

BIANCA CRISTINA COSTA GÊA

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS OBTIDOS DE SOLOS DE
DIFERENTES ECOSISTEMAS BRASILEIROS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Bemisia tabaci (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) E *Euschistus heros*
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

**Botucatu
2022**

BIANCA CRISTINA COSTA GÊA

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS OBTIDOS DE SOLOS DE
DIFERENTES ECOSSISTEMAS BRASILEIROS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Bemisia tabaci (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) E *Euschistus heros*
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de
Plantas).

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Coorientadora: Paula Leite dos Santos

Botucatu

2022

G292a	Gêa, Bianca Cristina Costa Avaliação de fungos entomopatogênicos obtidos de solos de diferentes ecossistemas brasileiros no controle biológico de <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) e <i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae) / Bianca Cristina Costa Gêa. -- Botucatu, 2022 85 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Carlos Frederico Wilcken Coorientadora: Paula Leite dos Santos 1. Beauveria. 2. Controle microbiano. 3. Cordyceps. 4. Metarhizium. 5. Prospeção. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS OBTIDOS DE SOLOS DE DIFERENTES ECOSISTEMAS BRASILEIROS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bemisia tabaci* (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) E DE *Euschistus heros* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

AUTORA: BIANCA CRISTINA COSTA GÊA

ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

COORIENTADORA: PAULA LEITE DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP



Pesquisador Dr. GABRIEL MOURA MASCARIN (Participação Virtual)
./ Embrapa Meio Ambiente



Pesquisadora Dr.ª SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO (Participação Virtual)
./ Ihara Indústrias Químicas S/A

Botucatu, 28 de julho de 2022

Aos meus país, Elvíra e Osni, e a minha
princesa Cacau, que estiveram comigo em todos os
momentos,

dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças, esperança e vontade de prosseguir todos os dias. No Senhor encontrei sabedoria e paz para realizar esse trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) pela oportunidade e por contribuir diretamente para o meu mestrado.

Ao Professor e Orientador Carlos Frederico Wilcken, pelos ensinamentos transmitidos com tanta sutilidade e paciência, e por confiar no meu trabalho. Agradeço e peço à Deus pela sua vida e pela vida dos seus.

À minha coorientadora e melhor amiga, Paula Leite dos Santos, por compartilhar seu conhecimento em microbiologia, por me amparar e abraçar nos melhores e piores momentos, sem você, não teria conseguido.

À banca, composta pelo Professor Dr. Carlos Frederico Wilcken e pelos pesquisadores, Dr^a. Simone Grazielle Moio Velozo e Dr. Gabriel Moura Mascarin, por todas as considerações feitas. Obrigada.

À todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) pelos ensinamentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio para execução do projeto Bio-Entosource (Processo nº 2018/12458-5).

Ao IPEF (Instituto de Estudos e Pesquisas Florestais) e às empresas filiadas, que integram o PROTEF (Programa de Proteção Florestal) que tanto auxiliaram para o desenvolvimento da pesquisa.

À Koppert pelo fornecimento dos insetos para início da criação em laboratório e pela concessão dos produtos microbiológicos para a realização dos testes de patogenicidade.

Aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, em especial Vanessa e Nivaldo, pela paciência, auxílio e amizade durante esses anos.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, em especial à equipe de microbiologia, Paula, Maurício, Pedro, Fabrício, Gabriela, Helena, Thiago e à técnica Fernanda, pela colaboração no decorrer dos experimentos, e principalmente, amizade.

À todos da minha família (avó, tia e primos) e ao meu namorado, Thiago, vocês foram únicos nessa caminhada.

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

“(...) portanto não vos entristeçais; porque a alegria do Senhor é a vossa força.”

BÍBLIA SAGRADA: Nova Almeida Atualizada (NAA). **Neemias 8:10**. 3. ed.
São Paulo: SBB, 2018. p. 1392.

RESUMO

Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) e *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B, são pragas da soja, *Glycine max*, no Brasil. O controle de ambas as pragas é majoritariamente realizado com inseticidas químicos, mas há demanda pelo controle biológico, incluindo o microbiano. Os fungos entomopatogênicos têm vantagens devido ao modo de ação, variabilidade genética e permanência no ambiente. Assim, o estudo teve por objetivo isolar e identificar fungos entomopatogênicos obtidos de solos dos estados de SP, PR e MA, avaliando a patogenicidade dos microrganismos sobre *E. heros* e *B. tabaci*. Os fungos foram obtidos pelo “Bait Method” com larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), alocados em potes com 50 g de solo. Os insetos mortos foram coletados diariamente e mantidos em câmara úmida para isolamento dos fungos, posteriormente foram preservados pelo método de Castellani e identificados por caracterização morfológica e molecular. Os testes de patogenicidade foram feitos em ovos, ninfas de 3º instar e adultos de *E. heros* e em ninfas de 4º instar de *B. tabaci*, com isolados que apresentaram viabilidade acima de 90%. Uma alíquota de 127 µl de cada suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 conídios/mL, com 0,01% de Tween 80, foi aplicada com aerógrafo a 10 psi de pressão em cada placa de Petri contendo cinco ovos ou quatro ninfas/adultos de percevejo marrom ou dez ninfas de mosca-branca. O controle consistiu em água destilada autoclavada com 0,01% de Tween 80. Os experimentos com *E. heros* permaneceram em sala, a 25°C e UR de 80%, e foram avaliados diariamente por 15 dias, enquanto que os experimentos com a *B. tabaci* permaneceram por oito dias sob condições controladas em câmara tipo BOD (Temp. de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h). Os insetos foram avaliados diariamente, e levados para câmara úmida, favorecendo a esporulação. Foram identificados 28 isolados de *Metarhizium anisopliae*, 10 de *Beauveria bassiana*, sete de *M. robertsii*, três de *Purpureocillium lilacinum*, dois do gênero *Cordyceps* e um *M. guizhouense*. Foram avaliados 25 isolados em adultos e 28 em ninfas e ovos, nos testes de patogenicidade contra o percevejo marrom. Os mais patogênicos foram os isolados LCBPF 11, 19, 20 e 28, além do produto comercial Octane® para adultos, LCBPF 23, 77, 79, 80 e 82 para as ninfas de terceiro instar e LCBPF 08, 13, 63 e 81, além do produto comercial Octane® para os ovos. Para a mosca-branca, foram avaliados 27 isolados, se destacando o LCBPF 23 de *B. bassiana*, LCBPF 11 de *C. javanica*, LCBPF 02 de *C. amoene-rosea* e LCBPF 15 de *B. bassiana*, com eficiência de 100%, 100%, 95% e 95%, respectivamente. Sendo assim, os fungos entomopatogênicos apresentaram potencial de controle para ambas as pragas.

Palavras-chave: biocontrole; *Beauveria*; controle microbiano; *Cordyceps*; mosca-branca; *Metarhizium*; percevejo marrom; prospecção.

ABSTRACT

Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotype B, are pests of soybean, *Glycine max*, in Brazil. The control of both pests is mostly carried out with chemical insecticides, but there is a demand for biological control, including microbial control. Entomopathogenic fungi have advantages due to their mode of action, genetic variability and permanence in the environment. Thus, the study aimed to isolate and identify entomopathogenic fungi obtained from soils in the states of SP, PR and MA, evaluating the pathogenicity of microorganisms on *E. heros* and *B. tabaci*. The fungi were obtained by the "Bait Method" with larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), placed in pots containing 50 g of soil. Dead insects were collected daily and kept in a humid chamber for the isolation of fungi, preserved by the Castellani method and identified by morphological and molecular characterization. Pathogenicity tests were performed on eggs, 3rd instar nymphs and adults of *E. heros* and on 4th instar nymphs of *B. tabaci*, with strains that showed viability above 90%. An aliquot of 127 μL of each fungal suspension at a concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} , with 0.01% Tween 80, was applied with an airbrush at 10 psi pressure in each Petri dish containing five eggs or four brown stink bug nymphs/adults or ten whitefly nymphs. The control was performed with autoclaved distilled water with 0.01% Tween 80. The experiments with *E. heros* were kept in a room at 25°C and 80% RH, and were evaluated daily for 15 days, while the experiments with the *B. tabaci* remained during eight days under controlled conditions in a BOD-type chamber (25 ± 1 °C and 12 h photophase). The insects were evaluated daily and taken to a humid chamber to improve sporulation. Twenty-eight strains of *Metarhizium anisopliae*, 10 of *Beauveria bassiana*, seven of *M. robertsii*, three of *Purpureocillium lilacinum*, two of the genus *Cordyceps* and one of *M. guizhouense* were identified. Were evaluated 25 strains in adults and 28 in nymphs and eggs, in the pathogenicity tests against the brown stink bug and the most pathogenic were the strains LCBPF 11, 19, 20 and 28, in addition to the commercial product Octane® for adults, LCBPF 23, 77, 79, 80 and 82 for 3rd instar nymphs and LCBPF 08, 13, 63 and 81, in addition to the commercial product Octane® for eggs. For the whitefly, 27 strains were evaluated, especially LCBPF 23, LCBPF 11, LCBPF 02 and LCBPF 15, with 100, 100, 95 and 95% of efficiency, respectively. Thus, the entomopathogenic fungi showed control potential for both pests.

Keywords: *Beauveria*; brown stink bug; *Cordyceps*; *Metarhizium*; microbial control; whitefly; prospection.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 – PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Bemisia tabaci</i> BIÓTIPO B (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1.3 RESULTADOS.....	32
1.4 DISCUSSÃO.....	40
1.5 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 2 – PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS PARA O CONTROLE DE <i>Euschistus heros</i> (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)	52
2.1 INTRODUÇÃO.....	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.3 RESULTADOS.....	61
2.4 DISCUSSÃO.....	72
2.5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda global por recursos alimentares vêm direcionando o cultivo de plantas para sistemas produtivos que venham a garantir o aumento na produtividade das culturas (TOLOI et al., 2021). Segundo os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o valor bruto da produção agrícola brasileira em 2021 atingiu R\$ 1,129 trilhão (MAPA, 2022). Dentre os principais produtos exportados pelo país, a soja a (*Glycine max* L. Merrill) (Fabaceae) apresentou valor bruto na safra 2020/2021, de 366,0 bilhões (MAPA, 2022). O Brasil é o maior produtor da cultura, com 136 milhões de toneladas na safra de 2020/2021 (CONAB, 2021), a qual vem sendo amplamente explorada para alimentação humana e animal, assim como utilizada para a fabricação de biocombustíveis. Grande parte da produção de soja é destinada à produção de farelo e óleo, sendo o primeiro destinado à produção de rações para animais (CONAB, 2020). Apesar da alta demanda nacional e internacional, a produtividade brasileira encontra-se na 5ª posição entre os países com maior produtividade por hectare, com 3,27 t/ha, atrás da Turquia (4,41 t/ha), Itália (3,92 t/ha), Estados Unidos (3,37 t/ha) e Geórgia (3,37 t/ha) (FAOSTAT, 2022).

Neste contexto, as perdas proporcionadas pelos insetos-praga geram decréscimo de US\$ 17,7 bilhões, em média, para o setor agrícola brasileiro (OLIVEIRA et al., 2014; POZEBON et al., 2020). Para a soja, as perdas ocasionadas por esses organismos podem chegar a 4,31 mt, representando perda econômica anual de US\$ 1,51 bilhões (CONAB, 2017; POZEBON et al., 2020), sendo assim, estão diretamente associados à redução da produtividade da cultura, fazendo-se necessário o controle destes para obtenção de maior produtividade e qualidade dos produtos (ONSTAD; CRAIN, 2019).

Anteriormente de importância secundária no Brasil, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) é definida como um complexo de espécies crípticas, com, ao menos, 44 espécies, morfologicamente idênticas, porém geneticamente distintas. A identificação das espécies do complexo pode ser obtida com base em marcadores moleculares, capacidade de transmissão viral, endossimbiontes, relações com as plantas hospedeiras, resistência a inseticidas químicos, habilidade de invasão e mais recentemente através da análise do gene da subunidade I do citocromo oxidase mitocondrial (*mtCOI*) (KANAKALA; GHANIM, 2019); Dentro desse

complexo, a espécie invasiva de mosca-branca *Middle East-Asia Minor 1* (biótipo B), introduzida na década de 1990, tornou-se nos últimos anos praga-chave para a cultura da soja (POZEBON et al., 2020; VIEIRA et al., 2013).

O desenvolvimento da mosca-branca é do tipo neometabólico, com ciclo de vida envolvendo a fase de ovo, os quais são elípticos, pedunculados, localizando-se, majoritariamente, na face abaxial das folhas. O desenvolvimento pós-embriônico é dividido em quatro ínstaes. No primeiro estágio, a ninfa é móvel e translúcida. Nos estádios seguintes elas se tornam sésseis e a coloração varia de um ínstar para outro. Além disso, durante o período ninfal, os insetos possuem características de serem achatados e finos, sendo a diferenciação entre os ínstaes realizada, principalmente, através do tamanho (CABALLERO, 1996; VILLAS-BÔAS; CASTELO-BRANCO, 2009). Quando adulto, *B. tabaci* possui dois pares de asas membranosas, recobertas por uma substância branca pulverulenta, com fêmeas e machos, medindo entre 1 a 2 mm (QUINTELA, 2002; VILLAS-BÔAS; CASTELO-BRANCO, 2009). Cada fêmea pode produzir até 300 ovos durante o seu ciclo de vida (GALLO et al., 2002). Possui aparelho bucal tipo sugador labial tetraqueta, com canais de alimentação e saliva, formados pela justaposição dos estiletes maxilares (CARVER; GROSS; WOODWARD, 1994; VILLAS-BÔAS; CASTELO-BRANCO, 2009).

As perdas causadas à soja por *B. tabaci* podem ocorrer de três maneiras. As ninfas e os adultos, ao se alimentarem, causam danos devido a injeção de toxinas e sucção do floema, provocando alterações fisiológicas à planta, o que influencia no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da lavoura. Há também a excreção do *honeydew* pelo inseto, substância açucarada que favorece o desenvolvimento do fungo saprófita no gênero *Capnodium* sp., conhecido como fumagina, o qual reduz a capacidade fotossintética da planta e, portanto, na produção e qualidade dos grãos (SCHUTZE et al., 2022). No entanto, o maior impacto dessa praga às lavouras de soja se dá devido à transmissão de vírus fitopatogênicos, com destaque ao *cowpea mild mottle virus* (CPMMV) (família *Betaflexiviridae*, gênero *Carlavirus*), o qual é eficientemente transmitido pelo biótipo B, que causa sintomas como nanismo, necrose, mosaico e clorose em soja, podendo, inclusive, levar a planta à morte e a perdas que variam de 174 a 638 kg/ha, a variar com a cultivar utilizada (BARRETO DA SILVA et al., 2020; BELLO et al., 2021).

Além da relevância para a cultura da soja, *B. tabaci* apresenta importância para o cenário agrícola no geral, devido ao seu alto potencial biótico, comportamento cosmopolita e polífago (SANTOS et al., 2018). Outra importante característica do inseto é a rápida seleção de populações resistentes a moléculas inseticidas, com 688 casos de resistência relatados no mundo (MOTA-SANCHEZ; WISE, 2022).

Além da mosca-branca, destaca-se a ocorrência dos percevejos fitófagos, grupo de pragas que mais causa perdas à produtividade da soja da América do Sul (BUENO et al., 2015). Desse grupo, o percevejo marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), é a espécie mais importante para a cultura em diversas regiões produtoras no Brasil, com alta abundância e dificuldades no manejo (BUENO et al., 2020; PANIZZI, 2013; PAZINI et al., 2019).

Com desenvolvimento hemimetabólico, o percevejo marrom possui ovos de coloração amarelada. A oviposição ocorre nas folhas e vagens, em quantidade de 6 a 15 ovos, arranjados paralelamente em duas ou três fileiras (DEGRANDE; VIVAN, 2012; GALLO et al., 2002). Suas formas imaturas passam por cinco estádios ninfais, apresentando em todos eles coloração que pode variar de cinza a marrom. No primeiro ínstar, as ninfas apresentam hábito gregário, permanecendo agrupadas em colônias sobre o córion dos ovos, sem que danos à soja sejam causados. Iniciam a alimentação no segundo ínstar, porém é somente no terceiro, quando apresentam tamanho médio de 3,63 mm, que danos maiores são causados aos grãos e sementes de soja (TESSMER et al., 2022). Quando adultos, atingem tamanho que pode variar de 9 a 15 mm, apresentam coloração marrom escura ou avermelhada, com dois prolongamentos laterais no pronoto em formato de espinhos pontiagudos, além da presença de uma mancha branca, em formato de “meia-lua”, localizada na extremidade do escutelo (AVILA; GRIGOLLI, 2014; DEGRANDE; VIVAN, 2012; GALLO et al., 2002).

Este inseto apresenta preferência pela soja, porém após a senescência e colheita da cultura, dispersa-se para plantas alternativas ou aloja-se na palhada existente no solo, visto a sua capacidade de permanecer em diapausa enquanto as condições não são favoráveis (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012; PEREIRA; SALVADORI, 2008; ZERBINO; PANIZZI, 2019).

Essa espécie de percevejo ocorre na soja desde a fase vegetativa, mas os danos tem início a partir da formação das vagens e ocorrem até a maturação dos grãos (CORRÊA-FERREIRA, 2012) devido ao processo alimentar, o qual prejudica a

qualidade fisiológica e sanitária das sementes (BUENO et al., 2020). Apenas no Brasil os danos dessa espécie de inseto podem chegar a R\$ 2 bilhões caso nenhuma medida de controle seja tomada (OLIVEIRA; LUCINI; PANIZZU, 2022).

Ao contrário do que ocorre com *B. tabaci*, *E. heros* não apresenta casos muitos casos de resistência à inseticidas químicos. Atualmente há 11 registros para a praga, todos no Brasil, e a maioria no Rio Grande do Sul (MOTA-SANCHEZ; WISE, 2022).

No entanto, o controle do percevejo marrom e da mosca-branca, é realizado majoritariamente pelo uso inseticidas químicos, os quais, dentre outros fatores, favorecem a seleção de populações resistentes, fato que vem sendo evidenciado a cada ano devido ao aumento nos casos de surtos nas regiões produtoras, dificultando ainda mais o manejo dessas pragas (PADILHA et al., 2021; PAZINI et al., 2019; POZEBON et al., 2020; TUELHER et al., 2018), além desencadearem problemas relacionados à contaminação ambiental, desequilíbrio da biodiversidade e do agroecossistema (HOROWITZ; ISHAAYA, 2014; PAZINI et al., 2019).

Dada a problemática acerca dos inseticidas químicos, em especial daqueles não seletivos, explorar estratégias para o controle dessas pragas, as quais aliadas ao controle químico seletivo, que reduzam a população desses insetos nas áreas de cultivo, são fundamentais (SUN; WU; ALI, 2021). No manejo integrado de pragas (MIP), os fungos entomopatogênicos (FEP) são reconhecidos há anos como inimigos naturais das populações de insetos-praga, com diferentes gêneros e isolados testados para o controle de *B. tabaci* e *E. heros* (ABDULLE et al., 2020; MASCARIN, 2013a; NORA et al., 2021; RESQUÍN-ROMERO et al., 2020; SUN; WU; ALI, 2021).

Esses patógenos, diferentemente do que ocorre com bactérias e vírus entomopatogênicos, possuem a capacidade de infectar o hospedeiro através do tegumento, devido, entre outras, à produção de enzimas como quitinases, proteases, esterases, lipases, fosfolipase C e catalase, que degradam a cutícula, conferindo vantagens no controle de insetos sugadores de seiva (MASCARIN et al., 2013a; QU; WANG, 2018). Esses microrganismos possuem a capacidade de causar epizootias, no entanto, na maioria dos casos, é insuficiente para controlar insetos-praga nas áreas cultivadas, o que justifica a adoção do controle biológico aplicado nas áreas de ocorrência da praga de interesse, uma vez que se aumenta a quantidade de inóculo presente no local (NORA et al., 2021). A Busca por isolados

de FEP é a etapa inicial para o desenvolvimento de bioinseticidas, visto a variabilidade genética desses microrganismos e a possibilidade de se encontrar cepas mais virulentas e patogênicas, seguido de testes em laboratório para avaliar a patogenicidade em insetos-praga, como é o caso de *B. tabaci* e do *E. heros* (BOTELHO et al., 2019). O Brasil possui a maior biodiversidade tropical do mundo (MITTERMEIER et al., 2005) e o solo é considerado um excelente local para permanência de FEP, visto estar protegido da radiação ultravioleta (UV) e de outras influências bióticas e abióticas (SANCHEZ-PENA et al. 2011). Além disso, diversos estudos já comprovaram que os entomopatógenos isolados de ambientes naturais, como o solo, são eficientes contra *B. tabaci* e *E. heros* (NORA et al., 2021; SANCHEZ-PENA et al. 2011; SUN; WU; ALI, 2021;). Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram isolar e identificar fungos entomopatogênicos de áreas nativas dos estados de SP, PR e MA e de áreas de soja e de eucalipto dos estados de SP e MA, cobrindo três regiões brasileiras, Sudeste, Sul e Nordeste, respectivamente, além de avaliar a patogenicidade dos fungos identificados e de fungos já pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) em *Bemisia tabaci* e *Euschistus heros*.

CAPÍTULO 1

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bemisia tabaci* BIÓTIPO B (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Bianca Cristina Costa Gêa¹; Paula Leite dos Santos¹; Thiago Souza Bulhões¹; Maurício Magalhães Domingues¹; Pedro Henrique Queiroz Navarro¹; Vanessa Rafaela de Carvalho¹; Carlos Frederico Wilcken¹.

¹Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae), biótipo B, se tornou praga-chave para a cultura da soja (*Glycine max*) no Brasil. O principal método de controle é o químico, porém, casos de resistência às moléculas tem aumentado. O manejo com agentes de controle microbiano, como fungos entomopatogênicos, tem sido explorado. Assim, objetivou-se isolar e identificar fungos entomopatogênicos obtidos de solos dos estados de SP, PR e MA, avaliando a patogenicidade dos isolados sobre *B. tabaci*. Os fungos foram obtidos pelo “*Bait Method*” com larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), alocados em potes com 50 g de solo. Os insetos mortos eram coletados diariamente e mantidos em câmara úmida para isolamento dos fungos, preservados pelo método de Castellani, e identificados por caracterização morfológica e molecular. O teste de patogenicidade foi feito com os isolados que apresentaram viabilidade acima de 90%. Recortes de 20 mm de folhas de couve com 10 ninfas de mosca branca de 4º instar foram acondicionadas em placas de Petri com solução de gel hidrorretentor na concentração de 5 g L⁻¹ de água. Uma alíquota de 127 µl de cada suspensão fúngica na concentração de 1x10⁸ conídios mL⁻¹ com 0,01% de Tween 80, foi aplicada com aerógrafo na pressão de 10 psi. O controle consistiu na aplicação de água destilada autoclavada com 0,01% Tween 80. Os experimentos permaneceram em BOD (Temp. 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h), e eram avaliados diariamente por sete dias em microscópio estereoscópio. As ninfas eram consideradas mortas quando apresentavam aspecto dessecado, coloração amarelada ou avermelhada e/ou crescimento micelial. Foram identificados 28 isolados de *Metarhizium anisopliae*, 10 de *Beauveria bassiana*, sete de *M. robertsii*, três de *Purpureocillium lilacinum*, dois do gênero *Cordyceps* e um *M. guizhouense*. Dentre os isolados mais patogênicos à *B. tabaci*, se destacaram o LCBPF 23 de *B. bassiana*, LCBPF 11 de *C. javanica*, LCBPF 02 *C. amoene-rosea* e LCBPF 15 de *B. bassiana*, com eficiência de 100%, 100%, 95% e 95%, respectivamente. Assim, há isolados que apresentaram capacidade de utilização na formulação de produtos comerciais para controle de *B. tabaci*, sendo necessários testes de campo para confirmação dos resultados.

Palavras-chave: *Beauveria*; controle microbiano; *Cordyceps*; mosca-branca; *Metarhizium*; prospecção.

ABSTRACT

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae), biotype B, has become a key pest for soybean (*Glycine max*) in Brazil. The main method of control is chemical, however, cases of resistance to molecules have increased. Management with microbial control agents, such as entomopathogenic fungi, has been explored. Thus, the objective was to isolate and identify entomopathogenic fungi obtained from soils in the states of SP, PR and MA, evaluating the pathogenicity of the strains on *B. tabaci*. The fungi were obtained by the "Bait Method" with larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), placed in pots with 50 g of soil. Dead insects were collected daily and kept in a humid chamber for isolation of fungi, preserved by the Castellani method, and identified by morphological and molecular characterization. The pathogenicity test was performed with the strains that presented viability above 90%. Cuts of 20 mm of cabbage leaves with 10 4th instar whitefly nymphs were placed in Petri dishes with a water-retaining gel solution at a concentration of 5 g L⁻¹ of water. A 127 µl aliquot of each fungal suspension at a concentration of 1x10⁸ conidia mL⁻¹ with 0.01% Tween 80 was applied with an airbrush at a pressure of 10 psi. The control consisted of the application of autoclaved distilled water with 0.01% Tween 80. The experiments remained in BOD (Temp. 25 ± 1 °C and 12 h photophase), and were evaluated daily for seven days under a stereoscopic microscope. Nymphs were considered dead when they presented a desiccated appearance, yellowish or reddish color and/or mycelial growth. Twenty-eight isolates of *Metarhizium anisopliae*, 10 of *Beauveria bassiana*, seven of *M. robertsii*, three of *Purpureocillium lilacinum*, two of the genus *Cordyceps* and one of *M. guizhouense* were identified. Among the most pathogenic isolates to *B. tabaci*, LCBPF 23 of *B. bassiana*, LCBPF 11 of *C. javanica*, LCBPF 02 *C. amoene-rosea* and LCBPF 15 of *B. bassiana* stood out, with efficiency of 100%, 100%, 95% and 95%, respectively. Thus, there are isolates that were able to be used in the formulation of commercial products to control *B. tabaci*, requiring field tests to confirm the results.

Keywords: *Beauveria*; *Cordyceps*; *Metarhizium*; microbial control; prospection; whitefly.

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando nas últimas safras como o maior produtor mundial de soja (*Glycine max* L. Merrill) (Fabaceae) (CONAB, 2021). A mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae) se tornou nos últimos anos praga-chave para a cultura (POZEBON et al., 2020; VIEIRA et al., 2013). Os danos podem ser causados por ninfas e adultos, que ao se alimentarem, danificam as plantas devido injeção de toxinas e sucção do floema, além disso, há a excreção do

honeydew, substância açucarada que favorece o desenvolvimento do fungo saprófita *Capnodium* sp., o qual reduz a capacidade fotossintética da planta, e a transmissão de vírus entomopatogênicos, dano indireto de maior impacto dessa praga, com destaque ao *cowpea mild mottle virus* (CPMMV) (família Betaflexiviridae, gênero Carlavirus), o qual é eficientemente transmitido pelo biótipo B, que pode levar a planta a morte e a perdas que variam de 174 a 638 kg/ha, a variar com a cultivar utilizada (BARRETO DA SILVA et al., 2020; BELLO et al., 2021).

O uso de inseticidas químicos é o método mais utilizado para controlar populações de *B. tabaci* (PADILHA et al., 2021; POZEBON et al., 2020). No entanto, o uso isolado dessa abordagem vem causando prejuízos ambientais, desequilíbrio no agroecossistema (HOROWITZ; ISHAAYA, 2014; PADILHA et al., 2021), e rápida seleção de populações resistentes às moléculas (MOTA-SANCHEZ; WISE, 2022), fatos estes que vêm estimulando a busca por novas táticas de manejo.

Dentre os diversos agentes de biocontrole a serem utilizados para mosca-branca, os fungos entomopatogênicos (FEP) possuem a capacidade de infectar o hospedeiro através do tegumento, conferindo vantagens no controle de insetos sugares de seiva (MASCARIN et al., 2013a; QU; WANG, 2018). Além disso, vem ganhando destaque no mercado mundial, com mais de 1000 espécies já relatadas (CHEN et al., 2021), e em especial, os pertencentes ao Filo Ascomycota e Ordem Hypocreales, ocorrem naturalmente no solo (SCHEEPMAKER; BUTT, 2010), como é o caso de *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Cordyceps* sp. e *Purpureocillium* sp., os quais vem atingindo altos níveis de controle de *B. tabaci* (GEBREMARIAM; CHEKOL; ASSEFA, 2022; MASCARIN et al., 2013a; SANTIAGO-ÁLVAREZ et al., 2006; SUN, WU, ALI, 2021; TIAN et al., 2015). A maior diversidade tropical do mundo está no Brasil (MITTERMEIER et al., 2005), e apesar da importância dos FEP como agentes de biocontrole na agricultura brasileira, a diversidade e a distribuição dos gêneros associados à ambientes naturais e cultivados ainda são pouco conhecidos. Sendo assim, os objetivos do primeiro capítulo foram investigar a distribuição de FEP de solos de diferentes biomas brasileiros e avaliar a patogenicidade dos entomopatógenos identificados e dos já pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) em *B. tabaci* biótipo B, visando fornecer novos recursos fúngicos para o controle biológico da praga.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Local do estudo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), localizado no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

1.2.2 Criação de *Tenebrio molitor* (Coleptera: Tenebrionidae)

Os insetos utilizados foram provenientes de criação estabelecida no LCBPF, criados em caixas de 15 L com farelo de trigo, previamente esterilizado, e chuchu, como fonte de umidade. A temperatura da sala de criação foi mantida a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com pouca luminosidade e baixa umidade relativa, favorecendo o desenvolvimento do inseto (RIBEIRO et al., 2018). As manutenções eram realizadas três vezes na semana para retirada das pupas das caixas das larvas e dos insetos mortos, e o farelo trocado sempre que apresentasse aspecto de pó. Além disso, uma nova caixa de larvas neonatas era feita sempre que necessário. Dessa forma, as caixas eram divididas conforme o tamanho das larvas, sendo neonatas, médias, pupas e adultos. Foram utilizadas para os bioensaios de prospecção dos FEP, insetos de terceiro ínstar presentes nas caixas, medindo de 2 a 2,5 cm de comprimento.

1.2.3 Criação de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Os insetos utilizados para os bioensaios de patogenicidade foram provenientes da criação estabelecida no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu. Adultos de mosca-branca, provenientes do campo, onde infestavam plantas de soja, foram coletados, trazidos e mantidos em plantas de couve *Brassica oleraceae* (Brassicaceae), em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. Plantas de couve com ninfas de quarto ínstar foram utilizadas nos bioensaios.

1.2.4 Bioensaios para prospecção dos fungos entomopatogênicos

Os isolados de fungos entomopatogênicos foram prospectados de amostras de solo coletadas de áreas de mata nativa dos estados de São Paulo, Paraná e Maranhão, e de cultivada por soja e eucalipto, nos estados de São Paulo e Maranhão (Tabela 1).

Tabela 1 - Localização das mostras de solo coletadas em três estados brasileiros, Maranhão, São Paulo e Paraná, em área com solo cultivado (soja e eucalipto) e não cultivado (floresta nativa), com o respectivo número de isolados obtidos, época e ano de coleta.

Estado	Cidade	Área	Localização	Nº de amostras coletadas	Nº de isolados	%	Época do ano
Maranhão	Açailândia	Eucalipto	5° 02' 20-25.2-9" S 47° 33' 52-55.1-9" O	10	11	22,45%	Out./2021
	Grajaú	Nativa	5° 50' 09-11.0-9" S 46° 12' 43-45.1-8" O	10	9	18,37	Out./2021
	Brejo	Soja	3° 43-44' 1-9.17-46" S 42° 57' 4-9.02-96" O	10	17	34,70	Prim./2020
São Paulo	Agudos	Eucalipto	22° 32' 1-2" S 49° 2' 11-13" O	10	4	8,16	Prim./2019
	Botucatu	Nativa	22° 50' 15-31" S 48° 25-26' 26-35" O	10	2	4,08	Ver./2020
	Botucatu	Soja	22° 48-50' 31-51" S 48° 25-26' 26-35" O	10	5	10,20	Ver./2020
Paraná	Mandaguaçu	Nativa	23° 23' 5-8.5-8" S 52° 08' 43-44.4-44" O	10	1	2,04	Ver./2020
Total	-	-	-	70	49	100	-

Para o isolamento, utilizou-se o "*Bait method*", com larvas de terceiro ínstar de *T. molitor* (ZIMMERMANN, 1986). Para isso, 10 amostras por área foram coletadas a 10 cm de profundidade da superfície (Figura 1), transportadas ao LCBPF em sacos de papel, dentro de caixas térmicas com gelo, e armazenadas em freezer, a -4 °C, até o processamento. Cada amostra de solo foi dividida em 10 repetições, e considerado como um tratamento. Sendo assim, cada área contava com 10 tratamentos.

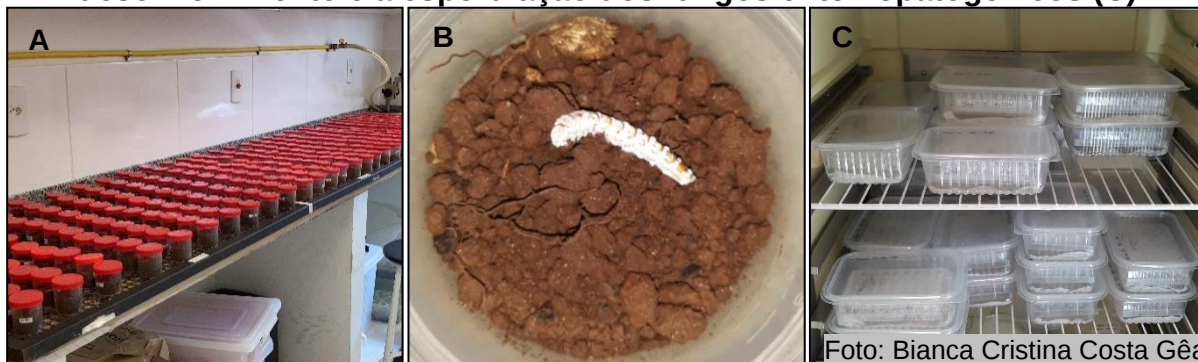
Figura 1 - Coleta do solo de área de floresta plantada com eucalipto, após retirada da matéria orgânica, seguido de armazenamento em sacos de papel para envio ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais.



Foto: Bianca Cristina Costa Gêa

Cinco larvas de *T. molitor* foram alocadas em um recipiente plástico de 100 ml, contendo 50 g de cada amostra de solo, o qual foi umedecido na capacidade de campo (UCC) de 40%, foi calculada para cada amostra, conforme a fórmula: $UCC = [(Massa \text{ de solo } 100\% \text{ umidade} - massa \text{ de solo seco}) \times 40/100]$. Os potes com os insetos foram mantidos em sala a temperatura de $25 \pm 1^\circ C$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Figura 2A). Nos primeiros cinco dias, os potes foram invertidos diariamente, visto os insetos apresentarem fototropismo negativo, objetivando o contato direto das larvas com todo o solo. Posterior a esses dias, as avaliações eram realizadas a cada dois dias, por 44 dias, totalizando 14 avaliações, e os insetos mortos eram retirados e superficialmente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) por 30 segundos, e em seguida, lavados em água destilada autoclavada por 30 s (Figura 2B). Os insetos foram mantidos no interior do fluxo laminar, para secarem, transferidos individualmente para poços de câmaras úmidas feitas com placas de cultura de célula de 48 poços, e incubados em câmara tipo BOD (Temp. de $25 \pm 1^\circ C$ e fotofase de 12 h) por 14 dias, visando estimular o desenvolvimento e a esporulação dos FEP (Figura 2C).

Figura 2 – Bioensaio conduzido com a técnica “Bait method” para detecção de fungos entomopatogênicos em larvas de *Tenebrio molitor* (Temp. de 25 ± 1 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h) (A); inseto apresentando sinal de infecção por fungo entomopatogênico durante a avaliação (B); Câmaras úmidas feitas com placas de cultura de célula de 48 poços, incubados em câmara tipo BOD (Temp. de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 14 dias, visando estimular o desenvolvimento e a esporulação dos fungos entomopatogênicos (C).



O isolamento dos fungos foi realizado em placas de Petri (90 mm) com 15 ml de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, Sigma-Aldrich 39 g/L), autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$). Cada isolado foi mantido em câmara tipo BOD, conforme descrito acima.

1.2.5 Preservação dos isolados de fungos entomopatogênicos obtidos

Os isolados de interesse foram preservados utilizando o método descrito por Castellani em 1939, o qual consiste na conservação por suspensão em água destilada em tubos de penicilina, mantidos em temperatura ambiente (JONK; ATKINS, 1986), e também em glicerina a 10%, armazenados em freezer a -20 °C.

1.2.6 Identificação dos isolados

Os isolados foram previamente identificados, ao nível de gênero, por exame morfológico e ao nível de espécie por análise molecular.

1.2.6.1 Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em placa de Petri (90 mm) contendo 15 ml de meio de cultura BDA, autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 g.L⁻¹)., mantidos em câmara tipo BOD (Temp. de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 14 dias e analisados quanto à sua estrutura, formada a partir do arranjo do conidióforo, fiálide e conídios, em microscópio óptico na amplificação de 400x (GADDEYYA et al., 2012).

1.2.6.2 Caracterização molecular

A extração do DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular e Nematologia, do Departamento de Proteção Vegetal, FCA/UNESP. O micélio e os conídios dos isolados com 14 dias de crescimento em placa de Petri contendo 15 ml de meio BDA, previamente autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 g.L⁻¹)., foram utilizados para a caracterização molecular. Em cada microtubo contendo a amostra do fungo para extração do DNA foram adicionados 80 µl de solução de resina Chelex 10% e 8 µl de proteinase K (20 mg/ml), e em seguida, incubada em bloco térmico por 95 °C a 20 minutos. O sobrenadante foi coletado para realização da reação de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, e foi realizada em um volume total de 50 µl, usando tampão Taq DNA Polymerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0,2 mM de dNTPs, 0,2 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA. A amplificação foi conduzida em termociclador (Infinigen, TC-96CG, USA), programado para desnaturação inicial a 95 °C por cinco minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 62 °C por um minuto, extensão a 72 °C por cinco minutos e extensão final a 72 °C por cinco minutos (XIONG et al., 2013).

Os produtos das extrações de DNA e da reação de PCR (50 µl) foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% sob luz ultravioleta (UV) e foto documentador. Os produtos de amplificação foram purificados por beads magnéticas e encaminhadas para o Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP/Botucatu, SP,

para sequenciamento Sanger. A sequência obtida foi utilizada para encontrar a sequência mais similar depositada do GenBank, usando a ferramenta BLASTn.

1.2.7 Viabilidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos

Cada isolado de FEP foi inoculado em placa de Petri (90 mm) contendo 15 ml de BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), previamente autoclavado a 121°C e 1 atm por 20 minutos, foi mantido em BOD (Temp. de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h) por 14 dias, até o completo desenvolvimento e esporulação.

A viabilidade de todos os fungos foi determinada depositando uma alíquota 100 μl da suspensão de conídios na concentração de 1×10^6 conídios/ml, previamente preparada com solução do surfactante Tween 80 (0,01% v/v), em placas de Petri (90 mm) contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), e incubadas em BOD, conforme descrito acima, por 18 h. O conídio foi considerado viável quando o tubo germinativo se encontrava duas vezes maior que o diâmetro do esporo. Um total de 100 conídios por repetição foi contabilizado em microscópio óptico com amplificação de 400x, utilizando-se três repetições por isolado. Os fungos que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizados nos bioensaios com os insetos (WRAIGHT; INGLIS; GOETTEL, 2007).

1.2.8 Screening dos isolados de fungos entomopatogênicos em *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyloridae)

O bioensaio de patogenicidade dos isolados em ninfas de quarto ínstar de *B. tabaci* biótipo B foi conduzido com 28 isolados de FEP (Quadro 1), três produtos comerciais (Boveril® WP, isolado PL63 de *Beauveria bassiana*; Metarril® WP, isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*; e Octane® SC, isolado 1296 de *Cordyceps fumosorosea*) e uma testemunha, composta por solução de Tween 80 (0,01% v/v).

Os conídios foram obtidos em placas de Petri (90 mm) contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com sulfato de estreptomicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), mantidos em câmara tipo BOD (Temp. de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h) por 14 dias. Cada suspensão foi preparada de maneira independente, para evitar contaminação. Os conídios foram obtidos através da raspagem superficial do meio de cultura, seguido

de adição de solução do surfactante Tween 80 (0,01% v/v). A concentração da solução foi ajustada para 1×10^8 conídios ml^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (CHEN, et al., 2021).

Plantas de couve infestadas por ninfas de quarto ínstar de *B. tabaci* tiveram as folhas retiradas, sendo selecionadas 10 ninfas de quarto ínstar por repetição, marcadas com corante a prova d'água (Figura 3). As folhas com as ninfas foram colocadas com a superfície abaxial para cima sobre 15 ml de solução de gel hidrorretentor na concentração de 5 gL^{-1} (condicionador de solo, marca comercial Hidroplan), para manutenção da turgidez da folha durante o período de avaliação, conforme metodologia adaptada de Mascarin et al. (2013_a), em placas de Petri (90 mm). O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo cada placa considerada uma repetição, com um total de seis repetições.

O volume da suspensão de conídios aplicada foi determinado de acordo com a recomendação de campo para inseticidas biológicos registrados para *B. tabaci* (200 L/ha), e de acordo com a área da placa de Petri de 90 mm ($63,6 \text{ cm}^2$). Dessa forma, uma alíquota de 127 μ da suspensão de cada isolado foi aplicada em cada repetição, de maneira independente, com auxílio de um aerógrafo profissional de dupla ação (DB134k, Fenghua Bida Machinery Manufacture Co., China), a 25 cm de distância da placa de Petri, com pressão de trabalho de 10 PSI, conforme metodologia adaptada de Mascarin et al. (2013_b), no interior da cabine de fluxo laminar. O equipamento foi lavado com hipoclorito de sódio (1% v/v), álcool 70% e água destilada autoclavada após a finalização da aplicação no tratamento.

Figura 3 - Ninfas de quarto ínstar de *Bemisia tabaci* biótipo B previamente marcadas com corante a prova d'água a serem avaliadas no bioensaio de patogenicidade.



Foto: Bianca Cristina Costa Gêa

Após cada aplicação, as placas foram imediatamente levadas à câmara tipo BOD (Temp. 25 ± 1 °C, UR de $85 \pm 2\%$ e fotofase de 12 h), e nesse ambiente mantidas durante sete dias. As avaliações foram diárias, com a primeira realizada 24 h após a inoculação dos fungos. Todas as avaliações foram realizadas com auxílio de microscópio estereoscópio. As ninfas foram consideradas mortas quando apresentavam aspecto dessecado, coloração amarelada ou avermelhada e/ou crescimento micelial (MASCARIN et al., 2013a). Além disso, os insetos mortos eram mantidos nas folhas e demarcados com outra coloração de corante a prova d'água, uma vez que o ambiente estava propício para o desenvolvimento do microrganismo aplicado, devido à alta umidade proporcionada pelo gel hidrorretentor, fato que auxiliou na comprovação da morte do inseto pelo fungo.

1.2.9 Análise estatística

Os dados da mortalidade das ninfas da testemunha e das ninfas inoculadas com os FEP foram submetidos ao teste de normalidade ($p > 0,05$). Os melhores isolados tiveram os dados da mortalidade transformados em mortalidade acumulada (%) e posteriormente, os melhores foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn's, visando comparar par a par as medianas ($p > 0,05$). Posteriormente, os dados foram corrigidos pela fórmula de Schneider-Orelli's (PÜNTENER; ZAHNER, 1981) e novamente submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn's ($P > 0,05$), com auxílio do software Excel (2020) e Minitab (2021).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Diversidade de espécies de fungos entomopatogênicos em solos brasileiros

Um total de 49 isolados de fungos entomopatogênicos foram obtidos de 70 amostras de solo, identificados com base na análise morfológica e na região ITS. Entre eles, *Metarhizium anisopliae* foi a espécie predominante, representando 69,38% dos FEP encontrados, ou seja, 34 isolados, seguido por *M. robertsii*, *Purpureocillium lilacinum* e *Beauveria bassiana*, com sete, quatro e dois isolados,

respectivamente. Além desses, foi encontrado uma de *Cordyceps amoene-rosea* e uma cepa de *M. guizhouense* (Tabela 2).

O número de FEP obtidos nas diferentes regiões do Brasil variaram com relação aos estados. O estado do Maranhão, onde foram coletadas 30 amostras de solo, foi o bioma com maior número de fungos isolados, com 37 no total. Além disso, o solo cultivado com soja foi o mais abundante, com 17 cepas obtidas, seguido por eucalipto e nativa, com 11 e nove fungos, respectivamente. O gênero mais encontrado foi *Metarhizium*, presente nas três áreas analisadas, sendo *M. anisopliae* a espécie dominante. Para o estado de São Paulo, solo dos três ecossistemas foi coletado, no qual foi encontrado 11 cepas, sendo o solo de soja o mais abundante, com cinco FEP, todos da espécie *M. anisopliae*, das amostras de solos de eucalipto foram isolados quatro FEP, sendo um de cada espécie: *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *B. bassiana* e *C. amoene-rosea*, e de mata nativa foi possível isolar apenas dois FEP, sendo um *M. anisopliae* e um *M. robertsii*. Com relação ao estado do Paraná, o único solo avaliado foi o de nativa, onde foi possível isolar apenas um exemplar de *M. anisopliae* (Tabela 2).

Tabela 2 - Isolados de fungos entomopatogênicos obtidos de 70 amostras de solo cultivado (soja e eucalipto) e não cultivado (nativa) dos estados do Maranhão, São Paulo e Paraná, identificados através de análise morfológica em microscópio estereoscópio e molecular através da região ITS do rDNA

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Cultura	Local
LCBPF 02	<i>Cordyceps amoene-rosea</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP
LCBPF 07	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP
LCBPF 08	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP
LCBPF 09	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP
LCBPF 13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP
LCBPF 27	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP
LCBPF 28	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP
LCBPF31	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP
LCBPF34	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP
LCBPF47	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP
LCBPF 50	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP
LCBPF 60	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Mandaguaçu - PR
LCBPF 77	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA
LCBPF 78	<i>Metarhizium guizhouense</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA
LCBPF 79	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA
LCBPF 80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA
LCBPF 81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA
LCBPF 82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA
LCBPF 83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA
LCBPF 85	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA
LCBPF 86	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA
LCBPF 88	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 89	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo - MA
LCBPF 90	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 92	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 93	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 95	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 96	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 98	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 100	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 101	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 102	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 103	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 105	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 106	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 107	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 108	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 109	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 111	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 113	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 115	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 116	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 117	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 123	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 124	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 137	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA
LCBPF 144	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA
LCBPF 165	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA

1.3.2 Viabilidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos

Foram selecionados para os ensaios de patogenicidade em *B. tabaci*, as cepas com viabilidade média superior a 90%. Foi realizada a viabilidade de 63 fungos, dentre eles, 48 obtidos do isolamento do solo dos estados de SP, MA e PR com *T. molitor*, 12 já pertencentes à coleção do LCBPF, os quais foram isolados por Domingues et al. (2022) e três produtos biológicos comerciais.

Os isolados selecionados de *M. anisopliae* apresentaram de 100 a $90,67 \pm 2,08\%$ de viabilidade, enquanto que os isolados selecionados de *B. bassiana* e *M. robertsii*, os mais abundantes após *M. anisopliae*, apresentaram, $97,67 \pm 0,57$ a $91,67 \pm 0,57\%$ e 100 a $91,67 \pm 3,51\%$, respectivamente, de viabilidade (Quadro 1).

Quadro 1. Fungos entomopatogênicos e produtos comerciais selecionados para o bioensaio de patogenicidade em *Bemisia tabaci* biótipo B com base na média da viabilidade (%) dos conídios na concentração de 1×10^6 acima de 90%

Isolado	Espécie	Viabilidade (%)
LCBPF 02	<i>Cordyceps amoene-rosea</i>	96,33 ± 3,79
LCBPF 07	<i>Metarhizium anisopliae</i>	82,67 ± 3,21
LCBPF 08	<i>Metarhizium robertsii</i>	84,0 ± 2,0
LCBPF 09	<i>Beauveria bassiana</i>	97,33 ± 2,08
LCBPF 11	<i>Cordyceps javanica</i>	93,33 ± 2,08
LCBPF12	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	96,0 ± 1,0
LCBPF 13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	92,0 ± 5,29
LCBPF 15	<i>Beauveria bassiana</i>	91,67 ± 2,52
LCBPF 17	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	96,0 ± 3,0
LCBPF 19	<i>Beauveria bassiana</i>	93,33 ± 3,06
LCBPF 20	<i>Beauveria bassiana</i>	91,67 ± 0,57
LCBPF 23	<i>Beauveria bassiana</i>	96,0 ± 3,0
LCBPF 27	<i>Metarhizium anisopliae</i>	76,0 ± 2,65
LCBPF 28	<i>Metarhizium anisopliae</i>	90,67 ± 2,31
LCBPF 31	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,67 ± 3,21
LCBPF 34	<i>Metarhizium anisopliae</i>	43,33 ± 4,16
LCBPF 45	<i>Beauveria bassiana</i>	84,67 ± 2,49
LCBPF 46	<i>Beauveria bassiana</i>	97,67 ± 0,57
LCBPF 47	<i>Metarhizium robertsii</i>	91,67 ± 3,51
LCBPF 50	<i>Metarhizium anisopliae</i>	43,33 ± 2,0
LCBPF 60	<i>Metarhizium anisopliae</i>	90,67 ± 2,08
LCBPF 62	<i>Beauveria bassiana</i>	97,33 ± 2,08
LCBPF 63	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	76,0 ± 2,65
LCBPF 77	<i>Metarhizium robertsii</i>	94,0 ± 2,0
LCBPF 78	<i>Metarhizium guizhouense</i>	90,0 ± 2,0
LCBPF 79	<i>Metarhizium anisopliae</i>	91,0 ± 4,0
LCBPF 80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	96,67 ± 4,93
LCBPF 81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,33 ± 2,52
LCBPF 82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	97,67 ± 2,08
LCBPF 83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100,0 ± 0,0
LCBPF 85	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,0 ± 2,0
LCBPF 86	<i>Metarhizium anisopliae</i>	21,33 ± 2,51
LCBPF 88	<i>Metarhizium anisopliae</i>	80,67 ± 1,15
LCBPF 89	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	80,33 ± 1,52
LCBPF 90	<i>Metarhizium anisopliae</i>	79,0 ± 5,0
LCBPF 92	<i>Beauveria bassiana</i>	47 ± 6,0
LCBPF 93	<i>Metarhizium anisopliae</i>	35,0 ± 6,0
LCBPF 95	<i>Metarhizium robertsii</i>	66,33 ± 2,08
LCBPF 96	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	35,0 ± 6,0
LCBPF 98	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	66,33 ± 2,08
LCBPF 100	<i>Metarhizium robertsii</i>	100,0 ± 0,0
LCBPF 101	<i>Metarhizium anisopliae</i>	68,33 ± 1,15
LCBPF 102	<i>Metarhizium anisopliae</i>	82,0 ± 4,35
LCBPF 103	<i>Metarhizium anisopliae</i>	68,67 ± 3,05
LCBPF 104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	93,67 ± 0,57
LCBPF 105	<i>Metarhizium anisopliae</i>	55,0 ± 3,6
LCBPF 106	<i>Metarhizium anisopliae</i>	66,0 ± 2,0
LCBPF 107	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	84,0 ± 3,0
LCBPF 108	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100,0 ± 0,0
LCBPF 109	<i>Metarhizium anisopliae</i>	35,0 ± 4,0
LCBPF 111	<i>Metarhizium anisopliae</i>	79,0 ± 1,0
LCBPF 113	<i>Metarhizium anisopliae</i>	84,0 ± 2,0
LCBPF 115	<i>Metarhizium robertsii</i>	85,0 ± 2,0
LCBPF 116	<i>Metarhizium robertsii</i>	74,33 ± 3,5
LCBPF 117	<i>Metarhizium anisopliae</i>	66,33 ± 1,52
LCBPF 123	<i>Metarhizium anisopliae</i>	13,67 ± 1,52
LCBPF 124	<i>Metarhizium anisopliae</i>	32,0 ± 3,5
LCBPF 137	<i>Metarhizium anisopliae</i>	73,67 ± 0,58
LCBPF 144	<i>Metarhizium anisopliae</i>	55,67 ± 2,08
LCBPF 165	<i>Metarhizium anisopliae</i>	79,0 ± 1,0
Boveril®	<i>Beauveria bassiana</i>	96,33 ± 3,79
Metarri®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	91,33 ± 1,53
Octane®	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	92,67 ± 3,06

1.3.3 Patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos a *Bemisia tabaci*

Os fungos entomopatogênicos aplicados na concentração 1×10^8 esporos/ml apresentaram patogenicidade aos adultos de *B. tabaci* comprovada por análise morfológica em microscópio óptico e reisolamento em meio BDA, quando necessário (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Ninfas de *B. tabaci* selecionadas com corante a prova d'água apresentando sinais e sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos. A – Isolado de LCBPF 11 (*C. javanica*). B – Isolado LCBPF 23 (*B. bassiana*).

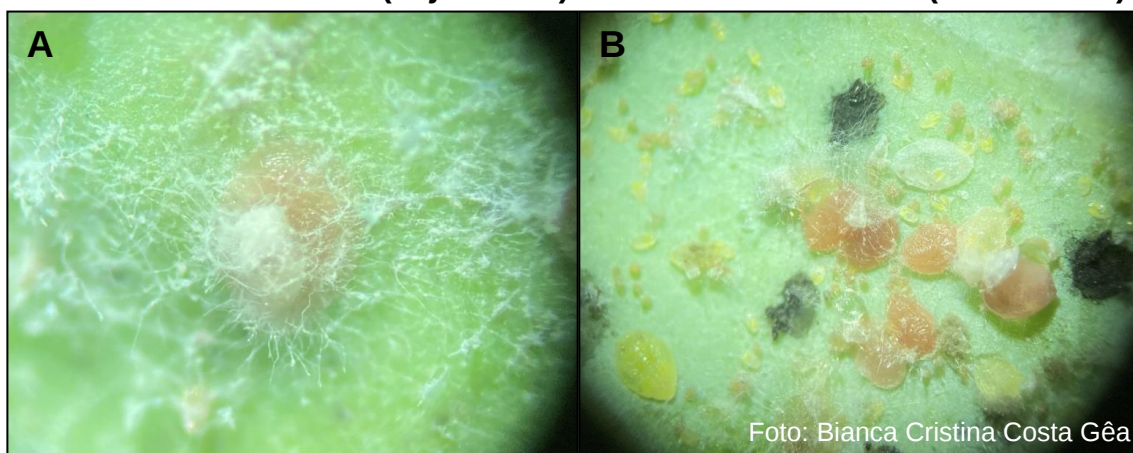


Figura 5 - Ninfas de *B. tabaci* selecionadas com corante a prova d'água apresentando sinais e sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos. A – Isolado LCBPF 02 (*C. amoene-rosea*). B – Isolado LCBPF 15 (*B. bassiana*). C



Todos os isolados e produtos comerciais avaliados foram patogênicos às ninfas de *B. tabaci* com, ao menos, 40% de mortalidade após oito dias (Quadro 2).

Quadro 2 - Mortalidade corrigida acumulada (%) de 30 tratamentos com fungos entomopatogênicos aplicados em *Bemisia tabaci* biótipo B oito dias após o início das avaliações (Temp. de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h)

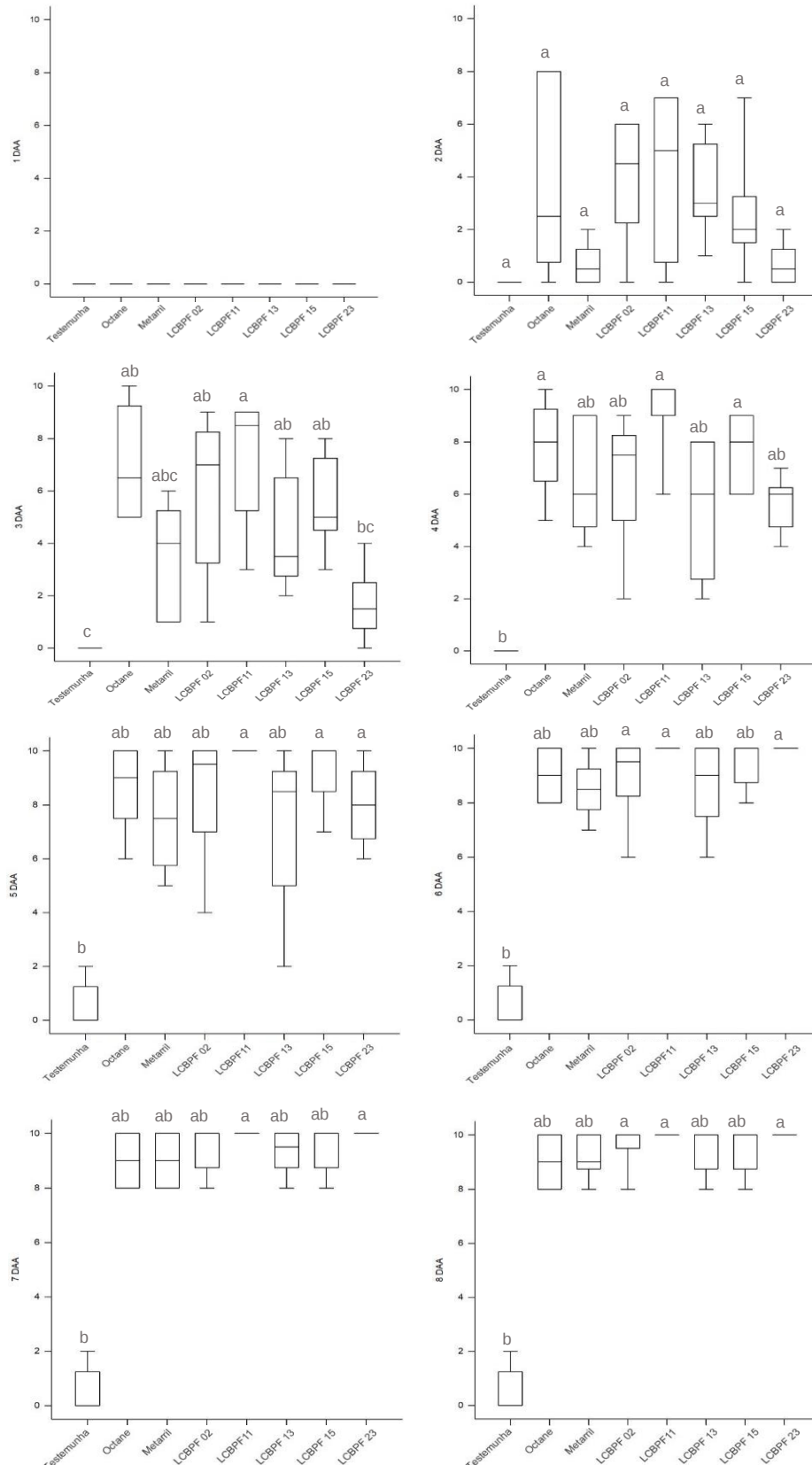
Tratamento	Espécie	Mortalidade corrigida acumulada (%)
Testemunha*	-	-
Boveril®	<i>Beauveria bassiana</i>	57,5 $\pm$ 2,0
Metarril®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	91,1 $\pm$ 1,2
Octane®	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	89,4 $\pm$ 1,4
LCBPF 02	<i>Cordyceps amoene-rosea</i>	96,6 $\pm$ 1,7
LCBPF 09	<i>Beauveria bassiana</i>	87,6 $\pm$ 1,9
LCBPF 11	<i>Cordyceps javanica</i>	100,0 $\pm$ 0,9
LCBPF12	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	57,5 $\pm$ 1,1
LCBPF 13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,7 $\pm$ 1,6
LCBPF 15	<i>Beauveria bassiana</i>	94,7 $\pm$ 1,1
LCBPF 17	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	46,8 $\pm$ 1,7
LCBPF 19	<i>Beauveria bassiana</i>	71,6 $\pm$ 2,6
LCBPF 20	<i>Beauveria bassiana</i>	78,7 $\pm$ 1,4
LCBPF 23	<i>Beauveria bassiana</i>	100,0 $\pm$ 0,6
LCBPF 28	<i>Metarhizium anisopliae</i>	84,0 $\pm$ 2,4
LCBPF 31	<i>Metarhizium anisopliae</i>	69,9 $\pm$ 1,5
LCBPF 46	<i>Beauveria bassiana</i>	41,5 $\pm$ 0,9
LCBPF 47	<i>Metarhizium robertsii</i>	87,6 $\pm$ 1,8
LCBPF 60	<i>Metarhizium anisopliae</i>	50,4 $\pm$ 1,3
LCBPF 62	<i>Beauveria bassiana</i>	37,9 $\pm$ 1,2
LCBPF 77	<i>Metarhizium robertsii</i>	71,6 $\pm$ 2,4
LCBPF 78	<i>Metarhizium guizhouense</i>	80,5 $\pm$ 1,3
LCBPF 79	<i>Metarhizium anisopliae</i>	36,2 $\pm$ 1,4
LCBPF 80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	75,2 $\pm$ 1,7
LCBPF 81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	36,2 $\pm$ 1,0
LCBPF 82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	57,5 $\pm$ 1,0
LCBPF 83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	85,8 $\pm$ 1,9
LCBPF 85	<i>Metarhizium anisopliae</i>	57,5 $\pm$ 0,8
LCBPF 100	<i>Metarhizium robertsii</i>	45,0 $\pm$ 1,1
LCBPF 104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	41,5 $\pm$ 0,8
LCBPF 108	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	39,7 $\pm$ 2,1

*Mortalidade média de *Bemisia tabaci* no tratamento Testemunha: 0,6 $\pm$ 0,4

Os fungos denominados LCBPF 11 e LCBPF 23, já pertencentes à micoteca do LCBPF, respectivamente identificados como *C. javanica* e *B. bassiana*, foram responsáveis por 100% de mortalidade ao fim do período de avaliação, no entanto, em velocidades distintas. O isolado LCBPF 11 se destacou por causar a morte de 100% das ninfas após cinco dias, enquanto o isolado LCBPF 23 levou 100% dos insetos à morte no sexto dia de avaliação (Figura 6 e 7).

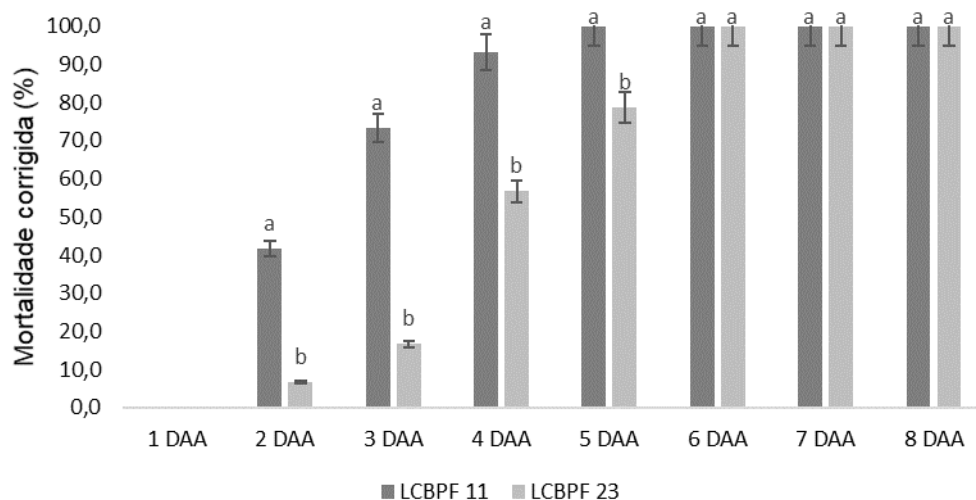
Os isolados LCBPF 02 de *C. amoene-rosea*, LCBPF 13 de *M. anisopliae*, LCBPF 15 de *B. bassiana* e os produtos comerciais Metarril® e Boveril®, foram responsáveis pela mortalidade acima de 90% dos insetos, em velocidades diferentes (Figuras 6 e 8).

Figura 6 – Mediana da mortalidade acumulada da testemunha, produtos comerciais Octane e Metarril, LCBPF 02, LCBPF 11, LCBPF 13, LCBPF 15 e LCBPF 23, respectivamente, em ninfas de *Bemisia tabaci* na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}



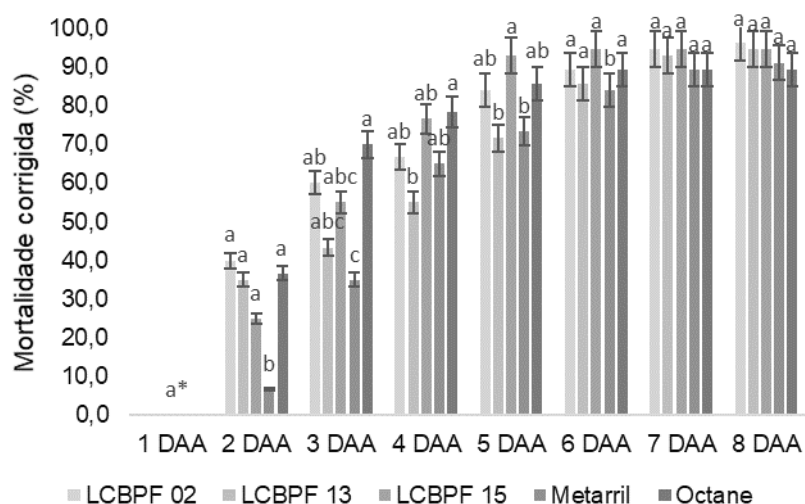
*DAA – Dias após a aplicação; medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 7 - Mortalidade corrigida acumulada (%) dos isolados LCBPF 11 e LCBPF 23, de *Cordyceps javanica* e *Beauveria bassiana*, respectivamente, em ninfas de *Bemisia tabaci* na concentração 10^8 conídios ml^{-1}



*Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente (Alpha = 0,05).

Figura 8 - Mortalidade corrigida acumulada (%) dos isolados LCBPF 02, LCBPF 13 e LCBPF 15, e produtos comerciais Metarril® e Octane® em ninfas de *Bemisia tabaci* na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}



*Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente (Alpha = 0,05).

1.4 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi possível complementar a coleção de microrganismos entomopatogênicos do LCBPF através do isolamento de fungos de amostras de solo de três estados brasileiros, MA, SP e PR usando o *T. molitor* através do “*Bait method*”. Além disso, os resultados do presente estudo complementam os obtidos

por Domingues et al. (2022), o qual realizou o isolamento de dois gêneros de *Cordyceps* em mosca-branca, dentre eles o LCBPF 11, de *C. javanica*, o qual apresentou alta letalidade à *B. tabaci* biótipo B nesse estudo.

Dentre as metodologias utilizadas para isolamento de entomopatógenos, as duas mais empregadas são a do “*Bait method*” e a do meio de cultura seletivo. Esta última consiste na adição de compostos bactericidas e fungicidas ao meio de cultura, os quais suprimem o desenvolvimento de contaminações. No entanto, já foi relatado que o composto dodina, muito empregue na obtenção de FEP, além de impedir o desenvolvimento de fungos que não possuem interesse para o estudo, podem evitar com que fungos entomopatogênicos pouco estudados e conhecidos se desenvolvam, devido à ruptura que causa à membrana plasmática (CHANG et al., 2021; RANGEL et al., 2010).

Dessa forma, o uso do “*Bait method*” com *T. molitor*, além de apresenta-se como uma metodologia de baixo investimento necessário, visto a criação do inseto em laboratório demandar poucos recursos e ser muito produtivo, é um método altamente sensível, o qual permite o isolamento direto de entomopatógenos (KIN et al., 2018). Esses motivos, e o fato de esta técnica ser utilizada em diversos trabalhos (CHANG et al., 2021; KIM et al., 2018; SHARMA et al., 2018; STEINWENDER et al., 2014), motivaram a escolha dessa metodologia para este estudo, no qual foi possível encontrar 49 cepas de fungos entomopatogênicos, de seis diferentes espécies em 70 amostras de solo.

Dentre as áreas estudadas, a área cultivada por soja foi a que apresentou maior quantidade de fungos, 22 no total, e maior diversidade, com isolados de *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *P. lilacinum* e *B. bassiana*. As observações aqui obtidas não corroboram com os resultados obtidos por Botelho et al. (2019), onde a o número de isolados de *Metarhizium* obtido foi maior em solos de áreas nativas que em áreas agrícolas. Além disso, a diferença demonstrada pelos autores e nos dados aqui obtidos, evidencia a estreita relação entre o solo, o ambiente em que está inserido e a distribuição de FEP. Entre as possíveis razões para isso acontecer, tem-se o fato de que as áreas cultivadas, com soja, por exemplo, apresentam grande diversidade de insetos-praga, de diferentes ordens e famílias, o que pode favorecer a manutenção dos FEP nessas áreas (CHEN et al., 2021). Agregado a isso, a adoção de práticas como plantio direto e fertilização do solo, aumentam disponibilidade de nichos para FEP, e posteriormente, aumentam a diversidade de fungos (SHARMA et

al., 2018). Solos bem arejados, favorecidos por práticas agrícolas, segundo MCGUIRE; NORTHFIELD (2020), durante o desenvolvimento micelial podem facilitar o desenvolvimento ótimo de FEP e o controle de pragas.

As espécies de *Metarhizium*, segundo UZMAN et al (2019) apresentam maior frequência em solos cultivados, resultado que concorda com os aqui obtidos, onde foram isoladas 15 cepas de *M. anisopliae* de solos cultivados por soja, de um total de 34, e isso pode ser devido aos relatos que *Metarhizium* são mais tolerantes à produtos fitossanitários quando comparado com *Beauveria*, por exemplo (SANCHEZ-PENA; LARA; MEDINA, 2011).

Os fungos selecionados para o teste de patogenicidade em *B. tabaci* foram aqueles que apresentaram viabilidade acima de 90% após 18 h de incubação. Os testes de viabilidade devem ser realizados visando a seleção de cepas com alta capacidade germinativa, ou seja, alta taxa de emissão do tubo germinativo dentro de 18 a 24 h, visto esta ser uma característica importante de virulência dos FEP aos insetos-praga (FARIA et al., 2015).

Foi determinado que o isolado LCBPF 11, de *C. javanica*, foi o mais letal às ninfas de quarto ínstar de *B. tabaci* em laboratório, seguido pelo isolado LCBPF 23 de *B. bassiana*. Sain et al. (2019) obtiveram resultados semelhantes aos aqui obtidos, com elevada eficácia (crescimento micelial, esporulação e mortalidade) para *B. bassiana* e *C. javanica*. Agregado a isso, *Cordyceps* e *Beauveria* são entomopatógenos conhecidos por infectar naturalmente moscas-brancas, com potencial de causar epizootias fúngicas (WU et al., 2021).

Os bioensaios foram realizados com ninfas de quarto ínstar de mosca-branca. No entanto, estudos anteriores em laboratório e em casa-de-vegetação relataram que o segundo ínstar é mais suscetível à infecção fúngica por *Cordyceps* e *Beauveria*, sendo o quarto ínstar, os ovos e os adultos os estádios menos suscetíveis (BOAVENTURA et al., 2021; CABANILLAS; JONES, 2009; LU et al., 2022; RAHIM et al., 2013; TIAN et al., 2015). No caso desse estudo, as ninfas de quarto ínstar foram selecionadas devido à alta disponibilidade de insetos e facilidade de serem manipuladas, visto serem maiores, além disso, cepas eficazes ao quarto ínstar, terão maiores chances de controlar os instares jovens. Testes futuros podem ser realizados visando à obtenção da virulência nos instares iniciais de *B. tabaci*, com alto potencial de estes isolados se apresentarem ainda mais letais, além de avaliação sobre ovos e adultos. Além disso, estudos envolvendo tecnologia de

aplicação também devem ser realizados, visto os estádios imaturos da praga geralmente ocorrerem na superfície abaxial das folhas, dificultando que os FEP atinjam diretamente o alto biológico (TIAN et al., 2015).

Dentre os isolados de *Cordyceps* avaliados no estudo, *C. javanica* e *C. amoene-rosea*, além do produto comercial Octane®, à base de *C. fumosorosea*, causaram 90% de mortalidade em seis dias, enquanto *C. fumosorosea* e *C. cateniannulata* foram responsáveis por 57,44 e 46,81% de mortalidade, respectivamente, após oito dias, valores que demonstram o potencial que esse gênero apresenta contra o inseto avaliado. A microscopia eletrônica de varredura revelou que os conídios de *C. fumosarosea* germinaram e produziram apressórios em 24 h quando inoculados em ninfas de segundo ínstar, enquanto que a penetração das hifas pela cutícula das ninfas de *B. tabaci* ocorreu em 48 h (TIAN et al., 2015). Apesar de o isolado de *C. fumosorosea* avaliado no presente estudo ter sido inferior às outras espécies avaliadas desse microrganismo, os dados obtidos quanto ao tempo de mortalidade dos insetos, 100% em cinco dias para *C. javanica* e 90% em seis dias para *C. amoene-rosea* e para o Octane®, condizem com a rapidez no processo de infecção obtido por Tian et al (2015), que pode estar correlacionado à presença de um grande número de genes codificadores de enzimas importantes durante as etapas iniciais de infecção, como as proteases (LIN et al., 2019).

Esta é uma característica importante a ser observada, visto que isolados de FEP mais virulentos e com melhores índices de eficácia terão melhor desempenho para serem utilizados em programas de MIP para controle de *B. tabaci*, além disso, fungos do gênero *Cordyceps* são facilmente produzidos em escala massal, favorecendo o seu uso à campo (BOAVENTURA, et al., 2021; SAIN et al., 2019; LIN et al., 2019; MASCARIN et al., 2015; MASCARIN et al., 2013).

O isolado LCBPF 23, de *Beauveria bassiana*, também apresentou alta efetividade contra mosca-branca, com 100% de mortalidade em seis dias de avaliação, seguido pelo isolado LCBPF 15, com 94,68% de mortalidade também após seis dias., resultado semelhante ao obtido por Bhadani et al (2021), o qual relata a mortalidade corrigida acima de 70% após seis dias de avaliação ($0,043 \times 10^5$ conídios mL⁻¹). O potencial de virulência de diferentes cepas de FEP varia de isolado para isolado, o que pode estar relacionado à alta produção de enzimas e metabólitos secundários por esse FEP. Segundo Gerbremeriam, Chekol e Assefa (2022) há grande variação quanto à produção de compostos enzimáticos por *B.*

bassiana e *M. anisopliae*, como quitinase, lipases e proteases, atribuindo à virulência exibida pelos isolados mais patogênicos altos níveis de atividade dessas enzimas, e, portanto, alta capacidade de quebra de quitina, lipídio e proteína, compostos que constituem a cutícula dos insetos. Além disso, os metabólitos secundários produzidos por *B. bassiana* como a beauvericina, são capazes modificarem a atividade da P-glioproteína, composto de defesa à fungos, produzido pelos insetos (NORA et al., 2021). Os compostos bassiatin, methyl 1,4-dihydro-4-oxo-2-quinolinecarboxylate e 6-dehydrocervisterol, isolados de uma cepa de *Beauveria* sp. apresentaram efeito inseticida quando aplicados em *B. tabaci* (AN et al., 2021), demonstrando o potencial que os metabólitos secundários produzidos por esse microrganismo possuem sobre a mosca-branca biótipo B

1.5 CONCLUSÃO

A alta diversidade identificada no presente estudo sustenta os outros estudos realizados, indicando que o solo age como um reservatório para os microrganismos entomopatogênicos. Foi demonstrado que os solos cultivados por soja foram os mais ricos em termos de quantidade de isolados e diversidade, quando comparado com áreas de mata nativa e florestas plantadas com eucalipto. *M. anisopliae* foi a espécie mais abundante, seguido por *M. robertsii*, *Purpureocillium lilacinum* e *Beauveria bassiana*. Com relação à patogenicidade em *B. tabaci* biótipo B, os isolados LCBPF 11 de *C. javanica* e LCBPF 23 de *B. bassiana* foram os mais letais, seguido pelo LCBPF 02 de *C. amoene-rosea*, LCBPF 15 de *B. bassiana*, LCBPF 13 de *M. anisopliae*, e produtos comerciais Metarril® e Octane®. Além disso, esse é o primeiro relato de *C. amoene-rosea* causando alta mortalidade de *B. tabaci* no Brasil. Sendo assim, estudos futuros devem ser realizados com esses isolados visando à obtenção de resultados à campo, assim como bioensaios avaliando diferentes formulações. Dessa forma, as melhores cepas poderão integrar, no futuro, produtos biológicos comerciais à base de fungos entomopatogênicos.

REFERÊNCIAS

- AN, R.; AHMED, M.; LI, H.; WANG, Y.; ZHANG, A.; BI, YUHUI.; YU, ZHIGUO. Isolation, purification, and identification of biological compounds from *Beauveria* sp. and their evaluation as insecticidal effectiveness against *Bemisia tabaci*. **Scientific reports**, v. 11, n. 12020, 2020. DOI: 10.1038/s41598-021-91574-9
- BARRETO DA SILVA, F.; MULLER, C.; BELLO, V. H.; WATANABE, L. F. M.; ROSSITTO DE MARCHI, B.; FUSCO, L. M.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; MINOZZI, G. B.; VIVAN, L. M.; TAMAI, M. A.; FARIAS, J. R.; NOGUEIRA, A. M.; SARTORI, M. M. P.; KRAUSE-SAKATE, R. 2020. Effects of cowpea mild mottle virus on soybean cultivars in Brazil. **PeerJ Life & Environment**, 2020. DOI: 10.7717/peerj.9828
- BELLO, V. H.; SILVA, F. B.; WATANABE, L. F. M.; VICENTIN, E.; MULLER, C.; BUENO, R. C. O. F.; SANTOS, J. C.; MARCHI, B. R.; NOGUEIRA, A. M.; YUKI, V. A.; MARABAYASHI, J. M.; SARTORI, M. M. P.; PAVAN, M. A.; GHANIM, M.; KRAUSE-SAKATE, R. Detection of *Bemisia tabaci* Mediterranean cryptic species on soybean in São Paulo and Paraná States (Brazil) and interaction of cowpea mild mottle virus with whiteflies. **Plant Pathology**, v. 70, p. 1509-1520, 2021. DOI: 10.1111/ppa.13387
- BHADANI, R. V.; GAJERA, H. P.; HIRPARA, D. G.; KACHHADIYA, H. J.; DAVE, R. A. Metabolomics of extracellular compounds and parasitic enzymes of *Beauveria bassiana* associated with biological control of whiteflies (*Bemisia tabaci*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 176, 2021. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104877
- BOAVENTURA, H. A.; QUINTELA, E. D.; SANTOS, E. N.; SILVA, J. F. A.; HUMBER, R. A. Susceptibility of All Nymphal Stages of *Bemisia tabaci* Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) to Three Brazilian Isolates of *Cordyceps* sp. (Hypocreales: Cordycipitaceae) in a Screenhouse Under Variable Temperature and Moisture Conditions. **Neotropical Entomology**, v. 5, p. 100-113, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00823-5
- BOTELHO, A. B. R. Z.; ALVES-PEREIRA, A.; PRADO, R. C.; ZUCCHI, M. I.; DELALIBERA JÚNIOR, Í. *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. **Fungal Ecology**, v. 41, p. 289-300, 2019. DOI: 10.1016/j.funeco.2019.07.004
- CABANILLAS, H. E.; JONES, W. A. Pathogenicity of *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection**, v. 28, p. 333-337, 2009. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.11.015

CHEN, W.; XIE, W.; CAI, W.; THAOCHAN, N.; HU, Q. Entomopathogenic Fungi Biodiversity in the soil of Three Provinces Located in Southwest China and First Approach to Evaluate Their Biocontrol Potential. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/jof7110984

CHUNG, J.; WU, S.; LIU, Y.; YANG, Y.; TSAI, Y.; LI, Y.; TSENG, C.; TANG, L.; NAI, Y. Construction and Selection of an Entomopathogenic Fungal Library from Soil Samples for Controlling *Spodoptera litura*. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 2021. DOI: 10.3389/fsufs.2021.596316

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, DF, v. 8, n. 12, 2021. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 09 mai. 2022.

CURI, P. R.; MORAES, R. V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuição multinomiais. **Ciência e cultura**, v. 35, n. 5, p. 713-722, 1980.

DOMINGUES, M. M.; SANTOS, P. L.; GÊA, B. C. C.; CARVALHO, V. R.; OLIVEIRA, F. N.; SOLIMAN, E. P.; SILVA, W. M.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS JÚNIOR, V. C.; WILCKEN, C. F. Isolation and molecular characterization of *Cordyceps* sp. from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and pathogenic to *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022. DOI: 10.1590/1519-6984.253028

FARIA, M.; LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; WRIGHT, S. P. Conidial vigor vs. Viability predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 68-72, 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2014.12.012

GADDEYYA, G.; NIHARIKA, P. S.; BHARATHI, P.; KUMAR, P. K. R. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 4, p. 2020-2026, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R.; PANIZI A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GEBREMARIAM, A.; CHEKOL, Y.; ASSEFA, F. Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **BMC Research Notes**, v. 15, n. 117, 2022. DOI: /10.1186/s13104-022-06004-4

GEBREMARIAM, A.; CHEKOL, Y.; ASSEFA, F. Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **BMC Research Notes**, v. 15, n. 1, 2022. DOI: 10.1186/s13104-022-06004-4

HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. **Pest of Management Science**, Sussex, v. 70, n. 10, p. 1568–1572, 2014. DOI: 10.1002/ps.3752

JONG, S.; ATKINS, W.B. **Conservation, collection and distribution of cultures**. New York: Marcel Dekker, 1986. p. 153-194.

KIN, J. C.; LEE, M. R.; KIN, S.; LEE, S. J.; PARK, S. E.; NAI, Y. S.; LEE, G. S.; SHIN, T. Y.; KIN, J. S. *Tenebrio molitor* – mediated entomopathogenic fungal library construction for pest management. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 1, 2018. DOI: 10.1016/j.aspen.2017.11.018.

LIN, R.; XIN, Z. B.; ZOU, M.; GAO, Y.; QIN, F. Genome sequence of *Isaria javanica* and comparative genome analysis insights into family S53 peptidase evolution in fungal entomopathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-09997-4

LU, QIAN; WANG, P.; ALI, A.; ZANG, L. Molecular Identification and Virulence of Four Strains of Entomopathogenic Fungi Against the Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 3, p. 731-738, 2022. DOI: 10.1093/jee/toac031

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA JUNIOR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 11-20, 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2014.12.001

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; DELALIBERA, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, n. 66, p. 209-2018, 2013a. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.05.001

MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D.; SILVA, E. G. D.; ARTHURS, S. P. Precision micro-spray tower for application of entomopathogens. **BioAssay**, n. 8, p. 1-4, 2013b. DOI: 10.14295/BA.v8.0.114

MCGUIRE, A. V.; NORTHFIELD, T. D. Tropical Occurrence and Agricultural Importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 2020. DOI: 10.3389/fsufs.2020.00006

MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 601-607, 2005.

MOTA-SANCHEZ, D.; WISE, J. C. **The Arthropod Pesticide Resistance Database**. Michigan State University, 2022. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org>>. Acesso: 11 mai. 2022.

NORA, D. D.; PIOVESAN, B. C.; BELLÉ, C.; STACKE, R. S.; BALARDIN, R. B.; GUEDES, J. V. C.; MICHAUD, J. P.; JACQUES, R. J. S. Isolation and avaluation of entomopathogenic fungi against the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Tecnology**, v. 31, 2021. DOI: 10.1080/09583157.2020.1826904

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop protection**, v. 56, p. 50-54, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.10.022

OLIVEIRA, W. P.; LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Seed Damage by the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.) to Resistant Soybean Cultivars with the Block Technology Versus a Susceptible Cultivar. **Environmental Entomology**, v. 51, n. 2, p. 451-459, 2022. DOI: 10.1093/ee/nvac011

ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. Major economic issues in integrated pest management. In: ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. (eds.). **The economics of integrated pest management of insects**. United Kingdom, Wallingford: CABI, 2019. Cap. 1, p. 1-13.

PADILHA, G.; POZEBON, H.; PATIAS, L. S.; FERREIRA, D. F.; CASTILHOS, L. B.; FORGIARINI, S. E.; DONATTI, A.; BEVILAQUA, J. G.; MARQUES, R. P.; MORO, D.; ROHRIG, A.; BONES, S. A. S.; CARGNELUTTI FILHO, A.; PES, L. Z.; ARMEMANN, J. A. Damage essessment of *Bemisia tabaci* and economic injury level on soybean. **Crop protection**, v. 143, 2021. DOI: 10.1016/j.cropro.2021.105542

POZEBON, H.; MARQUES, R. P.; PADILHA, G.; O'NEAL, O.; VALMORBIDA, I.; BEVILAQUA, J. G.; TAY, W. T.; ARNEMANN, J. J. Arthropod Invasions Versus

Soybean Production in Brazil: A Review. **Jornal of Economic Entomology**, v. 113, n. 4, p. 1591-1608, 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa108

PÜNTENER, W., ZAHNER, O. **Manual for field trials in plant protection**. 2 Ed., Basle: Ciba-Geigy Limited, Agricultural Division, 205 p., 1981.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 83, p. 96-103, 2018. DOI: 10.1016/j.dci.2018.01.010

RAHIM, E.; AHMAD, S. S.; DZOLKHIFLI, O.; NUR, A. A. First record of *Isaria fumosorosea* Wize (Deuteromycotina: Hyphomycetes) infecting *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Malaysia. **Journal of Entomology**, v. 10, p. 182-190, 2013. DOI: 10.3923/je.2013.182.190

RANGEL, D. E. N. DETTENMAIER, S. J.; FERNANDES, E. K. K.; ROBERTS, D. W. Suscetibility of *Metarhizium* spp. And other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science Technology**, v. 20, p. 375-389, 2010. DOI: 10.1080/09583150903518370

SAFITRI, A.; HERLINDA, S.; SETIAWAN, A. Entomopathogenic fungi od soils of freshwater swamps, tidal lowlands, peatlands, and highlands of South Sumatra, Indonesia. **BIODIVERSITAS**, v. 19, n. 6, 2018. DOI: 10.13057/biodiv/d190647

SAIN, K. S.; MONGA, D.; KUMAR, R.; NAGRALE, D. T.; KRANTHI, S.; KRANTHI, K. R. Comparative effectiveness of bioassay methods in identifying the most virulent entomopathogenic fungal strains to control *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 31, 2019. DOI: 10.1186/s41938-019-0130-z

SANCHEZ-PENA, S. R.; LARA, J. S.; MEDINA, R. F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect**, v. 11, 2011. DOI: 10.1673/031.011.0101.

SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; MARANHÃO, E. A.; MARANHÃO, E. QUESADA-MORAGA, E. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. **BioControl**, v. 51, n. 519, 2006. DOI: 10.1007/s10526-005-5737-1

SANTOS, T. T. M.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SANTANA, M. V. Enhanced mortality of *Bemisia tabaci* nymphs by *Isaria javanica* combined with

sublethal doses of chemical insecticides. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 6, p. 598-609, 2018. DOI: 10.1111/jen.12504

SCHEEPMAKER, J. W. A.; BUTT, T. M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 503-552, 2010. DOI: 10.1080/09583150903545035

SCHUTZE, I. X.; YAMAMOTO, P. T.; MALAQUIAS, J. B.; HERRITT, M.; THOMPSON, A.; MERTEN, P.; NARANJO, S. E. Correlation-Based Network Analysis of the Influence of *Bemisia tabaci* Feeding on Photosynthesis and Foliar Sugar and Starch Composition in Soybean. **Insects**, v. 13, v. 1, 2022. DOI: 10.3390/insects13010056

SHARMA, L.; OLIVEIRA, I.; RAIMUNDO, F.; TORRES, L.; MARQUES, G. Soil Chemical Properties Barely Perturb the Abundance of Entomopathogenic *Fusarium oxysporum*: A Case Study Using a Generalized Linear Mixed Model for Microbial Pathogen Occurrence Count Data. **Pathogens**, v. 7, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/pathogens7040089

SHARMA, L.; OLIVEIRA, I.; TORRES, L.; MARQUES, G. Entomopathogenic fungi in Portuguese vineyards soils: suggesting a '*Galleria-Tenebrio*-bait method' as bait-insects *Galleria* and *Tenebrio* significantly underestimate the respective recoveries of *Metarhizium (robertsii)* and *Beauveria (bassiana)*. **Mycocokeys**, v. 38, p. 1-23, 2018. DOI: 10.3897/mycokeys.38.26790

STEINWENDER, B. M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N. V. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 6-12, 2014. DOI: 10.1016/j.jip.2014.09.002

SUN, T.; WU, J.; ALI, S. Morphological and molecular identification of four *Purpureocillium* isolates and evaluating their efficacy against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 27, 2021.

TIAN, J.; DIAO, H.; LIANG, L.; HAO, C.; ARTHURS, S.; MA, R. Pathogenicity of *Isaria fumosarosea* to *Bemisia tabaci*, with some observations on the fungal infection process and host immune response. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 147-153, 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2015.08.003

UZMAN, D.; PLIESTER, J.; LEYER, I.; ENTLING, M. H.; REINEKE, A. Drivers of entomopathogenic fungi presence in organic and conventional vineyard soils. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 89-97, 2019. DOI: 10.1016/j.apsoil.2018.09.004

VIEIRA, S. V.; BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; BOFF, M. I. C.; GOBBI, A. L. Different timing of whitefly control and soybean yield. **Ciencia rural**, v. 43, n. 2, p. 247-253, 2013. DOI: 10.1590/S0103-84782013000200009

XIONG, Z.Q., YANG, Y.Y., ZHAO, N., WANG, Y. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013. DOI:10.1186/1471-2180-13-71

WU, SHAOHUI.; TOEWS, M. D.; CASTRILLO, L. A.; BARMAN, A. K.; COTTRELL, T. E.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Identification and Virulence of *Cordyceps javanica* Strain wf GA17 Isolated from a Natural Fungal Population in Sweetpotato Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1127-1136, 2021. DOI: 10.1093/ee/nvab061

WRAIGHT, S.; INGLIS, D. G.; GOETTEL, M. S. Fungi. *In*: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 223-248p., 2007.

CAPÍTULO 2

PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Euschistus heros* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Bianca Cristina Costa Gêa¹; Paula Leite dos Santos¹; Thiago Souza Bulhões¹; Maurício Magalhães Domingues¹; Pedro Henrique Queiroz Navarro¹; Vanessa Rafaela de Carvalho¹; Carlos Frederico Wilcken¹.

¹Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de ciências Agrônômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) é uma das principais pragas da soja, *Glycine max*, no Brasil. Seu controle é majoritariamente realizado com inseticidas químicos, mas há demanda pelo controle biológico, incluindo o microbiano. Os fungos entomopatogênicos têm vantagens devido ao modo de ação, variabilidade genética e permanência no ambiente. Assim, esse estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) em *E. heros*. Os fungos, preservados pelo método de Castellani, foram reativados em meio BDA, permanecendo em BOD a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h. Os insetos foram obtidos de criação estabelecida no LCBPF. O teste de patogenicidade foi feito em ovos, ninfas de 3º ínstar e adultos de *E. heros* com isolados que apresentaram viabilidade acima de 90%. Uma alíquota de 127 µl de cada suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} , com 0,01% de Tween 80, foi aplicada com aerógrafo a 10 psi de pressão em cada placa de Petri contendo cinco ovos ou quatro ninfas/adultos de percevejo marrom. O controle consistiu em água destilada autoclavada com 0,01% de Tween 80. Os experimentos permaneceram em sala, a 25°C e UR de 80%, e foram avaliados diariamente por 15 dias. Os insetos mortos foram levados para câmara úmida em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, para favorecer a esporulação. Foram avaliados 25 isolados em adultos e 28 em ninfas e ovos. Os mais patogênicos foram os isolados LCBPF 11, 19, 20 e 28, além do produto comercial Octane® para adultos, LCBPF 23, 77, 79, 80 e 82 para as ninfas de terceiro ínstar e LCBPF 08, 13, 63 e 81, além do produto comercial Octane® para os ovos. Sendo assim, os fungos entomopatogênicos apresentaram potencial de controle para *E. heros*.

Palavras-chave: *Beauveria*; controle microbiano; *Cordyceps*; micoinseticidas; percevejo marrom; *Metarhizium*.

ABSTRACT

Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) is one of the main pests of soybean, *Glycine max*, in Brazil. Its control is mostly carried out with chemical insecticides, but

there is a demand for biological control, including microbial control. Entomopathogenic fungi have advantages due to mode of action, genetic variability and permanence in the environment. Thus, this study aimed to evaluate the pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi belonging to the collection of the Laboratory of Biological Control of Forest Pests (LCBPF) in *E. heros*. The fungi, preserved by the Castellani method, were reactivated in PDA medium, remaining in BOD at a temperature of 25 ± 1 °C and a photophase of 12 h. The insects were obtained from breeding established in the LCBPF. The pathogenicity test was performed on eggs, 3rd instar nymphs and adults of *E. heros* with isolates that showed viability above 90%. An aliquot of 127 µl of each fungal suspension at a concentration of 1×10^8 conidia mL⁻¹, with 0.01% Tween 80, was applied with an airbrush at 10 psi of pressure in each Petri dish containing five eggs or four brown stink bug nymphs/adults. The control consisted of autoclaved distilled water with 0.01% Tween 80. The experiments were kept in a room, at 25 °C and 80% RH, and were evaluated daily for 15 days. The dead insects were taken to a humid chamber in BOD at 25 ± 1 °C to favor sporulation. Were evaluated 25 strains in adults and 28 in nymphs and eggs. The most pathogenic were isolates LCBPF 11, 19, 20 and 28, in addition to the commercial product Octane® for adults, LCBPF 23, 77, 79, 80 and 82 for 3rd instar nymphs and LCBPF 08, 13, 63 and 81, in addition to the commercial product Octane® for eggs. Therefore, the entomopathogenic fungi showed control potential for *E. heros*.

Keywords: *Beauveria*; brown stink bug; *Cordyceps*; *Metarhizium*; microbial control; mycoinsecticides.

2.1 INTRODUÇÃO

Os insetos-praga causam grandes perdas à agricultura mundial. No Brasil, as perdas geram um decréscimo de US\$ 17,7 bilhões ao setor agrícola (POZEBON et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2014). Apenas para soja, as perdas ocasionadas por esses organismos podem chegar a 4,31 milhões de toneladas (mt), representando uma perda econômica anual de US\$ 1,51 bilhões (POZEBON et al., 2020; CONAB, 2017), sendo assim, estão diretamente associados à redução da produtividade da cultura, fazendo-se necessário o controle destes para obtenção de maior produtividade e qualidade dos produtos (ONSTAD; CRAIN, 2019). O grupo dos percevejos fitófagos é o que mais causa perdas à produtividade da soja da América do Sul (BUENO et al., 2015). Desse grupo, o percevejo marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), é a espécie mais importante devido à alta frequência, abundância e dificuldades no manejo (BUENO et al., 2020; PAZINI et al., 2019; PANIZZU, 2013), ocorrendo desde a fase vegetativa até a maturação dos grãos na cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA, 2012). O inseto, durante o processo

alimentar, injeta toxinas na planta deixando-a clorótica e com porte menor, além de reduzir a produção de vagens e atrasar a maturação dos grãos (BUENO et al., 2020). As perdas, no Brasil, devido à alimentação pelo *E. heros* podem chegar a R\$ 2 bilhões, caso nenhuma medida de controle seja tomada (OLIVEIRA; LUCINI; PANIZZU, 2022).

O controle é majoritariamente realizado com o uso de inseticidas químicos, os quais, dentre outros fatores, favorecem a seleção de populações resistentes, fato que vem sendo evidenciado a cada ano devido ao aumento nos casos de surtos nas regiões produtoras, dificultando ainda mais o manejo (TUELHER et al., 2018; PAZINI et al., 2019), além de poderem desencadear problemas relacionados à contaminação ambiental, desequilíbrio da biodiversidade e do agroecossistema (PAZINI et al., 2019).

Sendo assim, explorar outras estratégias para o controle do *E. heros*, as quais, aliadas ao controle químico seletivo, podem reduzir os níveis populacionais nas áreas de cultivo (SILVA-SANTANA et al., 2021). No manejo integrado de pragas (MIP), os fungos entomopatogênicos (FEP) são reconhecidos como inimigos naturais importantes das populações de insetos-praga. No entanto, poucos são os estudos realizados com diferentes espécies, bem como, com diferentes isolados de FEP (OLIVEIRA et al., 2016; NORA et al., 2021; SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1998; RESQUÍN-ROMERO et al., 2020). Esses microrganismos têm a vantagem de possuírem ação por contato, se destacando entre os entomopatógenos, com capacidade de infectar o hospedeiro através do tegumento (QU; WANG, 2018). Após adesão e germinação do conídio na cutícula, ocorre a penetração e a propagação pela hemocele, levando o inseto a morte, geralmente devido à produção de metabolitos secundários e toxinas, e ao consumo dos nutrientes (BUTT et al., 2016). No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelos FEP, trabalhos relataram que o controle obtido para *E. heros* é baixo (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1998; OLIVEIRA et al., 2016), devido à ação de defesas químicas, que englobam compostos com ação fungistática presentes na epicutícula e voláteis tóxicos sintetizados pelas glândulas metatorácicas (LOPES et al., 2015). Sendo assim, a busca por isolados de FEP que sejam mais virulentos, não apenas a adultos, mas também a imaturos e ovos são necessários. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de diferentes espécies e isolados de FEP contra diferentes estádios de desenvolvimento de *E. heros*. Esses isolados apresentaram alta patogenicidade

ao psílídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) (DOMINGUES et al., 2022) e a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (dados não publicados), apresentando potencial de controle ao *E. heros*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local do estudo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), localizado no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, Campus de Botucatu.

2.2.2 Criação de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

A criação de *E. heros* foi iniciada a partir de massas de ovos obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - soja) e da Koppert Biological Systems do Brasil, e mantidas em sala de criação do LCBPF, conforme método proposto por Silva et al. (2007), sob condições controladas (Temp. de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, UR de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 h).

As posturas obtidas foram mantidas em placas plásticas (60 mm), contendo aproximadamente 1 g de ovo. Cada recipiente continha uma abertura na tampa, coberta por tecido tipo voil, para evitar a fuga das ninfas após eclosão e facilitar as trocas gasosas. No interior, além dos ovos, foi colocado um fragmento de vagem verde de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e amendoim cru (*Arachis hypogaea*). Os insetos foram mantidos nas placas até o início do segundo ínstar, fase em que foram transferidos para caixas plásticas transparentes de 4,5 L. Cada caixa possuía uma abertura na tampa, recoberta por tecido tipo voil, e o fundo era forrado com papel do tipo strong. Os insetos foram alimentados com dieta natural, composta por vagem verde de feijão, amendoim cru e, sazonalmente, com frutos de ligustro (*Ligustrum lucidum*) e, como fonte de umidade, foi utilizado recipientes contendo algodão hidrófilo umedecido.

Quando adultos, os insetos foram transferidos para caixas plásticas transparentes de 8 L, com as mesmas características citadas acima, contendo

aproximadamente 100 casais/caixa. Como substrato para oviposição, eram utilizados quatro recortes de tecido de algodão cru, alocados próximos às paredes das caixas, os quais foram retirados a cada 48 h, para início de uma nova geração de insetos.

2.2.3 Screening dos isolados de fungos entomopatogênicos em *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Para o ensaio de patogenicidade de fungos entomopatogênicos em *E. heros* foi utilizado os fungos pertencentes à coleção de FEP do LCBPF, preservados conforme método descrito por Castellani (1939) e em glicerina a 10% (-20 °C) (Tabela 1) e produtos biológicos comerciais (Tabela 2). Todos os entomopatógenos e produtos comerciais tiveram a viabilidade avaliada antes dos bioensaios.

Tabela 1 - Cepas de fungos entomopatogênicos pertencentes a coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, identificadas através de análise morfológica em microscópio estereoscópio e molecular através da região ITS do rDNA, que foram utilizadas nos bioensaios para o *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Cultura	Local	Alvo
LCBPF 02	<i>Cordyceps amoene-rosea</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP	O* N** A***
LCBPF 08	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP	O N A
LCBPF 09	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Agudos – SP	O N A
LCBPF 11	<i>Cordyceps javanica</i>	<i>B. tabaci</i>	Soja	Botucatu – SP	A
LCBPF 12	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 15	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 17	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 19	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 20	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 23	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 28	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP	O N A
LCBPF31	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 46	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF47	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Botucatu – SP	O N A
LCBPF 60	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Mandaguaçu - PR	O N A
LCBPF 62	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Cruzeiro do Sul -PR	O N A
LCBPF 63	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	<i>B. tabaci</i>	Soja	Botucatu - SP	O N
LCBPF 77	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA	O N A
LCBPF 78	<i>Metarhizium guizhouense</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA	O N A
LCBPF 79	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA	O N A
LCBPF 80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA	O N A
LCBPF 81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA	O N A
LCBPF 82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA	O N
LCBPF 83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú - MA	O N
LCBPF 85	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Nativa	Grajaú – MA	O N
LCBPF 96	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA	A
LCBPF 100	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA	O N A
LCBPF 104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Soja	Brejo – MA	O N A
LCBPF 108	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. molitor</i>	Eucalipto	Açailândia -MA	O N

*Ovo; ** Ninfa; ***Adulto.

Tabela 2 – Produtos comerciais e respectivos principais ativos da fabricante Koppert do Brasil Holding Ltda utilizados em todos os bioensaios com *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Produto comercial	Princípio ativo	Fabricante
Boveril®	<i>Beauveria bassiana</i>	Koppert do Brasil Holding Ltda.
Metarril®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Koppert do Brasil Holding Ltda.
Octane®	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	Koppert do Brasil Holding Ltda.

2.2.3.1 Viabilidade dos isolados

Cada isolado de FEP foi reativado em placa de Petri (90 mm) contendo 15 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA - Sigma-Aldrich 39 g L⁻¹) suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 g.L⁻¹), previamente autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Os fungos foram mantidos em BOD (Temp. de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 14 dias, até o completo desenvolvimento e esporulação.

Foi realizada a viabilidade de 30 cepas, as quais pertencem à coleção de fungos entomopatogênicos do LCBPF, além de três produtos biológicos comerciais (Tabela 1 e 2).

A viabilidade de todos os fungos foi determinada depositando uma alíquota 100 µl da suspensão de conídios na concentração de 1x10⁶ conídios mL⁻¹, previamente preparada com solução do surfactante Tween 80 (0,01% v/v), em placas de Petri (90 mm) contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 g.L⁻¹), e incubadas em BOD, conforme descrito acima, por 18 h. O conídio era considerado viável quando o tubo germinativo se encontrava duas vezes maior que o diâmetro do esporo. Um total de 100 conídios por repetição foi contabilizado em microscópio óptico com amplificação de 400x, utilizando-se três repetições por isolado. Os fungos que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizados nos bioensaios com os insetos (WRAIGHT; INGLIS; GOETTEL, 2007).

2.2.3.2 Patogenicidade dos isolados a *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Os bioensaios de patogenicidade ocorreram em adultos, ninfas de terceiro ínstar e posturas de *E. heros*.

2.2.3.2.1 Bioensaio em adultos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

O ensaio foi conduzido com adultos de *E. heros*, com sete dias de idade, 25 isolados de FEP, três produtos comerciais e uma testemunha, composta por água destilada autoclavada e Tween 80 (0,01% v/v) (Tabela 1 e 2).

Os conídios foram obtidos em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura BDA suplementado com sulfato de estreptomicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), mantidos em câmara tipo BOD (Temp. de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h) por 14 dias. Cada suspensão foi preparada de maneira independente, para evitar contaminação. Os conídios foram obtidos através da raspagem superficial do meio de cultura, seguido da adição de surfactante Tween 80 (0,01% v/v). A concentração da solução foi ajustada para 1×10^8 conídios mL^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (NORA et al., 2021).

Os insetos foram retirados da criação no dia anterior à montagem do ensaio, com seis dias após emergência, e mantidos em placas de Petri (90 mm) contendo vagem verde de feijão e papel filtro no fundo, até o momento da inoculação. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo cada placa considerada uma repetição, com um total de oito, contendo quatro insetos em cada.

O volume da suspensão de conídios aplicada foi determinado de acordo com a recomendação de campo para inseticidas biológicos registrados para *E. heros* (200 L ha^{-1}), e de acordo com a área da placa de Petri de 90 mm ($63,6 \text{ cm}^2$). Dessa forma, uma alíquota de $127 \text{ }\mu$ da suspensão de cada isolado foi aplicada em cada repetição, de maneira independente, com auxílio de um aerógrafo profissional de dupla ação (DB134k, Fenghua Bida Machinery Manufacture Co., China), a 25 cm de distância da placa de Petri, com pressão de trabalho de 10 PSI, conforme metodologia adaptada de Jordan et al. (2021), no interior da cabine de fluxo laminar. O equipamento foi lavado com hipoclorito de sódio a 1% (v/v), álcool 70% e água destilada autoclavada a cada tratamento.

Após cada aplicação, as placas foram imediatamente levadas à câmara tipo BOD (Temp. de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, UR de $85 \pm 2\%$ e fotofase de 12 h), e nesse ambiente mantidas por 48 h, favorecendo o contato dos insetos com os conídios retidos no papel filtro. Após esse período, os insetos foram transferidos para placas plásticas (60 mm) adaptadas com tecido tipo voil, contendo a mesma fonte de alimento e mantidos em sala a temperatura de 25°C , UR de 80% e fotofase de 12 h (Figura 1).

As avaliações foram realizadas diariamente, sendo a primeira conduzida 48 h após a inoculação dos fungos, a qual consistia na verificação de insetos mortos e na substituição do alimento, conforme necessário, durante 15 dias. Os cadáveres removidos das placas eram submetidos à desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) por 30 segundos e posteriormente lavados em água destilada autoclavada, por 30 segundos, seguido por transferência para as câmaras úmidas, confeccionadas de recipientes plásticos de 500 mL. A incubação ocorreu em BOD, com mesmas condições já descritas acima, por 15 dias, visando a confirmação da morte do inseto pelo fungo, através do desenvolvimento de estruturas como hifas e conídios.

Figura 1 – Bioensaio com *Euschistus heros* em placas adaptadas com tecido tipo *voil* mantidos a temperatura de 25°C, UR de 80% e fotofase de 12 h



Foto: Bianca Cristina Costa Gêa

2.2.3.2.2 Bioensaio em ninfas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

O bioensaio foi conduzido com ninfas de terceiro ínstar de *E. heros*, retiradas da criação, com no máximo 24 h, para evitar com que a troca de ínstar pudesse afetar o desenvolvimento do FEP, com as mesmas características descritas acima.

2.2.3.2.3 Bioensaio em posturas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

As posturas de *E. heros* utilizadas no bioensaio foram retiradas da criação 12 h antes da montagem do experimento. Além disso, quando retirados, os ovos estavam frescos, com no máximo 10 h. Todos os ovos selecionados para o bioensaio foram avaliados em microscópio estereoscópio, objetivando selecionar apenas os ovos viáveis, ou seja, sem danos aparentes no córion.

Os ovos que não emergiram ninfas foram considerados inviáveis/mortos, e levados à câmara úmida, conforme descrito. Os ovos que apresentaram estruturas fúngicas, após a incubação, tiveram a morte confirmada pelo microrganismo após a identificação morfológica do FEP em microscópio estereoscópio.

As ninfas que eclodiram foram mantidas no mesmo ambiente dos ovos. Além disso, foi realizada câmara úmida de todas as ninfas que morreram. Cada repetição foi composta por cinco ovos, totalizando 40 ovos por tratamento. As condições de inoculação foram as mesmas descritas acima.

2.2.3 Análise estatística

Os dados de mortalidade dos ovos, ninfas e adultos de *E. heros* do controle absoluto e dos tratamentos com FEP foram submetidos ao teste de normalidade, apresentando $p < 0,05$, sendo necessário o uso da análise não paramétrica. Os isolados tiveram os dados da mortalidade transformados em mortalidade acumulada (%) e posteriormente, os melhores foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn's, visando comparar par a par as medianas ($P > 0,05$). Posteriormente, os dados foram corrigidos pela fórmula de Schneider-Orelli's (PÜNTENER; ZAHNER, 1981) e novamente submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn's ($P > 0,05$), com auxílio do software Excel (2020) e Minitab (2021).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Viabilidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos

Foram avaliadas 30 cepas de FEP pertencentes à coleção do LCBPF e três produtos biológicos comerciais a base de FEP (Quadro 1), todos os fungos obtiveram viabilidade igual ou superior a 90%, e foram selecionados para serem utilizados nos bioensaios de patogenicidade em *E. heros*.

Quadro 1. Fungos entomopatogênicos e produtos comerciais selecionados para o bioensaio de patogenicidade em *Euschistus heros* com base na viabilidade (%) dos conídios, na concentração de 1×10^6 , acima de 90%

Isolado	Espécie	Viabilidade (%)
LCBPF 02	<i>Cordyceps amoene-rosea</i>	96,3 ± 3,8
LCBPF 08	<i>Metarhizium robertsii</i>	89,8 ± 2,5
LCBPF 09	<i>Beauveria bassiana</i>	97,3 ± 2,1
LCBPF 11	<i>Cordyceps javanica</i>	93,3 ± 2,1
LCBPF 12	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	96,0 ± 1,0
LCBPF 13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	92,0 ± 5,3
LCBPF 15	<i>Beauveria bassiana</i>	91,8 ± 2,5
LCBPF 17	<i>Cordyceps cateniannulata</i>	96,0 ± 3,0
LCBPF 19	<i>Beauveria bassiana</i>	93,3 ± 3,1
LCBPF 20	<i>Beauveria bassiana</i>	91,7 ± 0,6
LCBPF 23	<i>Beauveria bassiana</i>	96,0 ± 3,0
LCBPF 28	<i>Metarhizium anisopliae</i>	90,7 ± 2,3
LCBPF31	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,7 ± 3,2
LCBPF 46	<i>Beauveria bassiana</i>	97,7 ± 0,6
LCBPF47	<i>Metarhizium robertsii</i>	91,7 ± 3,5
LCBPF 60	<i>Metarhizium anisopliae</i>	90,7 ± 2,1
LCBPF 62	<i>Beauveria bassiana</i>	97,3 ± 2,1
LCBPF 63	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	93,7 ± 1,2
LCBPF 77	<i>Metarhizium robertsii</i>	94,0 ± 2,0
LCBPF 78	<i>Metarhizium guizhouense</i>	90,0 ± 2,0
LCBPF 79	<i>Metarhizium anisopliae</i>	91,0 ± 4,0
LCBPF 80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	96,7 ± 4,9
LCBPF 81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,3 ± 2,5
LCBPF 82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	97,7 ± 2,1
LCBPF 83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100,0 ± 0,0
LCBPF 85	<i>Metarhizium anisopliae</i>	94,0 ± 2,0
LCBPF 96	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	96,0 ± 4,6
LCBPF 100	<i>Metarhizium robertsii</i>	100,0 ± 0,0
LCBPF 104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	93,7 ± 0,6
LCBPF 108	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100,0 ± 0,0
Boveril®	<i>Beauveria bassiana</i>	96,3 ± 3,8
Metarril®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	91,3 ± 1,5
Octane®	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	92,7 ± 3,1

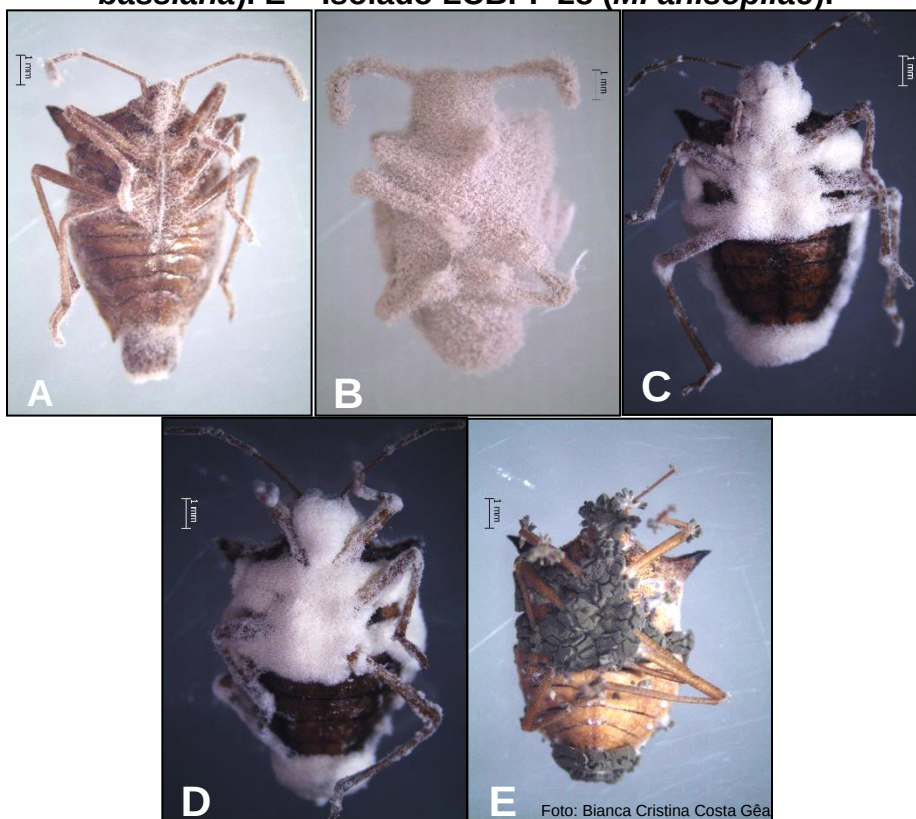
2.3.2 Patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos em adultos de *Euschistus heros*

Foram avaliados 28 tratamentos fúngicos, sendo três produtos comerciais e 25 cepas de FEP, e um tratamento controle, composto por água destilada autoclavada

+ 0,01% de Tween 80 (v/v). Os insetos mortos tiveram mortalidade comprovada pelos FEP por análise morfológica em microscópio óptico e reisolamento em meio BDA, quando necessário (Figura 2).

Para os adultos de *E. heros*, a mortalidade acumulada, aos 15 DAA, variou de 0 a 43,75% (Quadro 2).

Figura 2 – Adultos de *Euschistus heros* apresentando sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos. A – Octane®. B – Isolado LCBPF 11 (*C. javanica*). C – Isolado LCBPF 19 (*B. bassiana*). D – Isolado LCBPF 20 (*B. bassiana*). E – Isolado LCBPF 28 (*M. anisopliae*).

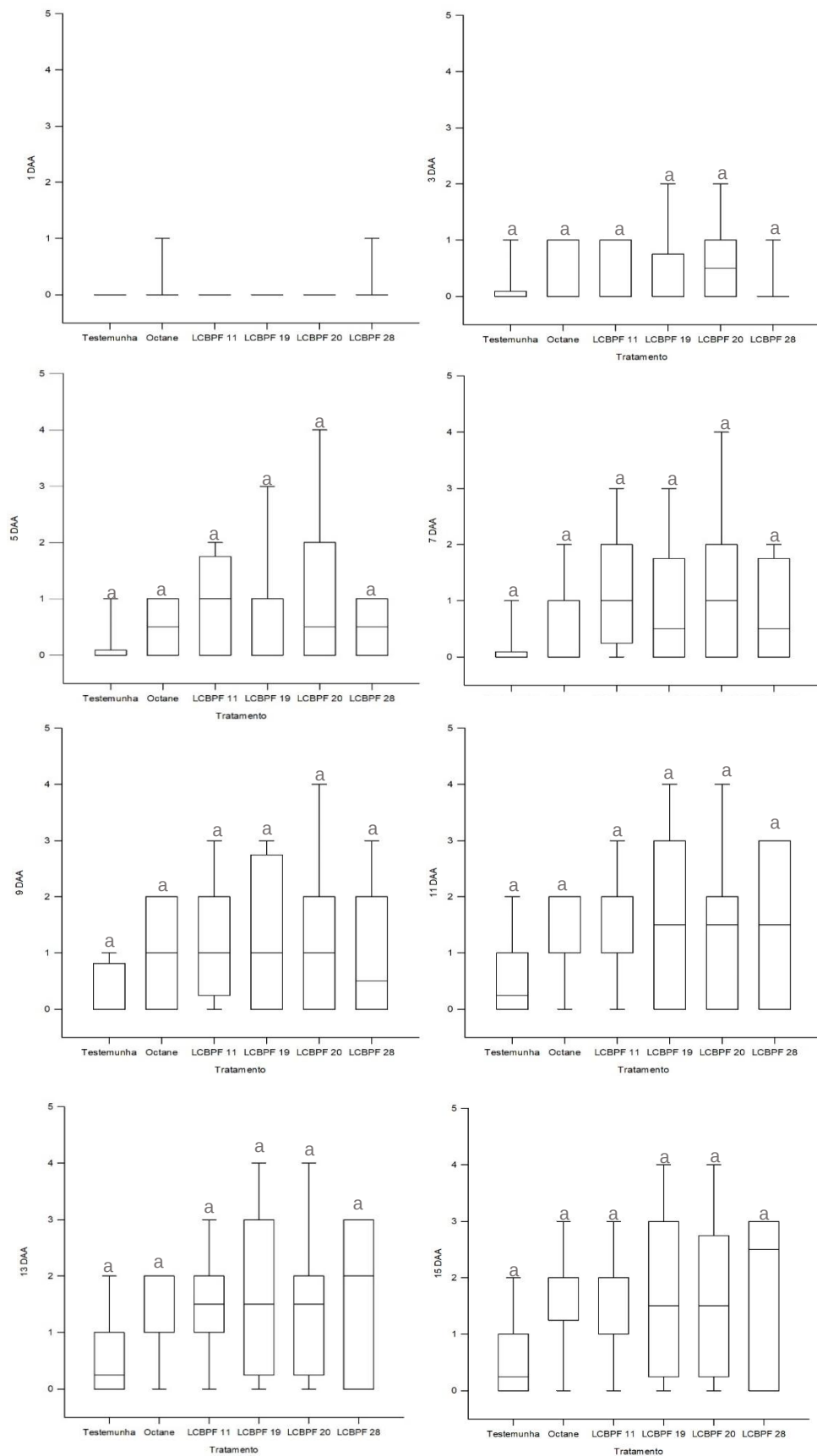


Quadro 2 – Número médio acumulado de adultos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) mortos com fungos entomopatogênicos e produtos comerciais na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}

Tratamento	Mortalidade acumulada (%)							
	1 DAA*	3 DAA	5 DAA	7 DAA	9 DAA	11 DAA	13 DAA	15 DAA
Testemunha	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8
Octane®	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,5	12,5 ± 0,5	18,8 ± 0,7	25,0 ± 0,9	37,5 ± 0,8	37,5 ± 0,8	43,8 ± 0,9
Boveril®	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,7	12,5 ± 0,9	15,6 ± 1,2	18,8 ± 1,5	21,9 ± 1,5	21,9 ± 1,5	21,9 ± 1,5
Metarril®	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	9,4 ± 1,1
LCBPF 02	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7
LCBPF 08	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,7	9,4 ± 0,7	12,5 ± 0,8	15,6 ± 0,9
LCBPF 09	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,5	9,4 ± 0,5	21,9 ± 0,6	25,0 ± 0,8	28,1 ± 0,8	28,1 ± 0,8	21,9 ± 0,8
LCBPF 11	0,0 ± 0,0	9,4 ± 0,5	21,9 ± 0,8	31,3 ± 1,0	31,3 ± 1,0	34,4 ± 0,9	37,5 ± 0,9	40,6 ± 0,9
LCBPF 12	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,7
LCBPF 13	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8	18,8 ± 0,9
LCBPF 15	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	12,5 ± 0,9	12,5 ± 0,9	12,5 ± 0,9	12,5 ± 0,9	12,5 ± 0,9
LCBPF 17	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5
LCBPF 19	0,0 ± 0,0	9,4 ± 0,7	15,6 ± 1,1	21,9 ± 1,1	31,3 ± 1,3	40,6 ± 1,6	43,8 ± 1,5	43,8 ± 1,5
LCBPF 20	0,0 ± 0,0	15,6 ± 0,7	28,1 ± 1,5	31,3 ± 1,4	31,3 ± 1,4	34,4 ± 1,4	37,5 ± 1,3	40,6 ± 1,4
LCBPF 23	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	15,6 ± 0,7	18,8 ± 0,7	18,8 ± 0,7	18,8 ± 0,7
LCBPF 28	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	12,5 ± 0,5	18,8 ± 0,9	25,0 ± 1,2	37,5 ± 1,4	40,6 ± 0,5	43,8 ± 0,5
LCBPF 31	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	6,2 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,3 ± 0,9	6,3 ± 0,9
LCBPF 46	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	12,5 ± 0,5
LCBPF 47	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,7	9,4 ± 0,7	15,6 ± 0,9	15,6 ± 0,9	18,8 ± 0,8	18,8 ± 0,7
LCBPF 60	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	9,4 ± 0,5
LCBPF 62	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8	15,6 ± 0,7
LCBPF 77	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5
LCBPF 78	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5
LCBPF 79	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,7	15,7 ± 0,9	18,8 ± 1,0	18,8 ± 1,0	18,8 ± 1,0	18,8 ± 1,0
LCBPF 80	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	9,3 ± 0,7	15,6 ± 0,9	18,8 ± 0,9	18,8 ± 0,9	28,1 ± 1,1
LCBPF 81	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	9,9 ± 0,5	9,4 ± 0,5
LCBPF 96	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,7	9,4 ± 1,1	9,4 ± 1,1	9,9 ± 1,1	9,4 ± 1,1
LCBPF 100	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
LCBPF 104	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,4 ± 0,7	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,8

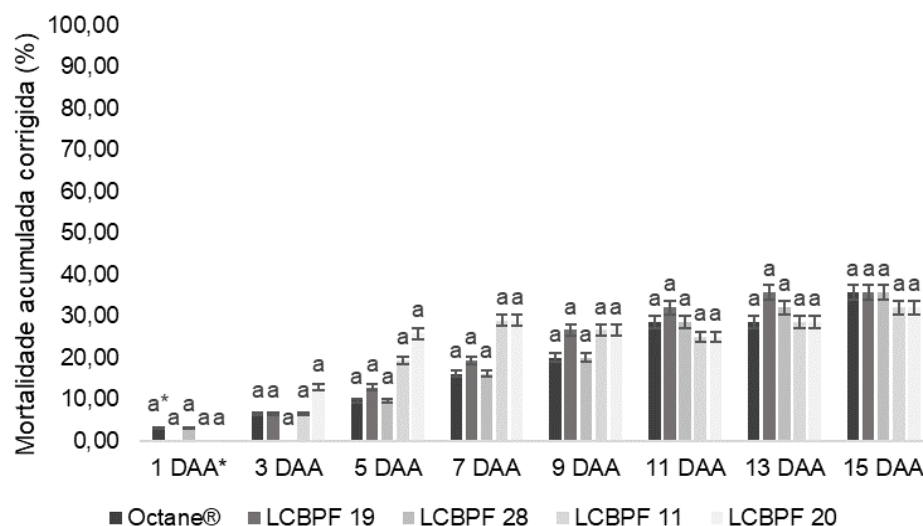
As melhores cepas e produtos comerciais foram submetidos à análise estatística, a qual evidenciou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os melhores tratamentos e a testemunha (Figura 3) com o decorrer dos dias de avaliação. A mortalidade acumulada corrigida também foi obtida, sendo possível a observação de que também não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo dia de avaliação (Figura 4).

Figura 3 – Mediana da mortalidade de adultos de *E. heros* (Hemiptera: Pentatomidae) pelos melhores isolados de fungos entomopatogênicos



*DAA – Dias após a aplicação; medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente (p < 0,05).

Figura 4 – Mortalidade média acumulada corrigida (%) dos melhores isolados de fungos entomopatogênicos e produtos comerciais biológicos em adultos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}



*Medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

1.3.3 Patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos em ninfas de *Euschistus heros*

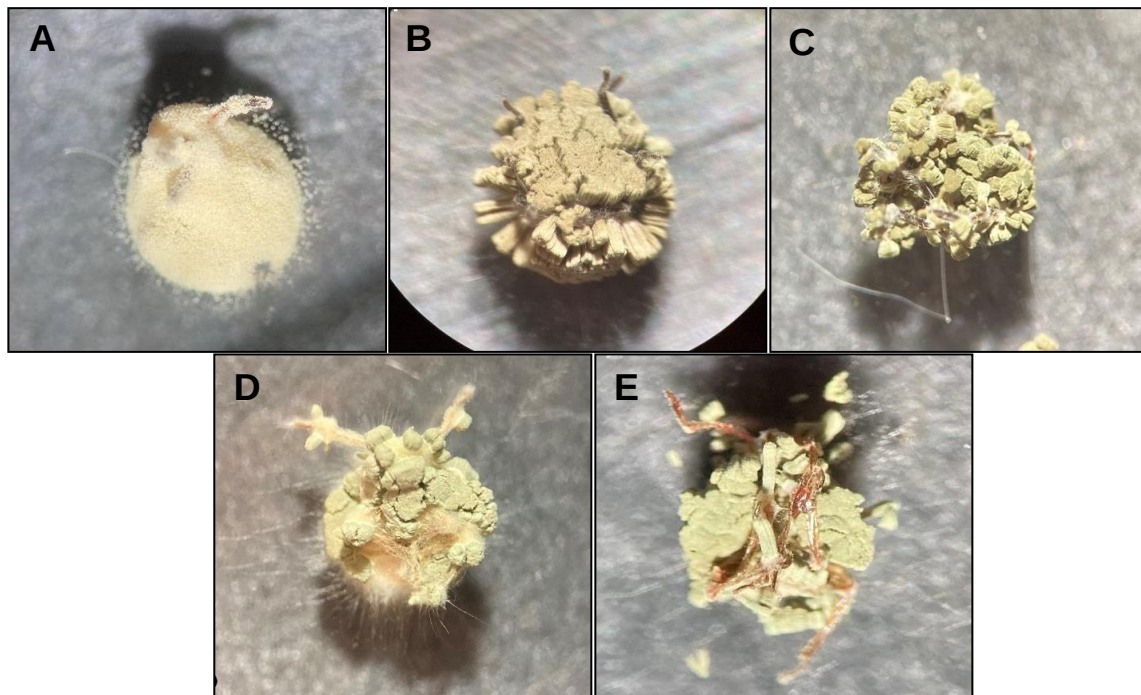
Nas ninfas foram aplicados e avaliados 31 tratamentos fúngicos, sendo três produtos comerciais e 28 cepas de FEP, e um tratamento controle, composto por água destilada autoclavada + 0,01% de Tween 80 (v/v). Os insetos mortos tiveram mortalidade comprovada pelos FEP por análise morfológica em microscópio óptico e reisolamento em meio BDA, quando necessário (Figura 5).

Para as ninfas de *E. heros*, a mortalidade acumulada, aos 15 DAA, variou de 3,57 a 67,86%, respectivamente identificados como LCBPF 20 (*B. bassiana*) e LCBPF 77 (*M. robertsii*) (Quadro 3).

A análise estatística dos isolados que apresentaram maior taxa de mortalidade para as ninfas evidenciou diferença estatística na mortalidade aos 9 DAA, se destacando o LCBPF 77, o qual diferiu da testemunha ($p = 0,004$), mas não diferiu dos tratamentos restantes. Nos dias posteriores, notou-se o aumento das mortes dentro de cada tratamentos, mas estas não diferiram estatisticamente, com exceção da diferença já relatada entre o LCBPF 77 e a testemunha (Figura 6).

A análise da mortalidade acumulada corrigida dos melhores tratamentos contra ninfas de *E. heros*, não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo dia de avaliação (Figura 7).

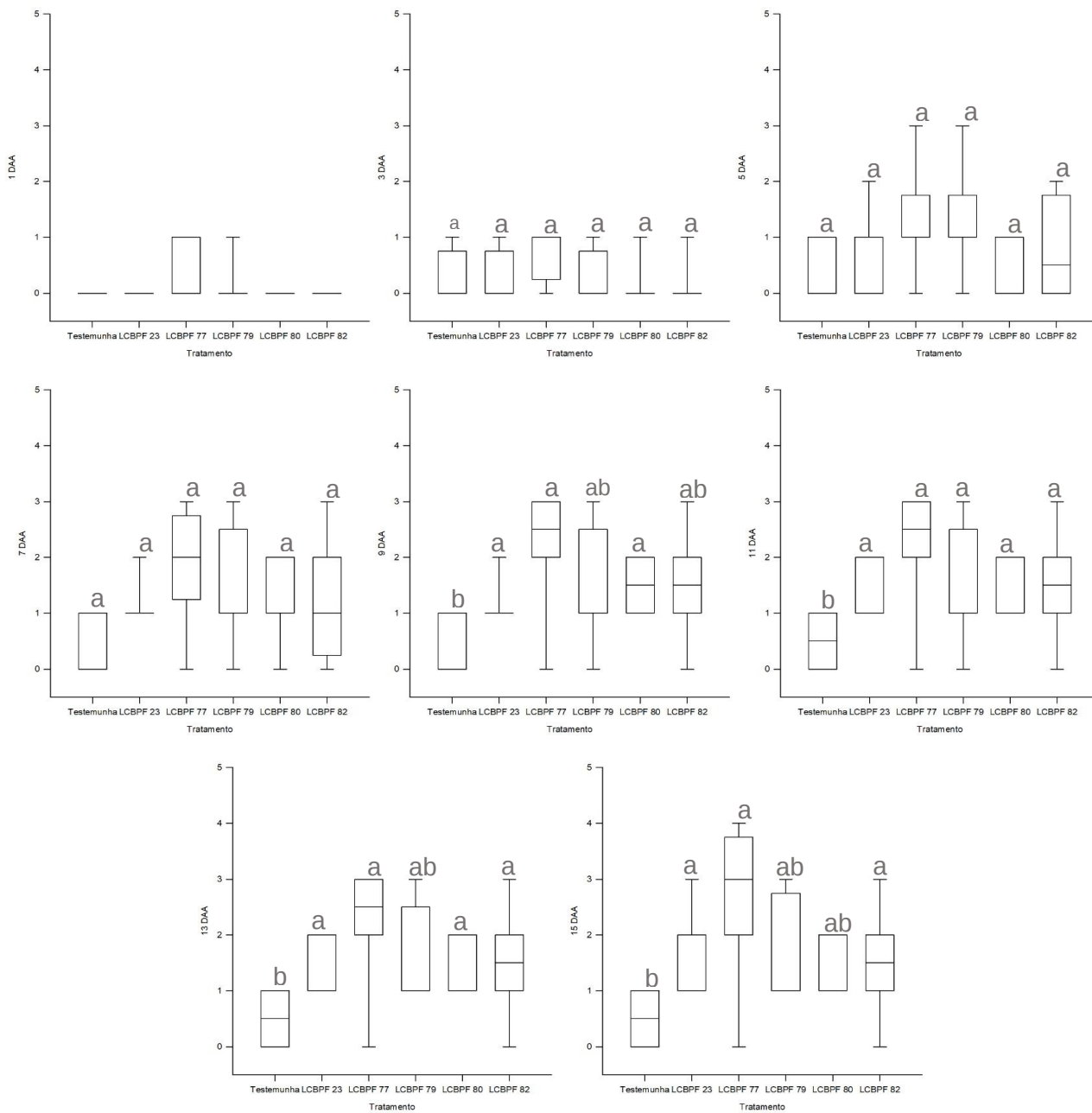
Figura 5 – Ninfas de terceiro ínstar de *Euschistus heros* apresentando sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos. A – Isolado LCBPF 23 (*B. bassiana*). B – Isolado LCBPF 77 (*M. robersii*). C – Isolado LCBPF 79 (*M. anisopliae*). D – Isolado LCBPF 80 (*M. anisopliae*). E – Isolado LCBPF 82 (*M. anisopliae*).



Quadro 3 – Número médio acumulado de ninfas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) mortas com fungos entomopatogênicos e produtos comerciais na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}

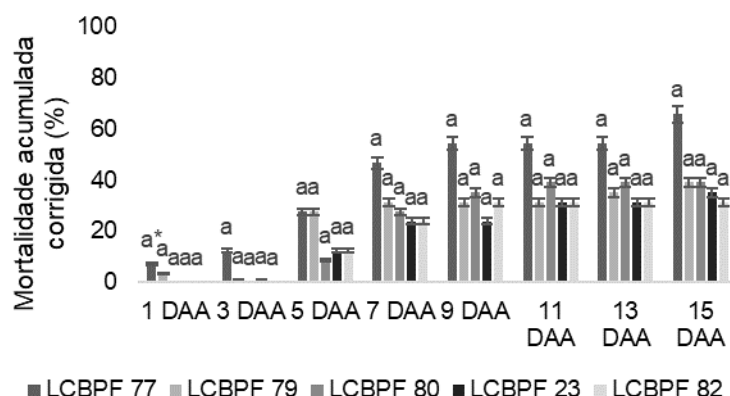
Tratamento	Mortalidade acumulada (%)							
	1 DAA*	3 DAA	5 DAA	7 DAA	9 DAA	11 DAA	13 DAA	15 DAA
Testemunha	0,0 ± 0,0	6,6 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5
Octane®	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,5	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,8	14,3 ± 1,1	21,4 ± 1,0	25,0 ± 0,9	25,0 ± 0,9
Boveril®	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,7
Metarril®	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,5
LCBPF 02	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5
LCBPF 08	3,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5
LCBPF 09	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4
LCBPF 12	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5
LCBPF 13	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	14,3 ± 0,5
LCBPF 15	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,5	14,3 ± 0,5	17,9 ± 0,7	17,9 ± 0,7	17,9 ± 0,7	21,4 ± 0,9
LCBPF 17	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	17,9 ± 0,7	21,4 ± 0,6	28,6 ± 1,0	28,6 ± 1,0	32,1 ± 1,0	32,1 ± 1,1
LCBPF 19	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,5	14,3 ± 1,0	21,4 ± 1,1
LCBPF 20	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5
LCBPF 23	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,5	17,8 ± 0,7	28,6 ± 0,4	28,6 ± 0,4	35,7 ± 0,5	35,7 ± 0,5	39,3 ± 0,8
LCBPF 28	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,5	10,7 ± 0,5	14,3 ± 0,5	17,9 ± 0,7	21,4 ± 1,0
LCBPF 31	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	17,9 ± 0,7	21,4 ± 0,8	28,6 ± 0,8	28,6 ± 0,9	28,6 ± 0,9	32,1 ± 0,7
LCBPF 46	0,0 ± 0,0	10,7 ± 0,5	21,4 ± 0,8	28,6 ± 0,6	32,1 ± 0,7	32,1 ± 0,7	32,1 ± 0,7	32,1 ± 0,7
LCBPF 47	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,5
LCBPF 60	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,4	3,6 ± 0,5	10,7 ± 0,5	17,9 ± 0,7	17,9 ± 0,7	17,9 ± 0,7	17,9 ± 0,7
LCBPF 62	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,5	17,9 ± 1,4	25,0 ± 1,3	25,0 ± 1,0	25,0 ± 1,3	25,0 ± 1,3	25,0 ± 1,3
LCBPF 63	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,5
LCBPF 77	7,1 ± 0,5	17,9 ± 0,5	32,1 ± 0,9	50,0 ± 1,0	57,1 ± 1,0	57,1 ± 1,0	57,1 ± 1,0	67,9 ± 1,0
LCBPF 78	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,4	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,5	10,7 ± 0,5	25,0 ± 1,1	25,0 ± 1,1	32,1 ± 1,0
LCBPF 79	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,5	32,1 ± 0,9	35,7 ± 1,1	35,7 ± 1,1	35,7 ± 1,1	39,3 ± 0,9	42,9 ± 0,9
LCBPF 80	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	14,3 ± 0,5	32,1 ± 0,7	39,3 ± 0,5	42,9 ± 0,5	42,9 ± 0,5	42,9 ± 0,5
LCBPF 81	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	21,4 ± 0,7	28,6 ± 0,8	28,6 ± 0,8	32,1 ± 0,8	32,1 ± 0,8	32,1 ± 0,8
LCBPF 82	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	17,9 ± 0,9	28,6 ± 1,0	35,7 ± 0,8	35,7 ± 0,8	35,7 ± 0,8	35,7 ± 0,8
LCBPF 83	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,5	14,3 ± 0,5	14,3 ± 0,9	14,3 ± 0,9	14,3 ± 0,9	14,3 ± 0,9
LCBPF 85	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	14,3 ± 0,7	17,9 ± 0,7	21,4 ± 0,5	21,4 ± 0,5	21,4 ± 0,5	21,4 ± 0,5
LCBPF 100	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,5	10,7 ± 0,5	14,3 ± 0,7	14,3 ± 0,7	14,3 ± 0,7	14,3 ± 0,7
LCBPF 104	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,7	3,6 ± 1,2	10,7 ± 1,2	14,3 ± 1,2
LCBPF 108	0,0 ± 0,0	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,8	10,7 ± 0,8	10,7 ± 0,8	14,3 ± 0,9	14,3 ± 0,9

Figura 6 - Mediana da mortalidade de ninfas de *E. heros* (Hemiptera: Pentatomidae) pelos melhores isolados de fungos entomopatogênicos (temp. de 25°C, UR de 80% e fotofase de 12 h)



*DAA – Dias após a aplicação; medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente (p<0,05).

Figura 7 – Mortalidade média acumulada corrigida (%) dos melhores isolados de fungos entomopatogênicos para ninfas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}



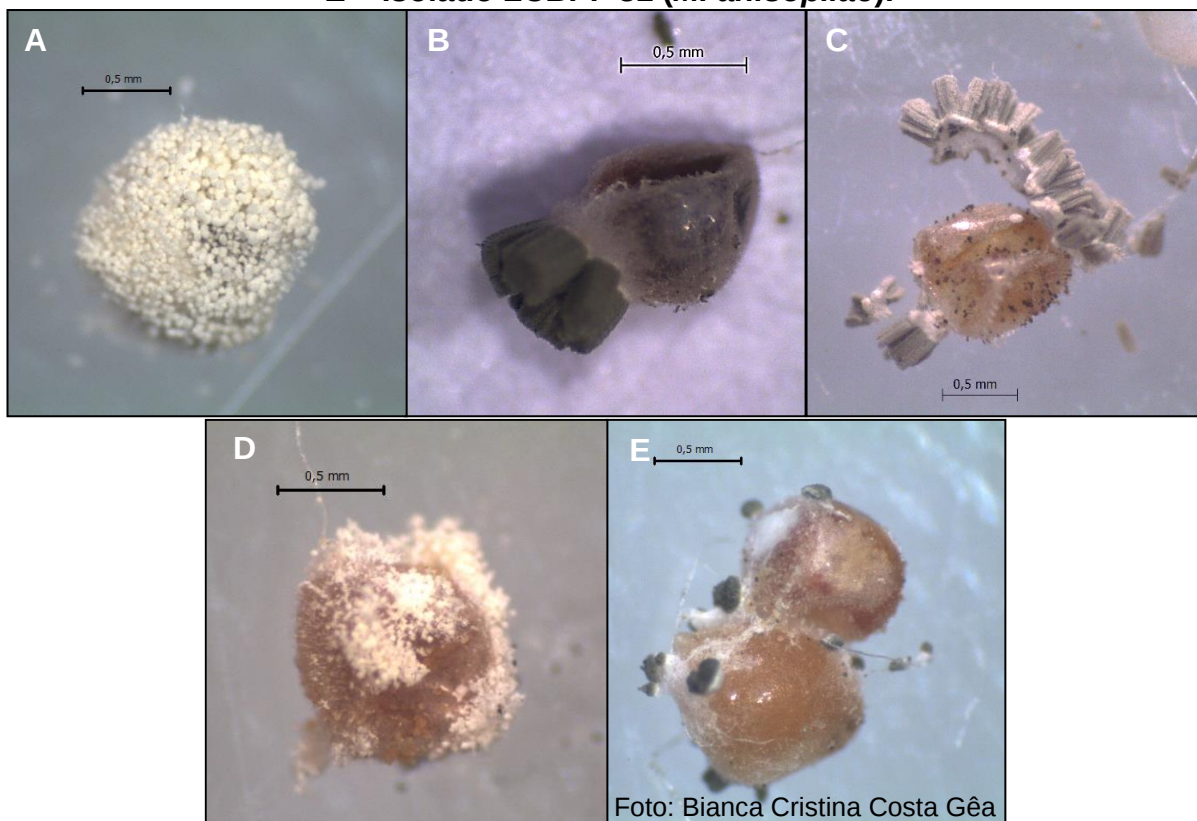
*Medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

1.3.4 Patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos em ninfas de *Euschistus heros*

Os ovos de *E. heros* inviáveis/mortos foram contabilizados 10 dias após a inoculação com as cepas de fungos entomopatogênicos e produtos comerciais na concentração 1×10^8 esporos ml^{-1} . Esses ovos foram levados à câmara úmida, e posteriormente a análise em microscópio óptico, e quando necessário, os fungos foram reisolados em meio de cultura BDA, para confirmação da contaminação (Figura 8).

Foram avaliados 31 tratamentos fúngicos, sendo três produtos comerciais e 28 cepas de FEP, e um tratamento controle, composto por água destilada autoclavada + 0,01% de Tween 80 (v/v). A mortalidade acumulada (%) variou de 62,5 a 17,5%, respectivamente, os isolados LCBPF 63 de *C. fumosorosea* e LCBPF 47 de *Metarhizium robertsii* (Quadro 4).

Figura 8 – Ovos de *Euschistus heros* apresentando sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos. A – Octane®. B – Isolado LCBPF 08 (*M. robertsii*). C – Isolado LCBPF 13 (*M. anisopliae*). D – Isolado LCBPF 63 (*C. fumosorosea*). E – Isolado LCBPF 81 (*M. anisopliae*).



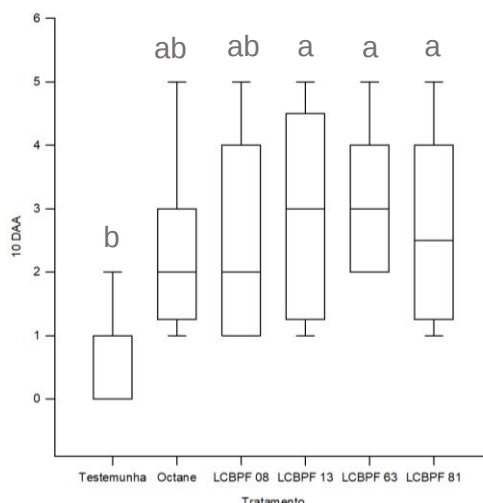
Os melhores tratamentos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, e tiveram as medianas comparadas pelo teste de Dunn's, o qual revelou que após 10 dias a instalação do experimento os fungos LCBPF 63, LCBPF 13 e LCBPF 81 diferiram estatisticamente da testemunha ($p = 0,006$) e apresentaram mortalidade de 62,5, 57,5 e 55% (Quadro 4 e Figura 9).

Quadro 4 – Número médio acumulado de ovos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) mortos devido aos fungos entomopatogênicos e produtos comerciais na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}

Tratamento	Mortalidade acumulada (%)
	10 DAA*
Testemunha	10,0 $\pm$ 0,8
Octane®	47,5 $\pm$ 1,3
Boveril®	32,5 $\pm$ 1,1
Metarril®	27,5 $\pm$ 1,3
LBCPF 02	42,5 $\pm$ 0,8
LCBPF 08	50,0 $\pm$ 1,6
LCBPF 09	40,0 $\pm$ 1,8
LCBPF 12	45,0 $\pm$ 1,5
LCBPF 13	57,5 $\pm$ 1,6
LCBPF 15	40,0 $\pm$ 1,4
LCBPF17	45,0 $\pm$ 1,0
LCBPF 19	25,0 $\pm$ 0,9
LCBPF 20	42,5 $\pm$ 1,4
LCBPF 23	35,0 $\pm$ 1,3
LCBPF 28	40,0 $\pm$ 1,3
LCBPF 31	40,0 $\pm$ 1,7
LCBPF 46	35,0 $\pm$ 1,5
LCBPF 47	17,5 $\pm$ 1,2
LCBPF 60	32,5 $\pm$ 1,4
LCBPF 62	40,0 $\pm$ 2,0
LCBPF 63	62,5 $\pm$ 1,1
LCBPF 77	27,5 $\pm$ 0,7
LCBPF 78	32,5 $\pm$ 1,1
LCBPF 79	32,5 $\pm$ 0,9
LCBPF 80	40,0 $\pm$ 1,9
LCBPF 81	55,0 $\pm$ 1,5
LCBPF 82	40,0 $\pm$ 1,2
LCBPF 83	35,0 $\pm$ 1,5
LCBPF 85	40,0 $\pm$ 1,1
LCBPF 100	40,0 $\pm$ 1,5
LCBPF 104	45,0 $\pm$ 1,7
LCBPF 108	32,5 $\pm$ 1,1

*DAA – Dias após a aplicação.

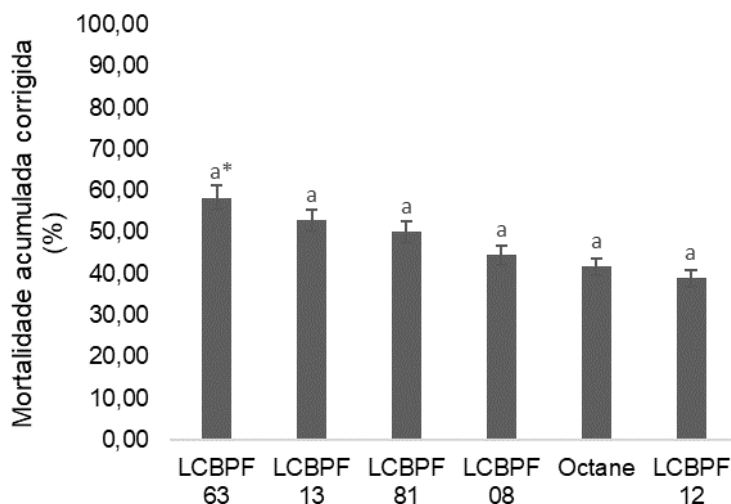
Figura 9 – Mediana acumulada para ovos de *E. heros* (Hemiptera: Pentatomidae) mortos pelos melhores isolados de fungos entomopatogênicos (temp. de 25°C, UR de 80% e fotofase de 12 h)



*DAA – Dias após a aplicação; medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os dados de mortalidade foram corrigidos e não revelaram diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$) após 10 dias de inoculação (Figura 10).

Figura 10 – Mortalidade média acumulada corrigida (%) dos melhores isolados de fungos entomopatogênicos para ovos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1}



*Medianas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

Os isolados pertencentes à coleção de fungos entomopatogênicos do LCBPF, os quais possuem origem de estados diferentes e, em alguns casos, de hospedeiro, variaram quanto à patogenicidade para adultos, ninfas e ovos de *E. heros*. O estudo revelou também que houve grande variação quanto aos isolados patogênicos quando correlacionados com os estádios do inseto, uma vez que não houve isolado em comum para todos os estádios avaliados do percevejo marrom. Além disso, a cepa LCBPF 77 de *M. robertsii* para ninfas, LCBPF 11 de *C. fumosorosea*, LCBPF 13 e 81 de *M. anisopliae* para ovos, apresentaram potencial de controle para os estádios de desenvolvimento citados da praga.

Diversos estudos avaliaram o desempenho de FEP em *E. heros* sob condições controladas de laboratório, sendo a maior parte dos resultados obtidos apenas em adultos (NORA et al., 2021; LOPES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; RESQUÍN-ROMERO, et al., 2020). Foi avaliado nesse trabalho três estádios de desenvolvimento do *E. heros*, os quais apresentaram alta variação quanto à suscetibilidade às cepas de entomopatógenos.

Os adultos, foram os que se apresentaram mais resistentes, com mortalidade após 15 dias de avaliação de 43,75%, provocado pelas cepas LCBPF 19 e 28, respectivamente, *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Lopes et al. (2015) também obtiveram resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho, com mortalidade variando de 10 a 22% para adultos de *E. heros*. Os Pentatomidae são insetos conhecidos pela liberação de compostos voláteis quando em situações de estresse. Esses compostos são produzidos e armazenados, no caso dos adultos, pelas glândulas metatorácicas, afetando negativamente o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos (LOPES et al., 2015; MORAES et al., 2008). Muito provável que esses compostos tenham sido os responsáveis pela baixa mortalidade de adultos nesse trabalho, além disso, estudos envolvendo formas que induzam a superação pelos FEP da inibição causada por esses voláteis podem ser relevantes para o manejo dessa praga com entomopatógenos.

As ninfas foram mais suscetíveis à infecção por fungos, juntamente com os ovos, com controle de 67,86% e 62,5% após 15 e 10 dias, respectivamente. Resquín-Romero et al. (2020) obtiveram mortalidade de 83,3% para ninfas de quinto ínstar, ao aplicarem o isolado ARSEF 3297 de *M. brunneum*. As ninfas são consideradas o estágio de vida mais suscetível do *E. heros*, e por isso maior virulência já era esperada (NORA et al., 2021). Além disso, enquanto os adultos produzem majoritariamente o composto n-tridecano, álcoois de cadeia curta e ésteres pelas glândulas metatorácicas, as ninfas produzem apenas o primeiro, através das glândulas abdominais (LOPES et al., 2015).

Com relação aos ovos, poucos são os produtos químicos que possuem efeito ovicida em hemípteros, sendo considerado um dos estádios mais difíceis de se obter o controle da praga (CAMPBELL; PEREIRA; KOEHLER, 2016; PERMADI et al., 2021). Os ovos utilizados no experimento com os FEP foram tratados quando estavam com no máximo 30 h, além disso, o tratamento controle teve apenas 10% de mortalidade, enquanto que o melhor tratamento, LCBPF 63, de *C. fumosorosea*, obteve 62,5% de mortalidade. Normalmente, inseticidas a base de óleo penetram melhor no córion, quando comparado com os inseticidas à base de água, e isso se deve à presença de compostos cerosos, os quais servem como barreira para perda de água (CAMPBELL; PEREIRA; KOEHLER, 2016), sendo assim, a formulação de um produto a base de óleo com o entomopatógeno LCBPF 63, pode auxiliar no aumento do controle obtido nesse trabalho. A somar, o córion é composto por

carboidratos e proteínas, os quais são essenciais para o desenvolvimento dos conídios dos FEP, o que contribui para a patogenicidade desses microrganismos durante o desenvolvimento embrionário dos insetos (PERMADI et al., 2021).

É interessante salientar que as ninfas, devido ao hábito gregário, tiveram contato com o microrganismo que estava presente na superfície do ovo, infectando-se. A câmara úmida permitiu a esporulação dos FEP presentes nas ninfas, sendo esta uma vantagem do uso desses microrganismos tendo como alvo ovos de *E. heros*, merecendo novos estudos.

2.5 CONCLUSÃO

Isolados de fungos entomopatogênicos, de origens diferentes, apresentaram patogenicidade às diferentes etapas de desenvolvimento do inseto. Os isolados LCPBF 19 de *B. bassiana* e 28 de *M. anisopliae*, com origem de mata nativa e de área cultivada por soja, respectivamente, foram os mais patogênicos aos adultos de *E. heros*. Para as ninfas de terceiro ínstar, o maior nível de mortalidade foi obtido pelo LCBPF 77 de *M. anisopliae*, originário de mata nativa, enquanto que para os ovos, o mais patogênico foi o LCBPF 63 de *C. javanica*, obtido de adultos de *Bemisia tabaci* de uma área de soja. Sendo assim, apesar de as eficácias de controle não terem sido tão satisfatórias, os fungos avaliados possuem potencial de controle da praga, visto que após a formulação podem ser mais eficientes no combate dos insetos. Além disso, a junção em um único produto dos melhores entomopatógenos pode apresentar excelentes resultados, controlando os insetos em todas as suas fases no campo.

REFERENCIAS

- BUENO, A. F.; BORTOLOTO, O. C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. B. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean. **Crop Protection**, v. 71, p. 132 – 137, 2015. DOI: 10.1016/j.cropro.2015.02.012
- BUENO, A. F.; BRAZ, É. C.; FAVETTI, B. M.; FRANÇA-NETO, J. B.; SILVA, G. V. Release of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to manage the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, in soybean production. **Crop protection**, v. 137, 2020. DOI: 10.1016/j.cropro.2020.105310
- BUTT, T. M.; COATES, C. J.; DUBOVSKIY, I. M.; RATCLIFFE, N. A. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *In*: LOVETT, B.; LEHER, R. J. (eds.). **Advances in genetics**. Academic Press, 2016. v. 94, cap. 9, p. 307-364. ISSN: 0065-2660
- CAMPBELL, B. E.; PEREIRA, R. M.; KOEHLER, P. G. Complications with controlling insect eggs. *In*: TRDAN, S. (ed.). **Insecticides Resistance**. London: IntechOpen, 2016. p. 83-96. DOI: 10.5772/61848
- CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. Planilhas de custos de produção – séries históricas: soja. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/custos-de-producao/planalhas-de-custo-de-producao/itemlist/category/414-planilhas-de-custos-de-producao-series-historicas>. 2017. Acesso em 09 mai. 2022.
- DOMINGUES, M. M.; SANTOS, P. L.; GÊA, B. C. C.; CARVALHO, V. R.; OLIVEIRA, F. N.; SOLIMAN, E. P.; SILVA, W. M.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS JÚNIOR, V. C.; WILCKEN, C. F. Isolation and molecular characterization of *Cordyceps* sp. from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and pathogenic to *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022. DOI: 10.1590/1519-6984.253028
- JORDAN, C.; SANTOS, P. L.; OLIVEIRA, L. R. S.; DOMINGUES, M. M.; GÊA, B. C. C.; RIBEIRO, M. F.; MASCARIN, G. M.; WILCKEN, C. F. Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien Eucalyptus pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific reports**, n. 7233, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-86638-9
- 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, p. 77-85, 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2015.08.011

MORAES, M. C. B. M.; PAREJA, R. A.; LAUMANN, M. BORGES. The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 489-505, 2008. DOI: 10.1590/S1519-566X2008000500001

NORA, D. D.; PIOVESAN, B. C.; BELLÉ, C.; STACKE, R. S.; BALARDIN, R. R.; GUEDES, J. V. C.; MICHAUD, J. P.; JACQUES, R. J. S. Isolation and evaluation of entomopathogenic fungi against the neotropical brown stnk bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology**, 2021. DOI: 10.1080/09583157.2020.1826904

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop protection**, v. 56, p. 50-54, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.10.022

OLIVEIRA, D. G. O.; DUDEZAK, A. C.; ALVES, L. F. A.; SOSA-GOMEZ, D. R. Biological Parameters of *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and its Susceptibility to Entomopathogenic Fungi When Fed on Different Diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, e16150141, 2016. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150141

OLIVEIRA, W. P.; LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Seed Damage by the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.) to Resistant Soybean Cultivars with the Block Technology Versus a Susceptible Cultivar. **Environmental Entomology**, v. 51, n. 2, p. 451-459, 2022. DOI: 10.1093/ee/nvac011

ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. Major economic issues in integrated pest management. In: ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. (eds.). **The economics of integrated pest management of insects**. United Kingdom, Wallingford: CABI, 2019. Cap. 1, p. 1-13.

PANIZZI, A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 119-127, 2013. DOI: 10.1007/s13744-013-0111-y

PAZINI, J. B.; PADILHA, A. C.; CAGLIARI, D.; BUENO, F. A.; RAKES, M.; ZOTTI, M. J.; MARTINS, J. F. S.; GRÜTZMACHER, A. D. Differential impacts of pesticides on *Euschistus heros* (Hem.: Pentatomidae) and its parasitoid *Telenomus podisi* (Hym.: Platygasteridae). **Scientific Reports**, v. 9, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-42975-4

PERMADI, M. A.; LUBIS, R. A.; HARAHA, Q. H.; SIREGAR, U. S. Virulence of Entomopathogenic Fungi Isolates Against Green Ladybug *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae) Eggs. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1764, n. 012146, 2021. DOI: 10.1088/1742-6596/1764/1/012146

PÜNTENER, W., ZAHNER, O. **Manual for field trials in plant protection**. 2 Ed., Basle: Ciba-Geigy Limited, Agricultural Division, 205 p., 1981.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 83, p. 96-103, 2018. DOI: 10.1016/j.dci.2018.01.010

RESQUÍN-ROMERO, G.; CABRAL-ANTÚNEZ, C.; SARUBBI-ORUE, H.; GARRIDO-JURADO, I.; VALVERDE-GARCIA, 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**, v. 113, n. 5, p. 2540-2545, 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa150

SILVA, M. T. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Fechando o cerco. **Cultivar**, Pelotas, v. 9, n. 98, 2007.

SILVA-SANTANA, M. F.; ALVES, L. F. A.; FERREIRA, T. T.; BONINI, A. K. Selection and characterisation of *Beauveria bassiana* fungus and their potential to control the brown stink bug. **Biocontrol Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 90-102, 2021. DOI: 10.1080/09583157.2021.1970716

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and Field Studies on the Infection of Stink Bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, n. 2, p. 115-120, 1998. DOI: 10.1006/jipa.1997.4716

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. DOI: 10.1007/s10340-017-0949-6

WRAIGHT, S.; INGLIS, D. G.; GOETTEL, M. S. Fungi. *In*: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 223-248p., 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Solos cultivados e não cultivados se apresentam como um ambiente propício para manutenção de isolados de fungos entomopatogênicos, sendo os estudos que visam a obtenção de novas cepas de regiões e áreas diferentes do Brasil essenciais para democratizar o controle microbiano de insetos. Foram encontradas 49 novas cepas desses microrganismos, dentre elas exemplares de *Metarhizium*, *Beauveria*, *Cordyceps* e *Purpureocillium*, com potencial para serem utilizados no controle de insetos-praga.

Os isolados LCBPF 11, 23, 02, 13 e 15 se destacaram no controle de *B. tabaci* biótipo B, sendo este o primeiro relato de patogenicidade de *C. amoene-rosea* para mosca-branca.

O controle microbiano de percevejos fitófagos da família Pentatomidae, como o *E. heros*, é dificultado devido à liberação de compostos voláteis das glândulas metatorácicas e abdominais que possuem efeito fungistático e fungicida aos fungos entomopatogênicos. O controle de adultos, apesar de dificultoso, apresenta potencial com os isolados LCBPF 11, 19, 20 e 28. Já as ninfas, as melhores taxas de controle foram obtidas pelos fungos LCBPF 23, 77, 79, 80 e 82, enquanto que para os ovos se destacaram as cepas LCBPF 08, 13, 63 e 81. Novos testes avaliando um produto, em suspensão de óleo, contendo as melhores cepas para cada estágio de vida do *E. heros* pode viabilizar um melhor controle da praga, abrangendo todas as fases do seu desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ABDULLE, Y. A.; NAZIR, T.; KEERIO, A. U.; ALI, H.; ZAMAN, S.; ANWAR, T.; NAM, T. D.; QIU, D. In vitro virulence of three *Lecanicillium lecanii* strains against the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, n. 30, v. 129, 2020. DOI: 10.1186/s41938-020-00328-8
- AVILA, C. J.; GRIGOLLI, J. F. J. Pragas de soja e seu controle. *In*: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. C.; ROSCOE, R. (Eds.). **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS, 2014. cap. 6, p. 109-168.
- BARRETO DA SILVA, F.; MULLER, C.; BELLO, V. H.; WATANABE, L. F. M.; ROSSITTO DE MARCHI, B.; FUSCO, L. M.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; MINOZZI, G. B.; VIVAN, L. M.; TAMAI, M. A.; FARIAS, J. R.; NOGUEIRA, A. M.; SARTORI, M. M. P.; KRAUSE-SAKATE, R. 2020. Effects of cowpea mild mottle virus on soybean cultivars in Brazil. **PeerJ Life & Environment**, 2020. DOI: 10.7717/peerj.9828
- BELLO, V. H.; SILVA, F. B.; WATANABE, L. F. M.; VICENTIN, E.; MULLER, C.; BUENO, R. C. O. F.; SANTOS, J. C.; MARCHI, B. R.; NOGUEIRA, A. M.; YUKI, V. A.; MARABAYASHI, J. M.; SARTORI, M. M. P.; PAVAN, M. A.; GHANIM, M.; KRAUSE-SAKATE, R. Detection of *Bemisia tabaci* Mediterranean cryptic species on soybean in São Paulo and Paraná States (Brazil) and interaction of cowpea mild mottle virus with whiteflies. **Plant Pathology**, v. 70, p. 1509-1520, 2021. DOI: 10.1111/ppa.13387
- BUENO, A. F.; BORTOLOTO, O. C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. B. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean. **Crop Protection**, v. 71, p. 132 – 137, 2015. DOI: 10.1016/j.cropro.2015.02.012
- BUENO, A. F.; BRAZ, É. C.; FAVETTI, B. M.; FRANÇA-NETO, J. B.; SILVA, G. V. Release of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to manage the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, in soybean production. **Crop protection**, v. 137, 2020. DOI: 10.1016/j.cropro.2020.105310
- CABALLERO, R. Identificación de moscas blancas. *In*: HILJE, L. (ed.). **Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus**. Turrialba: CATE, 1996. cap. 1, p. 1-10.
- CARVER, M. GROSS, G. F. WOODWARD, T. E. Hemiptera (bugs, leafhoppers, cicadas, aphids, scale insects, etc.). *In*: NAUMANN, I. D. (ed.). **Systematic and applied entomology: an introduction**. Melbourne: Melbourne University Press, 1994. cap. 30, p. 316-329.

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, DF, v. 8, n. 12, 2021. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 09 mai. 2022.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária: safra 2020/21**. Brasília, v. 8, 2020. 75 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 09 mai. 2022.

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. **Planilhas de custos de produção – séries históricas: soja**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/custos-de-producao/planilhas-de-custo-de-producao/itemlist/category/414-planilhas-de-custos-de-producao-series-historicas>. 2017. Acesso em 09 mai. 2022. CORRÊA-FERREIRA, B. S. Amostragem de pragas da soja. *In*: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2012. v. 1, p. 631-672.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. *In*: FUNDAÇÃO MS. **Tecnologia e Produção: soja e milho 2011/2012**. Dourados: Fundação MS, 2012. v. 1, cap. 8, p.155-206.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *In*: FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 09 mai. 2022.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R.; PANIZI A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. **Pest of Management Science**, Sussex, v. 70, n. 10, p. 1568–1572, 2014. DOI: 10.1002/ps.3752

KANAKALA, S.; GHANIM, M. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0213946

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; DELALIBERA, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, n. 66, p. 209-2018, 2013a. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.05.001

MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 601-607, 2005.

MOTA-SANCHEZ, D.; WISE, J. C. **The Arthropod Pesticide Resistance Database**. Michigan State University, 2022. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org>>. Acesso: 11 mai. 2022.

NORA, D. D.; PIOVESAN, B. C.; BELLÉ, C.; STACKE, R. S.; BALARDIN, R. B.; GUEDES, J. V. C.; MICHAUD, J. P.; JACQUES, R. J. S. Isolation and avaluation of entomopathogenic fungi against the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Tecnology**, v. 31, 2021. DOI: 10.1080/09583157.2020.1826904

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop protection**, v. 56, p. 50-54, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.10.022

OLIVEIRA, W. P.; LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Seed Damage by the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.) to Resistant Soybean Cultivars with the Block Technology Versus a Susceptible Cultivar. **Environmental Entomology**, v. 51, n. 2, p. 451-459, 2022. DOI: 10.1093/ee/nvac011

ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. Major economic issues in integrated pest management. In: ONSTAD, D. W.; CRAIN, P. R. (eds.). **The economics of integrated pest management of insects**. United Kingdom, Wallingford: CABI, 2019. Cap. 1, p. 1-13.

PADILHA, G.; POZEBON, H.; PATIAS, L. S.; FERREIRA, D. F.; CASTILHOS, L. B.; FORGIARINI, S. E.; DONATTI, A.; BEVILAQUA, J. G.; MARQUES, R. P.; MORO, D.; ROHRIG, A.; BONES, S. A. S.; CARGNELUTTI FILHO, A.; PES, L. Z.; ARMEMANN, J. A. Damage essessment of *Bemisia tabaci* and economic injury level on soybean. **Crop protection**, v. 143, 2021. DOI: 10.1016/j.cropro.2021.105542

PANIZZI, A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 119-127, 2013. DOI: 10.1007/s13744-013-0111-y

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 335-420.

PAZINI, J. B.; PADILHA, A. C.; CAGLIARI, D.; BUENO, F. A.; RAKES, M.; ZOTTI, M. J.; MARTINS, J. F. S.; GRÜTZMACHER, A. D. Differential impacts of pesticides on *Euschistus heros* (Hem.: Pentatomidae) and its parasitoid *Telenomus podisi* (Hym.: Platygastridae). **Scientific Reports**, v. 9, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-42975-4

PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R. **Aspectos populacionais de percevejos fitófagos ocorrendo na cultura da soja (Hemiptera: Pentatomidae) em duas áreas do norte do Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico, 253).

POZEBON, H.; MARQUES, R. P.; PADILHA, G.; O'NEAL, O.; VALMORBIDA, I.; BEVILAQUA, J. G.; TAY, W. T.; ARNEMANN, J. J. Arthropod Invasions Versus Soybean Production in Brazil: A Review. **Jornal of Economic Entomology**, v. 113, n. 4, p. 1591-1608, 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa108

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 83, p. 96-103, 2018. DOI: 10.1016/j.dci.2018.01.010

QUINTELA, E. D. **Manual de identificação dos insetos e outros invertebrados: pragas do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. (Embrapa arroz e feijão. Documentos, 142).

RESQUÍN-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**, v. 113, n. 5, p. 2540-2545, 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa150

SANCHEZ-PENA, S. R.; LARA, J. S.; MEDINA, R. F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect**, v. 11, 2011. DOI: 10.1673/031.011.0101.

SANTOS, T. T. M.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SANTANA, M. V. Enhanced mortality of *Bemisia tabaci* nymphs by *Isaria javanica* combined with sublethal doses of chemical insecticides. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 6, p. 598-609, 2018. DOI: 10.1111/jen.12504

SCHUTZE, I. X.; YAMAMOTO, P. T.; MALAQUIAS, J. B.; HERRITT, M.; THOMPSON, A.; MERTEN, P.; NARANJO, S. E. Correlation-Based Network Analysis of the Influence of *Bemisia tabaci* Feeding on Photosynthesis and Foliar Sugar and Starch Composition in Soybean. **Insects**, v. 13, v. 1, 2022. DOI: 10.3390/insects13010056

SUN, T.; WU, J.; ALI, S. Morphological and molecular identification of four *Purpleocillium* isolates and evaluating their efficacy against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 27, 2021.

TESSMER, M. A.; AZEVEDO KUHN, T. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; LOPES, J. R. S.; ERLER, G.; BONANI, J. P. Histology of Damage Caused by *Euschistus heros* (F.) Nymphs in Soybean Pods and Seeds. **Neotropical Entomology**, v. 51, p. 112–121, 2022. DOI:10.1007/s13744-021-00931-w

TOLOI, M. N. V.; BONILLA, S. H.; TOLOI, R. C.; SILVA, H. R. O.; NAAS, I. R.; Development Indicators and Soybean Production in Brazil. **Agriculture**, v. 11, n. 11, 2021. DOI: <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/11/1164>

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.

VIEIRA, S. V.; BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; BOFF, M. I. C.; GOBBI, A. L. Different timing of whitefly control and soybean yield. **Ciencia rural**, v. 43, n. 2, p. 247-253, 2013. DOI: 10.1590/S0103-84782013000200009

VILLAS-BÔAS, G. L.; CASTELO-BRANCO, M. **Manejo integrado da mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI)**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. 12 p. (Circular Técnica, 70).

ZERBINO, M. S.; PANIZZI, A. R. The underestimated role of pest pentatomid parasitoids in Southern South America. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 13, p. 703-718, 2019. DOI: 10.1007/s11829-019-09703-1