

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Susceptibilidade diferencial de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) a espécies de *Metarhizium*: influência do feromônio de alarme no processo infeccioso

Aline Nunes da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2023

Aline Nunes da Silva
Bacharela em Ciências Biológicas

Susceptibilidade diferencial de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) a espécies de
Metarhizium: influência do feromônio de alarme no processo infectivo
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Aline Nunes da

Susceptibilidade diferencial de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) a espécies de *Metarhizium*: influência do feromônio de alarme no processo infectivo / Aline Nunes da Silva. - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2023.

105 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biodefensivo 2. Fungos entomopatogênicos 3. Microrganismos 4. Pentatomídeos I. Título

DEDICATÓRIA

À minha irmã **Cecília**, por despertar em mim a vontade de construir um mundo melhor. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação e oportunidade;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À equipe do SPARCBio (São Paulo Advanced Research Center for Biological Control) do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ/USP) pelo apoio e ensinamentos, especialmente à Dr. Camila Costa Moreira, Dr. Janaína Seibert e Dr. Marta Oliveira, e aos amigos que passaram por esse grupo e tornaram meus dias mais leves: Lucas Emídio, Letícia Montelatto, Maria Julia Sternberg, Vitor Cattai, Maria Letícia Minatel e Isabela Fetter;

À Koppert Biological Systems pelo auxílio durante o desenvolvimento do presente estudo;

Ao Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP) pelo espaço e ao Dr. Diego Magalhães pelo auxílio na condução dos experimentos;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP) e ao técnico Renato pelos ensinamentos;

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pelos momentos que passamos juntos e por todo o auxílio sempre que necessário, foi bom ter vocês: Rosceli Martins, Carla Marassatto, Daniela Milanez, Isabela Rocha, Giovana Maranhão, Rejayne Lima, Lilian Akemi, Jean Braga, Eric Breviglieri e especialmente Nathan Rodriguez e Thaís Berganton;

Aos meus amigos da vida que acompanharam minha jornada na Pós-Graduação e sempre me encorajaram a seguir meu caminho. Vocês são meu oásis nas piores fases;

Ao meu noivo André pelo apoio desde o início da minha vida acadêmica;

À minha família que é o meu motivo de acordar todos os dias e ir atrás do que acredito.

A criatura mais forte, mais poderosa e mais perigosa desta Terra é uma mulher que sabe pensar. Não há nada que ela não possa fazer.

King Richard – Criando Campeãs

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1. A cultura da soja no brasil.....	11
1.2. Percevejo-marrom-da-soja (<i>euschistus heros</i>) e seu controle.....	12
1.3. Diversidade de espécies de <i>Metarhizium</i> e sua exploração para o controle de insetos	14
1.4. Desenvolvimento de biopesticidas.....	15
1.5. Formulação: possível efeito sinérgico de adjuvantes na mortalidade de insetos.....	16
1.6. Composição da cutícula e degradação de hidrocarbonetos cuticulares	19
1.7. Resistência de percevejos a fungos entomopatogênicos.....	21
Referências.....	22
2. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Metarhizium</i> spp. para o controle de <i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae) VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE BIOPESTICIDA	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
2.1. Introdução	32
2.2. Material e Métodos	33
2.2.1. Criação de <i>Euschistus heros</i>	34
2.2.2. Isolados fúngicos e preparo de suspensões	34
2.2.3. Seleção de isolados: virulência à <i>Euschistus heros</i>	36
2.2.4. Seleção de isolados: produtividade de conídios.....	36
2.2.5. Ensaio de dose resposta com conídios	37
2.2.6. Ensaio <i>E. heros</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	37
2.2.7. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>E. heros</i> infectados com isolados de <i>Metarhizium</i>	38
2.2.8. Microscopia óptica de ovos de <i>E. heros</i> infectados com isolados de <i>Metarhizium</i>	38
2.2.9. Desempenho de diferentes adjuvantes na viabilidade fúngica.....	39
2.2.10. Análises estatísticas.....	41
2.3. Resultados	42
2.3.1. Seleção de isolados: virulência a <i>Euschistus heros</i>	42
2.3.2. Seleção de isolados: produtividade de conídios.....	45

2.3.3. Ensaio de dose resposta com conídios.....	47
2.3.4. Ensaio com <i>E. heros</i> em diferentes fases de desenvolvimento	47
2.3.5. Avaliação do efeito ovicida	50
2.3.6. Análise de microscopia óptica de ovos de <i>Euschistus heros</i> infectados por isolados de <i>Metarhizium</i>	52
2.3.7. Desempenho de diferentes adjuvantes na viabilidade fúngica	54
2.4. Discussão	58
Referências	63
3. INFLUÊNCIA DOS MECANISMOS DE DEFESA DE <i>Euschistus heros</i> (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) DURANTE O PROCESSO INFECTIVO DE ESPÉCIES DE <i>Metarhizium</i> SPP.	67
Resumo	67
Abstract.....	68
3.1. Introdução.....	69
3.2. Material e Métodos.....	70
3.2.1. Criação de <i>Euschistus heros</i>	70
3.2.2. Isolados fúngicos e preparo de suspensões.....	70
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>E. heros</i> infectados com isolados de <i>Metarhizium</i>	71
3.2.4. Extração e quantificação do feromônio de alarme de <i>E. heros</i>	72
3.2.5. Análises químicas do feromônio de alarme de <i>E. heros</i> por cromatografia gasosa.....	73
3.2.6. Extração dos hidrocarbonetos cuticulares de <i>E. heros</i>	73
3.2.7. Análises químicas dos hidrocarbonetos cuticulares de <i>E. heros</i> por cromatografia gasosa	74
3.2.8. Avaliação da germinação de conídios expostos a diferentes concentrações de tridecano, (<i>E</i>)-2-hexenal e (<i>E</i>)-2-octenal	74
3.2.9. Avaliação in vitro do crescimento fúngico quando exposto a diferentes concentrações de tridecano, (<i>E</i>)-2-hexenal e (<i>E</i>)-2-octenal.....	75
3.2.10. Análises estatísticas	76
3.3. Resultados.....	76
3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>E. heros</i> infectados com isolados de <i>Metarhizium</i>	76
3.3.2. Extração de voláteis de adultos de <i>E. heros</i> infectados com isolados de <i>Metarhizium</i>	83

3.3.3. Extração e identificação dos hidrocarbonetos cuticulares de <i>E. heros</i>	86
3.3.4. Avaliação da germinação de conídios quando expostos a diferentes concentrações de tridecano, (<i>E</i>)-2-hexenal e (<i>E</i>)-2-octenal.....	89
3.3.5. Avaliação in vitro do crescimento fúngico quando exposto a diferentes concentrações de tridecano, (<i>E</i>)-2-hexenal e (<i>E</i>)-2-octenal	94
3.4. Discussão	96
Referências.....	101
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105

RESUMO

Susceptibilidade diferencial de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) a espécies de *Metarhizium*: influência do feromônio de alarme no processo infectivo

A falta de ferramentas sustentáveis para o controle de insetos-praga torna o controle microbiano uma alternativa promissora. Entretanto, alguns insetos desafiam essa abordagem por apresentar baixa susceptibilidade. Para os pentatomídeos essa tem sido associada à emissão de compostos voláteis que prejudicam o desenvolvimento fúngico. Buscando desenvolver um biopesticida para controle de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), a virulência de cinco espécies do gênero *Metarhizium* foi avaliada e a interação complexa entre fungos entomopatogênicos e pentatomídeos foi explorada para elucidar aspectos relacionados a efetividade das infecções fúngicas. Para o primeiro capítulo destaca-se: (i) Os parâmetros de susceptibilidade de adultos ($\approx 100\%$) e rendimento da fermentação sólida de conídios ($> 1,5 \times 10^9$ conídios/g) resultaram na seleção dos isolados ESALQ 3364 e ESALQ 4395; (ii) Na avaliação da mortalidade de ninfas ($< 70\%$) foi observada a ausência do padrão idade-dependência; (iii) A partir da realização de bioensaios *in vitro* e análises de microscopia óptica foi determinado pela primeira vez o efeito ovicida de *M. pingshaense* para a espécie *E. heros*; (iv) Na concentração letal mediana para adultos (CL_{50}) ambos os isolados apresentaram o mesmo valor ($5,1 \times 10^5$ conídios/mL); (v) Foram desenvolvidas dois tipos de formulação, sendo que as em pó (pó-molhável) tiveram melhor estabilidade que as oleosas (óleo dispersível). Em seguida, no capítulo dois: (i) A partir de análises de microscopia eletrônica de varredura constatou-se que a adesão e germinação de conídios não são afetadas pela emissão dos compostos voláteis pela glândula metatorácica (MTG), bem como os isolados de *M. pingshaense* apresentaram tubos germinativos maiores em relação ao isolado controle (ESALQ E9); (ii) Por técnicas CG-EM e CG-DIC determinou-se que a emissão de voláteis não foi influenciada por diferentes espécies fúngicas, e os compostos majoritários foram: (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, 4-oxo-(*E*)-hexenal e tridecano; (iii) De forma semelhante, o padrão quantitativo de hidrocarbonetos cuticulares não diferiu entre insetos infectados com diferentes espécies de *Metarhizium* e estes majoritariamente foram classificados como *n*-alcanos; (iv) Na avaliação *in vitro* do efeito de diferentes concentrações dos compostos sintéticos do feromônio de alarme, a concentração que mimetiza a emissão natural ($10 \mu\text{g/mL}$) não afetou a germinação e o crescimento fúngico, com destaque para o tratamento de mistura de compostos (blend) que estimulou a germinação do isolado ESALQ 4395. Esses resultados contradizem o já documentado efeito deletério dos compostos voláteis emitidos por *E. heros* sob o desenvolvimento fúngico, uma vez que *M. pingshaense* foi estimulado pela ação sinérgica do blend em concentrações próximas a emissão natural. A identificação desse padrão pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na relação inseto-patógeno, auxiliando no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle biológico.

Palavras-chave: Biodefensivo, Fungos entomopatogênicos, Microrganismos, Pentatomídeos, Feromônio de alarme

ABSTRACT

Differential susceptibility of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) to *Metarhizium* species: influence of the alarm pheromone on the infective process

The lack of sustainable tools for insect pest control makes microbial control a promising alternative. However, some insects challenge this approach by showing low susceptibility. For stink bugs, this has been associated with the emission of volatile compounds that hinder fungal development. Seeking to develop a biopesticide for controlling *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), the virulence of five species from the genus *Metarhizium* was evaluated, and the complex interaction between entomopathogenic fungi and stink bugs was explored to elucidate aspects related to the effectiveness of fungal infections. In the first chapter, the following highlights were observed: (i) The susceptibility parameters of adults ($\approx 100\%$) and the solid fermentation yield of conidia ($>1.5 \times 10^9$ conidia/g) resulted in the selection of isolates ESALQ 3364 and ESALQ 4395 ; (ii) When evaluating nymph mortality ($<70\%$), the absence of an age-dependent pattern was observed; (iii) The ovicidal effect of *M. pingshaense* for the species *E. heros* was determined for the first time through in vitro bioassays and optical microscopy analyses; (iv) Both isolates presented the same median lethal concentration for adults (LC_{50}) with a value of 5.1×10^5 conidia/mL; (v) Two types of formulations were developed, where the powdered ones (wettable powder) was more stable than the oil-based ones (oil dispersible). Moving on to chapter two: (i) Scanning electron microscopy analyzes revealed that the adhesion and germination of conidia are not affected by the emission of volatile compounds from the metathoracic gland (MTG), and the isolates of *M. pingshaense* showed larger germ tubes compared to the control isolate (ESALQ E9); (ii) By using GC-MS and GC-FID techniques, it was determined that the emission of volatiles was not influenced by different fungal species, and the major compounds were (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, 4-oxo-(*E*)-hexenal, and tridecane; (iii) Similarly, the quantitative pattern of cuticular hydrocarbons did not differ between insects infected with different *Metarhizium* species, and these were predominantly classified as *n*-alkanes; (iv) In the in vitro evaluation of the effect of different concentrations of synthetic compounds of the alarm pheromone, the concentration that mimics natural emission ($10 \mu\text{g/mL}$) did not affect fungal germination and growth, with a noteworthy finding that the blend treatment stimulated the germination of isolate ESALQ 4395. These results contradict the deleterious effect of volatile compounds emitted by *E. heros*, as *M. pingshaense* was stimulated by the synergistic action of the blend at concentrations close to natural emission. Understanding this pattern may contribute to the comprehension of action mechanisms in the insect-pathogen relationship, assisting in developing more effective strategies for biological control.

Keywords: Biodefensive, Entomopathogenic fungi, Microorganisms, Stink bugs, Alarm pheromone

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A cultura da soja no Brasil

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da Ásia e acredita-se que a sua disseminação ocorreu por meio de navegações. No Brasil, o primeiro relato sobre o cultivo dessa oleaginosa ocorreu no ano de 1882 no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em seguida, foi levada por imigrantes japoneses para São Paulo, e em 1914 foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, lugar onde mais tarde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor viriam a se adaptar (BONETTI, 1981). Anos depois, na década de 80, a partir dos avanços científicos e da disponibilização ao setor produtivo de tecnologias como a criação de cultivares resistentes, a implantação do cultivo da soja no Centro-Oeste (principalmente Goiás e Mato Grosso) possibilitou o desenvolvimento de regiões do Cerrado que, até então, eram pouco exploradas (FREITAS, 2011).

Atualmente, a soja é uma das culturas mais importantes para a economia mundial, isso porque seus grãos são usados em diversos setores. O Brasil destaca-se como o maior produtor e exportador desta *commodity* e para dimensionar o protagonismo produtivo do país, é possível recordar que, na safra 2010/11 a CONAB previu um recorde na produção de soja, onde seria possível atingir mais de 70 milhões de toneladas (CONAB, 2010), e VENCATO e colaboradores (2010) previam um salto produtivo que alcançaria os 40% até 2020. Superando o projetado 10 anos antes, a safra 2019/20 atingiu 120 milhões de toneladas (CONAB, 2020), e o esperado para 2022/23 é 153 milhões de toneladas (CONAB, 2023), reafirmando a expansão massiva da cultura no país.

Embora a produção tenha aumentado significativamente nos últimos anos, a demanda também tende a aumentar devido ao crescimento populacional (ZHANG et al., 2021). Por esse motivo, é essencial que estratégias que visem ampliar a produtividade de forma sustentável, através de custos reduzidos e baixo impacto ambiental sejam consideradas. Além do aumento de produção, torna-se importante destacar que a ocorrência de pragas e doenças são alguns dos fatores que impedem a maximização ou o total aproveitamento da produção, uma vez que, vários insetos e patógenos podem prejudicar a cultura, com ataques que vão desde a emergência das plântulas até a colheita (McFADYEN, 1998; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; SOSA-GÓMEZ et al., 2006; O'BRIEN, 2017).

Atualmente, as principais pragas da sojicultura dividem-se entre lagartas como as do complexo *Spodoptera*, além das falsas-medideiras *Rachiplusia nu* (Guenée) ou *Chrysodeixis*

includens (Walker, 1858) (ÁVILA, 2023) e percevejos fitófagos, sendo o principal, o percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros* (Fabr.,1798). Para o controle, além do tratamento convencional com inseticidas químicos é possível explorar mais opções para as lagartas. A essas pragas a utilização de plantas que expressam proteínas *Bt* tornaram-se uma das principais técnicas de controle (OMOTO et al., 2016), da mesma forma que o Baculovírus tem sido reconhecido como uma alternativa ambientalmente segura (BARRETO et al., 2005), e o uso de parasitoides tem atingido resultados positivos (MELO, 2022). Além destes, o fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S. A. Rehner & Humber tornou-se também uma alternativa viável por ser um patógeno altamente especializado em lepidópteros (DEVI & PRASAD, 2001).

Apesar do controle de lagartas que atacam a cultura da soja apresentar diferentes opções, quando o foco são os percevejos é importante salientar que os produtos sintéticos ainda são, em geral, a principal medida de defesa utilizada. Isso ocorre porque praticamente não existem biodefensivos para a praga em questão, tendo sido empregado com sucesso até o momento, apenas a utilização de macrorganismos.

1.2. Percevejo-marrom-da-soja (*Euschistus heros*) e seu controle

Nos últimos anos, devido a uma alteração na pentatofauna da sojicultura, o percevejo-marrom-da-soja que já foi considerado uma espécie rara na década de 70, tem se destacado por sua abundância e predominância nas principais regiões agrícolas do país, especialmente na região Centro-Oeste, onde seu desenvolvimento é favorecido devido às temperaturas elevadas (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; PANIZZI & LUCINI, 2016).

Esse inseto quando adulto apresenta coloração marrom por todo o corpo, com dois prolongamentos laterais no pronoto em forma de espinhos e uma meia lua branca ao final do escutelo (SOSA-GÓMEZ, 2010; PANIZZI et al., 2012). As ninfas neonatas apresentam coloração marrom ou cinza e permanecem em cima dos ovos até o segundo ínstar, quando iniciam a alimentação (DEGRANDE & VIVAN, 2006; SOSA-GÓMEZ, 2010). As fêmeas ovipositam massas de 5 a 7 ovos amarelados, e os adultos possuem longevidade média de 116 dias. Apesar de a espécie usar a soja como hospedeiro principal, no período entressafra pode se alimentar em hospedeiros alternativos, até que entre em diapausa (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; SOSA-GÓMEZ., 2010; PANIZZI et al., 2012).

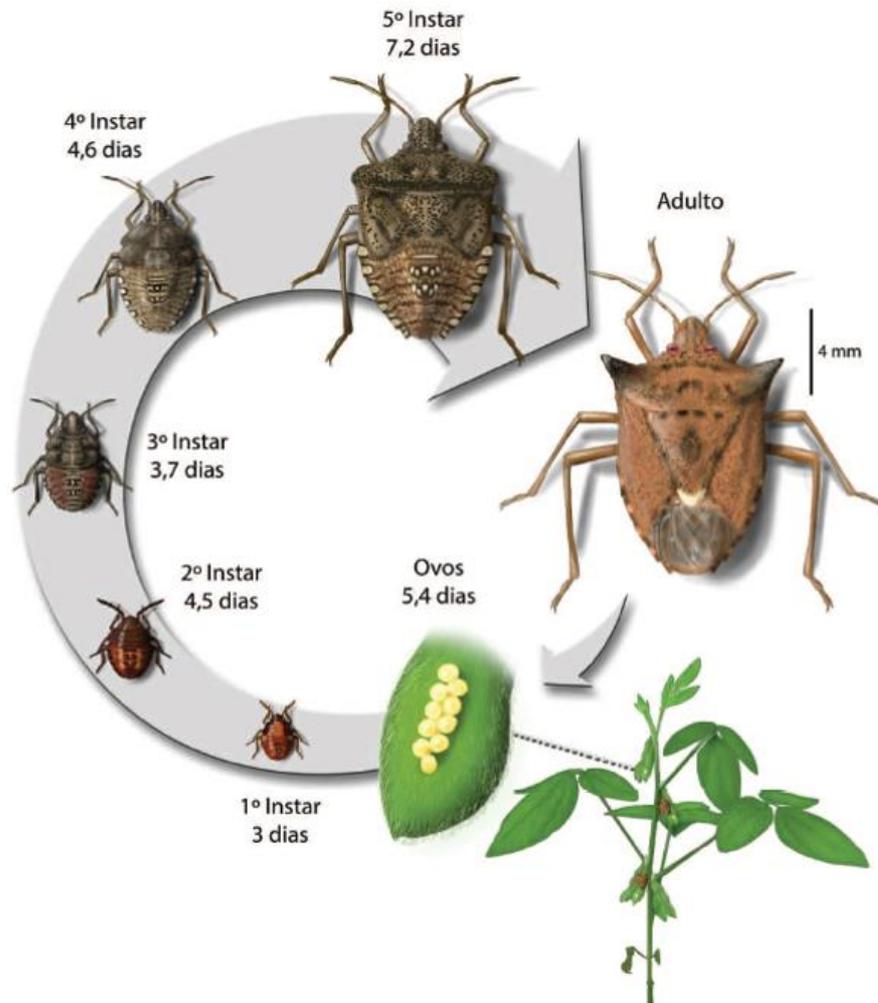


Figura 1. Ciclo de vida de *Euschistus heros*. Fonte: HOFFMANN-CAMPO; CORRÊA-FERREIRA; MOSCARDI (2012).

Os percevejos fitófagos surgem no início da fase reprodutiva da cultura, e podem ocasionar danos em diversas partes da planta, porém as sementes e frutos são os locais preferidos de alimentação (PANIZZZI, 2000). Os danos causados por *E. heros* são mais graves quando se concentram nas vagens, podendo ocasionar perdas de até 30%, principalmente quando atacadas ainda na fase de formação. Os sintomas oriundos desse ataque caracterizam-se por deformação, murchamento e manchas nos grãos, que podem perder o valor comercial por apresentarem teor de óleo reduzido. Tendo em conta que os percevejos têm o potencial de causar danos irreversíveis à cultura, conforme mencionado no tópico anterior o controle dessa praga tem sido feito principalmente com inseticidas químicos (SOMAVILLA et al., 2019), entretanto, casos de resistência vêm sendo reportados desde os anos 90.

De acordo com SOSA-GÓMEZ & OMOTO (2012), de 1960 até aproximadamente 2010, os inseticidas mais utilizados para o controle de percevejos pertenciam ao grupo dos organofosforados. Entretanto, esses produtos foram banidos em diversas partes do mundo,

devido aos efeitos adversos que provocavam no ambiente. Atualmente os ingredientes ativos mais utilizados para o controle de percevejos são piretroides e neonicotinoides (AGROFIT, 2023), e a falta de novas moléculas faz com que os produtos disponíveis possuam modo de ação muito parecido, de forma que aplicações sucessivas têm favorecido a evolução de resistência em diversas localidades (SOSA-GÓMEZ & OMOTO, 2012).

Além da seleção de populações de insetos resistentes, o controle químico apresenta toxicidade a inimigos naturais e insetos benéficos e, a longo prazo, é responsável por severos danos ambientais, que resultam na degradação dos recursos naturais (RUEGG et al., 1991). Tendo em vista esses problemas e considerando a crescente pressão do mercado por alimentos livres de resíduos químicos, o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle para essa e outras espécies passou a ser explorado.

1.3. Diversidade de espécies de *Metarhizium* e sua exploração para o controle de insetos

Dentre as diferentes espécies de fungos entomopatogênicos que podem ser exploradas para o controle biológico, o gênero *Metarhizium* (Sorokin, 1879) pertencente à ordem Hypocreales e a família Clavicipitaceae, é composto hoje por aproximadamente 34 espécies (MONGKOLSAMRIT et al., 2020). Inicialmente, o gênero foi revisado por TULLOCH (1976) e reduzido a apenas: *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, de forma que muitas espécies eram atribuídas e tidas como sinônimos das supracitadas (PETCH, 1931; PETCH 1934; GUO et al., 1986; ROMBACH et al.; 1986, 1987; SHIMAZU, 1989).

A partir dos anos 2000 baseando-se em caracteres moleculares, essas duas únicas espécies agora são consideradas um complexo de espécies distintas. Dentro do complexo *M. anisopliae*, atualmente encontram-se as espécies: *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. pingshaense*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. lepidotiae*, *M. acridum*, *M. globosum* (BISCHOFF et al., 2009), *M. indigoticum* (KEPLER et al., 2014), *M. kalasinense* (LUANGSA-ARD et al., 2017), *M. alvesii* (LOPES et al., 2018), *M. baoshanense* (CHEN et al, 2018), e mais recentemente *M. humberi*, uma espécie muito comum nos solos brasileiros que foi adicionada ao complexo por LUZ e colaboradores (2019), além de *M. brachyspermum* (YAMAMOTO; OHMAE; ORIHARA, 2020).

Em relação ao complexo *M. flavoviride* as espécies constituintes são: *M. flavoviride* (GAMS & ROZSYPAL, 1973), *M. frigidum* (BISCHOFF et al., 2006), *M. minus* (SHUNG et al., 2007), *M. pemphigi* (KEPLER et al., 2014), *M. blattodeae* (MONTALVA et al., 2016), *M.*

gaoligongense (CHEN et al., 2018), *M. argentinense* (GUTIERREZ et al., 2019), *M. bibionidarum*, *M. biotecense*, *M. culicidarum*, *M. koreanum*, *M. fusoidium* e *M. nornoi* (MONGKOLSAMRIT et al., 2020).

Além da diversidade de espécies, o gênero *Metarhizium* apresenta uma grande variabilidade intraespecífica (CASTRO et al., 2016; MOREIRA, 2016; IWANICKI et al., 2019; BOTELHO, et al., 2019) e alta plasticidade genética (HU et al., 2014). Entretanto, apesar da diversidade, poucas espécies e isolados desse gênero são explorados como inseticidas microbianos (MASCARIN et al., 2019), sendo que no Brasil a grande maioria dos produtos possuem apenas isolados da espécie *M. anisopliae* como ingrediente ativo. Diversos estudos já comprovaram o potencial de diferentes espécies de *Metarhizium* para pragas como a cigarrinha-do-milho (IWANICKI et al., 2020), o carrapato-do-boi (MARCIANO et al., 2021), mosquitos (BILGO et al., 2018), entre outros. Para pentatomídeos no geral, *Metarhizium anisopliae* vem sendo avaliado quanto ao seu potencial de controle para espécies como *Tibraca limbativentris* (Stal, 1860) (SILVA et al., 2015) ou *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (SOSA-GÓMEZ et al. 1997), já para *Euschistus heros*, além de muitos estudos com *M. anisopliae*, RESQUIN-ROMERO e colaboradores (2020) testaram isolados de *M. brunneum* e a espécie apresentou bom desempenho, no entanto, uma vez que a aplicação foi por imersão, não se sabe se a espécie realmente seria viável para aplicação em campo. Dessa forma, é necessário continuar com exploração das espécies de *Metarhizium* para que seja possível revelar o seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos microbianos.

1.4. Desenvolvimento de biopesticidas

Para espécies do gênero *Metarhizium* ou não, os fatores bióticos e abióticos são capazes de influenciar fortemente a capacidade do microrganismo em causar altos níveis de infecção nas condições de campo (ALVES, 1998). Dessa forma, um bom conhecimento desses fatores pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para otimizar o impacto do isolado em populações de insetos-praga (INGLIS et al., 2001). Para além desses fatores, a variabilidade genética existente entre as populações microbianas é muito grande, de forma que, características como a virulência e a persistência no ambiente podem ser expressadas a partir de diferentes níveis para microrganismos da mesma espécie (GOETTEL; ELIENBERG; GLARE, 2010). Nesse sentido, uma vez que a obtenção de bons resultados no controle microbiano é extremamente dependente da qualidade do processo de seleção do organismo (FRAVEL, 2005), estudos de seleção de isolados e de desenvolvimento de formulações são

peças-chaves para a obtenção de biopesticidas que sejam altamente efetivos em condições de campo.

O processo de seleção deve avaliar a capacidade de penetração no hospedeiro, a patogenicidade, que se caracteriza pela capacidade do microrganismo em provocar doença naquela determinada espécie e a virulência, que corresponde a agressividade na qual a doença se manifesta (ALVES, LECUNA, 1998; SHAPIRO-ILAN et al., 2005; VEGA et al., 2009). Além disso, para selecionar isolados com potencial comercial é necessário avaliar a capacidade de produção em massa dos propágulos infectivos de forma econômica. Assim como para garantir o sucesso dos microrganismos em campo, é preciso considerar a ação de alguns fatores abióticos que podem inviabilizar os fungos entomopatogênicos, como a radiação UV, a temperatura e a umidade (JARONSKI, 2010).

Por esse motivo, durante o processo de desenvolvimento de um produto comercial, é crucial que a formulação busque proteger os propágulos da ação desses e outros aspectos indesejáveis (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010), de forma a manter as características de eficácia durante o desenvolvimento e armazenamento (JACKSON, 1997), além de considerar se haverá compatibilidade com as tecnologias de aplicação e se ocorrerá persistência do microrganismo no ambiente.

Por fim, para o desenvolvimento de um biopesticida busca-se: um isolado que possua características específicas de pureza e virulência, abundância em esporos que permita economia na produção, viabilidade após longo período de *shelf-life*, facilidade no transporte e na aplicação e, além da comprovada eficiência no controle da praga-alvo.

1.5. Formulação: possível efeito sinérgico de adjuvantes na mortalidade de insetos

A partir da seleção de uma cepa de interesse, a necessidade de adicionar os entomopatógenos a formulações surge quando se deseja utilizá-lo em condições de campo, e embora esses microrganismos possam ser aplicados puros, essas condições não garantem proteção, distribuição e cobertura homogêneas (ALVES, 1998). Nesse sentido, o desenvolvimento de uma formulação torna-se crucial para transformar microrganismos que apresentam potencial contra determinados insetos-alvo, em produtos comerciais que apresentem efetividade em campo (BURGES, 1998). O processo de formular compreende a adição de componentes funcionais ao princípio ativo, que melhorarão seu desempenho em campo, facilitando seu manuseio e aplicação e permitindo seu armazenamento com uma perda mínima de qualidade (ALVES, 1998). Os primeiros inseticidas microbianos foram

formulados como pós secos e molháveis. Nestes casos, eram armazenados a seco até o momento da utilização e os inertes impediam a aglomeração dos esporos durante a estocagem (LUTHY et al., 1982). Embora novas tecnologias estejam disponíveis, as formulações comumente utilizadas estão separadas entre formulações sólidas e líquidas. As formulações sólidas, podem ser pós secos ou molháveis. Os pós secos consistem em uma mistura mecânica do princípio ativo com compostos minerais inertes, enquanto os pós molháveis diferem dos secos por possuírem surfactantes e adjuvantes que quando diluídos em água produzem uma suspensão estável (ALVES, 1998).

Por outro lado, as formulações granulares são também uma alternativa e consistem em preparações de baixa concentração de ingrediente ativo em conjunto com o diluente e vários agentes ligantes. Essas formulações podem ser a base de grânulos de micélio de fungos (AGUDELO & FALCON, 1983), grânulos de microescleródios ou blastosporos (MARCIANO et al., 2021). De forma complementar, grânulos com amido pré-gelatinizado podem ser uma alternativa para garantir nutrientes ao fungo, quando colocado em condições ideais de umidade (PEREIRA & ROBERTS, 1991) e os grânulos com alginato de sódio podem oferecer a vantagem de encapsular o patógeno junto a algum material que seja benéfico para seu armazenamento ou crescimento (ALVES, 1998).

Em relação a encapsulação, formulações com essa tecnologia tem sido uma alternativa promissora, uma vez que, visam a persistência do entomopatógeno no campo a partir do revestimento do mesmo por algum material. YAAKOV e colaboradores (2018) realizaram o encapsulamento bem-sucedido de conídios de *Metarhizium brunneum* a partir de emulsões pickering com nanopartículas de sílica. Da mesma forma, outra opção entre as formulações sólidas, são as formulações em iscas contendo propágulos dos entomopatógenos. ALVES (1998) pontua que a preparação pode ser feita a partir de um agente colante e a suspensão fúngica para ser pulverizada em algum substrato que tenha efeito atraente para os insetos-alvo.

Para o caso das formulações líquidas, estas podem ser a base de água ou óleo e alguns autores relataram que as formulações oleosas podem apresentar algumas vantagens como oferecer proteção aos esporos contra radiação UV (MOORE & PRIOR, 1993), fornecer condições melhores para o funcionamento da enzima trealose, encontrada em diversos microorganismos e capaz de aumentar a resistência do fungo frente a estresses, como altas temperaturas (LIU et al., 2009), ou causar efeito sinérgico sobre a patogenicidade do fungo (LATIFIAN, 2018). Já entre as formulações a base de água, os concentrados emulsionáveis,

onde o princípio ativo é diluído em solventes orgânicos com a adição de emulsificantes podem ser uma opção (GODOY, 1990).

Uma vez que as formulações podem proteger os propágulos de diferentes características adversas e, em algumas ocasiões até potencializar o efeito do ingrediente ativo a partir do efeito sinérgico, para o presente estudo seria interessante que a formulação estivesse associada a compostos capazes de proteger os conídios fúngicos da ação dos voláteis do feromônio de alarme de *E. heros*, já que esses compostos vêm sendo apontados por diferentes autores como os responsáveis pela baixa eficácia do controle microbiano para a espécie em questão (SOSA-GÓMEZ et al., 1997; QUINTELA et al., 2013; LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2015; ULRICH et al., 2015).

No geral, argilas com efeito abrasivo (ALVES, 1998) e/ou de absorção (HELVEY, 1952) têm sido apontadas como inertes capazes de garantir efeito sinérgico, uma vez que a partir da degradação da camada cerosa da cutícula dos insetos estes tornam-se mais suscetíveis à penetração do fungo entomopatogênico. Da mesma forma, diversos óleos podem ser utilizados e para o percevejo-marrom-da-soja COSSOLIN e colaboradores (2019), afirmam que o óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) além de apresentar toxicidade contra a espécie, foi capaz de causar alterações no tecido adiposo do inseto, causando diminuição das reservas de glicogênio e lipídios, sugerindo que essas moléculas de reserva de energia podem ter sido utilizadas na tentativa de desintoxicação. Sabendo que os voláteis podem ser produtos da degradação lipídica, uma vez que seria possível utilizar essa reserva energética para a síntese dos compostos, a diminuição causada por um ingrediente da formulação poderia auxiliar os propágulos fúngicos a combatê-los.

Apesar das possibilidades, ainda é necessário compreender a real influência dos voláteis e outros compostos como os hidrocarbonetos cuticulares no processo de infecção de *Euschistus heros*, para então determinar que tipo de tecnologia e formulação poderia conferir aos isolados fúngicos maior eficiência para o controle desses insetos em campo.

Além disso, se tratando de produtos biológicos, a etapa da formulação pode ser um desafio, visto que, a grande maioria das tecnologias desenvolvidas são direcionadas para ingredientes ativos de natureza química, o que exige adaptações para torná-las adequadas considerando as necessidades dos agentes de controle microbiano (ALVES, 1998). Entretanto, apesar da dificuldade o Brasil tem adequado suas necessidades e os avanços tecnológicos na área de biopesticidas têm possibilitado o registro de muitos produtos que alcançaram um padrão de eficiência satisfatório em campo.

1.6. Composição da cutícula e degradação de hidrocarbonetos cuticulares

Inicialmente, a possibilidade de cruzar a cutícula dos insetos teve um grande impacto para a evolução dos fungos entomopatogênicos, e este tem sido um testemunho do papel crítico que a cutícula desempenha para a proteção dos insetos contra a infecção por patógenos (LU & St. LEGER, 2016). A cutícula e a membrana peritrófica dos insetos constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos (LEVY et al., 2009), e uma vez que, os fungos entomopatogênicos infectam os insetos via tegumento, a defesa cuticular exerce um papel extremamente importante. A cutícula por possuir uma estrutura altamente heterogênea, varia muito em composição principalmente durante os estágios da vida do inseto. No geral, a epicutícula é a camada mais externa e fornece uma barreira hidrofóbica rica em lipídios. A procutícula vem logo depois e é composta por quitina e proteínas esclerotizadas, sendo este normalmente dividido entre: camadas exocuticulares, mesocuticulares e endocuticulares (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI, 2013).

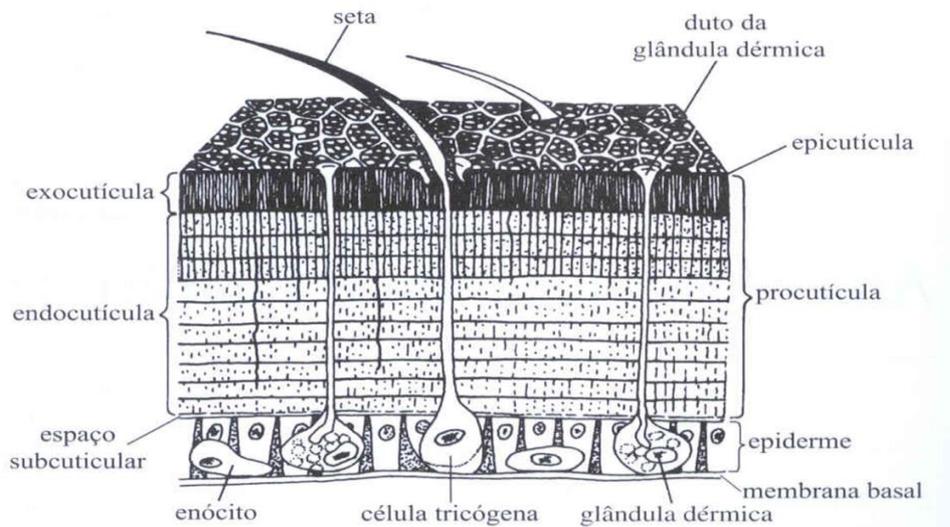


Figura 2. Estrutura geral do tegumento dos insetos. Fonte: CHAPMAN, 1998.

Na camada rica em lipídios é possível encontrar tanto lipídios estruturais como livres. Os estruturais são lipoproteínas e os lipídios livres são principalmente compostos alifáticos polares e apolares, que podem variar entre as espécies e incluem ácidos graxos, álcoois, ésteres, glicerídeos, esteróis, cetonas e uma alta porcentagem de hidrocarbonetos (LOCKEY, 1988; NELSON & BLOMQUIST, 1995). Os hidrocarbonetos cuticulares estão presentes em grandes quantidades na cutícula e podem ser: lineares, ramificados, saturados ou

insaturados, e sua principal função é proteger o inseto contra a dessecação e a entrada de patógenos (HOWARD & BLOMQUIST, 2005).

Evidenciada a importância dos componentes cuticulares para a sobrevivência dos insetos, é necessário reconhecer que a coevolução tem sido o recurso por trás da corrida armamentista entre insetos e fungos entomopatogênicos. Assim como os insetos aprimoraram suas defesas ao longo do processo evolutivo, os patógenos puderam desenvolver estruturas e mecanismos capazes de ultrapassar e até mesmo degradar a camada epicuticular de seus hospedeiros (NAPOLITANO & JUÁREZ, 1997). Essa degradação ocorre por meio da interação hidrofóbica e causa alterações no tegumento do inseto que permitem que o fungo seja nutrido e amplie seu poder germinativo a partir da assimilação dessas substâncias (ALVES, 1998).

De acordo com PEDRINI e colaboradores (2013), é provável que algumas espécies de fungos entomopatogênicos não apenas reconheçam e assimilem hidrocarbonetos específicos dos seus hospedeiros, como também sejam capazes de alterar o perfil cuticular dos mesmos, após a degradação de alguns compostos (PEDRINI et al., 2013). Fato que pode ser confirmado pelos resultados obtidos por ALMEIDA (2020), onde a superfície cuticular de abelhas expostas a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 apresentaram menos hidrocarbonetos do que aquelas não-expostas.

A redução de hidrocarbonetos se dá pela atividade enzimática que os fungos entomopatogênicos apresentam e que é fundamental no processo de infecção do hospedeiro (BOUCIAS et al., 2000; NUNES et al., 2010). Porém, esta atividade pode variar entre as diferentes linhagens do microrganismo, de forma que alguns apresentam maior potencial para o controle de diferentes pragas-alvo do que outros. De acordo com PEDRINI e colaboradores (2007; 2013), a virulência está relacionada, entre outras coisas, com a habilidade do fungo entomopatogênico em degradar os hidrocarbonetos cuticulares do inseto.

Em contrapartida, apesar de a capacidade de degradação de hidrocarbonetos estar associada à virulência dos microrganismos (PEDRINI et al., 2007; 2013), a degradação de lipídios, por mais que também se relacione à virulência, tem sido associada a formação de aldeídos voláteis (RODARTE, 2008). Uma vez que a presença de alguns compostos voláteis têm sido correlacionada com a baixa eficiência de fungos entomopatogênicos em pentatomídeos (SOSA-GÓMEZ et al., 1997; BORGES et al., 1992, 1993; LOPES et al., 2015), é necessário que os esforços se concentrem em tentar desvendar a real interação entre os mesmos.

1.7. Resistência de percevejos a fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos tornaram-se uma opção de controle vantajosa, principalmente para os insetos sugadores por possuírem ação por contato, via penetração direta do tegumento (LACEY & GOETTEL, 1995). Embora os fungos apresentem essa vantagem e já estejam sendo explorados comercialmente visando o controle de diversos insetos, incluindo algumas espécies de heterópteros, nenhum dos produtos, até o momento, apresenta grande efetividade no controle de pentatomídeos (FARIA & WRAIGHT, 2007). Acredita-se que isso se deve ao fato desses insetos apresentarem certa resistência a infecções causadas por fungos entomopatogênicos.

Essa resistência pode ser observada na maioria dos insetos e é iniciada a partir do contato com a cutícula, que é a principal proteção física contra infecções (SOSA-GÓMEZ et al., 1997). Além da cutícula, os pentatomídeos apresentam uma proteção extra de natureza química, relacionada a sua capacidade de expelir um cheiro desagradável frente a alguma perturbação. Esse odor característico é produzido pela liberação de voláteis, que tem função de feromônio de alarme ou defesa (MORAES et al., 2008), e são produzidos e armazenados por ninfas nas glândulas abdominais dorsais (DGAs) e adultos nas glândulas metatorácicas (MTG) (ALDRICH, 1988).

Estudos que avaliaram a composição dos voláteis das espécies de percevejos identificaram os aldeídos (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-decenal e (*E*)-2-hexenal como compostos majoritários (MORAES et al., 2008). Esses compostos já foram relatados como voláteis de defesa contra microorganismos por GILBY & WATERHOUSE (1967), e outros estudos vêm sendo realizados para compreender a produção desses compostos na defesa contra patógenos e predadores. TIMONIN (1961a, 1961b) relatou que os voláteis de percevejos da família Cydnidae eram repelentes à formigas e nematóides do solo, além de apresentarem ação fungicida ou fungistática para 15 espécies de fungos. REMOLD (1963) descreveu os voláteis dos pentatomídeos como venenos capazes de paralisar formigas e outras espécies de insetos.

Já os estudos realizados por BORGES et al. (1993), SOSA-GÓMEZ et al. (1997), SILVA et al. (2015) e LOPES et al. (2015) buscando avaliar a interação dos compostos com os fungos entomopatogênicos, observaram o efeito fungicida e/ou fungistático dos voláteis em *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Por outro lado, embora alguns resultados anteriores reforcem a ideia sobre a ineficiência do controle microbiano para pentatomídeos, outros estudos como os de GROTH (2017) alcançaram taxas de controle satisfatórias ao utilizar fungos entomopatogênicos. Em síntese, os estudos têm avaliado o efeito dos voláteis sob a

germinação dos conídios fúngicos em testes *in vitro*, de forma que muito ainda precisa ser esclarecido sobre como esses voláteis influenciam a germinação diretamente no tegumento desses insetos, a fim de compreender a real interação entre esses componentes.

Diante do exposto, o primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo selecionar um isolado de *Metarhizium* eficiente para o controle de *E. heros*, além de avaliar diferentes parâmetros relacionados ao desenvolvimento de um produto comercial para o controle da espécie. Já no segundo capítulo, o intuito principal foi compreender se os voláteis do feromônio de alarme são fatores limitantes para a adesão e germinação de conídios, além de avaliar outras características relacionadas à interação desses compostos com o processo infectivo.

Referências

- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: Fev. 2023.
- AGUDELO, F. & FALCON, L. A. Mass production, infectivity, and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42: 124-132p, 1983.
- ALDRICH, J. R. Chemical ecology of the *Heteroptera*. *Ann. Rev. Entomol.* 33: 211-238, 1988.
- ALMEIDA, F. C. R. Efeito do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no reconhecimento de companheiras de ninho da abelha *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). Dissertação/Mestrado, Piracicaba, 2020.
- ALMEIDA, J. E. M. & BATISTA-FILHO, A. A indústria do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: X Simpósio de Controle Biológico, 2007, Brasília – DF. Resumos... Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/SEB, 2007.
- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed, vol. 4. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ALVES, S. B., LECUNA, R. E. Epizootologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2ª edição ed. Piracicaba: FEALQ, p. 97–163, 1998.
- ÁVILA, C. J. Ocorrência da *Rachiplusia nu* em soja *Bt* em Mato Grosso do Sul. Nota técnica: Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados – Mato Grosso do Sul, 2023.
- BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of Baculovirus spodoptera isolates in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization By RAPD. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 1, p. 067 - 075, 2005.
- BILGO, E.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. SANON, A.; DABIRÉ, R. K. & DIABATÉ, A. Native entomopathogenic *Metarhizium* spp. from Burkina Faso and their virulence against the malária vector *Anopheles coluzzii* and non-targeted insects. *Parasites & Vectors*. 11, 209, 2018.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. & HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512-530, 2009.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, p.1- 18, 2000.

- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo : origem, história e distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas : ITAL, p. 1-6, 1981.
- BORGES, M. & ALDRICH, J.R. *Experientia*. 48: 893-896, 1992.
- BORGES, M.; LEAL, S. C. M.; TIGANO-MILANI, M. S. & VALADARES, M. C. C. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara Viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *An. Soc. Entomol. Bras.* 22: 505-512, 1993.
- BOTELHO, A. B. R. Z.; ALVES-PEREIRA, A.; PRADO, R. C.; ZUCCHI, M. I. & DELALIBERA JR., I. *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. *Fungal Ecology*, 41, 289-300, 2019.
- BOUCIAS, D. G.; TIGANO, M. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; GLARE, T. R. & INGLIS, P. W. Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. *Biol. Control*. 19, 124-138, 2000.
- BURGESS, H. D. Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Springer Science, 412p, 1998.
- CAPALBO, D. M. F. Comercialização de agentes microbiológicos para controle de pragas: experiências de países da América Latina. *Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)*, 2006.
- CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R. A., DEMÉTRIO, C. G. B. & DELALIBERA JR, I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agricultura, Ecosystems & Environment*, 233, 361-369, 2016.
- CHEN, Z.; XU, L.; YANG, X.; ZHANG, Y. & YANG, Y. *Metarhizium baoshanense* sp. nov., a new entomopathogen fungus from southwestern China. *Pakistan Journal of Zoology*, 50, 1739-1746p, 2018.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2010. Disponível em: Acesso em: Jan. 2023.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Soja – Análise Mensal, Julho 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja?start=10> Acesso em: Fev. 2023.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Central de Informações Agropecuárias. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4731-safra-2022-23-producao-de-graos-pode-chegar-a-308-milhoes-de-toneladas-impulsionada-pela-boua-rentabilidade-de-milho-soja-e-algodao> Acesso em: Fev. 2023.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PANIZZI, A.R. Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: EMBRAPA-CNPSO. 45p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 24), 1999.
- COSSOLIN, J. F. S.; PEREIRA, M. G. B.; MARTÍNEZ, L. C.; TURCHEN, L. M.; FIAZ, M.; BOZDOGAN, H. & SERRÃO, J. E. Cytotoxicity of *Piper aduncum* (Piperaceae) essential oil in brown stink bug *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Springer Nature*, 28: 763-770, 2019.
- CROPLIFE. Produtos Biológicos Registrados. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/> Acesso em: Jan. 2020.
- CropLife. Novos produtos biológicos aprovados no Brasil. Disponível em <https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/> Acesso em: Nov. 2022.

- DEGRANDE, P. E. & VIVAN, L. M. Pragas da soja. Boletim de Pesquisa de Soja: Central de texto, n. 10, p. 153-179, 2006.
- DEVI, P. S. & PRASAD, Y. G. *Nomuraea rileyi*: a potential mycoinsecticide. In: UPADHYAY, R. K.; MUKHERJI, K. G. & CHAMOLA, B. P. (eds) Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture. Springer, Boston, MA, 2001.
- FARIA, M. R. & WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256, 2007.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual review of phytopathology*, v. 43, p. 337–59, 2005.
- FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.12; 2011.
- GILBY, A. R. & WATERHOUSE, D. F. Secretion from lateral scent glands of the green vegetable bug *Nezara viridula*. *Nature*, 216: 90-91, 1967.
- GODOY, J. R. Tecnologia de aplicação de defensivos. Manejo integrado de pragas. Botucatu: Funep, 358p, 1990.
- GOETTEL, M. S.; ELIENBERG, J.; GLARE, T. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In: LAURENCE, I. G.; SARJEET, S. G. (Eds.). *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. 1 a ed. ELSEVIER, p. 387–437, 2010.
- GONZÁLEZ-GUZMÁN, A.; REY, M. D.; FROUSSART, E. & QUESADA-MORAGA, E. Elucidating the Effect of Endophytic Entomopathogenic Fungi on Bread Wheat Growth through Signaling of Immune Response-Related Hormones. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022.
- GROTH, M. Z. Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Australian Journal of Crop Science*, v.11, n.3, p. 360, 2017.
- GUNAWARDENA, N. E. & HERATH, H. M. W. K. B. Significance of medium chain n-alkanes as accompanying compounds in hemipteran defensive secretions: Na investigation based on the defensive secretion of *Coridius janus*. *J. Chem. Ecol.*, 17, 2449, 1991.
- HELVEY, T. C. *Insecticidal effect of inert solid diluents*. University Teachers College, New York, 1952.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 70p., 2000.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga. EMBRAPA, 1, 859p., 2012.
- HOWARD, R. & BLOMQUIST G. J. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual review of entomology*. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130359, 2005.
- HU, X.; XIAO, G.; ZHENG, P.; SHANG, Y.; SU, Y.; ZHANG, X.; LIU, X.; ZHAN, S.; ST LEGER, R. J. & WANG, C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 16796-16801, 2014.
- INGLIS, G. D., GOETTEL, M. S., BUTT, T. M., STRASSER, H. et al. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CABI Publishing, p. 23–70, 2001.

- IWANICKI, N. S.; PEREIRA, A. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; REZENDE, J. M.; MORAL, R. A. ZUCCHI, M. I. & DELALIBERA JR., I. Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Nature*, 4443, 2019.
- IWANICKI, N. S.; MASCARIN, G. M.; MORENO, S. G.; EILENBERG, J. & DELALIBERA JR., I. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36, 71, 2020.
- JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 180–187, 1997.
- JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, v. 55, p. 129–145, 2010.
- JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, v. 55, p. 159–185, 2010.
- KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F. & REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106, 811-829, 2014.
- LACEY, L.A.; GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for early 21st century. *Entomophaga*, v. 40, p. 1-25, 1995.
- LATIFIAN, M. Physicochemical properties affects on different oil formulations on fungus *Metarhizium anisopliae* for control of *Oryctes elegans*. *Journal of Entomology*, 1812-5670, 2018.
- LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, B.; SILVA, R. J. & GREGÓRIO, E. A. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 101, p. 17-22, 2009.
- LIU, Q.; YING, S. H.; FENG, M. G. & JIANG, X. H. Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95: 65-75, 2009.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B: Com. Biochem.* 89(4):595-645. doi 10.1016/0305-0491(88)90305-7, 1988.
- LOPES, R. B.; MICHEREFF-FILHO, M.; TIGANO, M. S.; NEVES, P. M. O. J.; LOPEZ, E. L.; FANCELLI, M.; SILVA, J. P. Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. *Bulletin of Insectology*, v. 64, n. 2, p. 201–208, 2011.
- LOPES, R. B.; LAUMANN, R. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M. & FARIA, M. 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, pp. 77-85, 2015.
- LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A. & FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: a new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Journal of Intertebrate Pathology*, 151, 2018.

- LUANGSA-ARD, J. J.; MONGKOLSAMRIT, S.; KHONSANIT, A.; TASANATHAI, W. & NOISRIPOOM, R. A. Clavicipitaceous entomopathogens: new species in *Metarhizium* and a new genus *Nigelia*. *Mycological Progress*, 16, 369-391p, 2017.
- LU, H. L. & ST. LEGER, R. J. Insect Immunity to Entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics*, v. 94, 251-285, 2016.
- LUTHY, P.; CORDIER, J. L. & FISCHER, H. M. *Bacillus thuringiensis* as a bacteridal insecticide; basic considerations and application. *Microbial and Virus Pesticides*. New York: Marcel Dekker Inc, 720p, 1982.
- LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; SOUZA, D. A. BOTELHO, A. B. R. Z. LOPES, R. B., FARIA, M. & DELALIBERA JR, I. *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 166, 2019.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/> Acesso em: Nov. 2022.
- MARCIANO, A. F.; MASCARIN, G. M.; FRANCO, R. F. F.; GOLO, P. S.; JARONSKI, S. T.; FERNANDES, E. K. K. & BITTENCOURT, V. R. E. P. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. *Scientific Reports*, 11, 4972, 2021.
- MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA JR., I.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C. & FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 46-53, 2019.
- McFADYEN, R. E. C. Biological Control of Weeds. *Annual Review of Entomology*, v. 43, p.369-93, 1998.
- MELO, M. C. Exigências térmicas e higrométricas de *Telenomus remus* (Nixon, 1937) (Hymenoptera: Scelionidae) em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) para produção massal e zoneamento do parasitoide no Brasil. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.
- MONGKOLSAMRIT, S.; KHONSANIT, A.; THANAKITPIPATTANA, D.; TASANATHAI, K.; NOISRIPOOM, W. LAMLERTTHON, S.; HAMAMAN, W.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. & LUANGSA-ARD. Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. *Studies in Micology*, 95: 171-251, 2020.
- MONTALVA, C.; COLLIER, K.; ROCHA, L. F. N.; INGLIS, P. W.; LOPES, R. B.; LUZ, C. & HUMBER, R. A. A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. *Fungal Biology*, 120: 655-665, 2016.
- MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A. & BORGES, M. The chemical volatiles (semiochemicals) produced by Neotropical stinkbugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*. 37, 489-505, 2008.
- MOREIRA, C. C. The double life of an insect pathogen: *Metarhizium* as a plant symbiont and its genetic diversity in coffee agroecosystems. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.
- MOORE, D. & PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News Inform.*, 14: 331-340, 1993.
- NAPOLITANO, R. & JUÁREZ, M. P. Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 344(1): 208-214, 1997.

- NELSON, D. R. & BLOMQUIST, G. J. Insect waxes. In: Hamilton RJ (ed) Waxes: chemistry, molecular biology and functions. The Oily Press Lipid Library, Dundee, Scotland, pp. 349, 1995.
- NUNES, A. R. F.; MARTINS, J. N.; FURLANETO, M. C. & BARROS, N. M. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Ciênc. Rural* 40, 1853-1859, 2010.
- O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases *Australasian Plant Pathology*, v.46, p.293-304. DOI 10.1007/s13313-017-0481-4, 2017.
- OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, v. 72, n. 9, p. 1727 - 1736, 2016.
- ORTIZ-URQUIZA, A. & KEYHANI, N. O. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi *versus* the Insect Cuticle. *Insects*, 4(3):357-374, 2013
- PANIZZI, A.R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 29, p. 1-12, 2000.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F. & SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORREA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga. Londrina: Embrapa Soja, cap. 5, p. 335 a 420, 2012.
- PANIZZI, A. R.; LUCINI, T. What happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible reasons to explain populations decline. *Neotropical Entomology*, v. 45, p. 619-628. DOI: 10.1007/s13744-016-0446-2, 2016.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R. & JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 124-137. doi 10.1016/j.cbpc.2006.08.003, 2007.
- PEDRINI, N.; ORTIZ-URQUIZA, A.; HUARTE-BONNET, C.; ZHANG, S. & KEYHANI, N. O. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4: 24, 2013.
- PEREIRA, R. M. F. & ROBERTS, D. N. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 84: 1657-1661, 1991.
- PNB, 2022. Programa Nacional de Bioinsumos. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/material-para-imprensa/pt/release-04-programanacionalbioinsumos_divulgacao Acesso em: Nov. 2022.
- QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SILVA, R. A.; BARRIGOSI, J. A. F.; MARTINS, J. F. Enhanced susceptibility of *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) to *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of chemical insecticides. *Biological Control*, v. 66, n. 1, p. 56-64, 2013.
- REMOLD, H. Scent-Glands of Land-Bugs, their Physiology and Biological Function. *Nature* 198, 764-768 (1963).

- RESQUIN-ROMERO, G.; CABRAL-ANTÚNEZ, C.; SARUBBI, ORUE, H.; GARRIDO-JURADO, I.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SCHADE, M. BUTT, T. M. Virulence of *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) strains against stinkbugs *Euschistus Heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*. 113, 5, 2540-2545, 2020.
- RODARTE, P. M. ANÁLISE SENSORIAL, QUÍMICA E PERFIL DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE CAFÉS ESPECIAIS. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- RUEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA M. S.; YOKOMIZO Y. & ALMEIDA W. F. Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade. São Paulo, 95p, 1991.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; FUXA, J. R.; LACEY, L. A.; ONSTAD, D. W.; KAYA, H. K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 88, p. 1–7, 2005.
- SILVA, R. A.; QUINTELA, E.; MASCARIN, G. M.; PEDRINI, N.; LIÃO, L. M. & FERRI, P. H. Unveiling chemical defense in the rice stalk stink bug against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 127, 93–100, 2015.
- SOMAVILLA, J. C.; REIS, A. C.; GUBIANI, P. S.; GODOY, D. N.; STURMER, G. R. & BERNARDI, O. Susceptibility of *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae) to selected insecticides in Brazil. *Journal of Economic Entomology*. 113(2):924-931, 2019.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 66p, 2006.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. Soja: Manejo Integrado de Pragas. 2 ed. Curitiba: Senar-Pr, 81p, 2010.
- SOSA-GÓMEZ, 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. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 31–39, 1997.
- SOSA-GÓMEZ D. R. & OMOTO, C. Soja, Manejo integrado de insetos e outros artrópodes praga: Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Embrapa Soja. Cap 10, 673-711, 2012.
- TIMONIN, M. Effect of volatiles constituents of *Scaptocoris talpa* Champion on the growth of soil fungi. *Plant & Soil*. 14 (4), 323-334, 1961a.
- TIMONIN, M. The interaction of plant, pathogen and *Scaptocotis talpa* Champion. *Canadian Journal of Botany*. 39, 695-703, 1961b.
- ULRICH, K. R.; FELDLAUFER, M. F.; KRAMER, M. & ST. LEGER, R. J. Inhibitions of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato in vitro by the bed bug defensive secretions (E)-2-hexenal and (E)- 2-octenal. *BioControl* 60, 517-526, 2015.
- VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N. K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B. H.; PELL, J. K.; RANGEL, D. E. N.; ROY, H. E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, v. 2, p. 149–159, 2009.
- VENCATO, A. Z., et al. Anuário Brasileiro da Soja 2010. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p. 144, 2010.
- WAAGE, J. The future development of IPM. *Entomologia Sinica*, 5, pp. 257-271, 1998.

- YAAKOV, N.; MANI, K. A.; FELFBAUM, R.; LAHAT, M.; COSTA, N.; BELAUSOV, E.; MENT, D. & MECHREZ, G. Single cell encapsulation via pickering emulsion for biopesticide applications. *Acs Omega*, 14294-14301, 2018.
- YAMAMOTO, K., OHMAE, M. & ORIHARA, T. *Metarhizium brachyspermum* sp. Nov. (Clavicipitaceae), a new species parasitic on Elateridae from Japan. *Mycoscience*, v. 61, 1, pp. 37-42, 2020.
- ZHANG, K.; WU, Q.; CHEN, Y. Detecting soybean leaf disease from synthetic image using multi-feature fusion faster r-cnn. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 183, e106064. DOI: 10.1016/j.compag.2021.106064, 2021.

2. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium* spp. PARA O CONTROLE DE *Euschistus heros* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE BIOPESTICIDA

Resumo

Como uma alternativa para o desenvolvimento agrícola sustentável, os fungos entomopatogênicos vêm sendo amplamente utilizados como agentes de controle biológico. Embora existam estudos que contestam a eficiência do controle do percevejo *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) a partir de fungos entomopatogênicos, este assunto necessita de investigações mais aprofundadas. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a susceptibilidade de adultos de *E. heros* a 15 isolados das espécies *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. humberi*, *M. pingshaense* e *M. robertsii*. Para os isolados mais virulentos determinou-se o rendimento de conídios, de forma que os isolados ESALQ E9, ESALQ 3364 e ESALQ 4395 foram selecionados e avaliados quanto o desempenho em relação a ovos e ninfas, a concentração letal mediana para adultos (CL_{50}) e o uso de diferentes inertes para o desenvolvimento de uma formulação para o controle de *E. heros*. Para avaliar a susceptibilidade das diferentes fases de desenvolvimento de *E. heros*, grupos de 10 indivíduos receberam suspensões fúngicas na concentração de 5×10^7 conídios/mL de diferentes isolados de *Metarhizium* e foram avaliados por 8 dias. A produção de conídios foi determinada a partir de sacos plásticos contendo 150g de arroz parboilizado hidratado usando 5mL da suspensão fúngica (5×10^7 con/mL) avaliado após 10 dias. Para determinação da concentração letal mediana, adultos de *E. heros* foram pulverizados com suspensões fúngicas a 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL e foram avaliados durante 8 dias. Para o desenvolvimento das formulações três inertes foram testados para o desenvolvimento de um pó-molhável (WP) e dois óleos para o desenvolvimento de uma formulação oleosa (OD), além de diferentes adjuvantes. As formulações foram avaliadas quanto à viabilidade por um período de seis meses. A mortalidade dos adultos para os isolados de *M. pingshaense* selecionados (ESALQ 3364 e ESALQ 4395) atingiram 100% ($P < 0,05$), enquanto para as ninfas os valores mantiveram-se abaixo dos 70%. Diferente do esperado, não foi constatado uma mortalidade idade-dependente, uma vez que a mortalidade entre os adultos foi mais acentuada do que em ninfas, entretanto, um efeito ovicida foi revelado para os três isolados testados (ESALQ E9, ESALQ 3364 e ESALQ 4395). A concentração letal mediana de adultos foi de $5,1 \times 10^5$ conídios/mL para os dois últimos isolados. As formulações de pós-molháveis apresentaram maior estabilidade do que as oleosas, e a refrigeração foi fator determinante para a manutenção da viabilidade. De modo geral, é necessário que esforços sejam concentrados para o desenvolvimento dessa etapa, visto que formular produtos biológicos ainda é um desafio devido a sensibilidade do ingrediente ativo.

Palavras-chave: Controle microbiano; percevejos; *Metarhizium pingshaense*; biodefensivos.

Abstract

Development of a biopesticide based on *Metarhizium* spp. for the control of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Entomopathogenic fungi have been widely used as an alternative for sustainable agricultural development as biological control agents. Although studies contest the efficiency of controlling the *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) bug using entomopathogenic fungi, further investigations are needed. In this study, the susceptibility of adults to 15 isolates from the species *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. humberi*, *M. pingshaense*, and *M. robertsii* was evaluated. For the most virulent isolates, the conidial yield was determined. The ESALQ E9, ESALQ 3364, and ESALQ 4395 isolates were selected and assessed for their performance against eggs and nymphs, determination of the median lethal concentrations for adults (LC_{50}), and the use of different inert materials in the development of a formulation for *E. heros* control. To evaluate the susceptibility of different developmental stages of *E. heros*, groups of 10 individuals received fungal suspensions at a concentration of 5×10^7 conidia/mL from *Metarhizium* isolates and were evaluated for eight days. Conidial production was determined in plastic bags containing 150g of hydrated parboiled rice using 5mL of the fungal suspension (5×10^7 conidia/mL) evaluated after 10 days. To determine the median lethal concentration, *E. heros* adults were sprayed with fungal suspensions at 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , and 1×10^8 conidia/mL and evaluated for eight days. For the formulation development, three inert materials were tested for wettable powder (WP) formulation, and two oils were tested for oily formulation (OD), along with different adjuvants. The formulations were evaluated for viability over six months. The mortality of adults for the selected *M. pingshaense* isolates (ESALQ 3364 and ESALQ 4395) reached 100% ($P < 0.05$), while the values for nymphs remained below 70%. Contrary to expectations, no age-dependent mortality was observed, as adult mortality was more pronounced than in nymphs. However, an ovicidal effect was revealed for the three tested isolates (ESALQ E9, ESALQ 3364, and ESALQ 4395). The median lethal concentration of the *M. pingshaense* on adults was 5.1×10^5 conidia/mL. Wettable powder formulations were more stable to oily formulations, and refrigeration was a determining factor for maintaining viability. In general, more significant efforts need to be focused on developing this stage, as formulating biological products remains a challenge due to the sensitivity of the active ingredient.

Keywords: Microbial control; stink-bug; *Metarhizium pingshaense*, biopesticides.

2.1. Introdução

O percevejo-marrom-da-soja (*Euschistus heros*) tem sido considerado uma importante praga por causar perdas que afetam seriamente o rendimento da soja, e por sua predominância nas principais regiões agrícolas do país (CÔRREA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; PANIZZI & LUCINI, 2016). Considerando a abundância do inseto nas lavouras e a gravidade dos danos que podem ser ocasionados, para evitar grandes perdas financeiras, o controle da mesma tem sido feito principalmente por inseticidas químicos (SOMAVILLA et

al., 2019), método que vem promovendo a evolução de resistência em populações de insetos praga desde os anos 90 (SOSA-GÓMEZ & OMOTO, 2012).

Além dos problemas de resistência, o controle químico, do ponto de vista ambiental, é responsável por apresentar efeito deletérios para insetos não-alvos. Levando em consideração a crescente pressão por alimentos livres de resíduos, existe a necessidade de explorar estratégias alternativas que visem um controle mais sustentável. Diante deste contexto, os bioinsumos à base de microrganismos utilizados atualmente na soja são compostos principalmente por fungos e bactérias, que além de realizar o manejo de insetos-praga e fitopatógenos, são capazes de estabelecer relações endofíticas que podem proporcionar inúmeros benefícios diretos e indiretos às plantas (IWANICKI et al., 2022).

Nesse sentido, o controle microbiano, sobretudo com o uso dos fungos entomopatogênicos tornaram-se uma excelente ferramenta, principalmente para os insetos sugadores como os pentatomídeos, por possuírem ação por contato (LACEY & GOETTEL, 1995). Entretanto, para o desenvolvimento de um produto comercial, aspectos que vão desde a prospecção de cepas de interesse até a formulação estão envolvidos, sendo a última uma etapa importante para garantir o sucesso do microrganismo em condições de campo.

Além da proteção contra os fatores abióticos do campo, o desenvolvimento de formulações tem sido um método eficaz para driblar outros fatores limitantes, uma vez que muitos compostos podem ser explorados como alternativas para romper inclusive as barreiras de proteção dos insetos (LATIFIAN, 2018). Sendo assim, embora a baixa susceptibilidade de pentatomídeos a fungos entomopatogênicos tenha sido relatada, o grande potencial do gênero *Metarhizium* para o controle de insetos incentiva novos estudos que visam avançar no desenvolvimento de bioinseticidas para esta praga. Nesse sentido, o presente capítulo visa principalmente selecionar um isolado que apresente alta virulência para o controle efetivo de *E. heros*.

2.2. Material e Métodos

As etapas descritas na metodologia foram realizadas no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia, ambos situados no *campus* da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP em Piracicaba, estado de São Paulo.

2.2.1. Criação de *Euschistus heros*

Os insetos utilizados nos experimentos foram obtidos da criação da empresa Koppert Biological Systems (Charqueada, SP). Os insetos foram mantidos em gaiolas de plástico cobertas com voil, com dieta natural composta por vagens de feijão e amendoim a 26°C.

2.2.2. Isolados fúngicos e preparo de suspensões

Todos os isolados utilizados pertencem a Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP). Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados isolados de 5 espécies do gênero *Metarhizium*: *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. humberi*, *M. robertsii* e *M. pingshaense*. Esses isolados foram obtidos de amostras de solo de diversas localidades e recuperados do solo através da metodologia de isca viva ou meio seletivo (Tabela 1). Os isolados estão preservados em glicerol 10% e armazenados em freezer a -80°C. O armazenamento foi feito a partir do recorte de pequenas parcelas de meio de cultura esporulado com a espécie de interesse submersas em 1 mL de glicerol 10% em criotubos. Após retirada dos criotubos do freezer e descongelamento, os isolados foram cultivados em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose e Ágar) e mantidos a 26°C com fotoperíodo de 12:12h, por aproximadamente 7 dias. As culturas esporuladas foram utilizadas para o preparo de suspensões utilizadas nos bioensaios.

Para o preparo das suspensões, os conídios de cada isolado foram raspados das placas e acondicionados em tubos cônicos tipo Falcon®. Os conídios foram suspensos em 10 mL de solução de Break-thru® S 255 (Evonik Industries) a 0,05%. O ajuste para a concentração desejada de conídios foi feito a partir de uma diluição seriada da suspensão inicial. A contagem foi feita em uma câmara de Neubauer usando a terceira diluição, em microscópio óptico (400x ampliação). A concentração da suspensão foi ajustada de acordo com a necessidade de cada experimento.

Tabela 1. Informações sobre os isolados do gênero *Metarhizium* utilizados nos bioensaios de laboratório

Espécie	Procedência	Coletor	Data	Isolamento	Isolado (ESALQ)
<i>M. anisopliae</i>	Boca da Mata (AL)	*	05/05/81	<i>Mahanarva posticata</i>	E9
<i>M. anisopliae</i>	Amazônia-Solo-Vegetação Nativa - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	07/08/12	IB- <i>Galleria mellonella</i>	4884
<i>M. anisopliae</i>	Amazônia-Solo-Milho - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	20/03/12	Meio seletivo	4931
<i>M. brunneum</i>	Canavial-Solo-Usina Iracema (SP)	Natasha S. A. Iwanicki	12/02/15	IB- <i>Galleria mellonella</i>	5022
<i>M. brunneum</i>	Canavial-Solo-Usina Iracema (SP)	Natasha S. A. Iwanicki	19/05/15	Meio seletivo	5181
<i>M. brunneum</i>	Canavial-Solo-Usina Iracema (SP)	Natasha S. A. Iwanicki	19/05/15	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	5286
<i>M. humberi</i>	Cerrado - Solo- Soja - Rio Verde (GO)	Ana Beatriz R. Zanardo	30/01/13	IB- <i>Galleria mellonella</i>	3742
<i>M. humberi</i>	Cerrado - Solo- Soja - Rio Verde (GO)	Ana Beatriz R. Zanardo	30/01/13	IB- <i>Galleria mellonella</i>	3996
<i>M. humberi</i>	Cerrado - Solo- Soja - Rio Verde (GO)	Ana Beatriz R. Zanardo	30/01/13	Meio seletivo	4823
<i>M. pingshaense</i>	Amazônia-Solo-Banana - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	09/03/13	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	3364
<i>M. pingshaense</i>	Amazônia-Solo-Banana - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	13/09/13	Meio seletivo	4288
<i>M. pingshaense</i>	Amazônia-Solo-Milho - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	23/03/13	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	4395
<i>M. robertsii</i>	Pampa-Solo-Vegetação Nativa- Aceguá (RS)	Ana Beatriz R. Zanardo	16/04/13	Meio seletivo	4669
<i>M. robertsii</i>	Amazônia-Solo-Vegetação Nativa - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	16/03/13	Meio seletivo	4791
<i>M. robertsii</i>	Amazônia-Solo-Vegetação Nativa - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	12/03/12	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	4924

2.2.3. Seleção de isolados: virulência à *Euschistus heros*

Para a seleção, foram testados três isolados de cada uma das 5 espécies do gênero *Metarhizium*, totalizando 15 isolados (Tabela 1). Para proporcionar condições ideais para a sobrevivência dos insetos e dos fungos durante os bioensaios, foram construídas amostras experimentais feitas com potes plásticos de 250ml com furos em suas tampas, devidamente identificados com etiquetas. No fundo de cada pote foram dispostas as vagens cortadas para servir de alimento, além de amendoim e um pedaço de algodão úmido. As vagens foram esterilizadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto e lavadas em água destilada. Na borda dos potes plásticos, vaselina sólida foi aplicada para conter os percevejos durante a aplicação da suspensão e avaliação do experimento. Após a montagem, 10 adultos de *E. heros* com aproximadamente 3 dias de idade foram inseridos nos potes, onde permaneceram até o momento da aplicação. A suspensão foi preparada conforme descrito no tópico anterior e ajustada para uma concentração de 5×10^7 conídios/mL. Dois tratamentos controle foram utilizados, um recebendo apenas água destilada e o outro uma solução de Break-thru 0,05%.

A aplicação das suspensões e das soluções controle foi feita em Torre de Potter, onde 2 mL foram aplicados em cada pote. Após a aplicação, os mesmos foram mantidos a 26°C com fotoperíodo de 12:12h por 8 dias. O experimento foi avaliado diariamente e os insetos mortos foram retirados, esterilizados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto e enxaguados em água destilada. Os insetos esterilizados foram acondicionados em câmaras úmidas e mantidos a 26°C para posterior confirmação da mortalidade por infecção fúngica. No decorrer do experimento as vagens e o algodão foram trocados quando houve necessidade, e as posturas de ovos foram retiradas sempre que presentes. Cada tratamento teve 5 repetições, com 10 insetos cada. O experimento foi realizado 2 vezes no tempo.

2.2.4. Seleção de isolados: produtividade de conídios

Após selecionar os isolados que apresentaram melhor desempenho em relação à mortalidade dos insetos, esses foram avaliados quanto a produtividade de conídios em fermentação sólida. Esse experimento foi conduzido em sacos plásticos contendo 150g de arroz parboilizado hidratado por 50 minutos. Os sacos contendo o arroz foram grampeados e

autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento, 5 mL da suspensão fúngica, a uma concentração de 5×10^7 conídios/mL foi adicionada a cada saco plástico. O arroz foi mantido a 26°C, com fotoperíodo de 12:12h durante 10 dias.

A quantificação da produção foi feita a partir da retirada de uma alíquota de 10g de arroz esporulado que foi diluído em 90mL de água com Tween 80 a 0,05%. Essa suspensão com arroz foi diluída 3 vezes seguindo o método de diluição seriada, e a contagem foi feita em uma câmara de Neubauer usando a terceira diluição, em microscópio óptico (400X ampliação).

Após a contagem, para possibilitar a extração e estimativa de peso de conídios por quilo de arroz seco, o arroz foi colocado em câmara de secagem por aproximadamente 48h, onde passado esse período foi avaliada a atividade de água do mesmo em um medidor de atividade de água (AquaLab). O material seco foi peneirado por 1h em um agitador de peneiras. Depois dessa etapa os conídios e arroz restante foram pesados e foi feita a estimativa de produção por quilo de arroz seco.

2.2.5. Ensaio de dose resposta com conídios

Bioensaios de concentração letal mediana (CL_{50}) dos melhores isolados, selecionados de acordo com a sua virulência a *E. heros* e produtividade em fermentação sólida foram conduzidos. Esse experimento foi executado de forma idêntica ao ensaio de seleção de isolados, entretanto usando suspensões de conídios em diferentes concentrações, sendo essas de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL além dos dois tratamentos controle, um somente com água destilada estéril e o outro com solução de Break-thru 0,05%. A aplicação, condições e avaliação também foram iguais às do experimento de seleção de isolados. Esse experimento teve 5 repetições para cada tratamento, com 10 insetos cada, e foi feito 2 vezes no tempo.

2.2.6. Ensaio *E. heros* em diferentes fases de desenvolvimento

Neste experimento o objetivo foi avaliar o efeito dos isolados escolhidos com base nos resultados dos experimentos anteriores, nas diferentes fases de desenvolvimento de *E. heros*. As fases foram separadas em ovos recém depositados, ninfas de 2° e 3° instar e ninfas de 4° e 5° instar recém emergidas. A suspensão foi preparada conforme descrito

anteriormente, na concentração de 5×10^7 conídios/mL. Os ovos foram separados em grupos de aproximadamente 10, foram acondicionados em placas de Petri de 3.5 cm de diâmetro contendo um pedaço de algodão umedecido em água destilada até o momento da aplicação. Para avaliação do efeito do isolado nas ninfas, foram utilizados potes iguais aos utilizados nos experimentos com adultos.

A suspensão foi aplicada em Torre de Potter. O experimento foi avaliado por 8 dias, onde foi avaliada a eclosão dos ovos e a mortalidade das ninfas. As ninfas mortas foram retiradas dos potes diariamente, esterilizadas superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto e enxaguadas em água destilada. Após esterilização, foram mantidas em câmara úmida à 26°C para a confirmação da mortalidade. Esse experimento teve 5 repetições, com 10 ovos ou ninfas em cada repetição, sendo realizado 2 vezes no tempo.

2.2.7. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *E. heros* infectados com isolados de *Metarhizium*

Para avaliar a adesão e germinação dos conídios, adultos de *E. heros* foram expostos a uma suspensão dos isolados selecionados de *M. pingshaense* (ESALQ 4395 e ESALQ 3364) e *M. anisopliae* (ESALQ E9). A suspensão foi ajustada a uma concentração de 1×10^8 conídios/mL e aplicada por imersão, garantindo que todas as partes do inseto fossem cobertas. Após a aplicação os insetos foram mantidos a 26°C durante os períodos de 18, 20, 24, 30 e 36 horas para determinar o tempo necessário para a germinação dos conídios. Após esses intervalos de tempo, os insetos foram congelados para interromper o crescimento fúngico. Para fixação, os insetos foram expostos ao vapor de ósmio (OsO_4) por 24h, e posteriormente foram colocados em sílica por algumas horas.

Após a secagem, os espécimes foram fixados em um porta-amostra (stub) usando fita dupla face de carbono, metalizados com ouro em um equipamento sputtering (Balzers SCD 050) e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-IT300 operado a 15,0 kV).

2.2.8. Microscopia óptica de ovos de *E. heros* infectados com isolados de *Metarhizium*

Para constatar a presença de hifas dentro de ovos de *E. heros*, ovos recém depositados receberam a suspensão de conídios dos isolados selecionados (ESALQ E9, ESALQ 4395, ESALQ 3364). A suspensão foi ajustada a uma concentração de 5×10^7 conídios/mL, aplicada em Torre de Potter. Após aplicação, os ovos foram mantidos a 26°C pelo período de 5 dias. Após esse período, estes foram congelados para paralisar o crescimento fúngico.

As amostras foram processadas de acordo com o descrito por MARQUES & NUEVO, (2022). Inicialmente os ovos foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Durante a fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para melhor fixação. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente e, em seguida, infiltradas em resina (Technovit 7100). Os blocos foram seccionados a 2-7 µm de espessura em micrótomo rotatório (Leica RM 2265). As secções foram montadas em lâminas de vidro. Posteriormente coradas com Azul de Toluidina, para as análises histológicas usuais e com Sudan Black B a fim de detectar substâncias lipofílicas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Axio Imager D2) com auxílio do software Axion Vision SE64 Rel 4.9.1.

2.2.9. Desempenho de diferentes adjuvantes na viabilidade fúngica

Nesta etapa, substâncias que poderiam ter efeito adjuvante para a proteção fúngica ou para a aumentar a mortalidade de *E. heros* foram avaliadas. Os adjuvantes foram incorporados aos conídios para formar uma formulação e sua viabilidade foi avaliada para a observação de seu efeito sobre os isolados fúngicos, tendo como foco verificar como esta se mantém ao longo do tempo (*shelf-life*), em duas temperaturas diferentes de aproximadamente 25°C (BOD) e 5° (geladeira). Sendo assim, neste experimento foram formulados pós-molhantes (WP) contendo como principais adjuvantes: terras de Fuller (atapulgita) e sais com efeito inseticida. Em paralelo, formulação contendo caulinita e diatomita foram usados para que houvesse parâmetro de comparação para o desempenho da atapulgita. Além do WP, formulações de dispersões oleosas (OD) também foram desenvolvidas com dois tipos de óleo vegetal.

Para o desenvolvimento das formulações tipo WP, as concentrações de cada aditivo foram determinadas previamente (Tabela 2), visando a melhor performance de dissolução e suspensão do produto a ser diluído em água. Antes da montagem das formulações, o agente de fluidez e os inertes foram secos em estufa à 100 °C por 24 horas. Os demais aditivos

(espessantes, emulsificante e sal) foram secos em dessecador por 24 horas. Conídios aéreos de *Metarhizium pingshaense* foram secos em câmara com sílica até que atividade de água (WA) estivesse entre 0,1 e 0,3. Por fim, os aditivos e o ativo foram adicionados a um tubo Falcon (50 mL) e a mistura foi homogeneizada para conter 5×10^9 conídios viáveis/g de produto formulado e a formulação foi porcionada em embalagens laminadas devidamente identificadas.

Tabela 2. Composição qualitativa e quantitativa das formulações WP desenvolvida com os isolados ESALQ 4395 e ESALQ 3364

Componentes	Formulação WP (p/p %)				
	Controle	1	2	3	4
Agente de fluidez	-	3	3	3	3
Espessante 1	-	2	2	2	2
Espessante 2	-	0,05	0,05	0,05	0,05
Emulsificante	-	5	5	5	5
Sal	-	-	0,10	1	10
Ingrediente ativo (q.s.p.)*	5×10^9	5×10^9	5×10^9	5×10^9	5×10^9
Inerte (q.s.p.)**	-	100	100	100	100

*Ingrediente ativo: ESALQ 4395 ou ESALQ 3364; **Inerte: atapulgita, caulinita ou diatomita; ***q.s.p.: quantidade suficiente para; ****p/p: peso/peso

Na formulação oleosa (OD) o processo de secagem dos aditivos foi o mesmo, com substituição dos aditivos caulinita, diatomita e atapulgita pelos diferentes óleos que não passaram por processos de secagem (Tabela 3). Para a mistura foi necessário a utilização de um béquer com auxílio de agitador magnético para melhor homogeneização dos compostos. Essa formulação foi porcionada em tubos Eppendorfs devidamente identificados, e o controle consistiu no armazenamento do conídio puro em embalagem laminada devidamente identificada.

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa das formulações OD desenvolvida com os isolados ESALQ 4395 e ESALQ 3364

Componentes (p/p %)	Formulação OD		
	Controle	1	2
Espessante 1	-	2	-
Espessante 2	-	-	10
Emulsificante 1	-	20	5
Emulsificante 2	-	5	10
Ingrediente ativo (q.s.p.)*	5x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹
Óleo 1 (q.s.p.)	-	100	-
Óleo 2(q.s.p.)	-	-	100

*Ingrediente ativo: ESALQ 4395 ou ESALQ 3364; **q.s.p.: quantidade suficiente para; ***p/p: peso/peso

Para avaliar a viabilidade, após a diluição das formulações com fungo, as mesmas foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 conídios/mL e 50µL foi inoculado em placas de petri do tipo Rodac® com meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar). As placas foram mantidas a 26°C com fotoperíodo de 12:12h durante 16h. Após esse período, as placas foram observadas em microscópio óptico, com aumento de 400x para a contagem de 100 conídios, germinados e não germinados, estabelecendo-se a proporção de germinados para inferir a viabilidade. Foram considerados germinados conídios que possuíam tubo germinativo maior que seu diâmetro. Para a discussão do efeito dos adjuvantes em relação a viabilidade de *M. pingshaense* foi estipulado um limite máximo de 50% de conídios viáveis.

2.2.10. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em condições de laboratório com delineamento inteiramente casualizado. Para avaliar a sobrevivência de adultos e ninfas de *E. heros* um modelo linear generalizado (GLM) foi aplicado com distribuição exponencial, onde as curvas foram comparadas entre si com base no teste de Log-Rank ($P < 0,05$). O efeito ovicida foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças significativas foram determinadas por um teste de comparação múltipla de Dunn's ($P < 0,05$). Em relação a produtividade de conídios uma ANOVA foi utilizada, sendo que as diferenças significativas foram evidenciadas por meio de uma comparação múltipla Tukey ($P < 0,05$). Para os dados de concentração letal (CL_{50}) um modelo linear generalizado (GLM) foi aplicado com distribuição binomial, função de ligação logit e transformação log-dose. O intervalo de confiança foi de 95%. As análises e gráficos foram feitos no R Cran Project (v. 4.2.2).

2.3. Resultados

2.3.1. Seleção de isolados: virulência a *Euschistus heros*

Todos os isolados testados ocasionaram mais de 60% de mortalidade, com destaque para os isolados de *Metarhizium humberi*, *Metarhizium pingshaense* e *Metarhizium robertsii* que ocasionaram 100% de mortalidade (Figura 1), significativamente maior que o isolado que obteve o pior desempenho (ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae*) com 61% e o Controle (água) com 28% ($p=0,00015$). Além da alta mortalidade, a proporção de cadáveres colonizados pelos patógenos (mortalidade confirmada) de todos os isolados mantiveram-se acima dos 70%, tendo os isolados que mataram 100% ficado acima de 80% (Figura 2). E para os isolados que causaram 100% de mortalidade, o tempo letal mediano (TL_{50}) manteve-se entre 5 e 6 dias (Tabela 4).

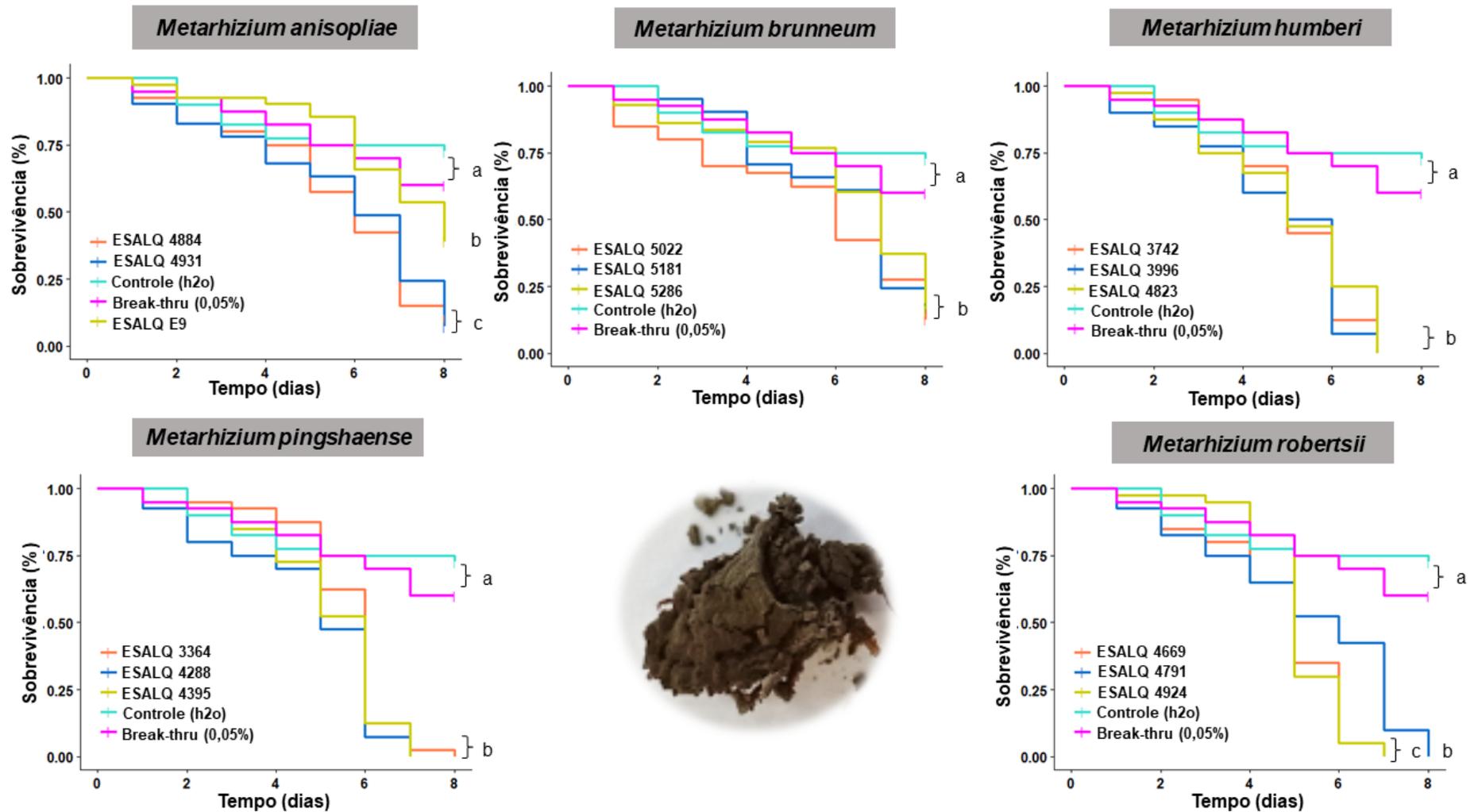


Figura 1. Taxa de sobrevivência de adultos de *Euschistus heros* após exposição a 15 isolados de *Metarhizium* na concentração de 5×10^7 con/mL. * Letras diferentes indicam diferença estatísticas (p<0,05)

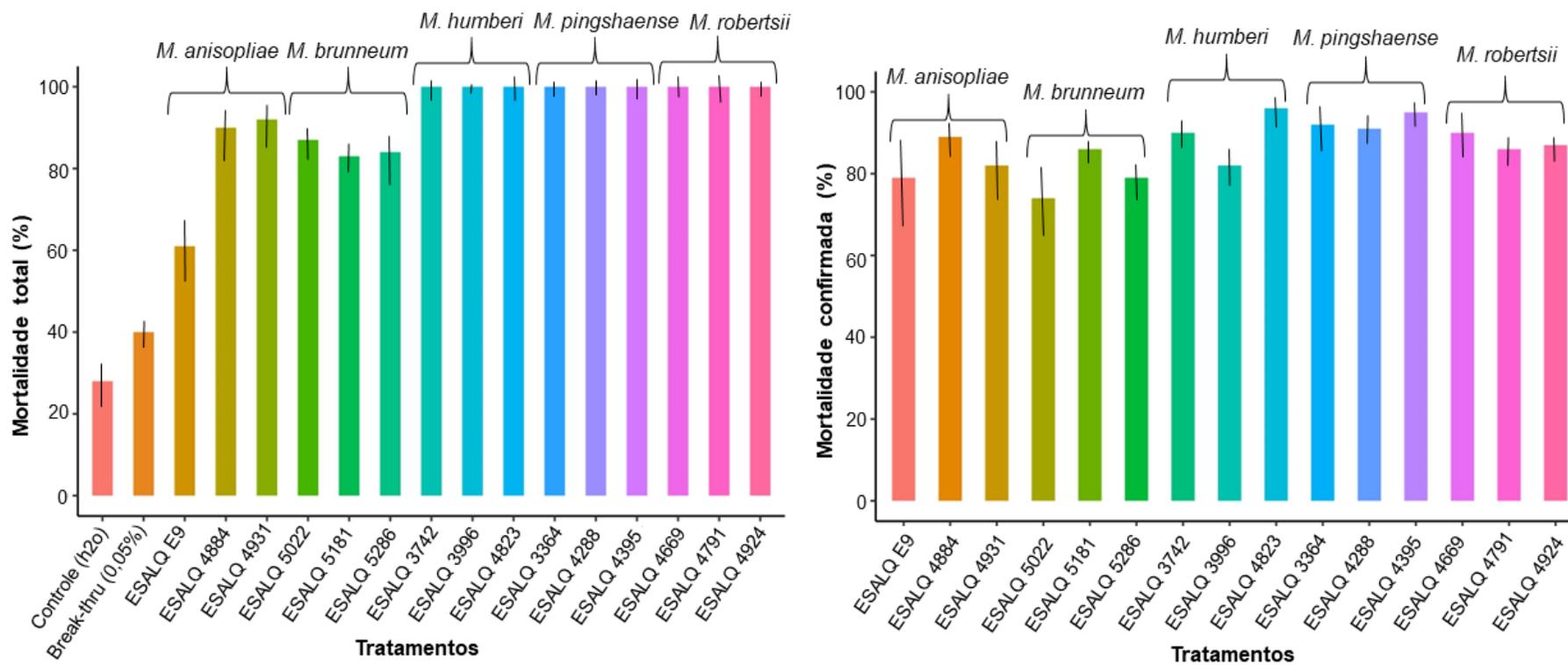


Figura 2. Porcentagem de mortalidade total e mortalidade confirmada (insetos mortos que esporularam) de adultos de *E. heros* expostos a isolados de *Metarhizium* 8 dias após inoculação

Tabela 4. Tempo letal médio (TL₅₀) de adultos de *E. heros* inoculados com isolados de *Metarhizium* na concentração de 5×10^7

Tempo letal médio (TL ₅₀)		
Espécie	Isolados (ESALQ)	Média (CI 95%)
<i>M. anisopliae</i>	E9	8 (7 - NA)
	4884	6 (5 - 7)
	4931	6 (6 - 7)
<i>M. brunneum</i>	5022	6 (5 - 7)
	5181	7 (6 - 7)
	5286	7 (6 - 8)
<i>M. humberi</i>	3742	5 (5 - 6)
	3996	5.5 (4 - 6)
	4823	5 (5 - 6)
<i>M. pingshaense</i>	3364	6 (5 - 6)
	4288	5 (5 - 6)
	4395	6 (5 - 6)
<i>M. robertsii</i>	4669	5 (5 - 6)
	4791	6 (5 - 7)
	4924	5 (5 - 5)

2.3.2. Seleção de isolados: produtividade de conídios

Nesta etapa foi possível evidenciar que nem todos isolados que ocasionaram alta mortalidade (100%), possuem aspectos desejáveis para uma produção em larga escala. Sendo assim, considerando a produção (con/g) os melhores isolados foram da espécie *M. pingshaense* ESALQ 4395 e ESALQ 3364, respectivamente, com uma concentração média de produção de $1,8 \times 10^9$ (95% ci \rightarrow 15,2 – 21,6) e $1,5 \times 10^9$ (95% ci \rightarrow 12,4 – 18,9) conídios/g de arroz seco, seguidos pelo isolado ESALQ E9 que apresentou média de $1,2 \times 10^9$ con/g (95% ci \rightarrow 9,4 – 15,8) (Figura 3). Para a eficiência de extração, o cálculo foi obtido apenas para os três isolados selecionados quanto à concentração, e esses produziram respectivamente uma média de 45, 42 e 37g de conídios/Kg de arroz seco.

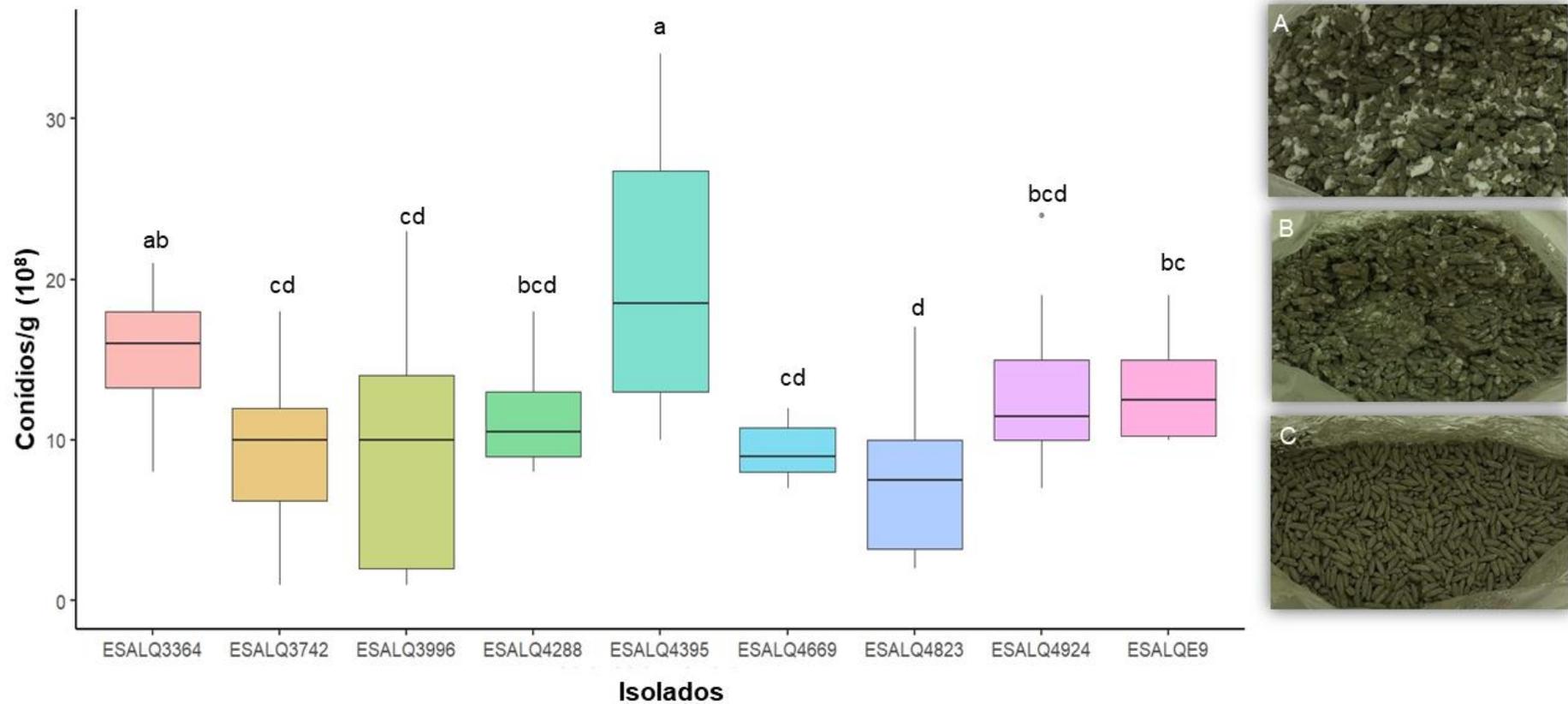


Figura 3. Concentração da produção de conídios obtidos a partir da fermentação sólida de 9 isolados diferentes de *Metarhizium*. Isolados de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9). Isolados de *Metarhizium humberi* (ESALQ 3742, ESALQ 3996, ESALQ 4823), isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 3364, ESALQ 4288, ESALQ 4395), e isolados de *Metarhizium robertsii* (ESALQ 4669, ESALQ 4924). Foto da produção dos isolados ESALQ 3996, ESALQ 4395 e ESALQ 4924 evidenciando aspectos que influenciam o rendimento. *Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) ** Conídios por grama de arroz seco ***A, B, C aspectos de diferentes isolados testados

2.3.3. Ensaio de dose resposta com conídios

Nesta etapa, conforme esperado, o aumento da concentração resultou em maior mortalidade. O desempenho dos isolados selecionados foi muito similar. Sendo o CL_{50} de $5,1 \times 10^5$ para ESALQ 4395 (95% ci \rightarrow 4,7 – 5,4), e $5,1 \times 10^5$ também para o isolado ESALQ 3364 (95% ci \rightarrow 4,8 – 5,5) (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade de adultos de *E. heros* submetidos a diferentes concentrações de *M. pingshaense* após 10 dias da inoculação

Tratamento	Concentração	Mortalidade (%)	Desvio-padrão (sd)
H₂O	0,00E+00	31	0.48
Break-thru (0,05%)	0,00E+00	35	0.47
	1,00E+05	45	0.49
	1,00E+06	69	0.46
	1,00E+07	81	0.39
ESALQ 3364	1,00E+08	87	0.33
	1,00E+05	48	0.50
	1,00E+06	70	0.45
	1,00E+07	78	0.41
ESALQ 4395	1,00E+08	93	0.26

2.3.4. Ensaio com *E. heros* em diferentes fases de desenvolvimento

A virulência dos isolados selecionados às ninfas de *E. heros* diferiu do observado em adultos da espécie. Ao contrário do esperado, não houve uma suscetibilidade idade-dependente uma vez que, a mortalidade em todos os isolados desse teste não ultrapassou os 67% (Figura 4), enquanto nos adultos a espécie *M. pingshaense* ocasionou 100% de mortalidade. Além disso, a morte confirmada em ninfas foi inferior a 50% para todos os isolados (Figura 5). A principal diferença foi observada para ninfas de 4 e 5º ínstar onde o isolado ESALQ 3364 (67%) foi mais virulento do que o isolado ESALQ E9 (58%) ($p < 0,05$). O tratamento controle com Break-Thru (27%) apresentou diferença em relação ao controle com água (17%) para as ninfas de 4º e 5º ínstar. Por fim, o TL_{50} tanto para as ninfas de 2 e 3º ínstar, quanto para as de 4 e 5º ínstar variou entre 7-8 dias (Tabela 6).

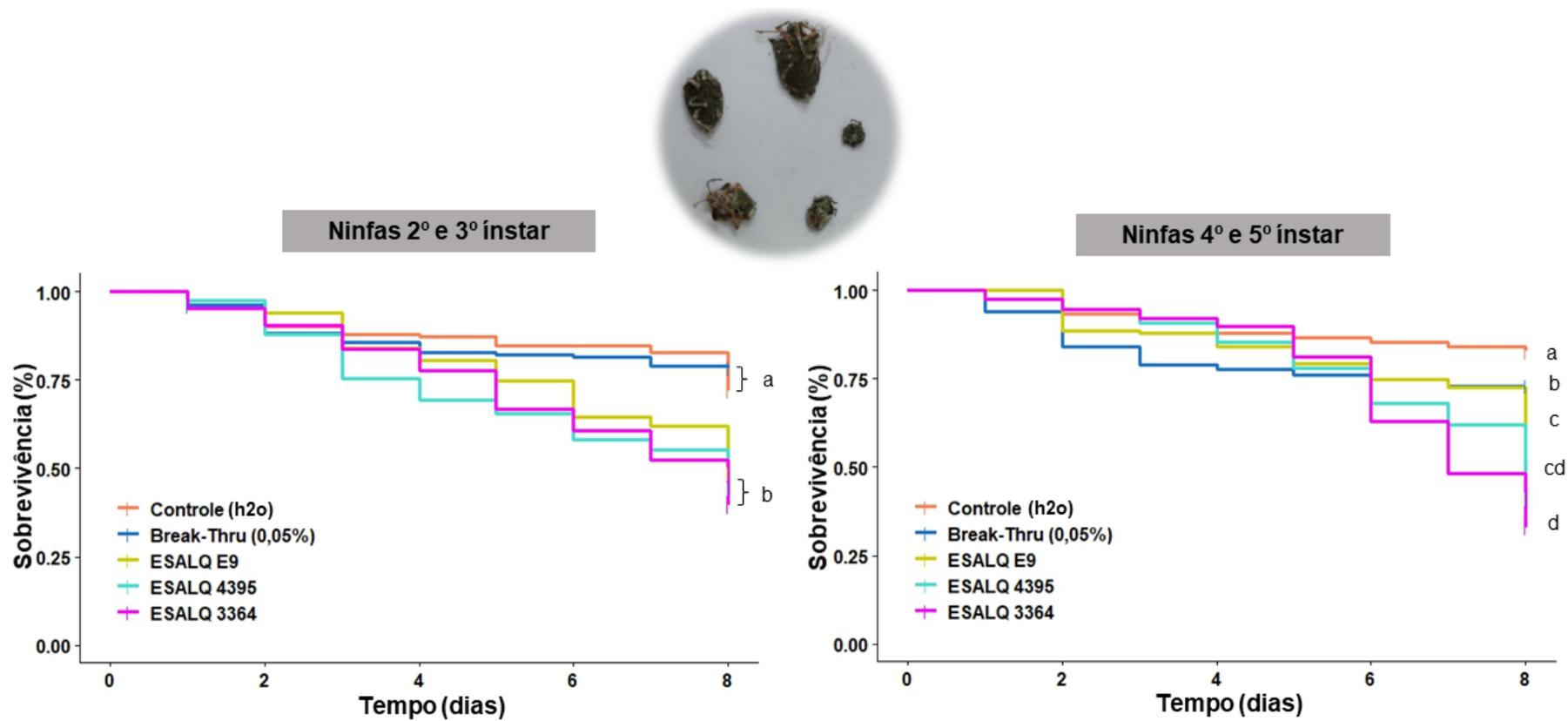


Figura 4. Sobrevivência de ninfas de *Euschistus heros* após exposição a 3 isolados diferentes de *Metarhizium*. Isolado de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9) e isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 3364, ESALQ 4395). Imagem de insetos em diferentes fases de desenvolvimento (2º ínstar a adulto) esporulados com o isolado ESALQ 4395

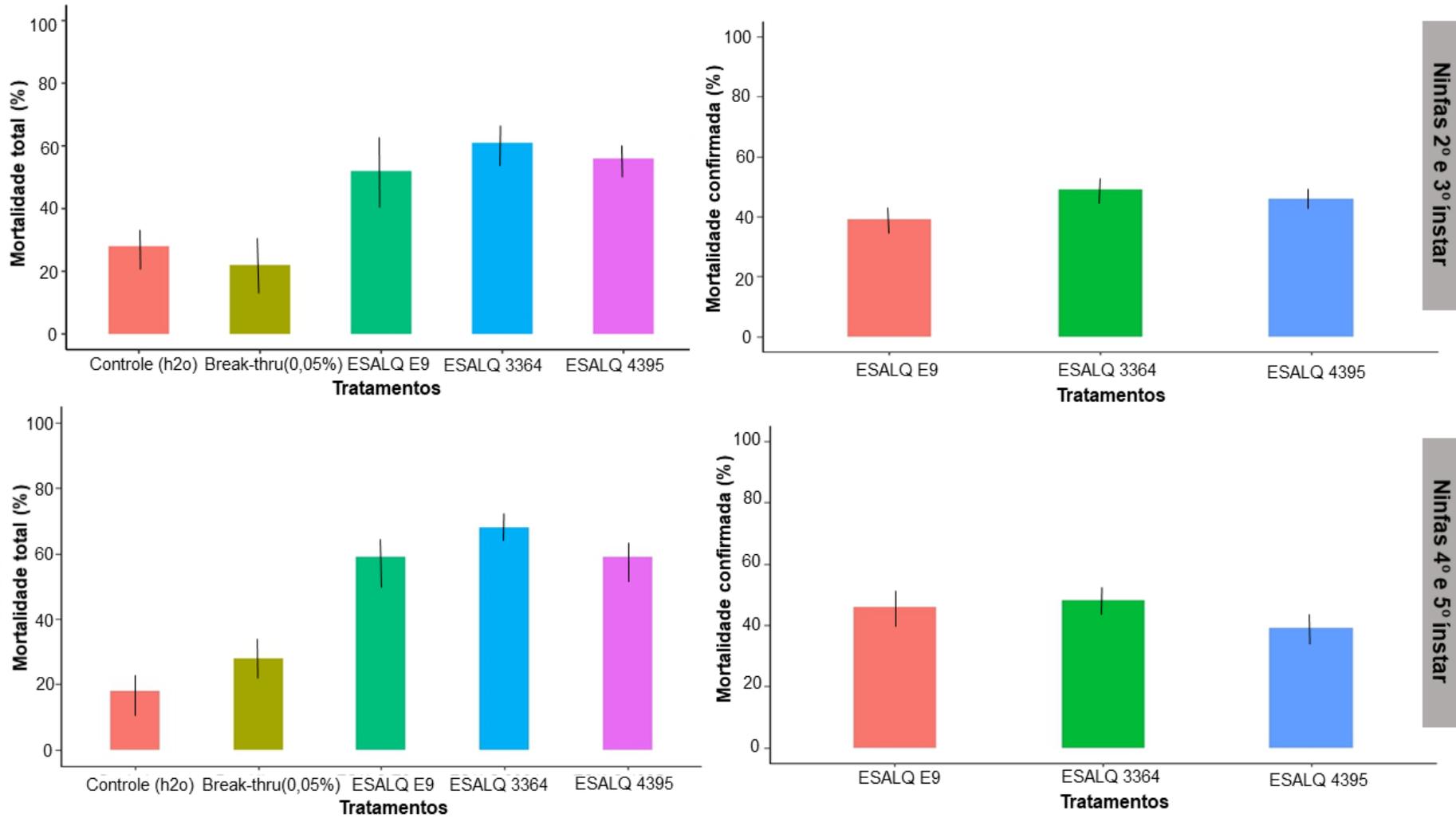


Figura 5. Porcentagem de mortalidade total e mortalidade confirmada (insetos mortos que esporularam) de ninfas de 2 e 3^o ou 4^o e 5^o instar expostas a isolados de *Metarhizium* após 8 dias da inoculação

Tabela 6. Tempo letal médio (TL₅₀) de ninfas de *E. heros* inoculados com isolados de *Metarhizium*

Ínstar	Tempo letal médio (TL ₅₀)		
	Espécie	Isolados	Média (ci 95%)
2° e 3°	<i>M. anisopliae</i>	E9	8 (8 - NA)
	<i>M. pingshaense</i>	3364	7 (7 - 8)
	<i>M. pingshaense</i>	4395	7 (7 - NA)
4° e 5°	<i>M. anisopliae</i>	E9	8 (8 - NA)
	<i>M. pingshaense</i>	3364	7 (7 - 8)
	<i>M. pingshaense</i>	4395	8 (8 - NA)

De forma complementar, a epiderme deixada por alguns insetos após a troca de ínstar foi retirada e submetida a técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o que permitiu a visualização de conídios aderidos em sua superfície (Figura 6).

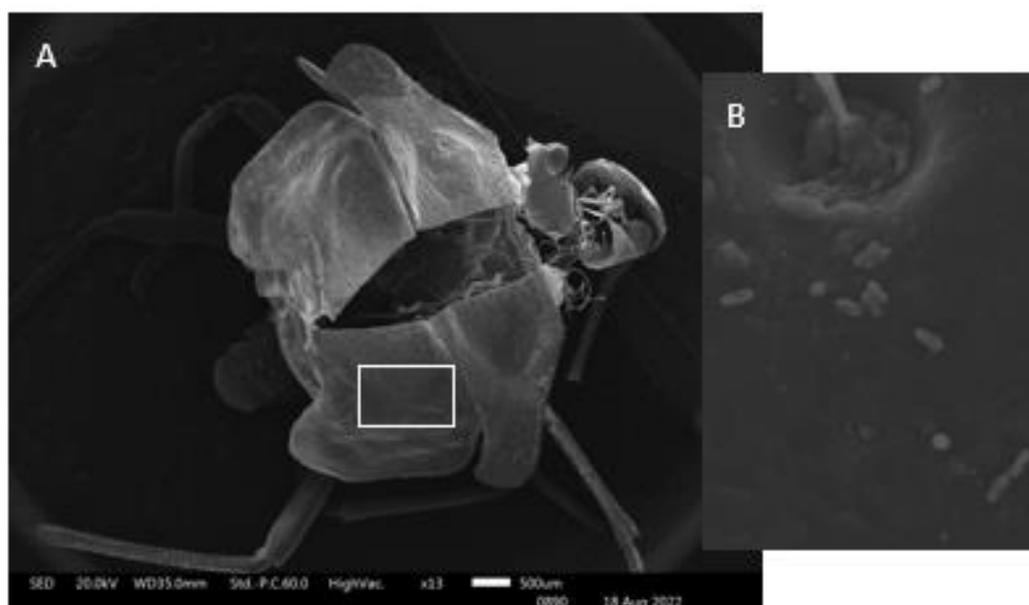


Figura 6. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de exúvia de ninfa de 3° ínstar de *E. heros* após 16 horas da aplicação de um isolado de *Metarhizium*. A) Exúvia com indicação do ponto a ser visualizado (dorso) B) Conídios aderidos na exúvia

2.3.5. Avaliação do efeito ovicida

Apesar da baixa mortalidade observada para as ninfas, os resultados permitiram constatar um efeito ovicida dos isolados de *Metarhizium* sobre ovos recém depositados. A média de eclosão das ninfas após aplicação dos isolados ESALQ 3364, ESALQ 4395 e

ESALQ E9 foi respectivamente 0,5, 0 e 0,16% contra 99,5% ($p < 0,0001$) do tratamento controle (Figura 7).

Para a constatação do efeito ovicida, os ovos foram submetidos a MEV e foi possível observar que o início da germinação se dá de forma semelhante ao observado para insetos adultos (Capítulo 2), ocorrendo por volta de 18h após a infecção (Figura 8). Cabe ressaltar ainda que antes do surgimento externo dos primeiros sinais de infecção, os ovos adquiriram aparência murcha, e quando houve eclosão nos tratamentos com *Metarhizium* as ninfas não sobreviveram e apresentaram sinais como pontos esporulados.

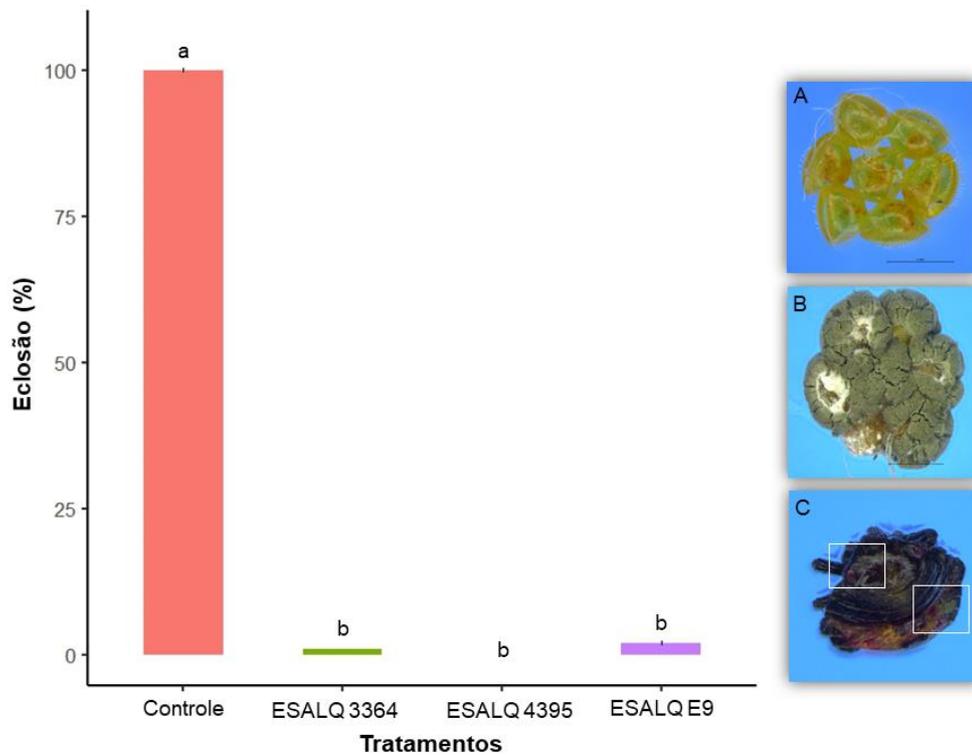


Figura 7. Efeito ovicida de 3 isolados de *Metarhizium* a ovos recém depositados de *E. heros*. Isolado de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9); Isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 3364 e ESALQ 4395) + A) ovos com aspecto ressecado após 3 dias de infecção, B) ovos apresentando conidiação intensa após 10 dias de infecção, C) ninfa morta com sinais de infecção. ($P < 0,05$) *Letras diferentes indicam diferença estatística

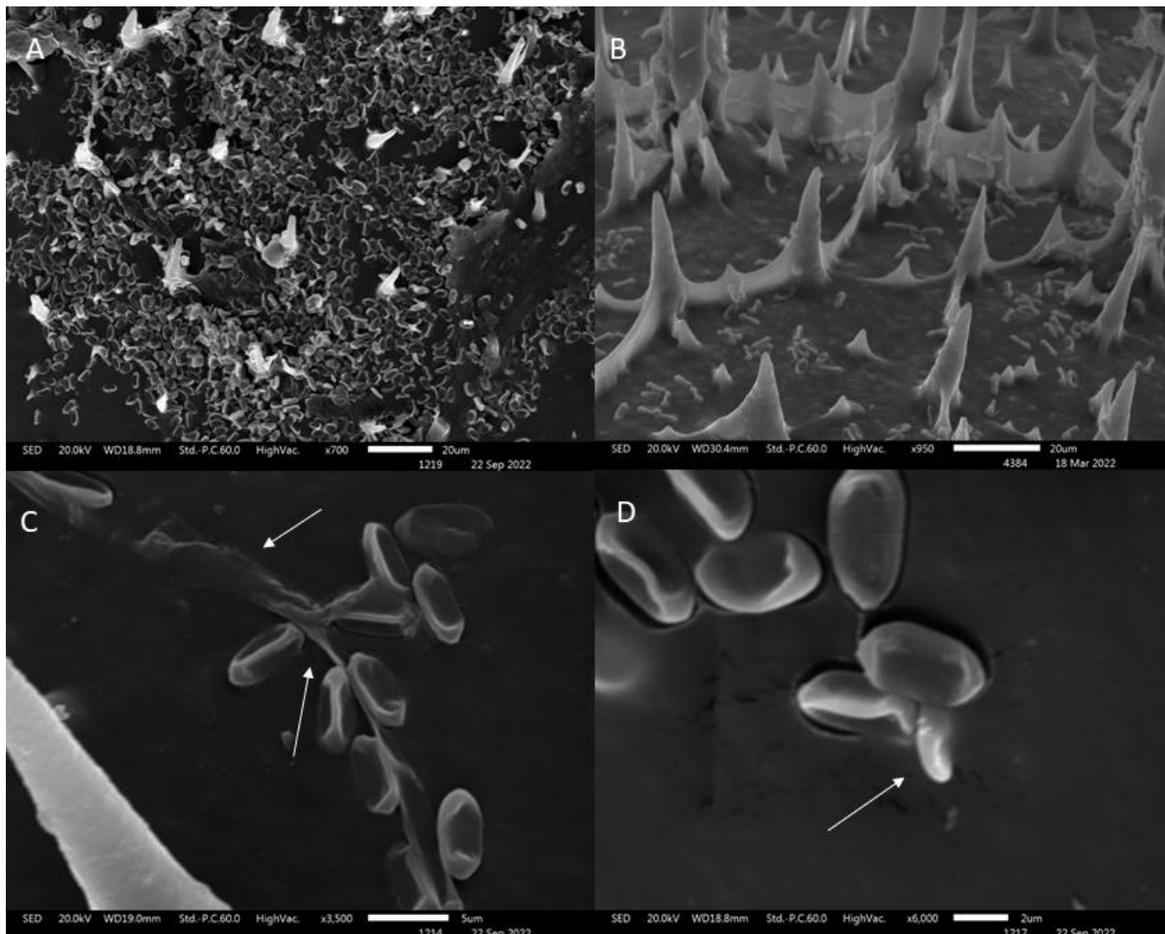


Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de ovos recém depositados de *E. heros* após 18 horas de infecção com o isolado ESALQ 4395. A) Aglomerado de conídios B) Conídios aderidos em diferentes pontos do ovo infectado C e D) Conídios germinados *Tubos germinativos indicados com seta

2.3.6. Análise de microscopia óptica de ovos de *Euschistus heros* infectados por isolados de *Metarhizium*

A partir da observação do efeito ovicida surgiu a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos nesse processo. Com a análise qualitativa das imagens, além da presença das hifas no interior dos ovos foi possível notar a degradação de sua parede pelo crescimento e penetração dos isolados de *Metarhizium* (Figura 9 - F), fato esperado durante o processo de colonização. Não houve diferença entre os isolados de *M. pingshaense* (ESALQ 4395 e ESALQ 3364) e o isolado ESALQ E9 de *M. anisopliae*. Além disso, o uso do corante Sudan Black B possibilitou a identificação de lipídios dentro e fora das hifas em ambas as espécies (Figura 9 - E).

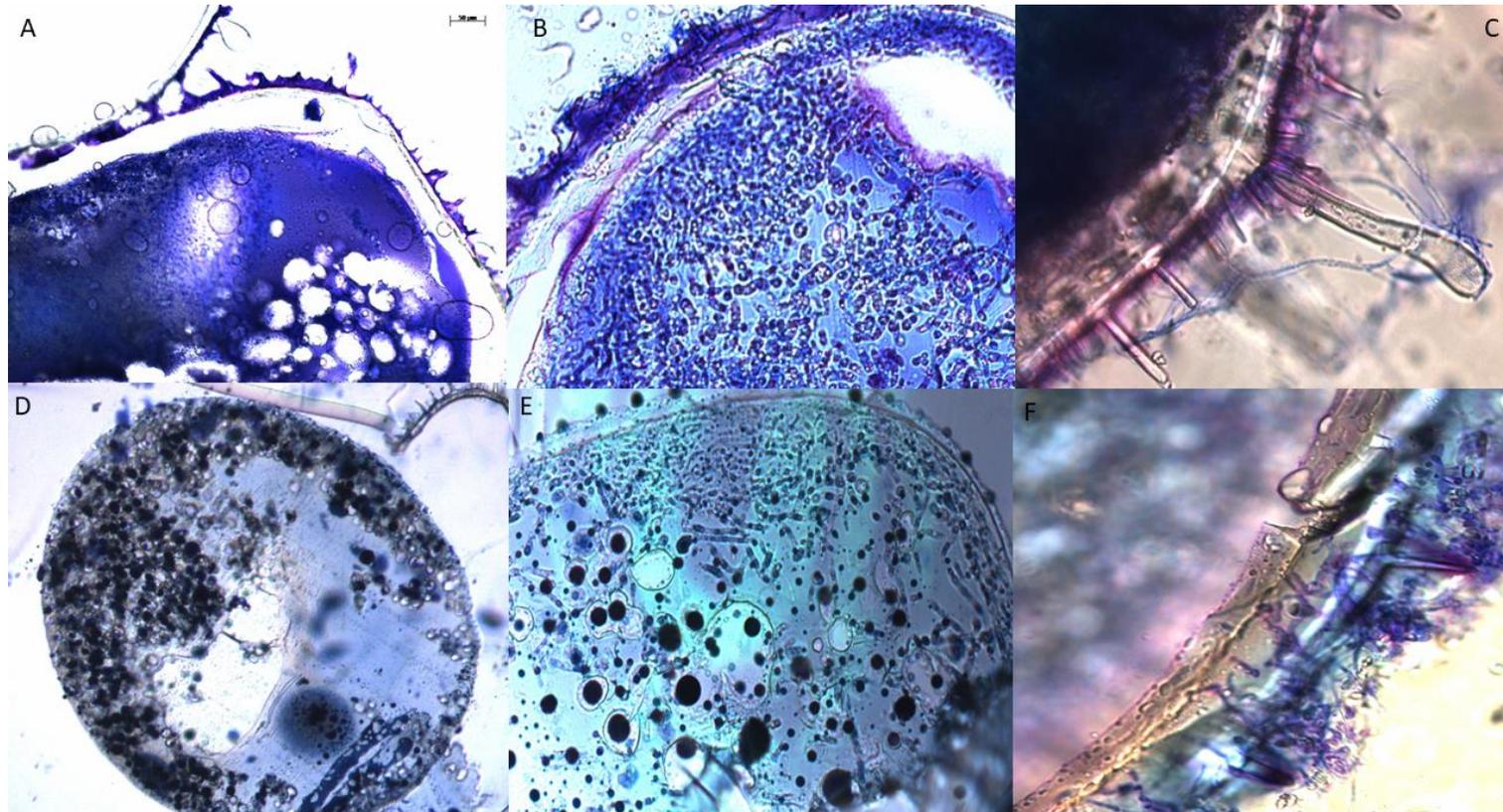


Figura 9. Imagens obtidas a partir da microscopia óptica de ovos infectados com os diferentes isolados *Metarhizium* testados (ESALQ E9, ESALQ 4395 e ESALQ 3364). A) Ovo não infectado (controle) corado com o corante Azul de Toluidina (20x); B) Aglomerado de hifas dentro de ovo infectado corado com o corante Azul de Toluidina (20x); C) Hifa na parte externa do ovo infectado (40x); D) Ovo não infectado (controle) corado com o corante Sudan Black B (20x); E) Aglomerado de hifas dentro de ovo infectado corado com o corante Sudan Black B (20x); F) Crescimento de hifas sobre a parede do ovo (40x)

2.3.7. Desempenho de diferentes adjuvantes na viabilidade fúngica

A dispersão oleosa não proporcionou bom shelf-life para os isolados em questão, visto que em 20 dias praticamente todos os tratamentos encontravam-se abaixo do limite estipulado (50% conídios viáveis), com exceção da viabilidade dos conídios no tratamento com o óleo 1 armazenado sob condições de geladeira. Entretanto, os tratamentos com o óleo 1 na avaliação seguinte (40 dias), já haviam caído drasticamente (Figura 10).

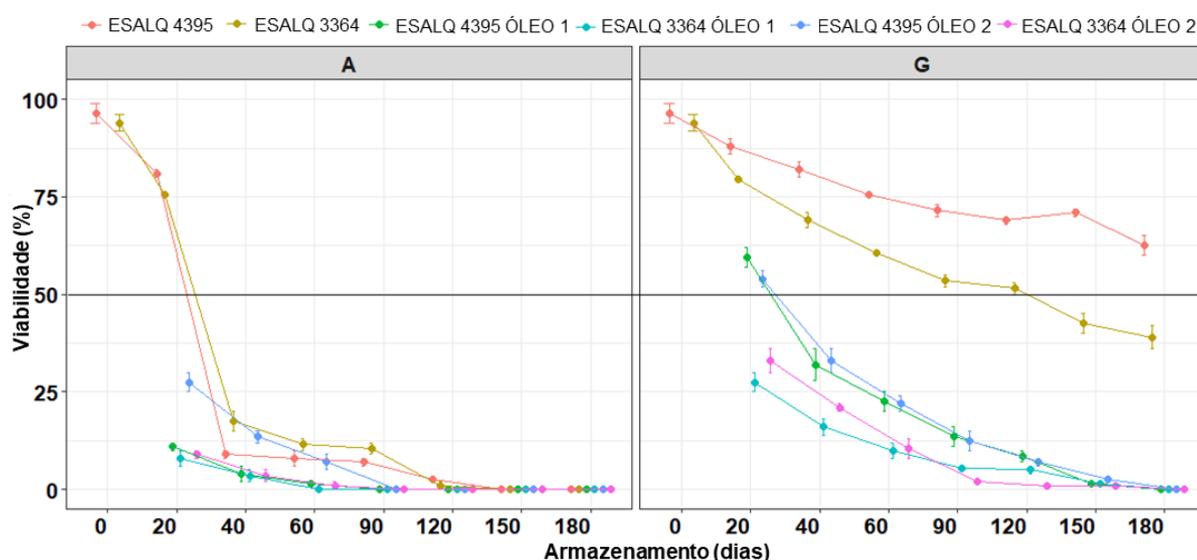


Figura 10. Viabilidade de conídios de dois isolados de *Metarhizium pingshaense* em formulação OD (dispersão oleosa). A= Temperatura ambiente (26°C); G= Geladeira (5°C)

Embora nenhum dos tratamentos tenha se mantido acima do limite, o efeito negativo é ainda mais acentuado para os armazenados em BOD (26°C). A viabilidade dos conídios a 26°C nos controles também caíram rapidamente com valores abaixo de 25% após 40 dias. Em temperatura ambiente aos 60 dias, a grande parte dos formulados já havia atingido viabilidade 0, e na geladeira esse efeito foi observado a partir dos 120 dias.

Já em relação ao WP e os diferentes inertes utilizados para seu desenvolvimento, apesar de os tratamentos armazenados a 26°C (BOD) demonstrarem desempenho inferior quando comparados aos da geladeira, os resultados no geral foram mais animadores que os da dispersão oleosa. Para o isolado ESALQ 4395, o inerte a base de atapulgita manteve a viabilidade por um período de tempo maior em relação a caulinita e a diatomita, principalmente nos tratamentos em BOD (Figura 11). Essa diferença pode ser visualizada inclusive ao comparar o controle (conídio puro) com as formulações, visto que aos 40 dias, enquanto a viabilidade no controle encontrava-se aproximadamente em 10%, a viabilidade

dos tratamentos permaneceu próxima de 50%. Por outro lado, os demais inertes mantiveram a mesma tendência do controle, e foi possível evidenciar que aos 70 dias a formulação contendo diatomita e caulinita apresentaram viabilidade próxima de 0%.

O desempenho do isolado ESALQ 3364 (Figura 12), apesar das formulações serem as mesmas, foi um pouco diferente. Isso se dá porque o próprio controle (conídio puro) diferiu do isolado anterior, visto que para o ESALQ 4395 o mesmo manteve-se acima do limite até o fim da avaliação, enquanto o ESALQ 3364 caiu para menos de 50% a partir dos 130 dias (G), ainda que a atividade de água considerada para ambos tenha se mantido entre 0,1 e 0,3. Além disso, diferente do observado no ESALQ 4395, para o ESALQ 3364 os três inertes utilizados apresentaram desempenho muito semelhante quando armazenados em geladeira, com as formulações à base de atapulgita e caulinita abaixo dos 50% de viabilidade a partir dos 70 dias de avaliação, e as de diatomita a partir dos 100 dias. Por outro lado, 26°C os tratamentos do isolado ESALQ 3364 formulados à base de atapulgita (A) mantiveram-se melhores que o controle, corroborando com o observado para o isolado anterior, onde o inerte em questão apresentou desempenho superior quando comparado aos demais.

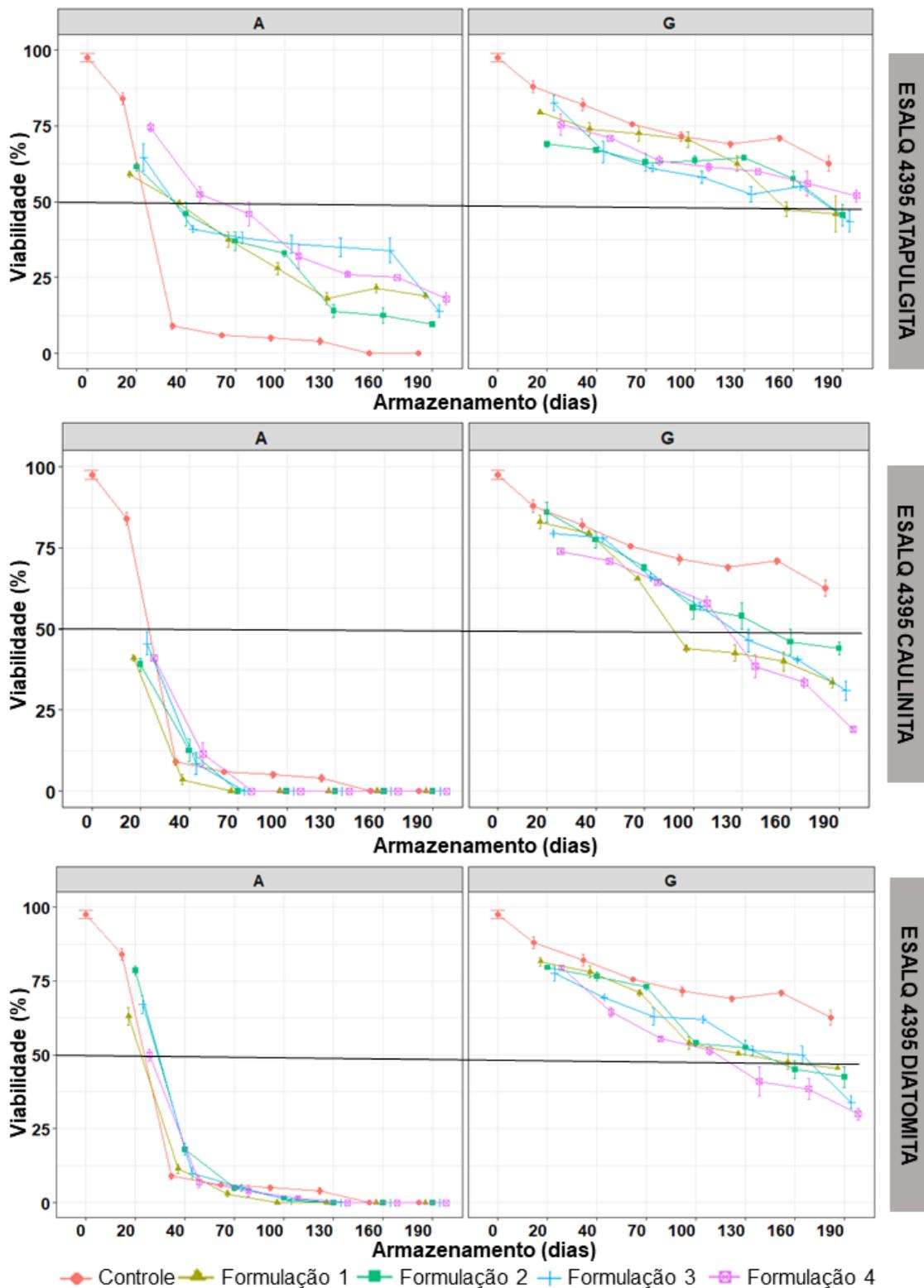


Figura 11. Viabilidade de conídios do isolado ESALQ 4395 de *Metarhizium pingshaense* em formulação WP (pó molhável). A= Temperatura ambiente (26°C); G= Geladeira (5°C)

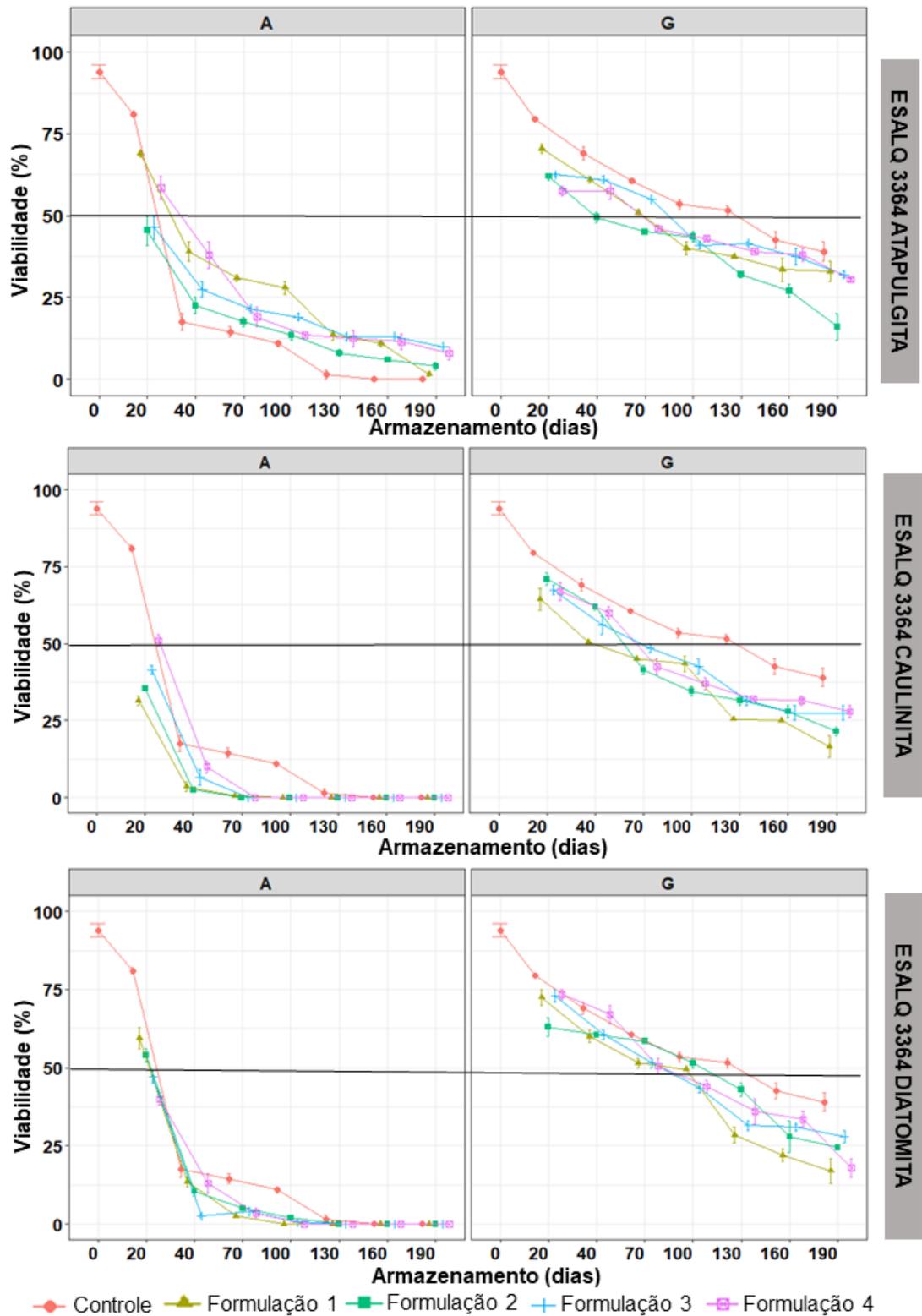


Figura 12. Viabilidade de conídios do isolado ESALQ 3364 de *Metarhizium pingshaense* em formulação WP (pó molhável). A= Temperatura ambiente (26°C); G= Geladeira (5°C)

2.4. Discussão

A virulência dos fungos entomopatogênicos varia de acordo com diferentes fatores, como isolado utilizado, concentração, fase de desenvolvimento do inseto e modo de aplicação (PELIN, 2017). Sendo assim, uma mesma espécie pode apresentar resultados distintos dependendo de suas características intrínsecas e da forma como é manuseada. Apesar do conhecimento acerca dessa variação, inúmeras pesquisas sustentam a hipótese de que os fungos entomopatogênicos apresentam baixa eficiência para controle de pentatomídeos apenas pelo efeito negativo de alguns compostos do feromônio de alarme das espécies, sob o desenvolvimento fúngico.

Nesse sentido, SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI (1998) afirmaram que entre os percevejos que atacam a soja *E. heros* tem sido relatado como um dos mais resistentes a infecções causadas por fungos entomopatogênicos. Em outro estudo foi possível observar que este percevejo foi menos suscetível que *Diceraeus melacanthus* (Dallas, 1851), quando exposto a *Beauveria bassiana* (LOPES et al., 2015). Considerando a virulência de fungos entomopatogênicos a outros pentatomídeos, em estudo desenvolvido com a espécie *Tibraca limbativentris* Stal, 1860, a mortalidade de adultos expostos a cepas de *M. anisopliae* com concentração idêntica à utilizada no presente estudo não alcançou 40%, entretanto a mortalidade de ninfas foi condizente ao observado (cerca de 60%) (SILVA et al., 2015). De forma similar, em estudo de QUINTELA e colaboradores (2013), a mortalidade de adultos dessa mesma espécie a partir da exposição a isolados de *Metarhizium* foi inferior a 50%.

Uma vez que os isolados utilizados em muitos estudos com pentatomídeos não atingem 50% de mortalidade (QUINTELA et al., 2013; SILVA et al., 2015; STACKE, 2021), torna-se difícil encontrar dados de concentração letal média (CL_{50}), e tratando-se da espécie *Metarhizium pingshaense* esses dados são ainda menos acessíveis. Já em estudo desenvolvido por RAAFAT e colaboradores (2015), foi possível determinar concentrações de CL_{50} de $3,2 \times 10^8$ e $2,8 \times 10^{10}$ conídios/mL respectivamente, para isolados de *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces* spp. sob o pentatomídeo *Nezara viridula* (L., 1758). Sabendo que a espécie mencionada também tem sido relatada como resistente a infecções fúngicas, é possível estabelecer uma comparação com *E. heros*. No entanto, nossos resultados indicaram uma concentração mais baixa e essa característica pode ser, dentre outros fatores, mais uma testemunha do alto potencial que as espécies de *Metarhizium* possuem para o controle de percevejos.

Além do potencial das espécies de *Metarhizium* evidenciado no presente estudo, a possível variação descrita inicialmente pode ser observada ao contrastar os estudos anteriores que avaliaram a mortalidade de pentatomídeos infectados com *M. anisopliae* (QUINTELA et al., 2013; SILVA et al., 2015) com o estudo desenvolvido por GROTH (2017), que apesar de apresentar algumas lacunas ao que se refere a metodologia utilizada, a mesma espécie foi efetiva para o controle de pentatomídeos como *N. viridula* e *D. melacanthus*, atingindo 100% de mortalidade após 8 dias de aplicação, corroborando ao observado no presente estudo para *E. heros* com as espécies de *M. humberi*, *M. pingshaense* e *M. robertsii*.

De maneira semelhante, outro estudo mostrou que certos isolados de *M. brunneum* foram capazes de causar 100% de mortalidade para as populações de *E. heros* e *D. furcatus* testadas (RESQUÍN-ROMERO et al., 2020), reforçando a existência da variação, visto que os isolados de *M. brunneum* utilizados no presente estudo não atingiram essa taxa de mortalidade, apesar de terem sido empregadas concentrações inferiores em comparação ao estudo mencionado. Sobretudo, os dados de mortalidade de *E. heros* também podem ter diferido entre alguns trabalhos mencionados, visto que a forma de aplicação foi através de inoculação dorsal (QUINTELA et al., 2013; LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2015), diferente do presente estudo.

Em relação a mortalidade de insetos em estágios de desenvolvimento, em alguns casos os primeiros ínstaros são normalmente mais suscetíveis à infecção por microrganismos, e isso relaciona-se ao fato de os insetos possuírem parede corporal menos espessa em seus estágios iniciais (KIRUBAKARAN et al., 2018). Porém, isolados altamente virulentos são capazes de superar a defesa de indivíduos adultos. Desse modo, é comum esperar por uma relação de mortalidade idade-dependente, mas a mesma pode não ter sido visualizada no estudo em questão. Isso pode ter se dado devido ao fato de que indivíduos dos primeiros estágios ninfais podem driblar o processo infectivo a partir da combinação de três fatores: menor área corporal que resulta em menor número de conídios aderidos; horas iniciais para o início da germinação e rápidas ecdises, que se encarregam de eliminar os conídios antes que estes consigam acessar a hemolinfa do hospedeiro (KIM & ROBERTS, 2012). Fato observado no presente estudo, na exúvia de alguns percevejos (Figura 7).

A mortalidade confirmada seguiu a mesma tendência observada para a mortalidade entre adultos e ninfas, sendo menos acentuada entre os indivíduos dos estágios iniciais. Na manifestação externa da infecção, o início do crescimento fúngico se deu em regiões Inter segmentares, seguido por intensa conidiação que dominou todo o cadáver (LOPES et al., 2015). Ainda que a confirmação tenha sido inferior para ninfas de *E. heros*, a esporulação em

cadáveres é uma característica muito importante para determinar o sucesso de um agente de biocontrole, isso porque esse aspecto permite a disseminação do patógeno em condições de campo, auxiliando-o na sua permanência e no potencial em causar epizootias (SHAN & FENG, 2010).

Em muitos casos os fungos entomopatogênicos não tem efeito ovicida para os insetos estudados. Entretanto, nossos resultados indicaram esse efeito e coincidiram com os de SILVA et al. (2015) e RESQUÍN-ROMERO et al. (2020) ambos para espécies de pentatomídeos (Figura 8). Além disso, o efeito ovicida também já foi documentado para diferentes espécies de *Metarhizium* em *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (ESPINOSA, 2016), *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (SOUSA et al., 2021; 2023), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (MONTECALVO & NAVASERO, 2021) e outros. Por outro lado, este é o primeiro estudo que avalia o efeito ovicida da espécie *M. pingshaense* sobre *E. heros*.

Considerando a escassez de informações acerca do efeito ovicida causado por *M. pingshaense*, uma vez que diversos estudos reforçam a hipótese de que é possível que, apenas a atividade metabólica dos conídios em germinação seja capazes de inviabilizar embriões de insetos sem que haja a penetração física (ST. LEGER et al., 1991; QAZI & KHACHATOURIANS, 2007), tornaram-se necessárias análises histológicas. As análises confirmaram a presença de hifas no interior dos ovos infectados, de forma que foi possível constatar que a infecção ocorreu de forma similar ao que ocorre em insetos adultos de *E. heros* (Figura 10). As análises também permitiram a visualização de lipídios sendo levados para o interior das hifas. A reserva lipídica durante o processo reprodutivo dos insetos garante o desenvolvimento dos ovócitos (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM; 2012), e nesse caso serviram como uma fonte de nutrientes para o microrganismo.

De forma geral, as diferentes formas de aplicação das espécies de *Metarhizium* faz deste fungo um microrganismo com alto potencial para o desenvolvimento de biopesticidas. Todavia, apesar da sua evidente pluralidade para que este seja eficientemente explorado para fins comerciais, sua produção em larga escala precisa ser rentável. Sendo assim, o observado no presente estudo em relação a produção de conídios por meio de fermentação sólida, corroborou com o observado por NEVES (1998), uma vez que a produção obtida para o mesmo isolado de *M. anisopliae* (ESALQ E9) foi de $1,54 \times 10^9$ con/g. De forma similar, FREITAS et al. (2014) e SANTOS (2015), alcançaram concentrações que foram de $1,75 \times 10^9$ a 2×10^9 con/g de arroz, próximo ao observado no presente estudo onde o isolado de melhor desempenho obteve produção de $1,8 \times 10^9$ con/g de arroz.

Sobre a perspectiva da aplicação comercial de fungos entomopatogênicos, a grande missão é oferecer um biodefensivo que possua características semelhantes aquelas observadas em microrganismos recém produzidos, de forma que a manutenção da sua integridade e sua eficiência sejam as maiores possíveis (MACHADO et al., 2013). Dessa forma, o desenvolvimento de formulações é parte crucial para garantir produtos de alta eficiência. Entretanto, essa etapa constitui ainda um desafio, uma vez que a sensibilidade dos microrganismos minimiza a gama de componentes que podem ser empregados.

A sobrevivência e a viabilidade dos propágulos infectivos sofrem influência direta de aspectos bióticos e abióticos, como temperatura e umidade (GOETEL et al., 2000). De forma que, embora exija maiores esforços financeiros, condições de baixa temperatura são melhores para assegurar o maior tempo de armazenamento. STATHERS et al. (1993) ao formular conídios de *M. flavoviride* em óleo de soja observaram que esses se mantiveram viáveis por até três meses em refrigeração, enquanto os que permaneceram em temperatura de 25°C a 35°C perderam a viabilidade em 15 dias. Esses dados corroboram com nossos resultados onde as formulações oleosas em temperatura ambiente perderam a viabilidade total em 60 dias de armazenamento, contra 120 dias quando mantidas sob refrigeração, ainda que nenhuma delas tenha apresentado desempenho superior quando comparada ao ingrediente ativo puro (Figura 11).

Independente das condições de temperatura, PRIOR e colaboradores (1988) afirmaram em seu estudo que formulações oleosas mostram-se superiores às demais. Contrastando essa afirmação e corroborando com o observado no presente estudo, ao avaliar o efeito de formulações aquosas, oleosas, granuladas e em pó sob um isolado de *M. anisopliae*, DAOUST & ROBERTS (1983) constataram que as formulações granuladas e em pó apresentaram desempenho superior quando comparadas às demais sob as mesmas condições de armazenamento.

Além do desempenho das formulações WP em relação às oleosas, aquelas com o inerte a base de atapulgita apresentaram potencial superior quando comparadas ao ingrediente ativo puro em condições de temperatura ambiente. Sob refrigeração esse inerte também apresentou desempenho superior para o isolado ESALQ 4395 em relação a caulinita e a diatomita, uma vez que ao fim da avaliação suas formulações mantiveram-se acima ou muito próximas do limite estabelecido em 50% de viabilidade (Figura 12). Apesar do atraente desempenho da atapulgita sob refrigeração, seria importante que a mesma demonstrasse desempenho superior ao controle, assim como foi possível observar nas condições de

temperatura ambiente para os dois isolados, pois essa característica indica alguma proteção aos conídios e torna justificável o empenho para o desenvolvimento da formulação.

Embora todos os inertes utilizados serem constituintes do grupo das argilas, a atapulgita diferentemente da caulinita e diatomita, não vem sendo amplamente utilizada como inerte para o desenvolvimento de produtos agrícolas. A atapulgita tem sido empregada como um absorvente de óleos (COELHO et al., 2007), e seu desempenho poderia ser justificado por essa característica. Porém, a diatomita também apresenta a capacidade de absorção, além da sua alta abrasividade (FRANÇA et al., 2008). Apesar do baixo protagonismo no desenvolvimento de produtos agrícolas, em trabalho desenvolvido por FREITAS et al. (2011), um inerte a base de atapulgita foi utilizado para avaliar a eficácia de um polissacarídeo proveniente de alga, em induzir resistência em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) contra o causador da antracnose *Colletotrichum lindemuthianum*, entretanto seu desempenho não foi satisfatório quando comparado aos demais inertes, uma vez que o mesmo não apresentou efeito sinérgico.

Ainda que o efeito da temperatura tenha sido bem representado pelos resultados obtidos, visto que altas temperaturas são capazes de danificar e inviabilizar os conídios, a seleção de isolados naturalmente termotolerantes ajudaria a melhorar a eficácia dos fungos no controle de pragas (FERNANDES et al., 2015). Desse modo, a umidade tem um papel secundário para o desenvolvimento fúngico, embora sua ausência seja de suma importância para assegurar um maior tempo de prateleira devido a redução da atividade metabólica. Em estudo conduzido por HONG e colaboradores (2001), uma umidade acima de 5% influenciou negativamente a longevidade dos conídios armazenados. De forma similar, outros estudos também confirmam a influência negativa das altas umidades para o armazenamento de conídios puros ou formulados (HEDGECOCK et al., 1995; MOORE et al., 1996, SANYANG, 2000).

Considerando essa característica, embora no presente estudo a atividade de água (WA) no momento do armazenamento tenha estado abaixo de 0,3 não foi possível obter, ao fim da avaliação, conídios com alta viabilidade. Além da umidade, outros fatores podem e devem ter influenciado o resultado obtido. Prezando pela qualidade dos bio defensivos a viabilidade para utilização em campo deve ser igual ou superior a 85% (JENKIS & GRZYWACZ, 2000), e mesmo sob refrigeração, nossos melhores resultados mantiveram-se próximos de 50% após os 6 meses de avaliação. Sendo assim, de forma a aprimorar e viabilizar a utilização desses isolados em campo, esforços precisam ser concentrados em prol do aperfeiçoamento das técnicas que envolvem a etapa de formulação.

Referências

- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed, vol. 4. Piracicaba: FEALQ, 1998
- ATELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D. & GONDIM, K. C. Metabolismo de Lipídios. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. INCT – EM. Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- ARAÚJO, E.S.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, n.11, p.1281-1288, 2003.
- CAMPBELL, B. E. & MILLER, D. M. Resistance in eggs and first instars of the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Insects*, v. 6, p.122-132, 2015.
- CAMPBELL, B. E.; PEREIRA, R. M. & KOEHLER, P. G. Complications with controlling insect eggs. pp. 83-96. *In Insecticide resistance*. Intechopen, Rijeka, Croatia, 2016.
- COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S. & SANTOS, H. S. Argilas especiais: O que são, caracterização e propriedades. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p. 146-152, 2007.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PANIZZI, A.R. Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 45p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 24), 1999.
- DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41: 143-150, 1983.
- ESPINOSA, D. J. L. Susceptibilidade de *Bemisia tabaci* Biótipo B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) a fungos entomopatogênicos. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Dissertação de mestrado, p. 34, 2016.
- FARIA, M. R. & WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256, 2007.
- FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L. & ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015.
- FRANÇA, S. C. A.; LUZ, A. B. & INFORÇATI, P. F. Diatomita. 2008 Disponível em: <http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/1109/1/20.%20Diatomita%20%28Rev%20Adao%20e%20Silvia%20-%20fev%202008%29.pdf> Acesso em: Maio 2023.
- FREITAS, M. B.; MEDUGNO, C. C.; SCHONS, R. F. & STADNIK, M. J. Eficiência de formulações de ulvana em induzir resistência em *Phaseolus vulgaris* contra *Colletotrichum lindemuthianum*. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, 1, 045-049, 2011.
- FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S.; ALMEIDA, M. E. B. & PESSOA, L. G. A. Yield of conidia and germination of different isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok (Ascomycota: Clavicipitaceae) grown on rice. *Scientific Communication, Agricultural Entomology*. Arq. Inst. Biol. 81 (01), 2014.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Fungi. *In: GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 255-282, 2000.

- GROTH, M. Z. Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus *Metarhizium anisopliae*. Australian Journal of Crop Science, v.11, n.3, p. 360, 2017.
- HEDGECOCK, S. MOORE, D. HIGGINS, P. M. & PRIOR, C. Influence of moisture content on tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conia in oil formulation. Biocontrol Science and Technology, v. 5, p. 371-377, 1995.
- HONG, T. D.; GUNN, J.; ELLIS, R. H.; JENKIS, N. E. & MOORE, D. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. Mycological Research, v. 105, p. 597-602, 2001.
- IWANICKI, N. S.; DELALIBERA-JR, I.; FARIA, M. R.; LOPES, R. B.; SANCHES, M. M.; SOUZA, M. L.; SEIXAS, C. D. S. & SOSA-GÓMEZ, D. R. Controle de qualidade de produtos microbiológicos. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. Embrapa – Distrito Federal, Brasília, 2022.
- JENKIS, N. E. & GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents – Assurance of products performance. Biocontrol Science and Technology, v. 10, p. 753-777, 2000.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cellular Biology, v.27, p.137-138, 1965.
- KIM, J. J. & ROBERTS, D. W. The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypi*, to conidia of *Lecanicillium attenuatum*, an entomopathogenic fungus. Biocontrol Science and Technology, 22:3, 319-331, 2012.
- KIRUBAKARAN, S. A.; ABDEL-MEGEED A. & SENTHIL-NATHAN, S. Virulence of selected indigenous *Metarhizium pingshaense* (Ascomycota: Hypocreales) isolates against the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guennée) (Lepidoptera: Pyralidae). Physiol. Mol. Plant. Pathol. 101, pp. 105-115, 2018.
- LACEY, L.A.; GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for early 21st century. Entomophaga, v. 40, p. 1-25, 1995.
- LATIFIAN, M. Physicochemical properties affects on different oil formulations on fungus *Metarhizium anisopliae* for control of *Oryctes elegans*. Journal of Entomology, 1812-5670, 2018.
- LOPES, R. B.; LAUMANN, R. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M. & FARIA, M. 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, pp. 77-85, 2015.
- MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A. & MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae* based bioherbicide. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 392-399, 2013.
- MARQUES, J. P. R. & NUEVO, L. G. Double-Staining Method to Detect Pectin in Plant-Fungus Interaction. [J. Vis. Exp.](#) (180), e63432, 2022.
- MONTECALVO, M. P. & NAVASERO, M. M. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). J Int Soc Southeast Asian Agric Sci, v. 27, n. 1, p. 15-26, 2021.
- MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O. K.; JENKIS, N. E. & LOMER, C. J. Effects of moisture content and temperatura on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. Biocontrol Science and Technology, v. 6, p. 51-61, 1996.

- NEVES, P. M. O. J. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae). 1998. 113p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- PANIZZI, A. R.; LUCINI, T. What happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible reasons to explain populations decline. *Neotropical Entomology*, v. 45, p. 619-628. DOI: 10.1007/s13744-016-0446-2, 2016.
- PELIN, M. L. Efeito de bioinseticidas à base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Dichelops melacanthus* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos – PR, 2017.
- PEÑA-PEÑA, A. J.; SANTILLÁN-GALICIA, M. T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. & GUZMÁN-FRANCO, A. W. *Metarhizium pingshaense* applied as a seed treatment induces fungal infection in larvae of the white grub *Anomala cincta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 130, p. 9-12, 2015.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.52, p.66-72, 1988.
- QAZI, S. S. & KHACHATOURIANS, G. G. Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal Invertebrate Pathology*, 95, pp. 48-59, 2007.
- QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SILVA, R. A.; BARRIGOSI, J. A. F.; MARTINS, J. F. Enhanced susceptibility of *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) to *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of chemical insecticides. *Biological Control*, v. 66, n. 1, p. 56-64, 2013.
- RAAFAT, I.; MESHRAF, W. S.; EL-HUSSEINY, E. M.; SEIF, A. I. & EL-HARIRY, M. *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) Cuticle as a Barrier for *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces* sp. Infection. *African Entomology*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.75-87, 2015.
- RESQUIN-ROMERO, G.; CABRAL-ANTÚNEZ, C.; SARUBBI, ORUE, H.; GARRIDO-JURADO, I.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SCHADE, M. BUTT, T. M. Virulence of *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) strains against stinkbugs *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*. 113, 5, 2540-2545, 2020.
- SANYANG, S.; VAN EMDEN, H. F. & MOORE, D. Laboratory shelf-life of oil-formulated conidia of the locust and grasshopper fungal pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal, in mixtures with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Journal of Pesticide Management*, v. 6, p. 165-168, 2000.
- SANTOS, P. S. Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP – Piracicaba – São Paulo, 77p, 2015.
- SHAN, L. T. & FENG, M. G. Evaluation of the biocontrol potential of various *Metarhizium* isolates against green peach aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) *Pest Manag. Sci.*, 66, pp. 669-675, 2010.
- SILVA, R. A.; QUINTELA, E.; MASCARIN, G. M.; PEDRINI, N.; LIÃO, L. M. & FERRI, P. H. Unveiling chemical defense in the rice stalk stink bug against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 127, 93–100, 2015.

- SOMAVILLA, J. C.; REIS, A. C.; GUBIANI, P. S.; GODOY, D. N.; STURMER, G. R. & BERNARDI, O. Susceptibility of *Euchistus heros* and *Dichelos furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae) to selected insecticides in Brazil. *Journal of Economic Entomology*. 113(2):924-931, 2019.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. & MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* and *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, pp. 115-120, 1998.
- SOSA-GÓMEZ D. R. & OMOTO, C. Soja, Manejo integrado de insetos e outros artrópodes praga: Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Embrapa Soja. Cap 10, 673-711, 2012.
- SOUSA, N. A.; RODRIGUES, J.; LUZ, C. & HUMBER, R. A. Exposure of newly deposited *Aedes aegypti* eggs to *Metarhizium humberi* and fungal development on the eggs. *Journal of Invertebrate Pathology*, V. 197, 107898, ISSN 0022-2011, 2023.
- SOUSA, N. A.; RODRIGUES, J.; ARRUDA, W.; HUMBER, R. A. & LUZ, C. Development of *Metarhizium humberi* in *Aedes aegypti* eggs. *Journal of Invertebrate Pathology*, V. 184, 107648, ISSN 0022-2011, 2021.
- STACKE, R. S. Métodos de inoculação de *Beauveria bassiana* no percevejo *Euchistus heros* e compatibilidade com inseticidas químicos e adjuvantes. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 40p, Dissertação de Mestrado, 2021.
- STATHERS, T. E.; MORRE, D. & PRIOR, C. The effect of different temperature on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 62, p. 111-115, 1993.
- ST. LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W. & STAPLES, R. C. Prepenetration events during the infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal Invertebrate Pathology*, 58, pp. 168-179, 1991.
- TAKADA, H.M. Patogenicidade e seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuill. para o controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae). 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

3. INFLUÊNCIA DOS MECANISMOS DE DEFESA DE *Euschistus heros* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) DURANTE O PROCESSO INFECTIVO DE ESPÉCIES DE *Metarhizium* spp.

Resumo

A baixa susceptibilidade do percevejo da soja *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) à infecção por fungos entomopatogênicos tem sido associada a emissão de compostos voláteis capazes de inibir ou reduzir a germinação de conídios. Essa característica dificulta o desenvolvimento de bioinseticidas para o controle desse inseto, que tem sido reportado como uma das pragas mais importantes da soja no Brasil. Em estudos anteriores, isolados de *Metarhizium pingshaense* apresentaram efeito ovicida e alto desempenho em controlar adultos dessa espécie. Neste contexto, o presente trabalho buscou compreender melhor a interação entre os fungos entomopatogênicos e os voláteis liberados por *E. heros* a partir de testes *in vitro* e *in vivo* com um isolado de *M. pingshaense* (ESALQ 4395) e um de *M. anisopliae* (ESALQ E9) que não foi tão efetivo em controlar a espécie anteriormente. O objetivo geral concentrou-se em buscar evidências que pudessem relacionar o baixo desempenho de *M. anisopliae* a emissão dos compostos com atividade antifúngica. Nos testes *in vivo* para avaliar se a adesão e germinação de conídios eram afetadas pela emissão dos compostos voláteis pela glândula metatorácica (MTG), adultos de *E. heros* foram imersos em suspensão fúngica (1×10^8 con/mL), mantidos à 26°C por diferentes períodos de tempo e fotografados por microscópio eletrônico de varredura. A emissão de voláteis foi avaliada com insetos sadios e infectados mantidos em câmaras de vidro para a coleta dos feromônios, e a extração de hidrocarbonetos foi obtida após lavagens sucessivas desses insetos em hexano destilado. A identificação foi feita por cromatografia CG-EM e a quantificação por CG-DIC. Nos testes *in vitro*, os isolados foram expostos de duas formas diferentes a compostos sintéticos que estão entre os majoritários para a espécie em questão, para avaliar a germinação e crescimento fúngico. As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram que a adesão é favorecida em regiões intersegmentares ou com a presença de cerdas como antenas, tíbias e tarsos. A germinação tem início a partir de 18h após a infecção, e a presença da glândula metatorácica parece não influenciar esse padrão, já que conídios aderiram e germinaram muito próximos dessa região. A coleta de feromônios indicou que a emissão não difere entre insetos infectados e sadios e os compostos majoritários foram (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, 4-oxo-(*E*)-hexenal e tridecano. O perfil quantitativo dos hidrocarbonetos não apresentou diferença entre os insetos infectados, e em relação a sua identificação, estes majoritariamente são classificados como *n*-alcanos. Para os testes *in vitro*, a menor concentração 10µg de todos os tratamentos não apresentou efeito negativo sobre a germinação e crescimento fúngico, bem como todas as concentrações de tridecano. Entretanto, a concentração de 10µg do tratamento blend sob o isolado ESALQ 4395 parece estimular a germinação fúngica ao ser comparada com o controle. Os resultados obtidos sugerem que o efeito negativo que vem sendo documentado ocorre em concentrações superiores à liberação normal observada no teste de extração. A menor concentração além de não afetar o desenvolvimento fúngico parece apresentar algum tipo de interação benéfica para a espécie *Metarhizium pingshaense*.

Palavras-chave: Feromônio de alarme, interação patógeno-hospedeiro; compostos voláteis; controle microbiano.

Abstract

Influence of defense mechanisms of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) during the infective process of *Metarhizium* spp.

The low susceptibility of the soybean bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) to infection by entomopathogenic fungi has been associated with the emission of volatile compounds capable of inhibiting or reducing conidial germination. This characteristic makes it difficult to develop bioinsecticides to control this insect, which has been identified as one of the most important soybean pests in Brazil. In previous studies, isolates of *Metarhizium pingshaense* showed an ovicidal effect and high performance in controlling adults of this species. In this context, the present study aimed to understand better the interaction between entomopathogenic fungi, and the volatiles released by *E. heros* through *in vitro* and *in vivo* tests using an virulent isolate of *M. pingshaense* (ESALQ 4395) and one of *M. anisopliae* (ESALQ E9) that was not as effective in controlling the species previously. The overall objective focused on seeking evidence that could associated the low performance of *M. anisopliae* to the emission of compounds with antifungal activity. In the *in vivo* tests to assess whether the adhesion and germination of conidia were affected by the emission of volatile compounds, adults of *E. heros* were immersed in fungal suspension (1×10^8 con/mL) and kept at 26°C for different periods and photographed by a scanning electron microscope. The emission of volatiles was evaluated with healthy and infected insects kept in glass chambers to collect volatiles, and the extraction of hydrocarbons was obtained after successive washings of these insects with distilled hexane. Identification was performed by GC-MS chromatography and quantification by GC-FID. In the *in vitro* tests, the isolates were exposed in two different ways to synthetic compounds that are among the main ones for the species in question for evaluating germination and fungal growth. The scanning electron microscopy (SEM) images indicated that adhesion is favored in intersegmental regions or areas with bristles, such as antennae, tibiae, and tarsi. Germination starts approximately 18 hours after infection, and the presence of the metathoracic gland does not seem to influence this pattern, as conidia adhered and germinated very close to this region. The collection of pheromones indicated that the emission did not differ between infected and healthy insects, and the major compounds were (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, 4-oxo-(E)-hexenal and tridecane. The quantitative profile of hydrocarbons showed no difference between the infected insects, and as for their identification, they are mainly classified as n-alkanes. For *in vitro* tests, the lowest concentration of 10 µg for all treatments as well as all tridecane concentrations did not negatively affect fungal germination and growth. However, the concentration of 10 µg for the blend treatment under the isolate ESALQ 4395 seems to stimulate fungal germination compared to the control. The results suggest that the documented negative effect occurs at concentrations higher than the regular release observed in the extraction test. The lowest concentration seems to have some beneficial interaction for *Metarhizium pingshaense*.

Key-words: Alarm pheromone, host-pathogen interaction; volatile compounds; microbial control.

3.1. Introdução

O percevejo marrom (*Euschistus heros*) tem sido responsável por significativas perdas econômicas na sojicultura (PANIZZI, 2015). Embora o controle dessa praga seja predominantemente realizado por meio da aplicação de inseticidas químicos (BUENO et al., 2013), esses métodos já não apresentam um desempenho satisfatório devido a problemas de resistência que se espalham pelo país (SOSA-GÓMEZ et al., 2001; SOSA-GÓMEZ & SILVA, 2010; TUELHER et al., 2018). Em contrapartida, o mercado de biodefensivos está em ascensão, movimentando mais de 4 bilhões de dólares no mundo (CropLife, 2022). Apesar de o controle biológico com fungos entomopatogênicos para o controle de *E. heros* ser uma possibilidade, alguns estudos não resultaram em controle satisfatório para esta praga.

Isso porque os insetos naturalmente possuem inúmeras defesas, começando pela cutícula que é a primeira barreira contra infecções. De acordo com PEDRINI et al. (2013), além da composição lipídica amplamente conhecida, a cutícula dos insetos contém componentes bioquímicos, como fenóis antimicrobianos, inibidores de enzimas e proteínas que os patógenos precisam superar para garantir uma infecção bem-sucedida. Além disso, como se essa barreira já não fosse forte o suficiente, os percevejos pentatomídeos ainda possuem um mecanismo extra, a emissão de semioquímicos voláteis (PAREJA et al., 2007; MORAES et al., 2008).

Estudos anteriores que avaliaram a composição dos voláteis emitidos por espécies de percevejos identificaram diversos compostos químicos, destacando-se os aldeídos, que foram encontrados em concentrações mais elevadas (MORAES et al., 2008) e já foram relatados como compostos defensivos contra predadores (GILBY & WATERHOUSE, 1967). Além disso, a interação desses voláteis com fungos entomopatogênicos já foi estudada, revelando efeitos fungicidas ou fungistáticos para espécies como *Metarhizium anisopliae* (BORGES et al., 1993; SOSA-GÓMEZ et al., 1997; SILVA et al., 2015, ULRICH et al., 2015) ou *Beauveria bassiana* (LOPES et al., 2015).

Apesar da existência da barreira adicional proporcionada pelos voláteis emitidos por percevejos, os fungos entomopatogênicos podem continuar sendo uma alternativa viável para promover o controle eficiente desses insetos (GROTH, 2017). Isto porque alguns resultados (vide Capítulo 1), evidenciaram a capacidade de diferentes isolados de *Metarhizium* em causar altas taxas de mortalidade em *E. heros*. Sendo assim, compreender o efeito dos voláteis na germinação e crescimento fúngico *in vitro* e *in vivo*, bem como comparar a concentração de hidrocarbonetos cuticulares após a infecção pelos fungos se fazem necessários. Para isso,

neste capítulo foram estudados aspectos relacionados à interação dos voláteis com o processo infeccioso buscando compreender se o baixo desempenho de alguns isolados estaria relacionado aos aspectos supracitados. Para essa avaliação foram utilizados um isolado de *Metarhizium pingshaense*, espécie que apresentou bom desempenho e até então não havia sido documentada como potencial controladora de pentatomídeos, e um isolado de *Metarhizium anisopliae* que embora venha sendo comercialmente utilizado, não apresentou taxas de mortalidade tão significativas.

3.2. Material e Métodos

As etapas descritas na metodologia foram realizadas no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia, situados no *campus* da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo.

3.2.1. Criação de *Euschistus heros*

Os insetos utilizados nos experimentos foram obtidos da criação da empresa Koppert Biological Systems (Charqueada, SP). Os insetos foram mantidos em gaiolas de plástico cobertas com voil, com dieta natural composta por vagens de feijão e amendoim a 26°C.

3.2.2. Isolados fúngicos e preparo de suspensões

Todos os isolados utilizados pertencem a Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP). Para o desenvolvimento deste capítulo, foram utilizados isolados de duas espécies do gênero *Metarhizium*: *M. anisopliae* e *M. pingshaense*. Esses isolados foram obtidos de amostras de solo de diversas localidades e recuperados do solo através da metodologia de isca viva ou meio seletivo (Tabela 1). Os isolados estão preservados em glicerol 10% e armazenados em freezer a -80°C. Após descongelar, estes foram cultivados em meio de cultivo BDA (Batata

Dextrose e Ágar) e mantidos a 26°C com fotoperíodo de 12h, por aproximadamente 7 dias. As placas esporuladas foram utilizadas para o preparo de suspensões utilizadas nos bioensaios.

Para o preparo das suspensões, os conídios de cada isolado foram raspados das placas e acondicionados em tubos cônicos tipo Falcon®. Os conídios foram suspensos em 10 mL de solução de Break-thru® S 255 (Evonik Industries) a 0,05%. O ajuste para a concentração desejada de conídios foi feito a partir de uma diluição seriada da suspensão inicial. A contagem foi feita em uma câmara de Neubauer usando a terceira diluição, em microscópio óptico (400x ampliação). A concentração da suspensão foi ajustada de acordo com a necessidade de cada experimento.

Tabela 1. Informações sobre os isolados do gênero *Metarhizium* utilizados

Gênero	Procedência	Coletor	Data	Isolamento	Isolado (ESALQ)
<i>M. anisopliae</i>	Boca da Mata (AL)	*	05/05/81	<i>Mahanarva posticata</i>	E9
<i>M. pingshaense</i>	Amazônia-Solo-Banana - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	09/03/13	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	3364
<i>M. pingshaense</i>	Amazônia-Solo-Milho - Sinop (MT)	Ana Beatriz R. Zanardo	23/03/13	IB- <i>Tenebrio molitor</i>	4395

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *E. heros* infectados com isolados de *Metarhizium*

Para avaliar a adesão e germinação dos conídios, adultos de *E. heros* foram expostos a uma suspensão dos isolados selecionados de *M. pingshaense* (ESALQ 4395 e ESALQ 3364) e *M. anisopliae* (ESALQ E9). A suspensão foi ajustada a uma concentração de 1×10^8 conídios/mL e aplicada por imersão, garantindo que todas as partes do inseto fossem cobertas. Após a aplicação os insetos foram mantidos a 26°C durante os períodos de 18, 20, 24, 30 e 36 horas para determinar o tempo necessário para a germinação dos conídios. Após esses intervalos de tempo, os insetos foram congelados para interromper o crescimento fúngico.

Para fixação, os insetos foram expostos ao vapor de ósmio (OsO_4) por 24h, e posteriormente foram colocados em sílica por algumas horas.

Após a secagem, os espécimes foram fixados em um porta-amostra (stub) usando fita dupla face de carbono, metalizados com ouro em um equipamento sputtering (Balzers SCD 050) e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-IT300 operado a 15,0 kV).

3.2.4. Extração e quantificação do feromônio de alarme de *E. heros*

Os percevejos foram submetidos a três tratamentos: (i) controle, consistindo em uma suspensão de Break-thru a 0,05%; (ii) exposição a um isolado de *M. pingshaense* (ESALQ 4395) e (iii) exposição a um isolado de *M. anisopliae* (ESALQ E9). Os insetos foram submetidos a uma concentração de 5×10^7 conídios/mL aplicado por Torre de Potter. Para a coleta do feromônio, 5 indivíduos de cada tratamento foram colocados em câmaras de vidro (volume interno 300mL), conectadas a um sistema de coleta de voláteis ARS[®] por meio de mangueiras de politetrafluoretileno (PTFE), e além dos insetos, vagens foram dispostas para que os mesmos pudessem se alimentar durante o experimento. No sistema de coleta de voláteis, o ar foi introduzido nas câmaras por meio de um compressor com fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$, passando por um filtro de carvão ativado para garantir a purificação do ar. A saída do ar foi direcionada para um tubo de vidro contendo um polímero adsorvente (50mg, HayeSep, Supelco, PA, EUA) onde os voláteis eram retidos.

Foram realizadas seis repetições para cada tratamento. Após 24, 48 e 72h, os voláteis retidos no polímero adsorvente foram eluídos com 500 μL de hexano destilado. Uma alíquota de 10 μL do composto β -cariofileno, preparado em hexano destilado a uma concentração final de 0,01mg/mL, foi adicionada a cada amostra como padrão interno (PI). As amostras com PI foram concentradas para 50 μL sob fluxo suave de N_2 e armazenadas a -30°C até sua utilização em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de ionização de chamas (CG-DIC) e CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM). Para a estimativa de liberação de voláteis por insetos, os valores obtidos foram divididos por 5 (número de insetos por cuba).

3.2.5. Análises químicas do feromônio de alarme de *E. heros* por cromatografia gasosa

Para as análises quantitativas foram injetados 2 μ L de cada amostra, provenientes da coleta do feromônio de alarme dos percevejos, no CG (GC-2010, Shimadzu, Japão) equipado com coluna apolar Rtx-1 (25mm x 30m x 25 μ m, RESTEK, PA, EUA) e um detector DIC no modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura inicial da rampa foi de 50°C por 2 minutos, com um aumento gradual de 5°C/min até atingir 180°C, onde foi mantida por 0,1 minuto. Em seguida houve um segundo aumento gradual de 10°C/min até atingir 250°C, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos. A temperatura do detector foi de 270°C e do injetor 250°C.

A quantificação do feromônio foi realizada comparando as áreas de cada componente feromonal em relação à área do PI. O fator de resposta do detector foi considerado igual a 1 para todos os compostos. Os dados foram coletados utilizando o *software* GC Solution e tabulados com o programa Excel (Microsoft Office 2020, EUA).

Para a avaliação qualitativa, amostras selecionadas foram injetadas no CG-EM (GCQP-2010 Ultra, Shimadzu, Japão) equipado com analisador quadrupolar, utilizando uma coluna apolar Rxi-1MS (25mm x 30m x 25 μ m, RESTEK, PA, EUA). A ionização de impacto de elétrons foi utilizada com uma energia de 70 eV e uma temperatura de 250°C, com injetor no modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi o hélio. Os dados foram coletados e analisados com o *software* GCMS Solution. A identificação dos compostos voláteis foi realizada comparando o padrão de fragmentação dos componentes da amostra com dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST 11) e também calculando o índice de retenção (IR).

Para calcular o IR, uma mistura de hidrocarbonetos alcanos lineares (C7-C30) foi injetada nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a confirmação final, o padrão de fragmentação e o IR dos compostos foram comparados com os dados obtidos da injeção de padrões autênticos, quando disponíveis.

3.2.6. Extração dos hidrocarbonetos cuticulares de *E. heros*

Para a extração de hidrocarbonetos, adultos de *E. heros* foram submetidos a três tratamentos: (i) controle, consistindo em uma suspensão de Break-thru a 0,05%; (ii) exposição a um isolado de *M. pingshaense* (ESALQ 4395) e (iii) exposição a um isolado de *M.*

anisopliae (ESALQ E9), a uma concentração de 5×10^7 conídios/mL aplicado por Torre de Potter. Após a aplicação, os insetos foram mantidos a 26°C por períodos de 12, 24 e 48 horas. No momento da extração dos hidrocarbonetos, os insetos foram mantidos em freezer a -20°C por 15 minutos para que não liberassem o conteúdo da glândula metatorácica. Os insetos foram então colocados individualmente em frascos cônicos contendo 1 mL de hexano destilado por 5 minutos. Cada inseto passou por três lavagens sucessivas, resultando em um volume final de 3mL. Foram realizadas seis repetições para cada tratamento.

Uma alíquota de 10µL do composto β-cariofileno, preparado em hexano destilado a uma concentração final de 0,01mg/mL, foi adicionada a cada amostra como padrão interno (PI). As amostras com PI foram então concentradas para 50µL sob fluxo suave de N₂ e armazenadas a -30°C até sua utilização em CG-DIC e CG-EM.

3.2.7. Análises químicas dos hidrocarbonetos cuticulares de *E. heros* por cromatografia gasosa

As análises quantitativas e qualitativas foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.5, com exceção do programa de temperatura. Neste caso, a temperatura inicial da rampa foi de 70°C por 2 minutos, aumentando gradualmente 5°C/min até atingir 200°C, onde foi mantida por 0,1 minuto, seguida de um segundo aumento gradual de 10°C/min até atingir 280°C, permanecendo nesta temperatura por 40 minutos. Uma diferença adicional é que, para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura de hidrocarbonetos alcanos lineares C7-C40 como padrão.

3.2.8. Avaliação da germinação de conídios expostos a diferentes concentrações de tridecano, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal

A metodologia utilizada foi adaptada de LOPES et al. (2015). Para determinar o efeito dos compostos majoritários do feromônio de alarme de *E. heros* na germinação dos isolados de *M. pingshaense* e *M. anisopliae in vitro*, discos de papel filtro estéreis de 6 mm foram impregnados com 20µL de diluições individuais em hexano de tridecano, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal, além de uma diluição combinada (Blend) dos três compostos, nas concentrações de 10, 100 e 200 µg/mL. Após a aplicação, os discos secaram por alguns segundos para garantir a evaporação do hexano, de modo que apenas o efeito fumigante fosse

avaliado. As concentrações mais altas foram escolhidas com base nos testes de LOPES et al. (2015), enquanto a concentração mais baixa foi determinada a partir da taxa de emissão do feromônio de alarme estimado por inseto equivalente.

Os discos impregnados foram colocados na tampa de placas de Petri do tipo rodac (60x15mm) contendo BDA, previamente inoculada com 50µL de suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/mL. Após a inoculação, as placas foram mantidas abertas por aproximadamente 20 minutos para permitir a secagem da suspensão e somente após a secagem, os discos foram adicionados às tampas e as placas foram fechadas. O controle consistiu em placas inoculadas expostas a discos tratados somente com hexano. Todas as placas foram mantidas em BOD a aproximadamente 25°C por 12, 16 e 22h, momentos em que a germinação foi avaliada através da contagem de conídios germinados e não germinados. Foram considerados como conídios germinados aqueles que apresentavam um tubo germinativo maior que seu diâmetro. Foi feita uma placa por tempo de avaliação e o experimento foi replicado três vezes em duas ocasiões diferentes.

3.2.9. Avaliação *in vitro* do crescimento fúngico quando exposto a diferentes concentrações de tridecano, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal

Esse experimento seguiu a mesma abordagem do experimento anterior, com algumas diferenças. O objetivo foi avaliar o crescimento fúngico em vez da germinação. Para isso, as placas de Petri com BDA foram inoculadas com 50µL de suspensão fúngica a uma concentração de 1×10^7 conídios/mL. A suspensão foi espalhada por toda a placa até ser completamente absorvida. Além disso, esse experimento avaliou tanto o efeito de contato direto quanto o efeito fumigante dos compostos. Para isso, os discos impregnados com as diluições de cada tratamento foram posicionados no centro da placa em contato com o meio de cultura para avaliar a ação de contato, ou foram colocados nas tampas para avaliar apenas a ação fumigante. Após a montagem, as placas foram seladas com papel filme e mantidas em BOD a aproximadamente 25°C por 72h. Nesse momento, o crescimento fúngico foi avaliado por meio da presença e medição de qualquer zona de inibição nas placas. O experimento foi replicado três vezes em duas ocasiões diferentes.

3.2.10. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em condições de laboratório com um delineamento inteiramente casualizado. Para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias na coleta do feromônio foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A emissão do feromônio de alarme entre os tratamentos foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). A germinação dos conídios sob efeito dos diferentes compostos sintéticos foi analisada por Kruskal-Wallis e as diferenças significativas foram determinadas por um teste de comparação múltipla de Dunn's ($P < 0,05$). Da mesma forma que na coleta do feromônio, para o teste e quantificação dos hidrocarbonetos cuticulares, foi verificada a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A composição dos hidrocarbonetos cuticulares foi analisada por ANOVA e teste de Kruskal-Wallis e os contrastes foram feitos com o teste de Tukey ($P < 0,05$). As análises estatísticas e os gráficos foram feitos no R Cran Project (v. 4.2.2).

3.3. Resultados

3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *E. heros* infectados com isolados de *Metarhizium*

Os pontos de adesão mais significativos de *M. pingshaense* e *M. anisopliae* em adultos de *E. heros* foram observados em áreas que apresentam um grande número de cerdas como tarsos, tíbias e antenas, além de regiões intersegmentais (Figura 1). Além disso, constatou-se que o padrão de adesão não é afetado pela presença da glândula metatorácica (MTG), uma característica intrínseca dos pentatomídeos. Da mesma forma, uma vez que conídios germinaram em proximidade a essa região seria possível inferir que a germinação também não é afetada (Figura 2). Por outro lado, para essa afirmação seria necessário estabelecer um comparativo com uma espécie que não esteja sobre a influência da MTG e seus compostos.

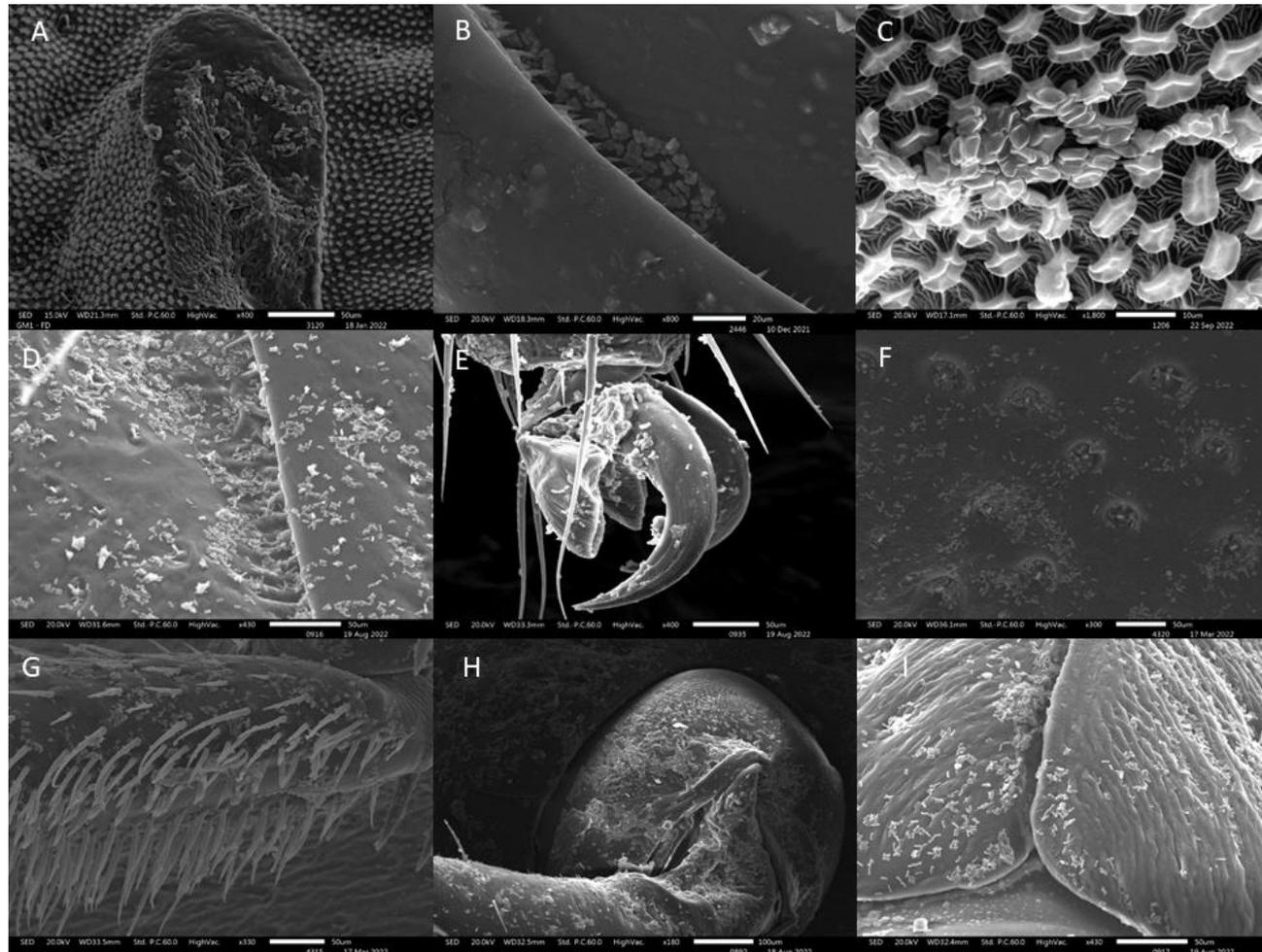


Figura 1. Mapeamento dos pontos de adesão captados por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de adultos de *Euschistus heros* pulverizados com isolados de *M. pingshaense* e *M. anisopliae*. A) Peritrema, B) Segmento abdominal, C) Evaporatório, D) Segmento abdominal, E) Garras tarsais, F) Dorso, G) Perna, H) Segmento da perna, I) Membrana da asa

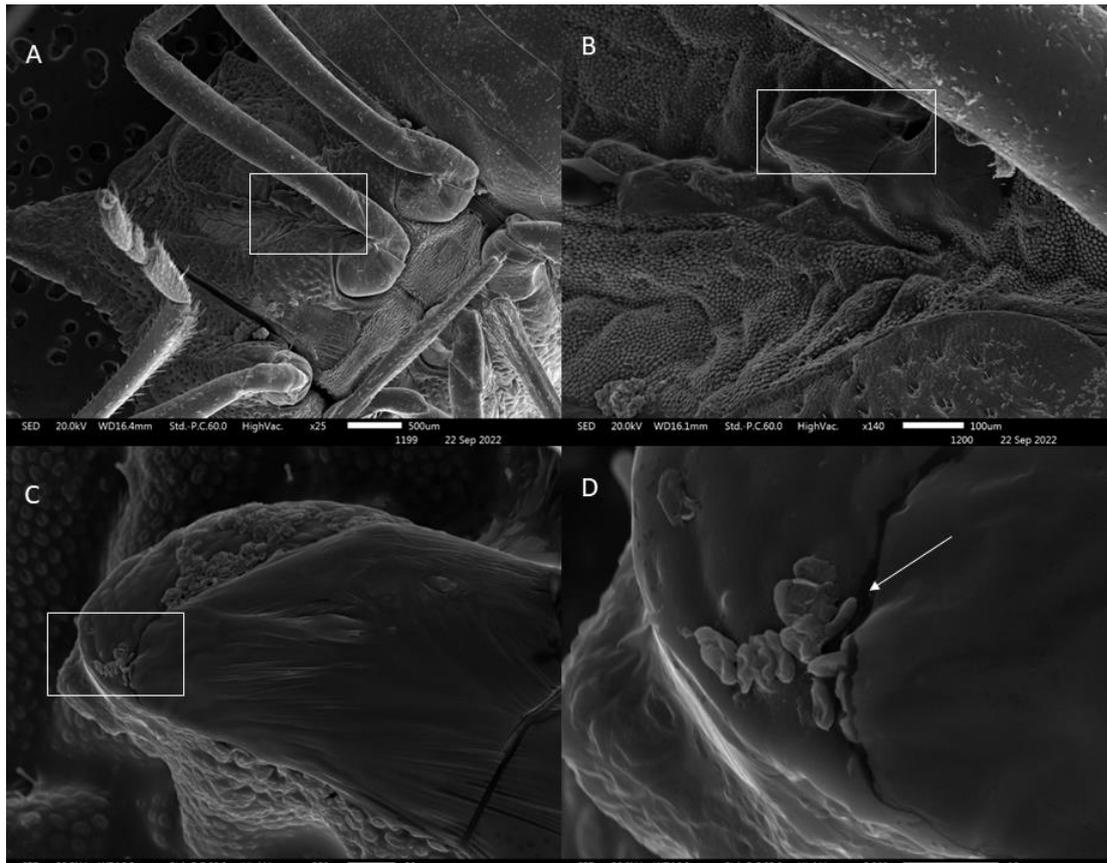


Figura 2. Adesão e germinação de conídios de *M. pingshaense* e *M. anisopliae* na região da glândula metatorácica (MTG) de adultos de *Euschistus heros* em diferentes níveis de aproximação sequenciais de A-D A) Localização da MTG (25x), B) Orifício da MTG (140x), C) Visualização de um adensamento de conídios (550x), D) Conídio com tubo germinativo na região da MTG (2,200x)

Além das importantes constatações acerca da adesão, também foi observado que ambos os isolados, independentemente do seu desempenho nos ensaios de avaliação de mortalidade dos insetos, iniciam seu processo de germinação aproximadamente 18 horas após a infecção (Figuras 3, 4 e 5). Embora variações no tamanho do tubo germinativo entre os diferentes tempos analisados sejam evidentes e esperadas, nos mesmos horários de avaliação, os isolados ESALQ 3364 e ESALQ 4395 (*M. pingshaense*) apresentaram ligeiramente tubos germinativos maiores em comparação ao isolado ESALQ E9 (*M. anisopliae*). Para os isolados de *M. pingshaense* foram identificados em todos os horários avaliados um adensamento maior de conídios, que formam “massas” em diferentes estruturas dos adultos de *E. heros* (Figura 6).

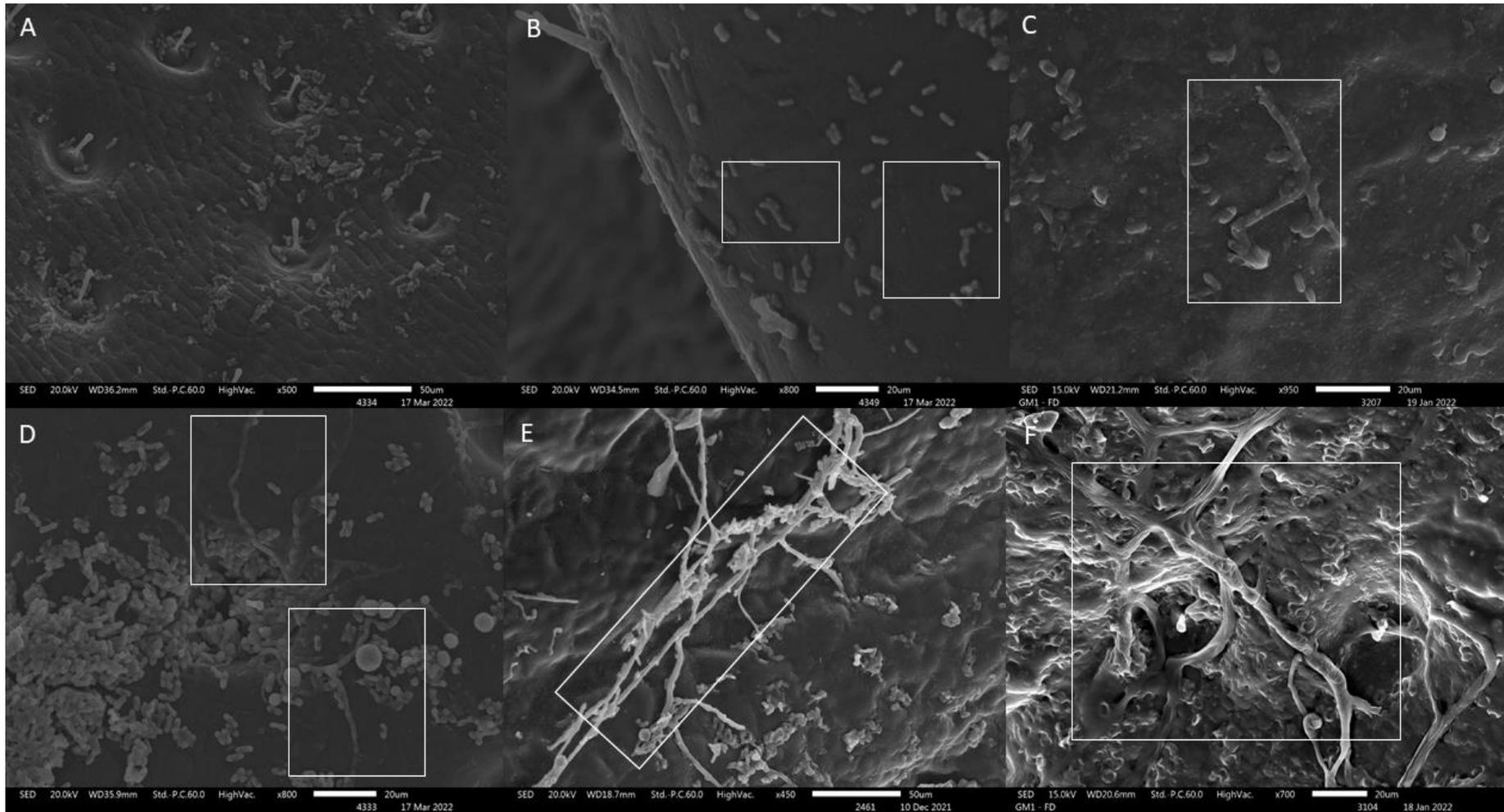


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de adultos de *Euschistus heros* pulverizados com o isolado ESALQ 3364 de *Metarhizium pingshaense* em diferentes tempos amostrais para determinação do início da germinação. A) 16h; B) 18h; C) 20h; D) 24h; E) 30h; F) 36h

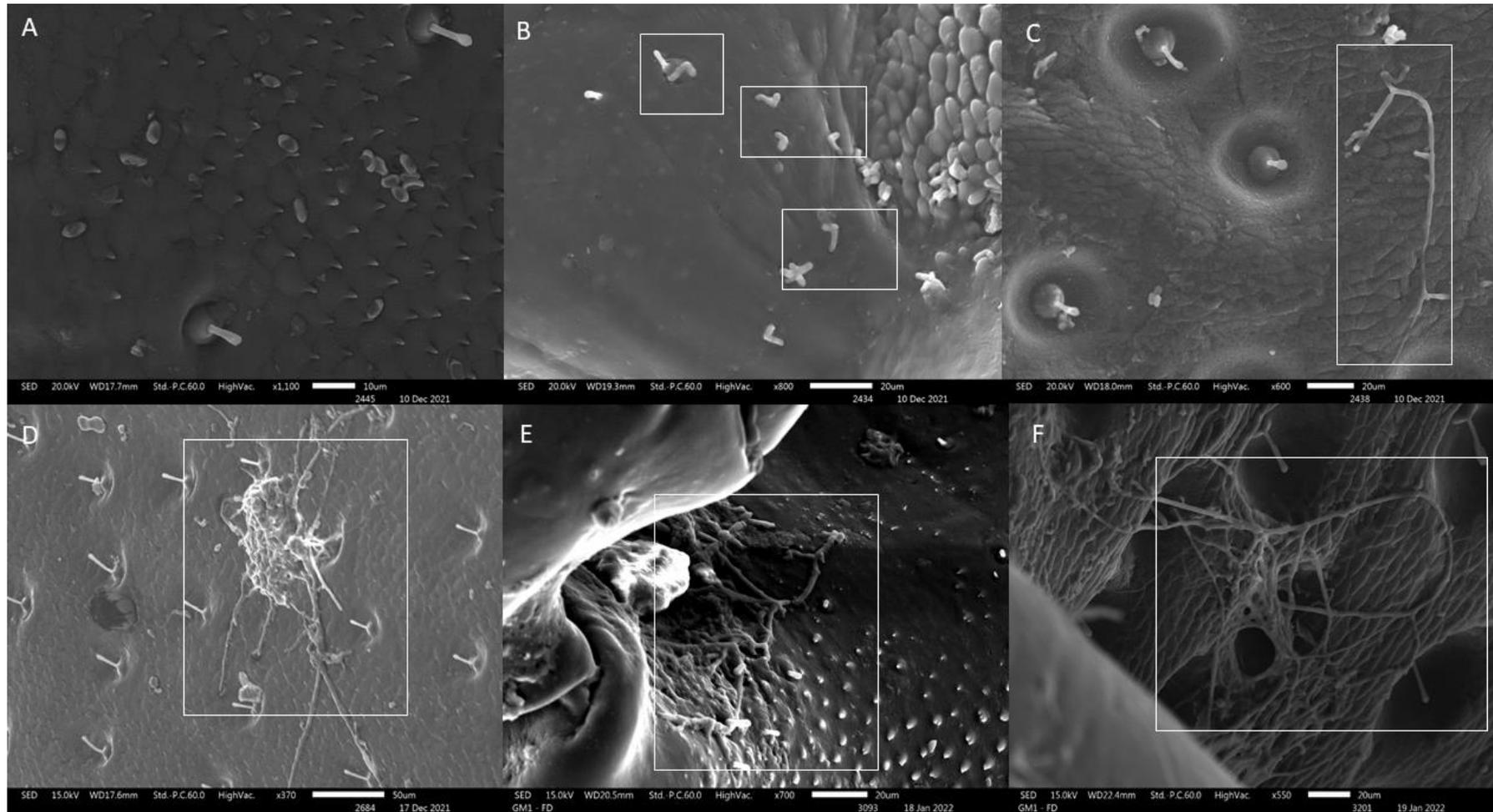


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de adultos de *Euschistus heros* pulverizados com o isolado ESALQ 4395 de *Metarhizium pingshaense* em diferentes tempos amostrais para determinação do início da germinação A) 16h; B) 18h; C) 20h; D) 24h; E) 30h; F) 36h

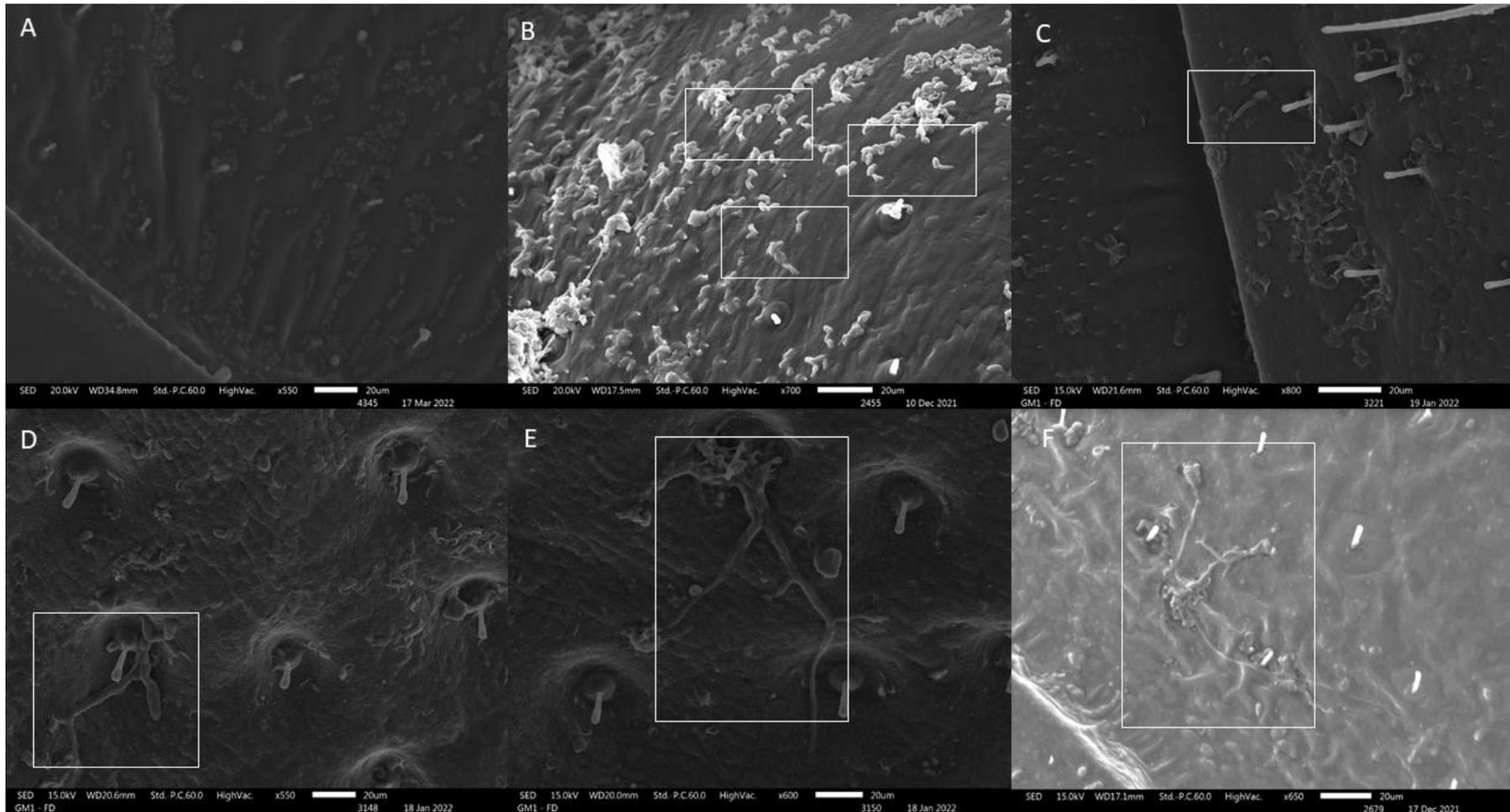


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de adultos de *Euschistus heros* pulverizados com o isolado ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tempos amostrais para determinação do início da germinação A) 16h; B) 18h; C) 20h; D) 24h; E) 30h; F) 36h

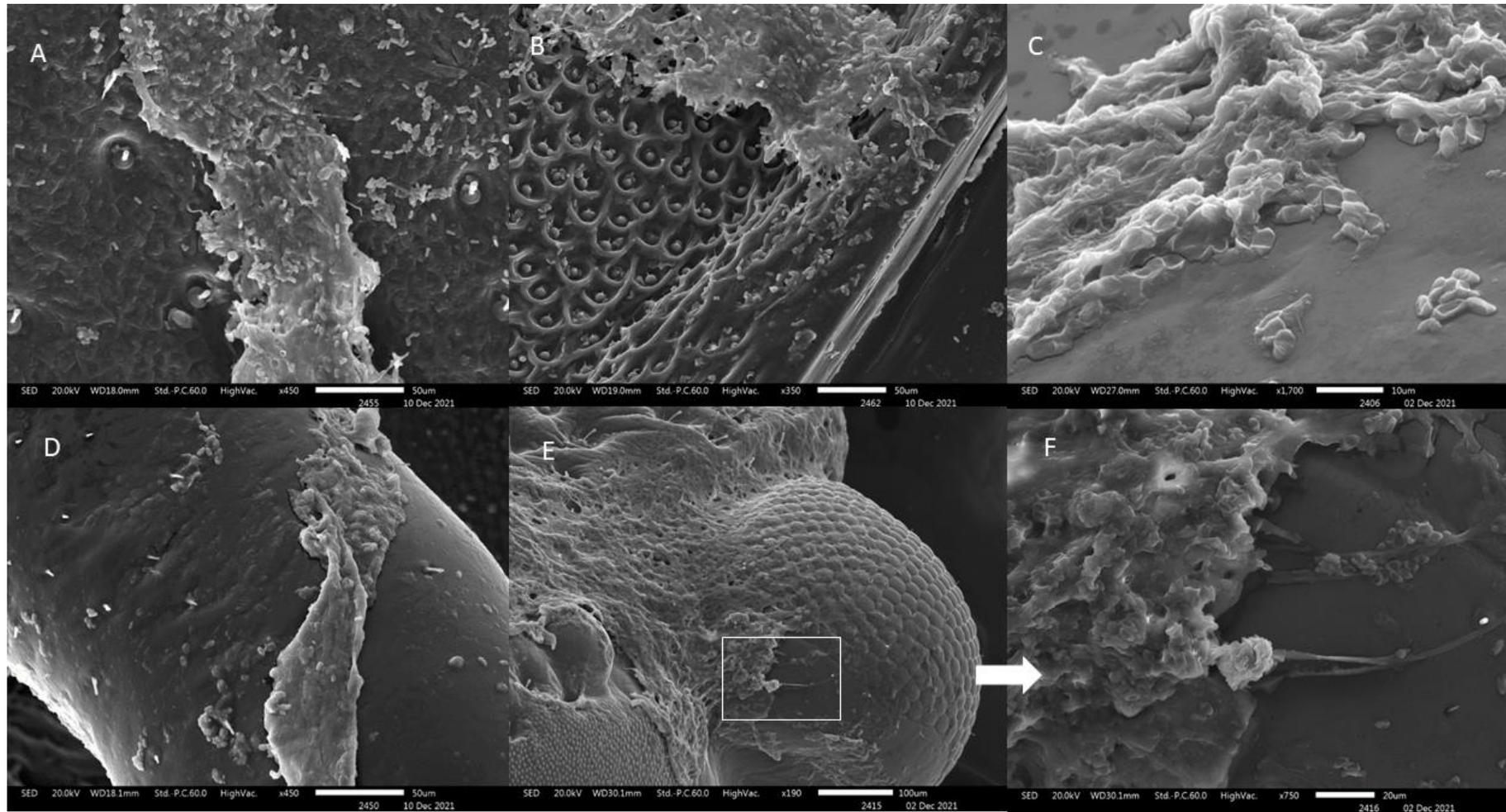


Figura 6. Adensamento de conídios captados por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de adultos de *Euschistus heros* infectados com ambos os isolados de *Metarhizium pingshaense*. A) Escutelo, B) Conexivo (lateral da asa), C-D) Perna, E-F) Olho.

3.3.2. Extração de voláteis de adultos de *E. heros* infectados com isolados de *Metarhizium*

Em todos os tratamentos foi observada a presença do feromônio de alarme de *E. heros*, sendo tridecano o composto predominante em todos os horários avaliados. Embora não tenha havido diferença significativa na emissão dos compostos entre o tratamento com os fungos e o controle quando analisados individualmente, foi identificado um aumento progressivo dessa emissão ao longo do tempo (Figura 7).

Quando analisada a mistura feromonal total, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em 24 e 48 h após a inoculação do fungo ($p > 0,05$) (Figura 8). No entanto, em 72h houve diferença entre os tratamentos, onde o controle apresentou uma emissão maior de feromônio ($p < 0,05$) (Figura 8) em relação aos insetos pulverizados com fungo.

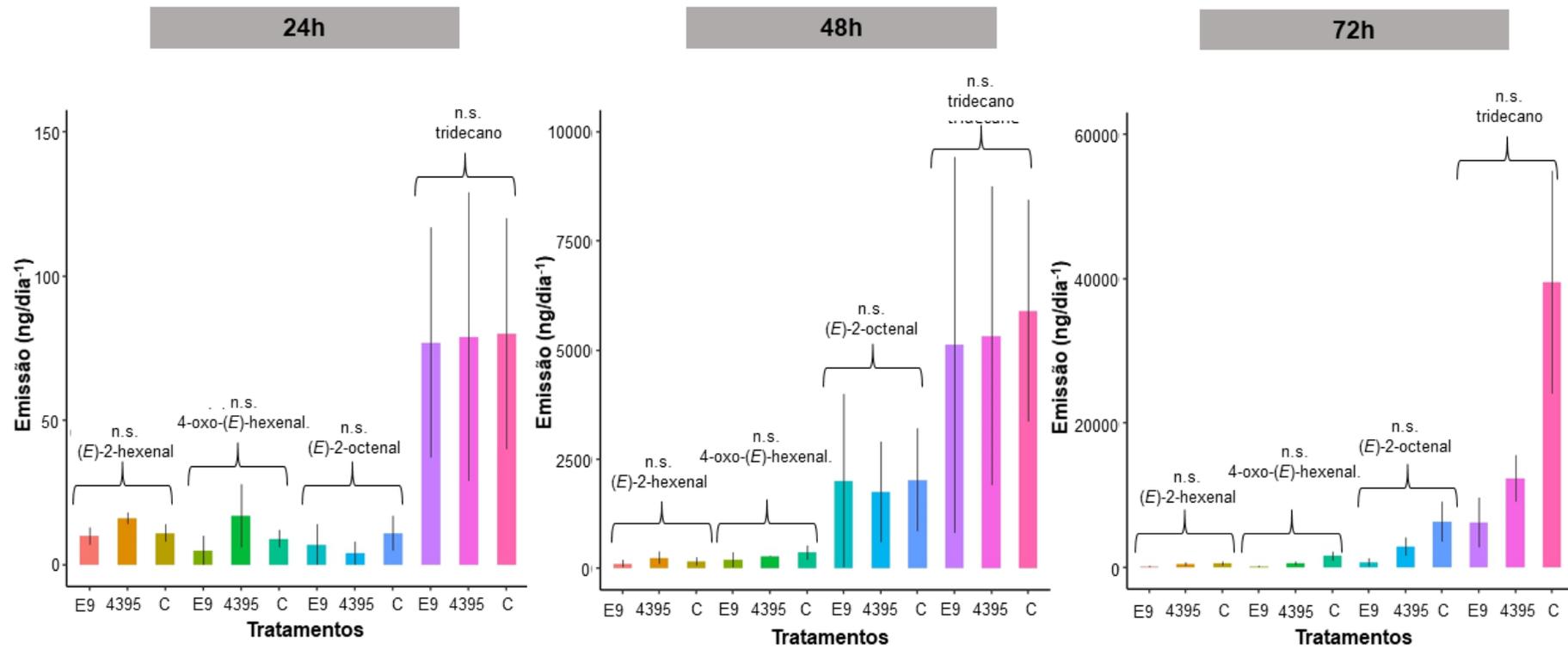


Figura 7. Emissão (ng/dia) dos principais componentes do feromônio de alarme de *Euschistus heros* não infectados (Controle) e infectados com isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) ao longo do tempo. *n.s.=não significativo

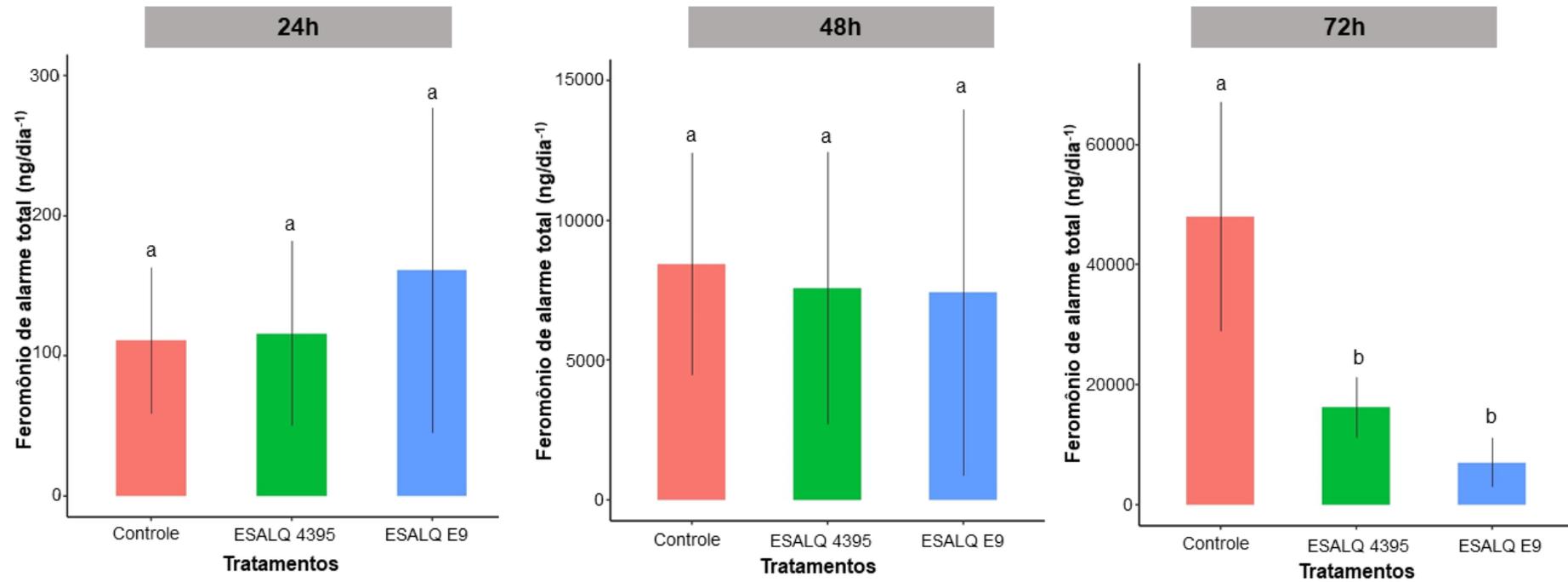


Figura 8. Emissão total dos principais componentes do feromônio de alarme de *Euschistus heros* não infectados (Controle) e infectados com isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) ao longo do tempo * Letras diferentes indicam diferença estatística

3.3.3. Extração e identificação dos hidrocarbonetos cuticulares de *E. heros*

Foram identificados 15 hidrocarbonetos na cutícula de adultos de *E. heros* não infectados e infectados com *M. pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9). Estes compostos são constituídos por uma cadeia principal variando de 24 a 35 átomos de carbono, incluindo 12 *n*-alcanos e 3 alcanos ramificados metilados (Tabela 2). Não foram observadas diferenças qualitativas entre os perfis de percevejos não infectados e infectados, independentemente do tempo decorrido após a infecção. No entanto, foram encontradas diferenças na quantidade total de hidrocarbonetos cuticulares entre os tratamentos e ao longo do tempo. Nos extratos de 12h (Tabela 2), não foram observadas diferenças significativas na quantidade total dos hidrocarbonetos. Os tratamentos com fungos não apresentaram diferença entre si nos extratos de 24h (Tabela 3) e 48h (Tabela 4), mas resultaram uma menor quantidade de hidrocarbonetos cuticulares em comparação ao controle.

Tabela 2. Composição quali e quantitativa dos hidrocarbonetos cuticulares de adultos de *E. heros* não inoculados (Controle) e inoculados com *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) após 12h

Composto	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção	Tratamentos		
			Controle	ESALQ E9	ESALQ 4395
			12h	12h	12h
Tetracosane	34,057	2399	55,89±7,40	18,39±4,01	42,95±9,42
Pentacosane	35,014	2499	42,76±6,43	32,20±6,15	25,31±4,71
Hexacosane	35,895	2699	108,09±5,09	68,47±7,46	51,64±4,90
Heptacosane	36,754	2771	110,43±4,33	81,59±12,12	67,25±9,29
Octacosane	37,691	2867	161,23±16,06	157,11±14,96	123,35±12,65
Nonacosane	38,754	2999	178,35±20,83	140,82±15,50	148,19±13,77
Triacotane	39,998	3033	395,46±34,14	396,17±51,23	419,92±43,35
Hentriacontane	41,468	3200	323,72±21,25	275,83±37,33	259,81±36,76
Dotriacontane	43,249	3222	628,01±33,14	552,60±78,19	502,25±37,41
x-methyl dotriacontane	45,404	3273	375,65±51,64	298,03±76,98	412,81±43,57
Tritriacontane	48,087	3357	480,94±38,79	322,21±73,30	507,03±108,2
Tettratriacontane	51,303	3449	223,12±25,72	248,09±35,42	281,92±11,05
11-methyl tettratriacontane+ 13-methyl tettratriacontane*	53,334	3499	292,20±5,78	316,28±64,27	253,20±29,21
Pentatriacontane	55,326	3500	192,98±21,72	158,50±54,45	152,00±36,16
Total			3568,84±292,32 ^a	3066,30±531,19 ^a	3247,63±400,44 ^a

*Quantidade total dos compostos 11-methyltettratriacontane + 13-methyltettratriacontane **Índice de retenção experimental
 Valores médios da AUC (area under the curve) *Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 3. Composição quali e quantitativa dos hidrocarbonetos cuticulares de adultos de *E. heros* não inoculados (Controle) e inoculados com *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) após 24h

Composto	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção	Tratamentos		
			Controle	ESALQ E9	ESALQ 4395
			24h	24h	24h
Tetracosane	34,057	2399	39,90±11,39	12,71±1,83	45,60±7,75
Pentacosane	35,014	2499	38,05±8,24	54,55±8,68	24,64±3,57
Hexacosane	35,895	2699	106,57±4,56	74,70±6,96	58,38±4,62
Heptacosane	36,754	2771	105,30±5,11	56,01±9,68	71,78±6,09
Octacosane	37,691	2867	176,13±13,95	266,39±29,17	147,85±14,45
Nonacosane	38,754	2999	170,43±19,98	138,05±28,08	172,44±19,04
Triacontane	39,998	3033	453,16±47,95	289,16±50,56	318,70±32,76
Hentriacontane	41,468	3200	338,64±46,68	197,15±16,56	274,60±27,08
Dotriacontane	43,249	3222	628,19±75,94	368,14±88,92	441,37±36,98
x-methyl dotriacontane	45,404	3273	412,48±55,95	220,41±36,52	294,47±63,66
Tritriacontane	48,087	3357	503,36±33,14	167,38±49,24	575,57±75,85
Tettratriacontane	51,303	3449	245,60±32,16	263,65±28,59	235,85±15,47
11-methyl tettratriacontane+ 13-methyl tettratriacontane*	53,334	3499	308,15±15,77	259,67±59,66	194,55±22,51
Pentatriacontane	55,326	3500	184,44±27,76	171,65±31,84	200,09±22,68
Total			3710,4±398,57 ^a	2539,59±446,30 ^b	3055,91±352,53 ^b

*Quantidade total dos compostos 11-methyltettratriacontane + 13-methyltettratriacontane **Índice de retenção experimental
 Valores médios da AUC (area under the curve) *Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$)

Tabela 4. Composição quali e quantitativa dos hidrocarbonetos cuticulares de adultos de *E. heros* não inoculados (Controle) e inoculados com *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) após 48h

Composto	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção	Tratamentos		
			Controle	ESALQ E9	ESALQ 4395
			48h	48h	48h
Tetracosane	34,057	2399	71,89±6,48	7,18±0,45	27,02±4,52
Pentacosane	35,014	2499	47,48±8,65	9,26±2,52	20,19±3,97
Hexacosane	35,895	2699	109,62±6,50	35,16±6,35	55,62±7,93
Heptacosane	36,754	2771	115,55±6,92	40,40±6,68	42,90±7,22
Octacosane	37,691	2867	146,34±21,49	103,78±8,40	143,48±7,98
Nonacosane	38,754	2999	186,27±25,65	90,96±15,64	145,20±17,44
Triacontane	39,998	3033	337,75±34,29	230,31±13,72	397,81±33,75
Hentriacontane	41,468	3200	308,80±20,55	150,05±8,75	273,45±28,84
Dotriacontane	43,249	3222	627,84±15,16	374,45±23,33	350,56±77,12
x-methyl dotriacontane	45,404	3273	338,82±68,96	89,68±29,56	276,54±19,49
Tritriacontane	48,087	3357	458,52±61,60	295,57±38,72	332,49±67,82
Tettratriacontane	51,303	3449	200,65±27,75	121,64±27,22	145,08±47,49
11-methyl tettratriacontane+ 13-methyl tettratriacontane*	53,334	3499	276,25±21,53	211,96±32,44	272,42±59,14
Pentatriacontane	55,326	3500	201,52±31,07	122,61±26,73	119,28±25,62
Total			3427,29±356,59 ^a	1883,03±240,50 ^b	2602,06±408,33 ^b

*Quantidade total dos compostos 11-methyltettratriacontane + 13-methyltettratriacontane **Índice de retenção experimental *** Valores médios da AUC (area under the curve) ****Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$)

3.3.4. Avaliação da germinação de conídios quando expostos a diferentes concentrações de tridecano, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal

Não houve diferença significativa na viabilidade dos isolados, independentemente do horário avaliado (Figura 9). Em todos os tratamentos a germinação dos isolados foi máxima quando os compostos foram testados na menor concentração (Tridecano 10µg, Hexenal 10µg, Octenal 10µg e Blend 10µg). O composto majoritário presente na mistura do feromônio de alarme de *E. heros* não afetou a viabilidade dos isolados, independentemente da dose e do horário avaliado (Tridecano 10µg, 100µg e 200µg). No entanto, para os demais componentes (Hexenal e Octenal) e para a mistura sintética (Blend), as doses mais altas (100µg e 200µg)

foram capazes de inibir completamente o processo germinativo em todos os horários avaliados, demonstrando um efeito fungicida (Figura 9).

Além disso, em 12 e 16h o tratamento Blend 10 μ g parece estimular a germinação do isolado ESALQ 4395 quando comparado ao controle e ao isolado ESALQ E9 (Figura 10). Da mesma forma, como observado nas análises de MEV, os tubos germinativos dos isolados de *M. pingshaense* ESALQ 4395 apresentaram tamanhos superiores aos do isolado de *M. anisopliae* ESALQ E9 nos mesmos horários avaliados (Figura 11).

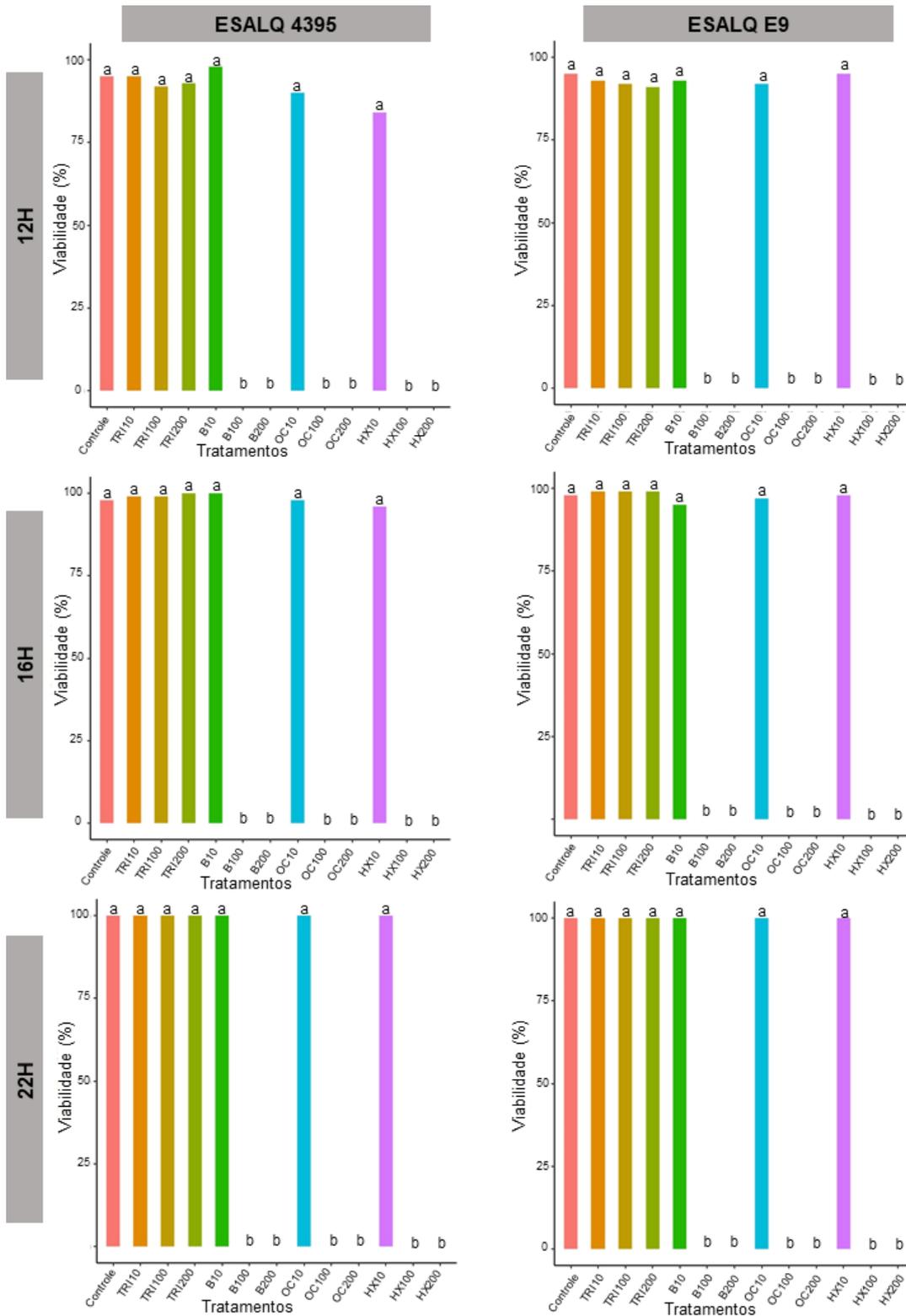


Figura 9. Viabilidade dos isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) após exposição aos componentes sintéticos do feromônio de alarme de *Euschistus heros* para diferentes tempos de análise *Letras diferentes indicam diferença estatística **TRI= tridecano; B= blend; OC= octenal; HX= hexena

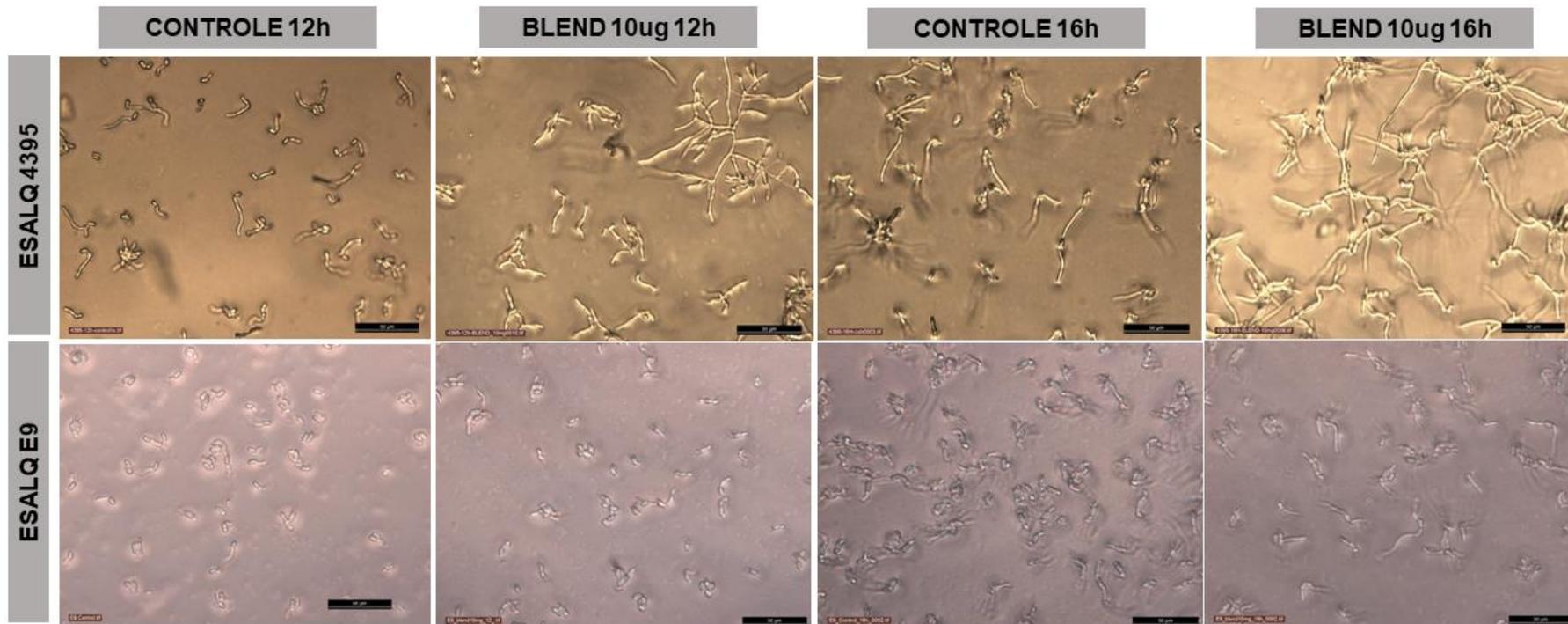


Figura 10. Comparação de imagens de microscopia optica dos isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) expostos ou não à mistura sintética de tridecano, hexenal e octenal (Blend 10 μ g) nos períodos de 12 e 16h

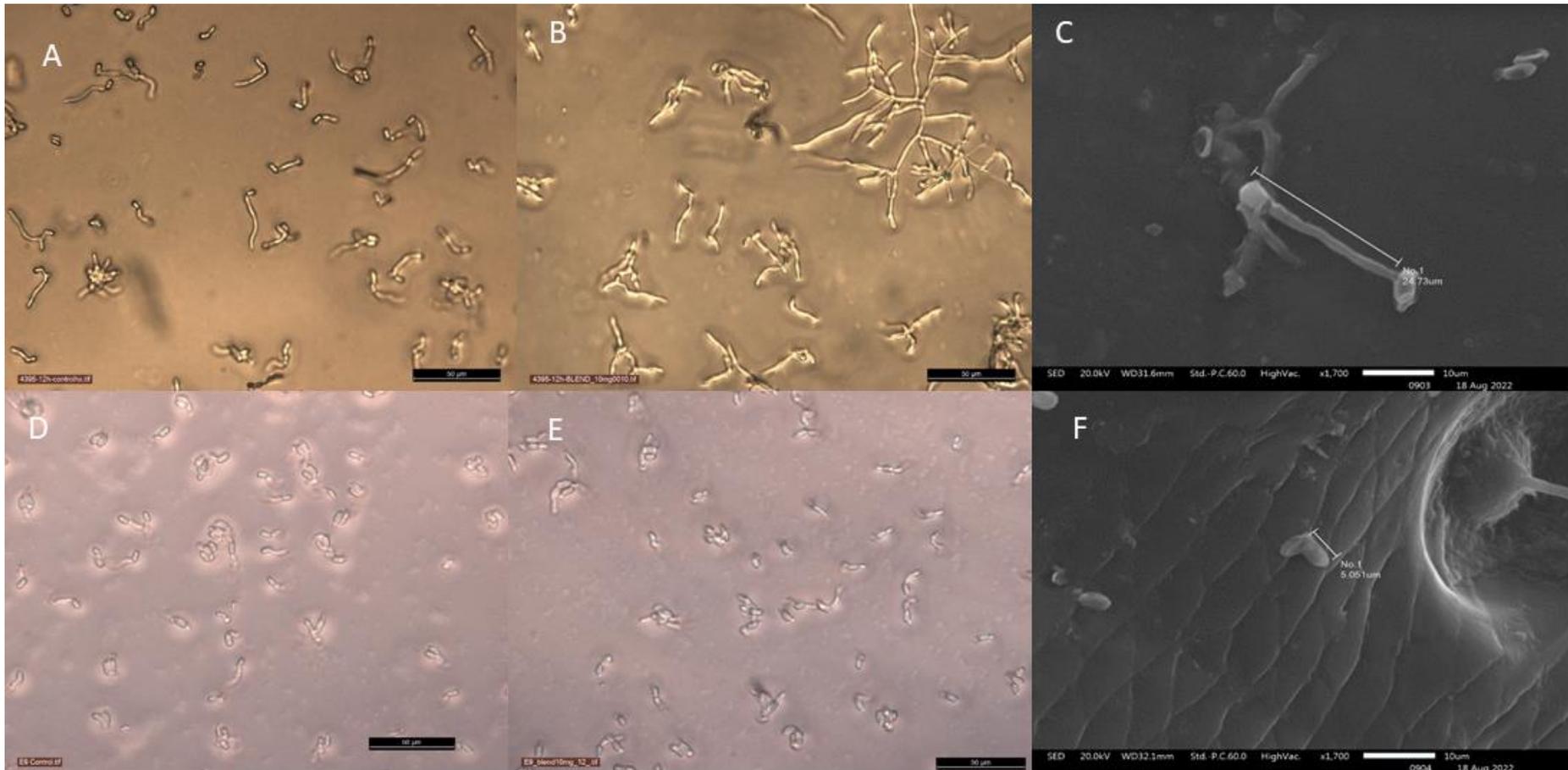


Figura 11. Comparação de imagens de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Metarhizium pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9). A) Isolado ESALQ 4395 12h após inoculação (controle); B) Isolado ESALQ 4395 12h após inoculação e exposição à mistura sintética de tridecano, hexenal e octenal (Blend 10 μ g); C) Isolado ESALQ 4395 18h após inoculação em um adulto de *Euschistus heros*; D) Isolado ESALQ E9 12h após inoculação (controle); E) Isolado ESALQ E9 12h após inoculação e exposição à mistura Blend 10 μ g; F) Isolado ESALQ E9 18h após inoculação em um adulto de *E. heros*

3.3.5. Avaliação *in vitro* do crescimento fúngico quando exposto a diferentes concentrações de tridecano, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal

Para este experimento, estabeleceu-se um limite mínimo de inibição de 20 mm para considerar o efeito dos tratamentos sobre *M. pingshaense* e *M. anisopliae*, além de observar a eficiência do método de exposição (contato direto ou fumigação). Todos os tratamentos de tridecano e o dos demais compostos na menor concentração 10 μ g não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. Entretanto, o método de exposição apresentou diferenças para o mesmo tratamento, evidenciando que a metodologia pode influenciar o resultado para o mesmo composto (Figura 12). No tratamento 12 (Blend 100 μ g), o halo de inibição no método de exposição por contato permaneceu abaixo da linha de corte, enquanto no método de fumigação o mesmo tratamento apresentou valor acima desse limite. Essa tendência também foi observada nos tratamentos 9 e 10 (Hexenal 100 e 200 μ g) (Figura 12).

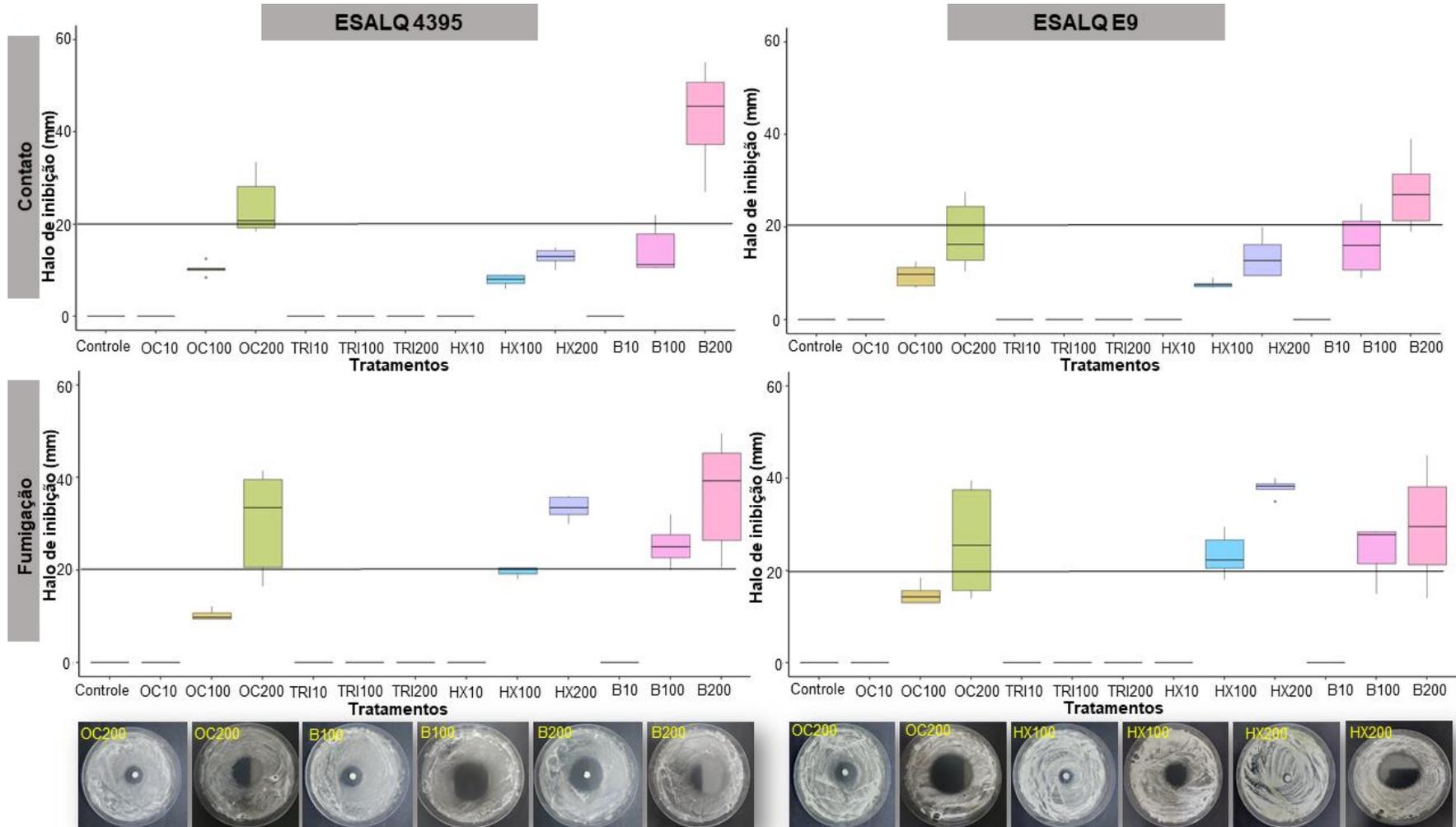


Figura 12. Halo de inibição (mm) do isolado de *M. pingshaense* (ESALQ 4395) e *M. anisopliae* (ESALQ E9) em resposta aos componentes sintéticos do feromônio de alarme de *Euschistus heros*; (OC= octenal; TRI= tridecano; HX= hexenal; B= blend)

3.4. Discussão

Os estudos apresentados buscaram elucidar o papel dos compostos cuticulares e feromônio de alarme de *E. heros* durante infecções causadas por isolados de *Metarhizium*. Uma vez que estudos anteriores já evidenciaram o efeito *in vitro* de compostos do feromônio de alarme dessa espécie (BORGES et al., 1993; LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2015; ULRICH et al., 2015), esperava-se que estes poderiam ser capazes de afetar características importantes do processo infectivo que ocorrem na cutícula do inseto. Entretanto, diferente do presumido, a emissão dos voláteis não afetou a adesão e a germinação fúngica no tegumento desse hospedeiro, de forma que os dados encontrados neste estudo refutam nossa hipótese inicial de que a glândula metatorácica (MTG) e a emissão natural do feromônio poderiam ser um fator limitante *in vivo*. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que os isolados foram capazes de colonizar regiões reconhecidas como pontos de adesão para fungos entomopatogênicos (Figura 1). Esse padrão observado em *E. heros* segue o que já havia sido documentado para outras espécies de insetos e o descrito por SOSA-GÓMEZ et al., (1997) para o pentatomídeo *N. viridula*. Da mesma forma, na região da glândula metatorácica os conídios germinaram independente da sua proximidade com a fonte do feromônio de alarme (Figura 2).

Além dessa constatação, nos mesmos horários avaliados os tubos germinativos de *M. pingshaense* foram maiores que os de *M. anisopliae*. Apesar de alguns estudos sugerirem que a virulência está frequentemente relacionada à velocidade de germinação (ALTRE et al., 1999), outros destacam que não existe correlação positiva entre a velocidade de germinação ou a taxa de crescimento e a virulência (LIU et al., 2003; ROMÓN et al., 2017). No entanto, a diferença de tamanho dos tubos germinativos entre as duas espécies de *Metarhizium*, atrelada a maior eficiência, possibilita uma discussão acerca de aspectos relacionados à fixação do patógeno à cutícula do hospedeiro.

De acordo com QUINTELA & McCOY (1998), o contato patógeno-hospedeiro pode levar a diferentes respostas, incluindo a não germinação dos conídios, a produção de tubos germinativos de tamanhos distintos ou sem apressório. Isso porque, a especificidade do patógeno é influenciada pela superfície cuticular dos diferentes hospedeiros (BOUCIAS & PENDLAND, 1991), bem como pelos compostos produzidos por eles (PADULLA, 2007). Entre os compostos encontrados na superfície cuticular, os ácidos graxos podem influenciar a germinação e diferenciação de esporos fúngicos, podendo ter efeitos fungistáticos ou estimulatórios, a depender da espécie patogênica (GOLEBIEWSKI, 2012). Por outro lado, as

diferenças no crescimento dos tubos germinativos dos isolados podem ser explicadas por diferentes taxas de degradação (TAMAI, 2002) ou até mesmo por uma sobrecompensação por parte dessa espécie de fungo entomopatogênico, que aumenta o tamanho dos tubos germinativos em resposta a um ambiente estressante (SCHUMACHER & POEHLING, 2012). Para o presente estudo, o ambiente estressante pode ser justificado pela presença do feromônio de alarme de *E. heros*.

Além da constatação da diferença de tamanho dos tubos germinativos entre as duas espécies, embora a mesma concentração tenha sido utilizada nos diferentes tratamentos, foi observado um adensamento dos conídios formando “massas” nos isolados de *M. pingshaense* (Figura 6). Essa característica também não havia sido documentada anteriormente, e o resultado desta aglomeração é desconhecido. De forma similar, embora haja relatos de infecções causadas por esse microrganismo a diferentes insetos (CITO et al., 2014; FRANCIS, 2019; LOVETT et al., 2019; SENTHIL-KUMAR et al., 2021), essa espécie também nunca havia sido documentada como virulenta para pentatomídeos.

Dessa forma, buscando compreender alguns aspectos relacionados à eficiência de *M. pingshaense*, a extração de voláteis foi proposta, não para identificar os compostos majoritários, visto que esse aspecto já foi elucidado (ALDRICH, 1988; PAREJA et al., 2007; FÁVARO et al., 2011; LOPES et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2017), mas para determinar se a liberação de voláteis poderia ser influenciada pela presença dos propágulos infectivos no inseto, além de quantificar a emissão “natural”. Ao evidenciar que a exposição do inseto aos dois isolados fúngicos não refletiu na emissão de voláteis, não foi possível afirmar que o padrão observado nos testes de mortalidade (Capítulo 1) e na MEV seja resultado de uma maior liberação desses compostos quando os insetos são infectados por diferentes espécies fúngicas. Isso sugere que os isolados que apresentaram melhor desempenho podem possuir atributos que os permitam se desenvolver na presença do feromônio de alarme de *E. heros* em concentrações liberadas naturalmente pelo inseto em condições normais.

Embora os isolados não tenham apresentado diferenças entre si para a emissão de voláteis, o controle diferiu dos tratamentos no último horário avaliado (72h). Considerando que a penetração já tenha ocorrido, é justificável que os insetos doentes tenham seu padrão alterado. Esse mesmo perfil pode ser observado em plantas infectadas por patógenos, que em resposta também alteram a emissão de semioquímicos (MAUCK et al., 2010; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013). Interessantemente, é possível associar a redução na emissão de voláteis por insetos infectados com o fato de alguns componentes do feromônio de alarme dos pentatomídeos possuírem a função de cairomônios, como o (*E*)-2-hexenal que é usado pelo

parasitoide *Telenomus podisi* para encontrar seu hospedeiro *E. heros*. A liberação reduzida desses compostos pode evitar que os parasitóides sejam atraídos para insetos já infectados, contribuindo para um controle mais efetivo. Em relação à quantidade dos compostos, quando perturbados os pentatomídeos podem liberar até 40µg de aldeídos em uma única emissão (KILPINEN et al., 2012), diferente dos nossos resultados em que apenas o tratamento controle em 72h se aproximou dessa quantidade, justificando-se pelo fato de que durante o desenvolvimento do teste de extração de voláteis, os insetos não foram expostos a perturbações, o que pode ter contribuído para a divergência observada.

Ainda buscando compreender o desempenho de *M. pingshaense* foi proposta a avaliação dos hidrocarbonetos cuticulares, uma vez que a emissão de voláteis não foi afetada a partir da exposição a diferentes espécies fúngicas. Fungos entomopatogênicos podem degradar os hidrocarbonetos cuticulares de seus hospedeiros (PEDRINI et al., 2007), e a eficiência de degradação pode estar relacionada à virulência de algumas cepas (PEDRINI et al., 2009). Embora a expectativa fosse evidenciar um maior consumo por *M. pingshaense*, não foi possível identificar diferenças significativas entre os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de *E. heros* infectados com as duas espécies.

O comprimento das cadeias de hidrocarbonetos cuticulares pode variar de 20 a mais de 50 carbonos, sendo geralmente relatadas como misturas que envolvem componentes saturados de cadeia linear, insaturados e ramificados (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). Embora os hidrocarbonetos cuticulares variem qualitativa e quantitativamente entre as espécies (BLOMQUIST et al. 2018), o estudo desenvolvido por PASQUALE et al. (2007) para a espécie de pentatomídeo *Bagrada hilaris* Burmeister identificou algumas similaridades em relação ao presente estudo. Em ambos os casos, os compostos identificados foram alcanos lineares de cadeia longa, sendo que seis desses compostos foram coincidentes entre as espécies estudadas. De forma similar, compostos de cadeia longa foram identificados como os principais constituintes dos hidrocarbonetos cuticulares de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (SESSA et al., 2021) e *Nezara viridula* (L., 1758) (SOSA-GÓMEZ et al., 1997). Além disso, nossos resultados estão de acordo com relatos anteriores para diferentes ordens de insetos, os quais ressaltam que os hidrocarbonetos saturados são muito mais comuns que os insaturados (HOWARD & BLOMQUIST, 2005).

Para a interpretação dos testes *in vitro*, retomando a possibilidade do estímulo de propágulos fúngicos a partir de alguns compostos (GOLEBIEWSKI, 2012), os resultados obtidos no teste de germinação forneceram evidências que indicam que *M. pingshaense* pode ser estimulado pelo tratamento de menor concentração (Blend 10µg) oriundo da mistura

sintética de tridecano, (*E*)-2-octenal e (*E*)-2-hexenal (Figura 10). O isolado de *M. pinghaense* exposto a esse tratamento apresentou tubos germinativos maiores em comparação ao controle e ao mesmo tratamento de *M. anisopliae*. Interessantemente, esse estímulo observado *in vitro* pode ser associado ao que foi observado *in vivo* para a mesma espécie, através da microscopia eletrônica de varredura.

Em contraste ao estímulo observado, foi documentado por ULRICH e colaboradores (2015) que conídios sob influência de aldeídos podem apresentar tubos germinativos menores em comparação ao controle. Por outro lado, cabe ressaltar que a avaliação individual dos compostos pode desconsiderar o possível efeito sinérgico entre os componentes da mistura. Os compostos (*E*)-2-hexenal e tridecano, por exemplo, são capazes de causar maior efeito repelente quando combinados (GUNAWARDENA & HERATH, 1991). Este fato reforça a possibilidade de que os compostos do feromônio de alarme dos pentatomídeos podem apresentar um efeito distinto quando em conjunto, o que corrobora com o presente estudo que, observou um padrão de estímulo que não ocorreu quando o propágulo fúngico foi exposto aos compostos individualmente.

Atrelando o estímulo observado à virulência da espécie, uma característica que pode reforçar a relação entre os compostos voláteis e a mortalidade do hospedeiro é o fato dos compostos (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal estarem presentes somente em adultos (SILVA et al., 2015). Corroborando ao efeito do Blend (10µg), que parece exercer uma pressão positiva sobre a germinação e provavelmente sobre a mortalidade dos insetos adultos, essa constatação também pode ser relacionada a ninfas infectadas por *M. pingshaense* (Capítulo 1), em que a ausência desses compostos pode ter contribuído para a baixa mortalidade. Sendo assim, é essencial que seja realizada a avaliação da mistura para mimetizar o efeito natural da emissão, ao mesmo tempo em que é necessário considerar a concentração, a fim de evitar conclusões contraditórias decorrentes de valores superestimados.

Neste contexto, diferentes concentrações de tridecano não afetaram a germinação de *B. bassiana* (LOPES et al., 2015) corroborando com o presente estudo para isolados de *M. pingshaense* e *M. anisopliae*. Por outro lado, no mesmo estudo a concentração de 100µg de (*E*)-2-hexenal não apresentou diferença em relação ao controle, e para as concentrações de 200µg e 400µg desse composto a taxa de germinação foi menor que a do controle no tempo analisado, evidenciando um efeito fungistático em vez de fungicida como o observado aqui, onde as maiores concentrações (100 e 200µg) inviabilizaram completamente a germinação fúngica em todos os intervalos de tempo avaliados. De forma semelhante, na investigação

conduzida por BORGES et al. (1993), o mesmo composto (avaliado individualmente com concentração de 5mg/mL) inviabilizou a germinação de *M. anisopliae* mesmo após 72h.

Em relação ao crescimento fúngico, concentrações de 1mg e 0,5mg de (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-octenal em contato direto e fumigação respectivamente, foram capazes de causar inibição total do desenvolvimento fúngico para *M. anisopliae*, independentemente da forma de exposição (ULRICH et al., 2015). De forma similar, os mesmos compostos inibiram completamente o crescimento vegetativo de *M. anisopliae* em concentração também superior (SILVA et al., 2015). Sendo assim, considerando que as concentrações utilizadas são maiores que as do presente estudo, a inibição total ao invés da formação do halo poderia ser esperada. Por outro lado, como o tridecano não apresentou sequer efeito sob a germinação de conídios, outros estudos sobre o crescimento fúngico não avaliaram seu impacto, pois ele é inexistente.

Além disso, a comparação anterior baseou-se em *M. anisopliae* já que os efeitos dos compostos do feromônio de alarme de *E. heros* ainda não haviam sido avaliados sob *M. pingshaense*. Estudos gerais com pentatomídeos têm se concentrado principalmente entre as espécies de fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998; PATEL et al., 2006; LOPES et al., 2015; PELIN, 2017; STACKE, 2021) e *M. anisopliae* (BORGES et al., 1993; SOSA-GÓMEZ et al., 1997; SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998; QUINTELA et al., 2013; SILVA et al., 2015; ULRICH et al., 2015; PELIN, 2017). Apesar do número de estudos, não foi encontrado um que tenha avaliado o efeito do blend (mistura proporcional 1:1:1 dos compostos sintéticos majoritários do feromônio de alarme de *E. heros*) sobre o crescimento fúngico. Embora, muitos estudos tenham avaliado o efeito desses compostos sobre fungos entomopatogênicos *in vitro*, e esses testes possam funcionar como bioensaios de triagem (MORAES et al., 2008), o presente estudo é o primeiro passo para o início da compreensão sobre como os voláteis influenciam a germinação desses microrganismos diretamente no tegumento dos insetos.

Por fim, é importante ressaltar que a atividade antifúngica dos voláteis pode variar de acordo com a concentração, a intensidade (LOPES et al., 2015) e a metodologia de exposição (contato direto ou fumigação) como observado no presente estudo. A variação observada *in vitro* no tamanho do halo de inibição (superiores no método fumigação), pode ser explicada através da hidrofobicidade dos compostos que tem sua dispersão dificultada a partir do contato com o meio de cultura sólido. Considerando que ainda não se conhece completamente a interação entre os vários compostos presentes no feromônio de alarme dos pentatomídeos (FÁVARO & ZARBIN, 2012), o observado no presente estudo pode contribuir para essa discussão em andamento, buscando elucidar o que afeta o estabelecimento de infecções

fúngicas a essa família de insetos. Além de sugerir que as observações acerca da espécie *M. pingshaense* estão intimamente relacionadas à virulência que esta apresenta para o controle de *Euschistus heros*.

Referências

- ALDRICH, J. R. Chemical ecology of the *Heteroptera*. *Ann. Rev. Entomol.* 33: 211-238, 1988.
- ALTRE, J. A.; VANDENBERG, J. D. & CANTONE, F. A. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamond back Moth *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, V. 73, 3, P. 332-338, 1999.
- BLOMQUIST, G. J. & BAGNÈRES, A. G. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. *Insect Hydrocarbons, Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp. 3–18, 2010.
- BLOMQUIST, G. J.; TITTIGER, C. & JURENKA, R. Cuticular hydrocarbons and pheromones of arthropods. *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. Springer, Cham, pp. 1–432, 2018.
- BORGES, M.; LEAL, S. C. M.; TIGANO-MILANI, M. S. & VALADARES, M. C. C. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara Viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *An. Soc. Entomol. Bras.* 22: 505-512, 1993.
- BOUCIAS, D. G. & PENDLAND, J. C. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event mycoses in arthropod hosts. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. (Ed.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press, p. 101-127, 1991.
- BUENO, A. F.; PAULA-MORAES, S. V.; GAZZONI, D. L. & POMARI, A. F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption and adequacy. *Neotropical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 439-447, 2013.
- CITO, A.; MAZZA, G.; STRANGI, A.; BENVENUTI, C.; BARZANTI, G. P.; DREASSI, E.; TURCHETTI, T.; FRANCARDI, V. & ROVERSI, P. F. Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhychophorus ferrugineus*. *FEMS Microbiology Lett.* 355, pp. 108-115, 2014.
- CropLife. Novos produtos biológicos aprovados no Brasil. Disponível em <https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/> Acesso em: Nov. 2022.
- FÁVARO, C. F.; RODRIGUES M. A. D. M.; ALDRICH, J. R. & ZARBIN, P. H. G. Identification of semiochemicals in adults and nymphs of the stink bug *Pallantia macunaima* Grazia (Hemiptera: Pentatomidae). *J Braz Chem Soc* 22:58–64, 2011.
- FÁVARO, C. F. & ZARBIN, P. H. G. Identificação dos compostos defensivos encontrados nas glândulas metatorácica e abdominais dorsais dos percevejos *Loxa deducta* e *Pellaea stictica* (Heteroptera: Pentatomidae). *Quim. Nova*, v. 35, n. 8, pp. 1582-1586, 2012.
- FRANCIS, J. R. Biocontrol potencial and genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* lineage in agricultural habitats. *J. Appl. Microbiol.* 127, pp. 556-564, 2019.
- GILBY, A. R. & WATERHOUSE, D. F. Secretion from lateral scent glands of the green vegetable bug *Nezara viridula*. *Nature*, 216: 90-91, 1967.

- GOLEBIEWSKI, M. Comparison of Free Fatty Acids Composition Cuticular Lipids of *Calliphora vicina* Larvae and Pupae. *Lipids*, v. 47, p. 1001-1009, 2012.
- GROTH, M. Z. Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Australian Journal of Crop Science*, v.11, n.3, p. 360, 2017.
- HOWARD, R. & BLOMQUIST G. J. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual review of entomology*. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130359, 2005.
- KILPINEN, O.; LIU, D. & ADAMSEN, A. P. S. Real-time measurement of volatile chemicals released by bed bugs during mating activities. *PLoS ONE* 7:50981, 2012.
- LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIDGE, M. & PARKER, L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 82, pp. 139-147, 2003.
- LOPES, R. B.; LAUMANN, R. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M. & FARIA, M. 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, pp. 77-85, 2015.
- LOVETT, B.; BILGO, E.; MILLOGO, S. A.; OUATTARRA, A. K.; SARE, I.; GNAMBANI, E. J.; DABIRE, R. K.; DIABATE, A. & ST. LEGER, R. J. Transgenic *Metarhizium* rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. *Science*, 364, pp. 894-897, 2019.
- MANN, R. S.; ALI, J. G.; HERMANN, S. L. TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K. S.; ALBORN, H. T.; STELINSKI, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PlosPathogens*, San Francisco, v. 8, n. 3, pp. 1-13, 2012.
- MARTÍNEZ, L. C.; PLATA-RUEDA, A.; ZANUNCIO, J. C.; DE SOUZA, T. W. & SERRÃO, J. E. Comparative morphology of the odoriferous system in three predatory stink bugs (Heteroptera: Asopinae). *Protoplasma* 254:1965–1972, 2017.
- MAUCK, K. E.; DE MORAES, C. M. & MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *National Academy of Sciences of the USA, Washington Proceedings*, v. 1, n. 1, pp. 1-6, 2010.
- MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A. & BORGES, M. The chemical volatiles (semiochemicals) produced by Neotropical stinkbugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*. 37, 489-505, 2008.
- PADULLA, L. F. L. Estudos de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Dissertação Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba – SP, 92p.*, 2007.
- PANIZZI, A. R. Growing Problems with Stink Bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Species Invasive to the U.S. and Potential Neotropical Invaders, *American Entomologist*, V. 61,4, p. 223-233, 2015.
- PASQUALE, C.; GUARINO, S.; PERI, E; ALONZO, G. & COLAZZA, S. Investigation of cuticular hydrocarbons from *Bagrada hilaris* genders by SPME/GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 389, p. 1259-1265, 2007.
- PATEL, D. T.; FUXA, J. R. & STOUT, M. J. Evaluation of *Beauveria bassiana* for control of *Oebalus pugnax* (Hemiptera: Pentatomidae) in rice. *Journal Entomol. Sci.*, v. 41, p. 126-146, 2006.

- PEDRINI, N.; CRESPO, R. & JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 124-137. doi 10.1016/j.cbpc.2006.08.003, 2007.
- PEDRINI, N.; MIJAILOVSKY, S. J.; GIROTTU, J. R.; STARIOLO, R.; CARDOZO, R. M.; GENTILE, A.; JUÁREZ, M. P. & LEHANE, M. J. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 3, n. 5, 2009.
- PEDRINI, N.; ORTIZ-URQUIZA, A.; HUARTE-BONNET, C.; ZHANG, S. & KEYHANI, N. O. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4: 24, 2013.
- PELIN, M. L. Efeito de bioinseticidas à base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Dichelops melacanthus* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos – PR, 2017.
- QUINTELA, E. D. & McCOY, C. W. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with Imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology*, Riverside, n. 72, p. 220-230, 1998.
- QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SILVA, R. A.; BARRIGOSI, J. A. F.; MARTINS, J. F. Enhanced susceptibility of *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) to *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of chemical insecticides. *Biological Control*, v. 66, n. 1, p. 56-64, 2013.
- ROMÓN, P.; HATTING, H.; GOLDARAZENA, A.; ITURRONDOBEITIA, J. C. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana* to the pine weevil *Pissodes nemorensis* in relation to mycelium characteristics and virulence genes. *Fungal Biol.*, v. 121, n. 2, pp. 189-197, 2017.
- SCHUMACHER, V.; POEHLING, H. M. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology*, v. 116, n. 1, p. 121-132, 2012.
- SENTHIL-KUMAR, C. M.; JACOB, T. K.; DEVASAHAYAM, S.; GEETHU, C. & HARIHARAN, V. Characterization and biocontrol potential of a naturally occurring isolate of *Metarhizium pingshaense* infecting *Conogethes punctiferalis*. *Microbiological Research*, V. 243, 126645, ISSN 0944-5013, 2021.
- SESSA, L. CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. M.; ABREO, E.; ALTIER, N.; MIJAILOVSKY, S. J.; GIROTTI, J. R. & PEDRINI, N. Epicuticular hydrocarbons of the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae): sexual dimorphism and alterations in insects collected in insecticide-treated soybean crops. *Pest Management Science*, v. 77, 11, p. 4892-4902, 2021.
- SILVA, R. A.; QUINTELA, E.; MASCARIN, G. M.; PEDRINI, N.; LIÃO, L. M. & FERRI, P. H. Unveiling chemical defense in the rice stalk stink bug against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 127, 93–100, 2015.
- SOSA-GÓMEZ, 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. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 31–39, 1997.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. & MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* and *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, pp. 115-120, 1998.

- SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). *Neotropical Entomology*, v. 30, p. 317-320, 2001.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. & SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, p. 767-769, 2010.
- STACKE, R. S. Métodos de inoculação de *Beauveria bassiana* no percevejo *Euschistus heros* e compatibilidade com inseticidas químicos e adjuvantes. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 40p, Dissertação de Mestrado, 2021.
- TAMAI, M. A. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 3, p. 89-96, 2002.
- TUELHER, E. S.; SILVA, E. H.; RODRIGUES, H. S.; HIROSE, E.; GUEDES, R. N. C. & OLIVEIRA, E. E. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science*, v. 91, n. 2, p. 849-859, 2018.
- ULRICH, K. R.; FELDLAUFER, M. F.; KRAMER, M. & ST. LEGER, R. J. Inhibitions of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato in vitro by the bed bug defensive secretions (E)-2-hexenal and (E)-2-octenal. *BioControl* 60, 517-526, 2015.
- ZHAO, J. P.; WANG, H. T.; ZENG, X. N. & XUE, P. P. Differences in selection behaviors and chemical cues of adult asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected young shoots of citrus plants. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, v. 5, n. 9, p. 83-91, 2013.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui presentes trazem avanços significativos em prol do desenvolvimento e utilização do controle biológico para controle da praga em questão. A descoberta da alta virulência do fungo *Metarhizium pingshaense* sobre adultos de *Euschistus heros*, aliada à sua eficiência na produção de conídios abre as portas para a utilização desse agente microbiano em larga escala. Além disso, este estudo trouxe uma contribuição inédita ao demonstrar que *M. pingshaense* tem efeito ovicida sobre esse inseto-praga, o que amplia ainda mais seu potencial de controle. Outro achado relevante foi a constatação de que a menor concentração dos compostos sintéticos presentes no feromônio de alarme da espécie não prejudicou o desenvolvimento fúngico, bem como sua mistura apresentou efeito estimulante para *M. pingshaense*. Esse estudo abre perspectivas interessantes para o desenvolvimento de formulações e estratégias de aplicação que potencializem a ação do fungo no controle de pragas. Neste cenário estratégias mais eficientes e sustentáveis seriam alcançadas no manejo, trazendo benefícios tanto para a agricultura quanto para o meio ambiente.