a avaliação ocorreu no 7º dia após a inoculação. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.

Tabela 2. Isolados de bactérias simbióticas e seus nematoides, testados quanto a virulência para *Euschistus heros*.

Bactéria	Nematoide	Isolado	Local/Origem
<i>P. luminescens</i>	<i>H. amazonenses</i>	IBCBn10	Santa Fé do Sul- SP
<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	HB EN01	Alemanha*
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>S. glaseri</i>	CER 21	Rio Verde – GO
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	CER144	Rio Verde – GO
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>S. carpocapsae</i>	IL2	São João da Boa Vista- SP
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	AM165	Sinop – MT
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>S. braziliense</i>	Ponto 2C	Porto-Murtinho- MS
<i>X. doucetiae</i>	<i>S. diaprepesi</i>	AM 163	Sinop – MT
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i>	PAM 25	Bagé – RS

* Isolado híbrido, originado a partir de cross-breeding entre *H. bacteriophora* (Nova Jersey) e os isolados HK1 e HD01 (Alemanha).

S.: *Steinernema*; X.: *Xenorhabdus*; H.: *Heterorhabditis* e P.: *Photorhabdus*.



Figura 4. Repetição do experimento de virulência de bactérias simbiotes de NEPs no *E. heros*.

4.7. Virulência de *Steinernema diaprepesi* em diferentes concentrações para *Euschistus heros*

Esse experimento avaliou diferentes concentrações de *Steinernema diaprepesi* (NGUYEN; DUNCAN, 2002) na mortalidade de adultos de *E. heros*. Cinco tratamentos foram constituídos das concentrações de 0,7; 3,5; 17,6; 88,4 e 442,4 JI/cm² (\cong 1; 40; 200; 1000; 5000 JIs/ inseto), considerando-se o cálculo da área na superfície do substrato (113 cm²) no pote plástico de 1,5 L (12,5 cm Ø). Cada tratamento teve 4 repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico de 1,5 L (12,5 cm Ø), contendo 100g de areia (14% de umidade), duas vagens de feijão e

10 insetos (Figura 5A). O nematoide foi aplicado com o auxílio de pipeta até alcançar as diferentes concentrações. O tratamento controle recebeu apenas água. Os potes foram vedados com o tecido voil e elástico (Figura 5B), incubados em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12h). A avaliação ocorreu sete dias após a inoculação, com base na mortalidade dos insetos. Os insetos mortos foram transferidos para armadilhas White (Figura 5C), sendo uma armadilha para cada repetição, para determinar o número de juvenis infectivos que emergiram por inseto. O experimento foi conduzido 2 vezes no tempo.



Figura 5. (A) Repetições do bioensaio de diferentes concentrações do *Steinernema diaprepesi*. (B) Repetições vedadas após a inoculação. (C) Armadilhas White.

4.8. Virulência de *Steinernema diaprepesi* para *Euschistus heros* em dois substratos com duas espessuras de camadas

Esse estudo avaliou a virulência de *Steinernema diaprepesi* para *E. heros* em dois substratos com duas espessuras de camadas, visando seu controle na entressafra quando encontra-se sobre o solo ou sobre os restos culturais/palhada presentes no campo após a colheita da cultura. Foram estabelecidos oito tratamentos: A) areia 200g - 1 cm de espessura da camada; B) areia 1000g - 5 cm de espessura da camada; C) palha 4g - 1 cm de espessura da camada; D) palha 20g - 5 cm de espessura da camada e os respectivos controles (Figura 6). A escolha da areia e da palha em duas espessuras de camadas foi para constatar se o nematoide desceria na espessura maior, resultando em menores concentrações na superfície do substrato e, conseqüentemente, em menores índices de mortalidade do inseto.

O nematoide *S. diaprepesi* foi aplicado com pipeta, gerando a concentração de 88,4 JIs/cm² (1000 JIs/inseto), a qual proporcionou o maior nível de mortalidade no experimento anterior, com a maior reprodução do nematoide por inseto. Cada tratamento teve três repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico de 1,5 L (12,5 cm Ø) contendo o substrato, duas vagens de feijão e 10 insetos adultos. A areia foi umedecida previamente para 14% de umidade, enquanto

a palha permaneceu submersa em água por 24 horas, sendo que a água foi drenada e a palha umedecida foi transferida para os potes. Cada um dos tratamentos teve o respectivo controle contendo apenas água.

Os insetos foram liberados dentro dos potes após 24 horas da aplicação do nematoide, procurando permitir a distribuição prévia dos JIs nos substratos. Os potes foram vedados com o tecido voil e elástico, incubados em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12h). A avaliação foi realizada sete dias após a liberação dos insetos, com base na mortalidade deles. Os insetos mortos foram transferidos para armadilha White visando a confirmação da infecção pelos nematoides. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.

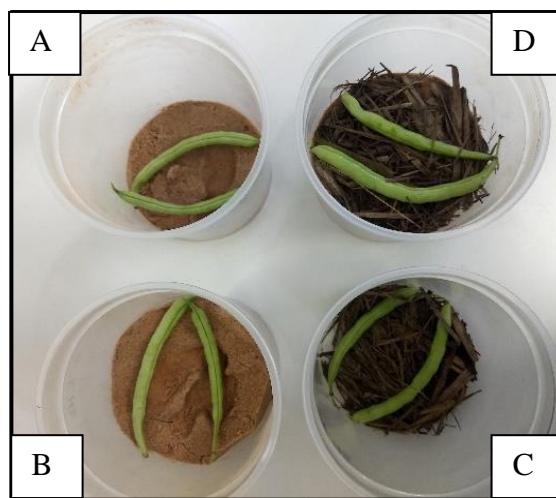


Figura 6. Tratamentos do bioensaio realizado em dois substratos com duas espessuras de camadas: (A) areia 200g - 1 cm de espessura da camada; (B) areia 1000g - 5 cm de espessura da camada; (C) palha 4g - 1 cm de espessura da camada; (D) palha 20g - 5 cm de espessura da camada.

4.9. Susceptibilidade comparativa de *Dichelops melacanthus* e *Euschistus heros* ao nematoide *Steinernema diaprepesi*

Esse estudo comparou duas espécies de percevejos, *E. heros* (percevejo-marrom) e *D. melacanthus* (barriga-verde) quanto a susceptibilidade para o nematoide *S. diaprepesi* (Figura 7). Assim, os tratamentos consistiram dos dois insetos tratados com o nematoide e dos dois controles representados pelos dois insetos tratados com água. Para cada tratamento foram estabelecidas 3 repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico de 1,5 L (12,5 cm Ø) contendo 200g de areia (14% de umidade) coberta com 4 g de palha pré-umedecida (24 horas de molho antes da drenagem da água), duas vagens de feijão e dez insetos.

S. diaprepesi foi aplicado com pipeta, gerando a concentração de 88,4 JI/cm² (1000 JIs/inseto), a qual proporcionou maior mortalidade do inseto, com maior reprodução do NEP por

hospedeiro no experimento realizado com diferentes concentrações desse nematoide. Os potes foram vedados com tecido voil e elástico, e incubados em sala climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12 horas). As avaliações foram realizadas após sete dias da inoculação, com base na mortalidade do inseto. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.

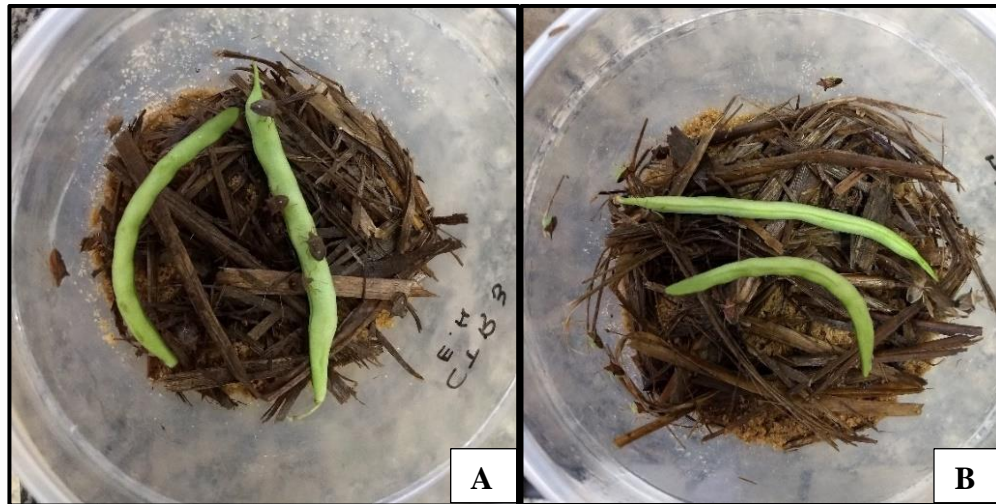


Figura 7. Experimento de diferença de virulência do nematoide *S. diaprepesi* entre percevejos. (A) Repetição do *E. heros*. (B) Repetição do *D. melacanthus*.

4.10. Virulência comparativa de *Steinernema diaprepesi* e *Steinernema carpocapsae* ao percevejo *Dichelops melacanthus*

Esse estudo comparou os nematoides *S. diaprepesi* AM163 e *S. carpocapsae* IP1 (Weiser, 1955) quanto a virulência para o percevejo *D. melacanthus*, que apresentou maior resistência para *S. diaprepesi* quando comparado ao percevejo *E. heros*. Esses dois nematoides foram selecionados por terem causado 100% de mortalidade do *E. heros* no primeiro teste, e por possuírem estratégias de forrageamento diferentes. Enquanto *S. diaprepesi* é do tipo “cruiser” (DEL VALLE et al., 2014), que busca seus insetos alvos, o nematoide *S. carpocapsae* é do tipo “ambush” (KOPPENHÖFER; KAYA, 1996), comportamento conhecido por ficar na espreita, esperando o hospedeiro se aproximar.

O estudo consistiu em três tratamentos representados pelo inseto tratado com os dois nematoides e pelo controle (inseto tratado com água). Para cada tratamento foram estabelecidas três repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico de 1,5 L (12,5 cm Ø) contendo 200g de areia (14% de umidade) coberta com 4 g de palha pré-umedecida (24 horas de molho antes da drenagem da água), duas vagens de feijão e 10 insetos.

Os dois nematoides foram aplicados com pipeta, gerando a concentração de 88,4 JI/cm² (1000 JIs/inseto). Os potes foram vedados com tecido voil e elástico, incubados em sala

climatizada (25°C, UR 60±5% e fotofase de 12 horas). A avaliação foi realizada no 7° dia após a inoculação, com base na mortalidade dos insetos. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, conduzido duas vezes no tempo.

4.11. Eficácia de *Steinernema diaprepesi* no controle de *Euschistus heros* em casa de vegetação

O estudo avaliou a eficácia do nematoide *S. diaprepesi* no controle de *E. heros* em condições de casa de vegetação, buscando prever sua eficácia no campo. Para simular esse ambiente, utilizamos a casa de vegetação do Laboratório de Controle Biológico. Assim, o estudo consistiu de apenas dois tratamentos: aplicação do nematoide e controle.

Cada tratamento teve quatro repetições distribuídas em blocos ao acaso, sendo cada bloco constituído de uma caixa de cimento (63 x 83 x 53 cm) preenchida com solo, resultando numa área (4.800 cm²) para receber os dois tratamentos. Cada repetição foi representada por um tubo PVC (25 cm de diâmetro x 21 cm de altura), aprofundado em 2 cm no solo da caixa, contendo 8g de palha pré-umedecida (24 horas de molho na água antes da sua drenagem) cobrindo o solo (pré-umedecido com 12L de água/caixa de cimento), duas vagens de feijão e 10 insetos (Figura 8). O nematoide *Steinernema diaprepesi* foi aplicado dentro dos tubos com o auxílio de um Becker, adicionando-se a suspensão até gerar a concentração de 88,4 JI/cm² (\cong 4.332 JIs/inseto), que proporcionou o maior nível de mortalidade de insetos (74,6%), com a maior taxa de reprodução do nematóide por inseto (5.400 JIs) no experimento aplicado diferentes concentrações de *S. diaprepesi*. Para os tubos do controle, apenas água foi aplicada. .

O experimento foi irrigado diariamente por microaspersores. Durante o experimento, a temperatura variou entre 18 e 25 ° C e a avaliação foi realizada sete dias após a liberação dos insetos nos tubos, com base na mortalidade dos insetos. Os insetos mortos foram transferidos para armadilhas Whites para confirmar a infecção pelo nematoide. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.



Figura 8. Experimento realizado em casa de vegetação com o *S. diaprepesi* visando o controle do *E. heros*.

4.12. Análises Estatísticas

Os experimentos realizados no laboratório foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, enquanto o experimento em casa de vegetação foi conduzido em blocos ao acaso. Para todos os testes, exceto para "virulência de NEPs", "virulência de bactérias" e "eficácia de *S. diaprepesi*", os dados foram corrigidos usando a fórmula de Abbott ($[\text{sobreviventes no controle} - \text{sobreviventes no tratamento}] / \text{sobreviventes em o controle} \times 100$) (ABBOTT, 1925). Em seguida, os dados corrigidos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro Wilk e Barlett. Para os testes que seguiram os pressupostos, foi realizado o teste t de Student quando havia apenas duas variáveis, enquanto a análise de variância (ANOVA) foi realizada quando havia mais de duas variáveis e, em seguida, o teste de Tukey 5%.

Para o experimento "Virulência de *Steinernema diaprepesi* em diferentes concentrações para *E. heros*", os dados corrigidos (fórmula de Abbott) foram analisados por regressão logarítmica entre concentrações de nematoides e mortalidade de insetos. Para analisar o número de JIs gerados por inseto, foi utilizado o Modelo Linear Generalizado (GLM - Modelos Lineares Generalizados) com distribuição Quasipoisson e ligação "log". Posteriormente, foi realizada análise de variância, seguida da comparação das médias pelo teste de Tukey a 5%.

Todos os dados percentuais (frequências) foram transformados em arco seno $\sqrt{x} / 100$ antes da análise (SOUTHWOOD, 1978). As análises foram realizadas no software SPSS 16.0 e no R 3.6 (R Core Team 2019), por meio dos pacotes lme4 (BATES et al., 2015), emmeans (SEARLE et al., 1980), drc (RITZ et al., 2015) e hnp (MORAL et al., 2017).

5. RESULTADOS

5.1. Virulência de nematoides entomopatogênicos para *Euschistus heros*

Os nematoides *Steinernema diaprepesi* AM163, *S. carpocapsae* All e *S. carpocapsae* IP1 causaram 100% de mortalidade em *E. heros* (Tabela 3), mas não diferiram significativamente dos outros seis nematoides testados, com mortalidade acima de 88% ($F_{16, 101} = 27,57$, $P = 0,71$). Em relação aos nematoides menos virulentos, três deles causaram mortalidade abaixo de 42%, não diferindo do controle ($P = 0,2$) (Tabela 3). Os insetos mortos foram observados em estereomicroscópio, sendo possível observar JIs emergindo dos cadáveres (Figura 9).

Tabela 3. Mortalidade (%) do *E. heros* sete dias depois da aplicação dos 16 isolados de NEPs no substrato areia, na concentração de 140 JIs/cm².

Nematoide	Isolado	Mortalidade (%)
<i>S. diaprepesi</i>	AM163	100 ± 0 a
<i>S. carpocapsae</i>	All	100 ± 0 a
<i>S. carpocapsae</i>	IP1	100 ± 0 a
<i>S. feltiae</i>	IBCBn47	98,5 ± 1,9 a
<i>S. glaseri</i>	CER21	98,3 ± 1,9 a
<i>S. carpocapsae</i>	IL2	98,0 ± 2,0 a
<i>S. carpocapsae</i>	IL1	95,0 ± 6,0 a
<i>Steinernema sp.</i>	IBCBn20	93,3 ± 2,5 a
<i>H. bacteriophaga</i>	HB EN01	88,3 ± 6,2 ab
<i>H. amazonensis</i>	IBCBn10	73,3 ± 10,9 bc
<i>H. amazonensis</i>	IBCBn44	60,0 ± 6,0 cd
<i>S. rarum</i>	PAM25	55,0 ± 11,9 cd
<i>S. rarum</i>	PAM13	51,6 ± 13,8 cd
<i>S. brazilense</i>	PONTO2C	41,6 ± 8,0 cde
<i>S. brazilense</i>	IBCBn06	35,0 ± 5,0 de
<i>S. rarum</i>	PAM11	31,6 ± 6,2 de
Controle		15,0 ± 0,2 e

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.

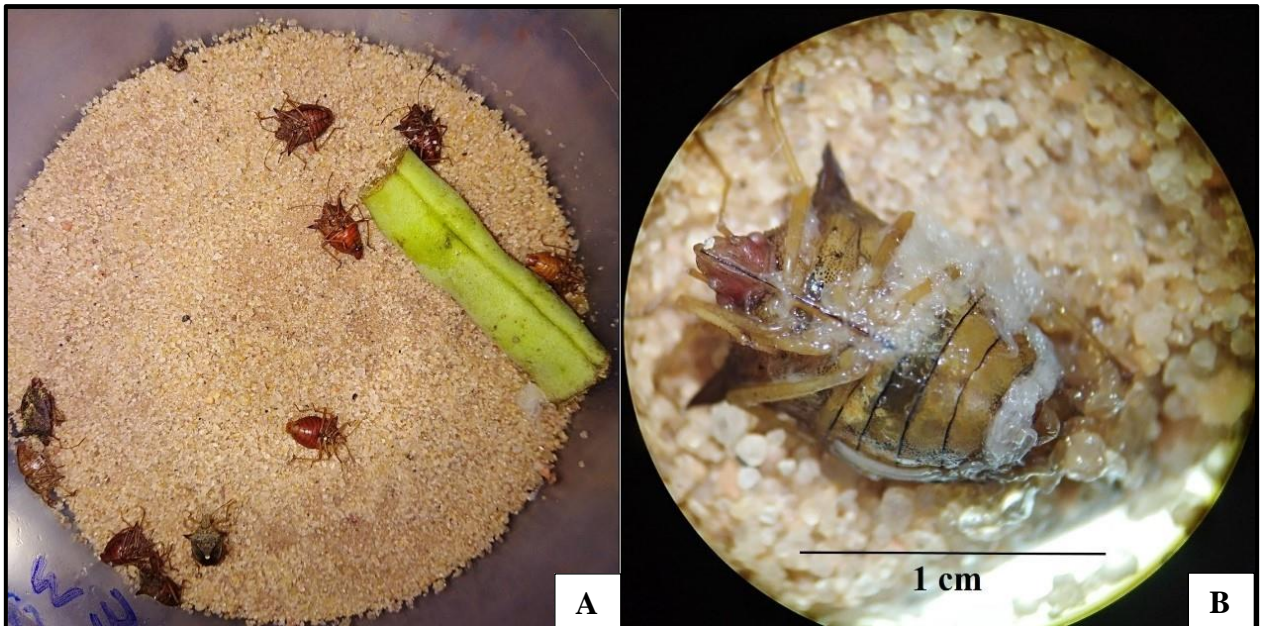


Figura 9. (A) Percevejos adultos de *E. heros* mortos pelo nematoide *Steinernema diaprepesi*. (B) Nematoides emergindo do cadáver do inseto.

5.2. Virulência de bactérias simbióticas para *Euschistus heros*

Todas as bactérias simbióticas causaram baixos níveis de mortalidade em *E. heros* (21,7% a 40,3%), apenas *X. doucetiae* AM163 e *P. luminescens* IBCBn10 (associadas a *S. diaprepesi* e *H. amazonensis*, respectivamente) diferiram significativamente do controle ($F_{9, 59} = 2,58$, $P = 0,016$) (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade (%) de *E. heros* após sete dias da inoculação com culturas de bactérias simbióticas.

Bactéria simbiótica	Nematoide	Isolado	Mortalidade (%)
<i>X. doucetiae</i>	<i>S. diaprepesi</i>	AM163	40,3 ± 5,6 a
<i>P. luminescens</i>	<i>H. amazonensis</i>	IBCBn10	37,0 ± 9,1 a
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	IL2	29,9 ± 3,4 ab
<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	CER21	28,9 ± 7,9 ab
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>S. braziliense</i>	PONTO2C	27,9 ± 4,7 ab
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i>	PAM25	24,1 ± 5,3 ab
<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	HB EN01	23,2 ± 4,1 ab
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	CER144	21,9 ± 4,6 ab
<i>Xenorhabdus</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	AM165	21,7 ± 6,5 ab
Controle			10,4 ± 3,8 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.

5.3. Virulência de *Steinernema diaprepesi* em diferentes concentrações para *Euschistus heros*

A curva logarítmica obtida pela correlação das diferentes concentrações de *S. diaprepesi* AM163 com a mortalidade em *E. heros* foi altamente significativa ($R = 0,96$) (Figura 10). Com base na equação, o LC50 foi determinado como 24 JIs/cm² e o LC80 como 256 JIs/cm².

O número de JIs produzidos por inseto também foi acrescido com o aumento das concentrações de nematoides. Mas apenas até a concentração 88,4 JIs cm², em que os juvenis infectivos produzidos por inseto atingiram 5.400 JIs, com diferença significativa apenas em relação às duas menores concentrações utilizadas: 0,7 JIs/cm² e 3,5 JIs/cm². (GLM; $F = 17,2144$; $p < 0,0001$ / Figura 11).

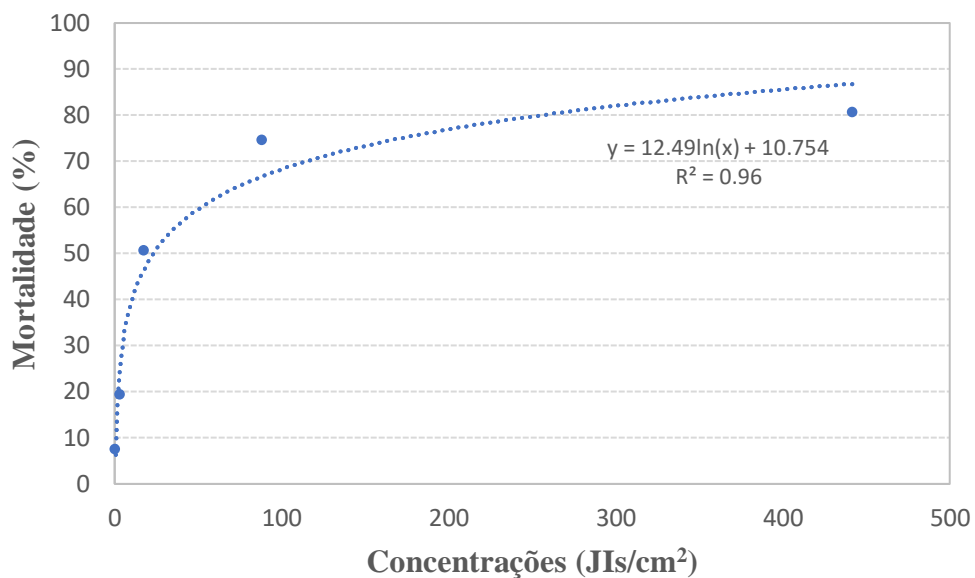


Figura 10. Curva obtida por regressão logarítmica entre as diferentes concentrações (0,7; 3,5; 17,6; 88,4; 442,4 JI/cm²) aplicadas do nematoide *S. diaprepesi* e a mortalidade (%) corrigida (fórmula de Abbott) do *Euschistus heros*, após sete dias de aplicação dos JIs

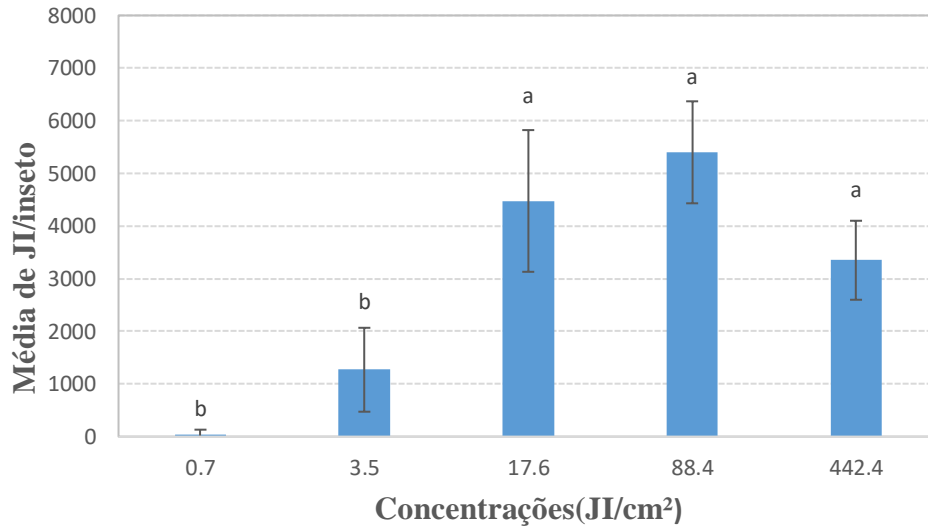


Figura 11. Reprodução do *S. diaprepesi* AM163 em *E. heros* expostos a diferentes concentrações de juvenis infectivos. * Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.

5.4. Virulência de *Steinernema diaprepesi* para *Euschistus heros* em dois substratos com duas espessuras de camadas

O nematoide *S. diaprepesi* aplicado em areia com as espessuras 1 e 5 cm causou 83% e 80% de mortalidade em *E. heros*, respectivamente, níveis que não diferiram daqueles obtidos pela sua aplicação no substrato palha com as mesmas espessuras de 1 (70%) e 5 cm (69%) (Figura 12) (One-way ANOVA; $F = 1,3632$; $p = 0,2826$).

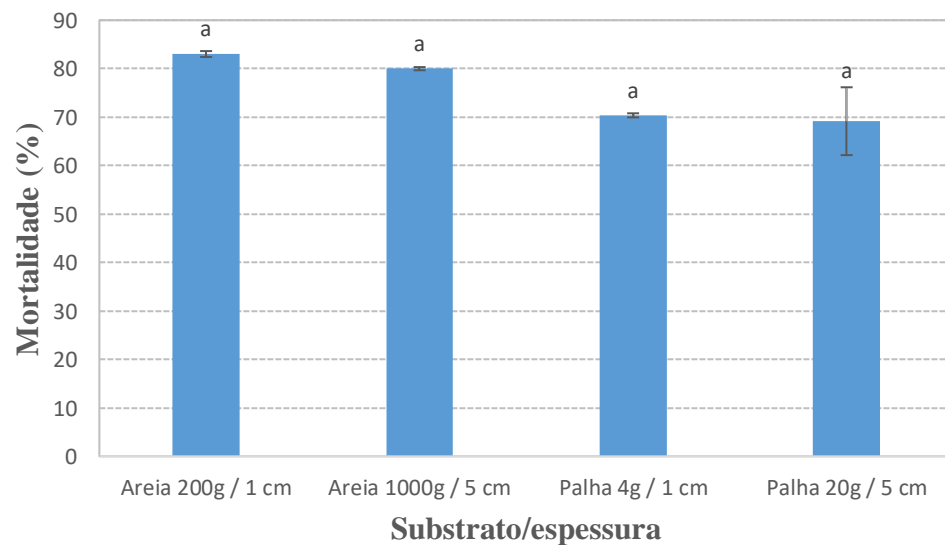


Figura 12. Mortalidade (%) corrigida de *Euschistus heros* (fórmula de Abbott) após 7 dias da aplicação do *Steinernema diaprepesi* na concentração de 88,4 J1/cm², em dois substratos com duas espessuras de camadas. *Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%

5.5. Susceptibilidade comparativa de *Dichelops melacanthus* e *Euschistus heros* ao nematoide *Steinernema diaprepesi*

O nematoide *S. diaprepesi* apresentou-se significativamente mais virulento para *E. heros* que para *D. melacanthus* (Figura 13), causando 69,1% e 28,8% de mortalidade dos adultos desses insetos, respectivamente, após sete dias da aplicação (Teste T; $t = 3,5162$; d.f. 9,4968; $p = 0,006$).

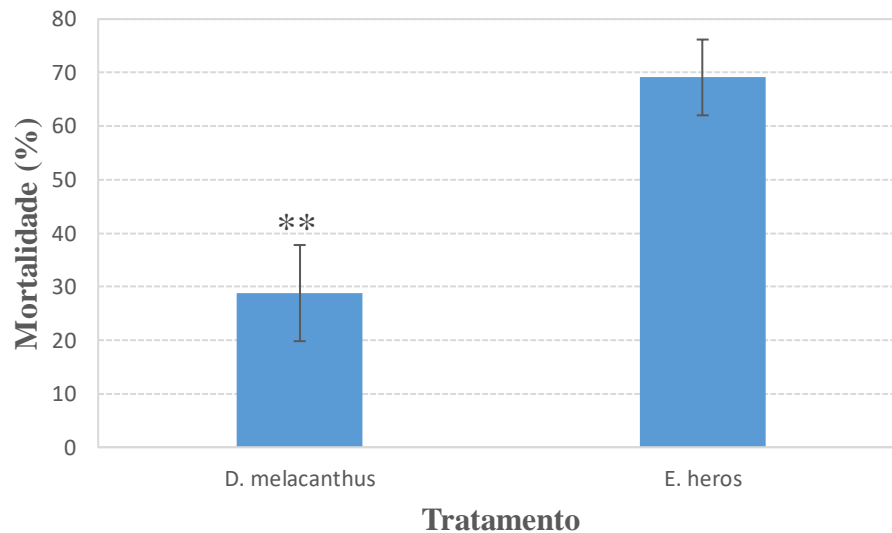


Figura 13. Mortalidade (%) corrigida de *E. heros* e *D. melacanthus* (fórmula de Abbott) sete dias após a aplicação de *Steinernema diaprepesi* AM163 no substrato palha sobre areia na concentração 88,4 JIs/cm² (** $p < 0,01$; Student's t test).

5.6. Virulência comparativa de *S. diaprepesi* e *S. carpocapsae* ao percevejo *D. melacanthus*

Comparando *S. diaprepesi* e *S. carpocapsae* quanto a virulência para *D. melacanthus* (percevejo mais resistente), ambas as espécies causaram baixos índices de mortalidade ($< 25\%$) (Figura 14), não diferindo significativamente entre si (Teste T; $t = -0,6811$; d.f. 9,7665; $p = 0,5116$) e confirmando a maior resistência do percevejo *D. melacanthus* para nematoides entomopatogênicos com relação a *E. heros*.

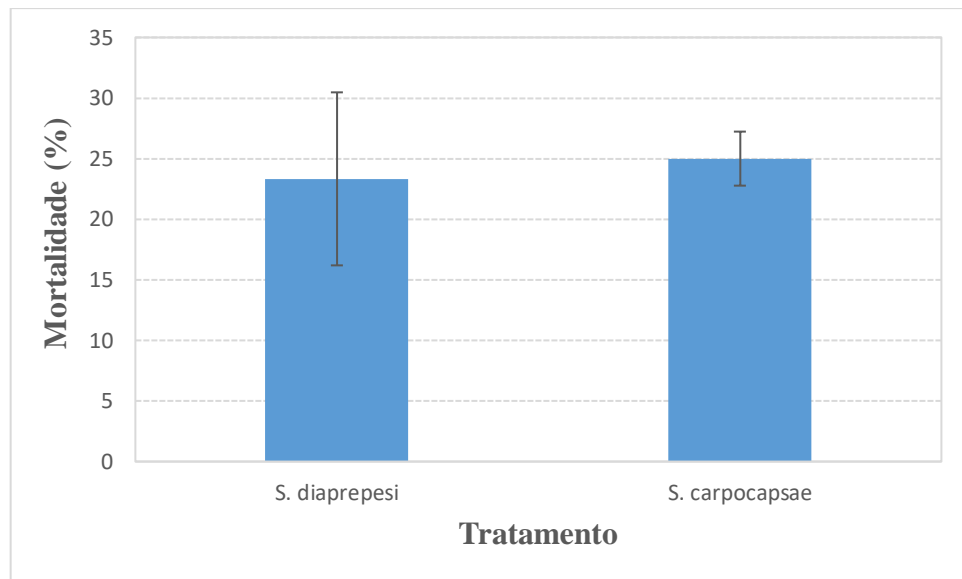


Figura 14. Mortalidade (%) corrigida de *Dichelops melacanthus* (fórmula de Abbott) sete dias depois da aplicação de *Steinernema diaprepesi* AM163 e *Steinernema carpocapsae* IP1 no substrato palha sobre areia na concentração 88,4 JIs/cm² ($p > 0.05$; Student's t test).

5.7. Eficácia de *S. diaprepesi* no controle de *E. heros* em casa de vegetação

O nematoide *S. diaprepesi* causou 72,5% de mortalidade dos adultos de *E. heros* (Figura 16), diferenciando-se significativamente do controle (5%) (Teste T, $t = -10,42$; d.f. = 9,7558; $p < 0,0001$) (Figura 15).

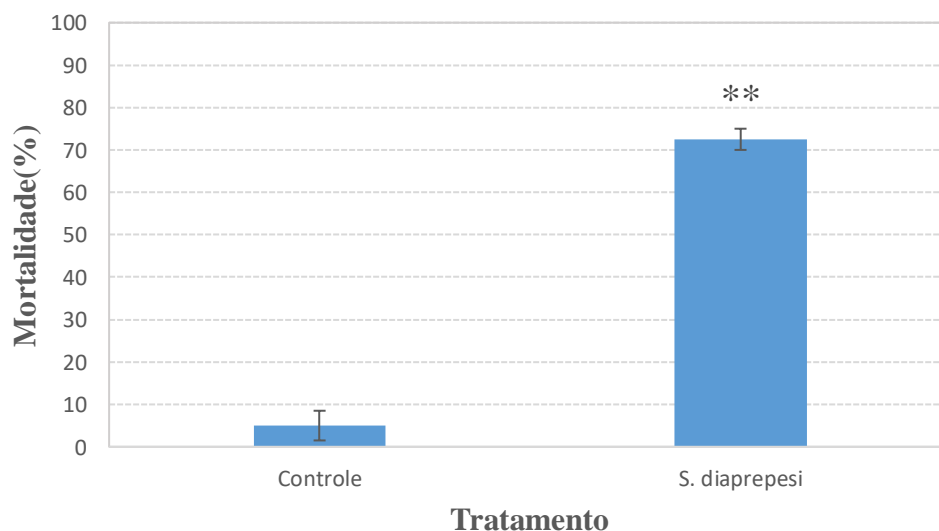


Figura 15. Mortalidade (%) de *Euschistus heros* sete dias após aplicação do nematoide *Steinernema diaprepesi* AM163 no substrato palha sobre solo, na concentração 88,4 JIs/cm² (** $p < 0.01$; Student's t test).



Figura 15. Mortalidade de *E. heros* com aplicação do nematoide *S. diaprepesi* na concentração 88,4 JI/cm² em tubos de PVC.

6. DISCUSSÃO

Os nematoides *S. diaprepesi* (AM163), *S. carpocapsae* (All) e *S. carpocapsae* (IP1) causaram 100% de mortalidade de *E. heros* sobre o substrato areia. Sendo selecionado o primeiro isolado para os próximos ensaios por ser originado de uma região mais quente do Brasil, Sinop - MT, onde concentram grandes áreas produtoras de soja, podendo ser uma espécie mais adaptada para climas quentes. Existem apenas alguns estudos de NEPs servindo como agentes de controle biológico de espécies de Hemiptera. Principalmente espécies que permanecem em contato com o solo em algum estágio do seu ciclo de vida (LEITE et al., 2005; MELO et al. 2006; BATISTA; AUAD, 2010; VIEUX; MALAN, 2013; MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2013; BATISTA et al., 2014; ALVES et al., 2009; GUERRERO; PARDEY, 2019; MOUSSA et al., 2021; ZART et al., 2021). Porém também existem estudos com Hemipteras que permanecem principalmente na parte aérea das plantas (MARTÍNEZ-CÓRDOBA et al., 2011; SHAPIRO-ILAN; MIZELL, 2012; NARANJO et al., 2012; NIEKERK; MALAN, 2013; MARRERO et al., 2015; GUIDE et al., 2015; 2019; PLATT et al., 2020). As suscetibilidades desses insetos variam amplamente, com algumas espécies sendo mais resistentes do que outros hospedeiros de insetos normalmente testados, exigindo alta concentração de NEPs (100 JIs/cm²) para fornecer mortalidade > 70% (GUIDE et al., 2015; 2019).

As bactérias simbióticas testadas proporcionaram baixa mortalidade de *E. heros* (< 40,3%). Três fatores podem contribuir para a baixa virulência ou inocuidade das bactérias sobre *E. heros*. O primeiro refere-se ao processo de infecção, pois as bactérias dependem dos NEPS para serem introduzidas até o hemocele do inseto (POINAR, 1990; DOLINSKI, 2006). O segundo, as bactérias podem ser mais virulentas em associação com o NEPs, já que esses podem afetar a atividade de hemócitos dos insetos infectados, afetando a imunidade dos hospedeiros (BALASUBRAMANIAN et al., 2009; TOUBARRO et al., 2013; ONO; YOSHIGA, 2018). O terceiro fator está relacionado com características presentes nos percevejos que dificultam a ação de microrganismos, como a composição química da cutícula (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; SOSA-GOMEZ et al., 1997; OLIVEIRA, 2014), voláteis produzidos por glândulas metatorácicas (LOPES et al., 2015), aparelho bucal e fisiologia digestiva de percevejos (LOMATE & BONNING, 2016).

No presente estudo, *X. doucetiae* e *P. luminescens* foram as bactérias mais virulentas para *E. heros*, diferindo significativamente do controle. Essas mortalidades podem ter sido causadas pelo efeito tóxico produzido pelos metabólitos ou pela penetração das células da bactéria através de aberturas naturais como espiráculo e ânus. Outros estudos também mostraram alguns efeitos de culturas de bactérias simbióticas em ovos, larvas e pupas de Lepidoptera, bem como em Coleoptera, Thysanoptera e ácaros (ABDEL-RAZEK, 2003; MOHAN et al., 2003; GERRITSEN et al., 2005;

BUSSAMAN et al., 2009; NAMSENA et al., 2016; EROGLU et al., 2019; CEVIZCI et al., 2020), destacando o efeito tóxico de seus metabólitos para os dois primeiros grupos de artrópodes. Mais recentemente, Incedayi et al. (2021) identificaram os compostos produzidos por *X. nematophila* e comprovaram que a xenocoumacina é o composto mais tóxico. Enquanto a bactéria não simbiótica *Chromobacterium subtsugae*, também produziu metabólitos que causaram a mortalidade de *N. viridula* (MARTIN et al., 2007). Assim, novos estudos devem ser realizados no sentido de rastrear bactérias simbióticas e não simbióticas contra *E. heros*, bem como identificar os compostos produzidos pela bactéria que causaram a mortalidade do inseto.

No teste com *S. diaprepesi* aplicado sobre o solo em diferentes concentrações, a mortalidade de *E. heros* esteve acima de 50% somente nas concentrações elevadas de aplicação do nematoide, acima de 24 JIs/cm². Para se obter 80% de mortalidade são necessárias concentrações acima de 256 JIs/cm², algo que não condiz com os produtos atualmente disponíveis no mercado, pois é um valor muito maior que a concentração de 25 JIs/cm², considerada como efetiva para a maioria das pragas de solo (SHAPIRO-ILAN et al., 2002).

Interessantemente, o aumento das concentrações resultou em um acréscimo também no número de nematoides produzidos por inseto, porém até 88,4 JIs/cm², já que na concentração maior ocorreu uma queda na produção por inseto. Assim, concentrações muito elevadas podem levar provavelmente à uma maior competição dos nematoides por alimento ou à uma maior contaminação no cadáver do inseto, afetando a reprodução do agente. Outros estudos também demonstraram essa redução na reprodução de nematoides nas concentrações mais altas de *Steinernema* sp. (640 JIs / inseto), de *S. feltiae* (FILIPJEV, 1934) (200-400 JIs / inseto) e de *S. thermophilum* (100 JIs / inseto) para larva de *Tenebrio molitor* (L.) (BALIADI et al. 2011), *G. mellonella* (RAHOO et al. 2017) e *Athalia lugens proxima* (YADAV; LALRAMLIANA 2012), respectivamente. De acordo com esses estudos, a cocentração que começa a causar diminuição na reprodução dos nematoides depende da suscetibilidade do hospedeiro.

O nematoide *S. diaprepesi* testado sobre *E. heros* em dois substratos com duas espessuras de camadas, na concentração de 88,4 JIs/cm², causou alta mortalidade do inseto, independentemente do substrato e da sua espessura, sendo um pouco maior na areia (83% para 1cm e 80% para 5 cm) que na palha (70 % para 1 cm e 69 % para 5 cm), mas sem diferirem significativamente. Assim, caso concentrações elevadas sejam viabilizadas para uso, NEPs poderão se apresentar como agentes potenciais para o controle desse inseto logo após a colheita da soja, quando o inseto é forçado a descer para a palhada, ou no período de diapausa nas regiões mais frias, quando o inseto se encontra nos restos culturais. A semelhança na mortalidade de *E. heros* para as duas espessuras das camadas de cada substrato pode sugerir uma igual atração dos

JIs para a superfície do substrato na tentativa de alcançarem os adultos do inseto ali presentes.

Steinernema diaprepesi foi considerado ter um comportamento “cruiser” (DEL VALLE et al., 2014), podendo gerar melhores resultados contra insetos enterrados em relação àqueles na superfície do substrato (BANU; CANNAYNE; MENNA, 2017). Nesse estudo *S. diaprepesi* pode ter forrageado na superfície dos substratos, pois é onde *E. heros* permanece preferencialmente, em um comportamento “ambush” ou semelhante a isso. Segundo Wilson et. al (2012), NEPs podem ter ambos os comportamentos “ambush” e “cruiser” em cada espécie, podendo haver a predominância de um ou de outro dependendo do tipo de substrato.

O nematoide *S. diaprepesi* apresentou-se mais virulento para *E. heros* que para *D. melacanthus*, mesmo sendo ambos os insetos pertencentes a mesma família Pentatomidae. A diferença de susceptibilidade desses dois percevejos pode estar relacionada a diferença de comportamentos de ambos. *Euschistus heros* permanece na parte aérea da soja durante o período reprodutivo dessa cultura (CÔRREA-FERREIRA et. al., 2009), enquanto *D. melacanthus* permanece em contato com o solo ou palhada nos estádios iniciais das plântulas de milho, quando causa danos à cultura (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Esses diferentes hábitos podem ter resultado em uma seleção distinta, tornando o percevejo que ataca apenas a parte aérea da soja mais susceptível a NEPs. É concebível que os insetos tendem a ser mais resistentes a NEPs se permanecerem naturalmente mais expostos no solo durante seu ciclo de vida (KAYA et al., 1993, JACKSON, 1996; 1999).

O percevejo *D. melacanthus* apresentou-se igualmente resistente para ambos os nematoides *S. diaprepesi* AM163 e *S. carpocapsae* IP1, os quais diferem nos seus comportamentos “cruiser” e “ambush”, respectivamente (DEL VALLE et al., 2014; KOPPENHÖFER; KAYA, 1996). Testando *S. diaprepesi* e *S. carpocapsae* sobre *D. melacanthus*, Guide et al. (2019) obtiveram maiores índices de mortalidade (78 e 64% respectivamente), porém usando concentração maior (100 JIs/cm²) e acondicionando os insetos dentro de placas de Petri (9 cm), sobre papel de filtro no fundo. O nematoide *S. feltiae* selecionado por Guide et al. (2019) como um dos mais virulentos causou 72% de mortalidade em placa de Petri, e menos de 40% em casa de vegetação, ocorrendo mais de 25% de mortalidade no controle.

No experimento em casa de vegetação, *S. diaprepesi* manteve alta mortalidade em *E. heros* (72,5%) na concentração elevada de 88,4 JIs/cm², como observado nos testes em laboratório. Essa concentração é muito elevada, especialmente se comparada a concentrações usadas em outros testes contra hemípteros de solo, como aquelas testadas contra cigarrinhas do gênero *Mahanarva*, de 1 a 10 JIs/cm² (LEITE et al., 2005; BATISTA; AUAD, 2010; BATISTA et al., 2014).

Esse estudo demonstrou a virulência presente dos NEPs em relação ao *E. heros*, porém de acordo com o experimento de concentrações, concluímos que são necessários concentrações altas 256 JI/cm² para atingir 80% de mortalidade nesse percevejo. Por isso, estudos na área de produção, podem possibilitar futuramente tornar viável essa tecnologia para o controle do *E. heros*.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados de nematoides entomopatogênicos apresentaram maior virulência ao *E. heros* do que as bactérias simbiontes dos NEPs;
- O nematoide *S. diaprepesi* controlou eficientemente o percevejo *E. heros* na alta concentração de 88,4 JI/cm² em diferentes substratos no laboratório e na casa de vegetação;
- O percevejo *D. melacanthus* demonstrou menor suscetibilidade aos nematoides entomopatogênicos: *S. diaprepesi* e *S. carpocapsae*, se comparado com *E. heros*.

8. REFERÊNCIAS

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

ABDEL-RAZEK, A. S. Pathogenic effects of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of the *Diamondback Moth*, *Plutella xylostella* (L.). **Anzeiger für Schädlingskunde= Journal of pest Science**. v. 76, n. 4, p. 108-111, 2003.

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and sistematics. In: GAUGLER, R (Ed). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI. p. 1-34, 2002.

AGROFIT- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 02 set. 2020.

ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, C.; WINTER, C. Nematoides entomopatogênicos. SILVA NETO, MAC da; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Ed.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro, INCT-EM, p. 1-40, 2012.

ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**. v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006.

ANDALÓ, V. et al. Entomopathogenic nematodes for the control of *Gryllus* sp. (Orthoptera: Gryllidae) under laboratory and field conditions. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biological control**, v. 28, n. 1, 2003.

ALVES V. S. et al. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 67-73, 2009.

BALASUBRAMANIAN, N. et al. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **International Journal for Parasitology**. v.39, p. 975–984, 2009.

BALIADI Y. et al. Pathogenicity, development and reproduction of the entomopathogenic nematode *Steinernema* sp., in mealworm *Tenebrio molitor*. AGRIVITA, **Journal of Agricultural Science**, v. 33, n. 3, p. 233-244, 2012.

BANU, J. G.; CANNAYANE, I.; MEENA, K.S. "Entomopathogenic nematodes: General biology and behaviour." In: ABD-ELGAWAD, M.; ASKARY, T.H; COUPLAND, J (Ed). **Biocontrol Agents Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes**, 2017. p. 63-87.

BATES, D. et al. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, 2015.

BATISTA E. S. D. P., AUAD A. M. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 10, p. 1079-1085, 2010.

BATISTA, E. S. D. P. et al. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) to spittlebug *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, n.81, v.2, p.145-149, 2014.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, 2009.

BOEMARE, N. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, 2002. p. 35-36.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**. v. 134, 1988.

BORGES, J. V. O. **Concentração de *Heterorhabditis amazonenses* (NEMATODA: RHABDITIDA) visando o controle do percevejo-marrom na cultura da soja**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, v. 43, p. 363-375, 1997.

BUENO, A. F. et al. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. **Crop Protection**, v. 71, p. 132-137, 2015.

BUSSAMAN, P. et al. Pathogenicity of additional strains of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) to the mushroom mite *Luciaphorus perniciosus* (Acari: Pygmephoridae). **Applied Entomology and Zoology**. v. 44, n. 2, p. 293-299, 2009.

CANESIN, A. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-dagoiaba (Coleoptera: Curculionidae)**. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.

CARNEIRO, C. N. B. et al. Effects of Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus temperata* Infection on the Digestive Enzymes of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) Larvae?. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, n. 7, 2008.

CAVALCANTI, R.S. **Associação *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. – nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) – *Orius insidiosus* (Say) no controle de tripés (Thysanoptera) em cultivo protegido**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Entomologia agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CEVIZCI, D. et al. Mode of entry of secondary metabolites of the bacteria *Xenorhabdus szentirmaii* and *X. nematophila* into *Tetranychus urticae*, and their toxicity to the predatory mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.174,

2020.

CHACON-OROZCO, J. G. **Caracterização e virulência de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos nativos do Brasil, e toxicidade de seus metabolitos secundários para larvas de traça da colméia (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) - Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CHACÓN-OROZCO, J. G. et al. Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. against the soybean pathogenic *Sclerotinia sclerotiorum*. **Sci Rep**. v.10, n.20649, 2020.

CLARKE, D. J. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cell Microbiology**. v. 10, p. 2159-67, 2008.

CHEN, G.; DUNPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antifungal Activity of Two *Xenorhabdus* Species and *Photorhabdus luminescens*, Bacteria Associated with the Nematodes *Steinernema* Species and *Heterorhabditis megidis*. **Biological Control**, v. 4,1994.

CHOCOROSQUI, V.R. **Bioecologia de *Dichelops (Diceraeus) melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), danos e controle em soja, milho e trigo no Norte do Paraná**. 2001. 1. Tese (Doutorado em Entomologia) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 16 de set. 2020.

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

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PANIZZI, A.R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1999. 45p. (Circular Técnica, 24)

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GOMEZ, D. R. **Percevejos e o sistema de produção soja-milho**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. 98p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN: 1516-781X;

n.397)

CRUZ, B. P. B. **Pragas de culturas e controle biológico**. Campinas: Fundação Cargill, 1988, p. 26-28.

DALLAS, A. 1851 in de Jong Y (2016). Fauna Europaea. Fauna Europaea Consortium.

DEL VALLE, E. E. et al. Ecological aspects of an isolate of *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) from Argentina. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n.6, p. 690-704.

DE PAULA, A. R. et al. Patogenicidade e efeito comportamental de *Photorhabdus temperata* K122 nas formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **O Biológico**, v. 68, p. 118-122, 2006.

DOLINSKI, C. Nematóides como Agentes do Controle Biológico de Insetos. In: **Agentes de Controle Biológico**. Universidade Estadual do Norte Fluminense. p. 73- 101, 2006.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R (Ed.) **Entomopathogenic Nematology**. New York: CABI, p. 79–98, 2002.

EHLERS, R. U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.56, p. 623–633, 2001.

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 2020. Disponível em: <http://www.embrapa.br/>. Acesso em: 27 set. 2020.

EROGLU, C. et al. Acaricidal effect of cell-free supernatants from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 160, 2019.

FABRICIUS, J.C. Supplementum entomologiae systematicae. Hafniae [= Copenhagen]: Proft and Storch, pp. 572, 1978.

FILIPJEV, I. N. Miscellanea Nematologica. I. Eine neue Art der Gattung Neoaplectana Steiner nebst Bemerkungen über die systematische Stellung der letzteren. Parasitologicheskii Sbornik Zoologicheskogo. **Instituta Akademii Nauk SSSR**. v. 4, p. 229-240, 1934.

FORST, S. et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 51, 1997.

GERRITSEN, L. J. M.; GEORGIEVA, J.; WIEGERS, G. L. Oral toxicity of *Photorhabdus* toxins against thrips species. **Journal of invertebrate pathology**. v. 88, n. 3, p. 207-211, 2005.

GOMEZ, S. A.; ÁVILA C. J. Milho: barriga-verde na safrinha. **Cultivar: grandes culturas**, Pelotas, v. 3, n. 26, 2001.

GOTZ, P.; BOMAN, A.; BOMAN, H. G. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. **The Royal Society London**. v.212; p. 333-350, 1981.

GRIGOLLI, J. F. J. et al. Estratégias de controle químico do percevejo barriga verde *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de sucessão soja e milho safrinha. **XXXI CNMS**, p.248-253 [Apresentado no XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2016, Bento Gonçalves-RS].

GUERRERO M. R., PARDEY A. E. B. Selection of nematodes to control nymphs of *Haplaxius crudus* (Van Duzee) (Hemiptera: Cixiidae). **American Journal of Entomology**, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2019.

GUIDE, B. A. et al. Nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) em el control de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Entomología Mexicana**, v. 2, 2015.

GUIDE, B. A. et al. Pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes against *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae). **Semina: Ciência Agrária**, v. 40, n. 4, 2019.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70p. (Circular Técnica 30).

IBGE - Levantamento sistemático da produção agrícola. 2017. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html. Acesso em: 20 ago. 2020.

INCEDAYI, G. et al. Relative potency of a novel acaricidal compound from *Xenorhabdus*, a bacterial genus mutualistically associated with entomopathogenic nematodes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

IRAC-BR- Percevejo-marrom, *Euschistus heros*. 2020. Disponível em: <https://www.irac-br.org/euschistus-heros>. Acesso: 15 ago. 2020.

JACKSON, T.A. Soil dwelling pests - is specificity the key to successful microbial control. In: T.A. JACKSON, T. A.; GLARE, T. R. (ed.) **Proc 3rd International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests**. New Zealand: AgResearch. p. 1–6, 1996.

JACKSON T. A. Factors in the Success and Failure of Microbial Controlagents for Soil Dwelling Pests. **Integr. Pest Manag**, v. 4, p. 281–285, 1999.

JÚNIOR, A. S. N.; NEGRISOLO, C. R. C. B.; SILVA, A. P. P. O. **Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. p. 24. (Documentos 202).

KAYA, H. K.; BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. An overview of insect-parasitic and entomopathogenic nematodes. In: BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J.; KAYA, H. K.(ed). **Nematodes and the Biological Control of Insect Pests**. CSIRO, Australia, 1993. p. 1-10.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, p. 281-324, 1997.

- KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA H. K. Coexistence of two steinernematid nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) in the presence of two host species. **Applied Soil Ecology**, v. 4, n. 3, p. 221-230, 1996.
- KOPPERT- Podisibug Micro-Vespa Parasitóide *Telenomus podisi* - Registro no MAPA 43919. Disponível em: <https://www.koppert.com.br/podisibug/>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- LEITE, L. G. et al. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root splittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, 2005.
- LEITE, L.G. et al. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. **Arq. Inst. Biol.** v. 74, 2007.
- LEITE, L. G. et al. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, 2012.
- LE VIEUX P. D., MALAN A. P. The potential use of entomopathogenic nematodes to control *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 34, n. 2, p. 296-306, 2013.
- LI, J. et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. **Journal of Natural Products**, v. 58, 1995.
- LOCKWOOD, J. A.; STORY, R. N. Adaptive Functions of Nymphal Aggregation in the Southern Green Stink Bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**. v. 15, n. 3, p. 739–749, 1986.
- LOMATE, P. R.; BONNING, B. C. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Sci Rep**, v. 6, 2016.

LOPES, R. B. et al. The fungistatic and fungicidal effects of volatiles from metathoracic glands of soybean-attacking stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) on the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 77-85, 2015.

MARRERO L. et al. Patogenicidad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) sobre las chinches de la soya *Piezodorus guildinii* West y *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) **Fitosanidad**, v. 19, n. 3, p. 227-232, 2015.

MARTÍNEZ-CÓRDOBA, H. E. et al. Evaluación de hongos y nematodos entomopatógenos para el control de *Dictyla monotropidia* (Hemiptera: Tingidae). **Cenicafé**, v. 62, n. 2, p. 69-78, 2011.

MARTINS-CECCONELLO, D. **Nematoides entomopatogênicos no controle de percevejo *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná, 2020.

MARTIN, P. A. et al. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 993-999, 2007.

MARTINS, P. M. **Controle de larvas de *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae) utilizando nematoides entomopatogênicos e variedades resistentes de tomateiro**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

MBATA G. N.; SHAPIRO-ILAN D. The potential for controlling *Pangaeus bilineatus* (Heteroptera: Cydnidae) using a combination of entomopathogens and an insecticide. **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 5, p. 2072-2076, 2013.

MELO et al. Evaluación de dos cepas comerciales de entomonematodos como agentes de control de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). **Revista Colombiana de Entomología** v. 32, n. 1, p. 31-38, 2006.

MIRANDA, J. E. **Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Cerrado brasileiro**. Campina Grande: Embrapa algodão, 2006. 24p. (Circular Técnica 98).

MINAS, S. R.; **Potencial dos nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico da mosca-domediterrâneo *ceratitis capitata* (wied.) (diptera: tephritidae)**. 2008. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

MOHAN, S.; SABIR, N. Biosafety concerns on the use of *Photorhabdus luminescens* as biopesticide: experimental evidence of mortality in egg parasitoid *Trichogramma* spp. **Current Science**, p. 1268-1272, 2005.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, 2017.

MOUSSA A. et al. Entomopathogenic nematodes and fungi to control *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cixiidae). **BioControl**, p. 1-12, 2021.

MULLER, D. et al. Controle de percevejo-marrom em soja com o uso de produtos químicos e biológicos. In: III CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER-PVDAgro 2017.

NAMSENA, P.; BUSSAMAN, P.; RATTANASENA, P. Bioformulation of *Xenorhabdus stockiae* PB09 for controlling mushroom mite, *Luciaphorus perniciosus* Rack. **Bioresources and Bioprocessing**. v. 3, n. 1, p. 1-7, 2016.

NARANJO, N.; MONTERO, D. A.; SÁENZ, A. Control de la chinche de los pastos *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae) con nematodos entomopatógenos en invernadero. **Revista Brasileirade Ciencias Agrarias**, v. 8 n. 1, p. 90-94, 2013.

NGUYEN, K. B.; DUNCAN, L. W. *Steinernema diaprepesi* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L)(Coleoptera: Curculionidae). **Journal**

of **Nematology**. v. 34, n. 2, p. 159, 2002.

NORA, D. D. **Isolamento e seleção de fungos para o controle do percevejo-marrom**. 2019. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Norte, 2019.

NUNES M. C.; CORRÊA-FERREIRA B. S. Danos causados à soja por adultos de *Euschistus heros* (Fabricius)(Hemiptera: Pentatomidae), sadios e parasitados por *Hexacladia smithii* Ashmead (Hymenoptera: Encyrtidae). **Neotropical Entomology**, v.31, n.1, p.109-113, 2002.

OLIVEIRA, D. G. P. **Parâmetros biológicos de *Euschistus heros* (hemiptera: pentatomidae) alimentados em dietas naturais e sua relação com a infecção causada por fungos entomopatogênicos**. 2014. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ONO, M.; YOSHIGA, T. Cellular immunity in the insect *Galleria mellonella* against insect non-parasitic nematodes. **Parasitology** p.1–8, 2018.

PANIZZI, A. R. et al. Stink bugs (Pentatomidae). In: SCHAEFER, C. & PANIZZI, A. R. (Ed.) **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton, CRC, 2000. p.421-474.

PANIZZI, A.R. et al. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B. et al. **Soja manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. p.335-420.

PANIZZI, A.R. et al. **Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo**. Embrapa Trigo, 2015. 40 p. (Documentos 114).

PANIZZI, A. R.; NIVA, C. C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern paraná. **Pesq. Agropec. Bras**, v.29, n.3, 1994.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY, J. R. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist, Gainesville**, v. 68, n. 1, 1985.

- PANIZZI, A. R.; VIVAN, L. M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* in overwintering sites and the breaking of dormancy. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 82, 1997.
- PLATT T.; STOKWE N. F.; MALAN A. P. A review of the potential use of entomopathogenic nematodes to control above-ground insect pests in South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2020.
- POINAR JR, G. O. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* N. Gen., N. Sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). **Nematologica**. v. 21, n. 4, p. 463-470, 1975.
- POINAR, G. O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, Florida p. 23-60, 1990.
- RAHOO A. M. et al. Reproductive potential and host searching ability of entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 49, n. 1, p. 229-234, 2017.
- RESQUÍN-ROMERO, G. et al. Virulence of *Metarhizium brunneum* (Ascomycota:Hypocreales) Strains Against Stinkbugs *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 5, p. 2540–2545, 2020.
- RIDNER, E. **Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud**. Buenos Aires: Grupo Q S.A.: Sociedad Argentina de Nutrición. 2006. 96p. 1a ed.
- RITZ, C. et al. Dose-Response Analysis Using R. **Plos One**, 2015.
- ROGGIA, S. **Eficiência de inseticidas no controle do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) em soja, na safra 2013/14: resultados sumarizados de ensaios cooperativos**. Embrapa Soja, 2018. 22p. (Circular Técnica 137).

ROSA, J. M. O. et al. Avaliação da eficácia do nematoide entomopatogênico (*Steinernema carpocapsae*) no controle do percevejo castanho da raiz (*Scaptocoris castanea*) em solo. **IX Reunião Científica em Ciências Agrárias do Lageado**, p.1 [Apresentado na IX Reunião Científica em Ciências Agrárias do Lageado,2002, Botucatu-SP].

SALVADORI, J. D. **Caracterização da patogenicidade de NEPs e de bactérias associadas para o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; KOPPENHÖFER, A. M. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: **Entomopathogenic nematology**. CABI: Wallingford. p. 333–355, 2002.

SHAPIRO-ILAN D. I., MIZELL R. F. Laboratory virulence of entomopathogenic nematodes to two ornamental plant pests, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae) and *Stethobaris nemesis* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, v. 95, n. 4, p. 922-927, 2012.

SEARLE, S. R.; SPEED, F. M.; MILLIKEN, G. A. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. **Am Stat**, v. 34, 1980.

SEIXAS, C. D. S. **Tecnologias de Produção da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN 2176-2902; n. 17).

SOARES, et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Sci Rep**. v. 8, n. 2496, 2018.

SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **J Invertebr Pathol**. v. 69, p. 31-9, 1997.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDINI, F. (ed.). **Soja Manejo Integrado de Insetos e outros Ártropodes-Praga**. Embrapa. p. 673-723.

SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological Methods with Particular Reference to the Study of Insect Populations**. 524 p, 1978.

TOZLU, E. et al. Potentials of some entomopathogens against the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera: Pentatomidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 29, n. 1, p. 1-8, 2019.

TOUBARRO, D. et al. A pathogenic nematode targets recognition proteins to avoid insect defenses. **Plos One**. v. 8, e. 75691, 2013.

VAN NIEKERK, S.; MALAN A. P. Adjuvants to improve aerial control of the citrus mealybug *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) using entomopathogenic nematodes. **Cambridge University**, v. 89, n. 2, p. 189-195, 2013.

VOSS, M. I. Nematoides entomopatogênicos (Neps) como agentes de controle biológico de insetos. In: VOSS, M.; ANDALÓ, V.; JÚNIOR, A. S. N; NEGRISOLI, C. R. B.2009. (Eds). **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Embrapa, v. 199. (Documento EMBRAPA)

WEISER, J. Príspevek k znalosti cizopasníku kúrovce *Ips typographus*-II. **Vestník Československe Spolecnosti Zoologicke**. v. 19, n. 4, p. 374-380, 1955.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, 1927.

WILSON M. J., EHLERS R. U., GLAZER I. Entomopathogenic nematode foraging strategies—is *Steinernema carpocapsae* really an ambush forager? **Nematology**, v. 14. N. 4, p. 389-394, 2012.

WOOD, W. B. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1988.

YADAV A. K., LALRAMLIANA. Evaluation of the efficacy of three indigenous strains of entomopathogenic nematodes from Meghalaya, India against mustard sawfly, *Athalia lugens*

proxima Klug (Hymenoptera: Tenthredinidae). **Journal of parasitic diseases**, v. 36, n. 2, p. 175-180, 2012.

ZAMBIAZZI, E. V. et al. Controle biológico in-vitro do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.6, n.2. 47 p, 2012.

ZART M. et al. Performance of entomopathogenic nematodes on the mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) and the compatibility of control agents with nematodes. **Journal of Nematology**, v. 53, 2021.