



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Euschistus heros*
(Fabricius, 1798)**

AMANDA MICHEL STEFANELLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

NOVEMBRO/2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Euschistus heros*
(Fabricius, 1798)**

AMANDA MICHEL STEFANELLO

**ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT
COORIENTADOR: MARCELO TAVARES DE CASTRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: DISSERTAÇÃO/2021

BRASÍLIA/DF

NOVEMBRO/2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A
Euschistus heros (Fabricius,1798)**

AMANDA MICHEL STEFANELLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

ROSE GOMES MONNERAT SOLÓN DE PONTES, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Orientadora) CPF:512.803.701-86 e-mail: rose.monnerat@embrapa.br

MARIA LUCRÉCIA GEROSA RAMOS, DSc, Professora, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília – FAV (Membro Interno) CPF:002.094.438-12 e-mail: lucrecia@unb.br

ADENEY DE FREITAS BUENO, Ph.D. Pesquisador, Embrapa Soja (Membro Externo) CPF: 120.454.568-54 e-mail:adeney.bueno@embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 30 de NOVEMBRO de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Stefanello, Amanda Michel

Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Euschistus heros* (Fabricius, 1798). /
Amanda Michel Stefanello, orientação de Rose Monnerat – Brasília, 2021.

69 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Bioensaios. 3. CL₅₀. 4. Controle biológico. I. Monnerat, R.G. II. Doutora.

CDD ou CDU

Agris / FAO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

STEFANELLO, A. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Euschistus heros* (Fabricius, 1798)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 69 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: AMANDA MICHEL STEFANELLO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1798)

GRAU: Mestre

ANO: 2021

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: AMANDA MICHEL STEFANELLO

CPF: 025.161.421-29

Endereço. STN, LOTE K, ED. MONTREAL. BLOCO 1. APTO 114, ASA NORTE, DF, BRASIL

Tel. (67) 99667-0467

Email: amandamichelstefanello@gmail.com

Aos meus pais, João Carlos Libreloto Stefanello e Helena Fonseca Michel Stefanello, pelo amor e apoio incondicional.

Às minhas irmãs, Marcela, Gabriela e Fernanda, pelo amor fraterno e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Márcio Martinello Sanches, pelo amor e cumplicidade e por ser espelho de dedicação à pesquisa e apoio incondicional.

Aos meus cunhados, Obed, Manoel Lucas e Afonso, pelo carinho e apoio incondicional.

À minha avó Eva Maria de Souza da Fonseca (*in memorian*)

Ao meu mestre Lan Kwo Fan (*in memorian*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que tem oferecido em minha vida.

Ao meu namorado Márcio Martinello Sanches, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, pelo incentivo, pelo apoio incondicional e pela cumplicidade em toda esta trajetória para meu aprimoramento pessoal e profissional.

Aos meus pais, João Carlos e Helena, pelo amor, pelas conversas, pelo zelo, pelo apoio incondicional, pela preocupação e pela torcida constante.

Às minhas irmãs, Marcela, Gabriela e Fernanda, pelo apoio incondicional, pelo carinho e por fazerem dos nossos encontros, momentos felizes e agradáveis, cheios de boas recordações e de saudades.

Aos meus cunhados, Obed, Manoel Lucas e Afonso, pelo apoio incondicional, pelas conversas, pelo carinho e pela torcida constante.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Rose Gomes Monnerat, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela paciência e compreensão, incentivo e competência na condução dos trabalhos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcelo Tavares de Castro, pela solicitude em me atender, pelas sugestões, pelo incentivo, pelas contribuições valiosas para o desenvolvimento do trabalho.

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro para o desenvolvimento do trabalho. Aos funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelos auxílios com os experimentos e pela amizade.

Aos companheiros de laboratório, Lillian, Paulo, Ester, Camila, Izabela, Lara, Janaina, Gabriela, Zezinho, Sandro, Stefany, Giovana, Andréa, Breno por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Ao pesquisador Raúl Alberto Laumann, pelos aconselhamentos, pela ajuda na criação de percevejos e pela solicitude em me atender.

Ao pesquisador Miguel Borges, pelos aconselhamentos e pela atenção oferecida.

Às minhas amigas, Marlinda, Daniela e Zonaite, pelo carinho, pelas conversas e pelo apoio constante.

E a todos que de alguma maneira contribuíram na realização deste projeto.

RESUMO

Euschistus heros Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) é responsável por grandes perdas na cultura da soja e o seu controle possui um alto custo aos produtores, no qual é baseado principalmente no uso de defensivos químicos, porém, são pouco eficientes. Assim, evidencia-se a demanda por mais estudos para encontrar formas diferentes que sejam eficazes no controle de *E. heros*, contribuindo também para a elaboração de novos produtos comerciais que sejam à base de biológicos. Desta maneira, foram selecionadas estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *E. heros*, após a determinação de uma metodologia de ensaios seletivos e de dose. Primeiramente, insetos de *E. heros* foram criados em quatro dietas artificiais. A dieta artificial que permitiu o melhor desenvolvimento dos insetos, comparado ao desempenho dos criados em dieta natural (controle), foi escolhida para ser usada nos bioensaios. A avaliação da atividade tóxica das estirpes de *Bacillus* spp. contra *E. heros* foram feitas através da inoculação da bactéria-teste via água, com reinoculações a cada 48 horas e avaliação dos ensaios durante sete dias. Das 50 estirpes avaliadas, quatro apresentaram taxas de mortalidade de 100%. A estirpe n. 30, identificada como *B. cereus* lato sensu, foi a mais tóxica para *E. heros* e o valor da sua CL₅₀ foi de $0,58 \times 10^4$ esporos/mL. As estirpes n. 28 e n. 9, identificadas como *B. thuringiensis*, também foram tóxicas a *E. heros* e os valores das suas CL₅₀ foram de $14,94 \times 10^4$ esporos/mL e $215,1 \times 10^4$ esporos/mL, respectivamente. Além disso, esse trabalho relata, pela primeira vez, toxicidade causada pelas espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. safensis* em *E. heros*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, Bioensaios, CL₅₀, Controle Biológico.

ABSTRACT

Euschistus heros Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) is responsible for great losses in soybean crops and its control has a high cost to producers, this cost is mainly due to chemical pesticides, however, few are efficient. This is why there is a clear demand for more studies to find alternative ways which are effective in controlling the *E. heros*, while also contributing to the development of new commercial products based on biologicals. In this way, strains of *Bacillus* spp. were selected, toxic to the *E. heros*, after determination of dose selective trials. Firstly, *E. heros* insects were created using four different diets. The artificial diet allowed for the best development of the insects, compared to the natural (control) diet, and it was the one chosen for use on the bioassays. The toxic activity evaluation of *Bacillus* spp. strains against *E. heros* were done through the inoculation of the test-bacteria using water, with reinoculations every 48 hours with the trial being evaluated every seven days. From the 50 strains tested, four presented a mortality rate of 100%. The n. 30 strain, identified as *Bacillus cereus* lato sensu, was the most toxic to *E. heros* and its LC₅₀ value was $0,58 \times 10^4$ spores/mL. The n. 28 and n. 9 strains, identified as *B. thuringiensis* to *E. heros* and their LC₅₀ values were $14,94 \times 10^4$ spores/mL and $215,1 \times 10^4$ spores/mL, respectively. Moreover, this work first reports the toxicity of *B. amyloliquefaciens* and *B. safensis* species -to *E. heros*.

Key Words: *Bacillus thuringiensis*, Bioassays, Biological Control, LC₅₀.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do percevejo-marrom <i>Euschistus heros</i> , baseado em Cividanés (1992)	7
Figura 2. Montagem das placas TPP para os insetos criados em dieta Natural (controle).....	18
Figura 3. Montagem das placas TPP para os insetos criados em dieta artificial.....	18
Figura 4. Montagem das caixas Gerbox para os insetos criados em dieta Natural (controle).....	19
Figura 5. Montagem das caixas Gerbox para os insetos criados em dieta artificial (4 tratamentos).....	20
Figura 6. Gaiolas dos insetos adultos criados em: (a) dieta natural e (b) dieta artificial.....	20
Figura 7. Montagem das gaiolas, em potes plásticos, para os insetos adultos criados em dieta artificial (tratamentos).....	21
Figura 8. Montagem dos bioensaios seletivos a base de dieta artificial, em placas TPP, para os insetos de segundo ínstar de <i>E. heros</i>	26
Figura 9. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: (a) insetos de 3º ínstar, (b) insetos de 4º ínstar.....	29
Figura 10. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4º ínstar.....	29
Figura 11. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4º ínstar.....	29
Figura 12. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4º e 5º ínstars.....	30
Figura 13. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: (a) insetos de 4º e 5º ínstars, (b) insetos de 5º ínstar.....	30
Figura 14. <i>E. heros</i> criados na dieta artificial D1: inseto de 5º ínstar e insetos adultos.....	30
Figura 15. <i>E. heros</i> criados na dieta natural: (a) insetos de 3º ínstar.....	31
Figura 16. <i>E. heros</i> criados na dieta natural: (a) insetos de 4º ínstar, (b) inseto de 5º ínstar.....	31
Figura 17. <i>E. heros</i> criados na dieta natural: (a) insetos de 4º e 5º ínstars, (b) insetos de 5º ínstar.....	31
Figura 18. <i>E. heros</i> criados na dieta natural: (a) insetos de 4º e 5º ínstars, (b) insetos de 5º ínstar.....	32
Figura 19. <i>E. heros</i> criados na dieta natural: (a) e (b) insetos adultos.....	32

Figura 20. *E. heros* adultos com deformações: (a) com vestígios de exúvias presas e (b) nas asas externas.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes da dieta artificial D1 para a criação de <i>E. heros</i> em condições de laboratório.....	15
Tabela 2. Ingredientes da dieta artificial D2 para a criação de <i>E. heros</i> em condições de laboratório.....	16
Tabela 3. Composição das dietas D3 e D4 para a criação de <i>E. heros</i> em condições de laboratório.....	17
Tabela 4. Concentração de esporos das amostras de <i>Bacillus</i> spp. utilizadas nos ensaios para determinação das doses-resposta.....	27
Tabela 5. Tempo de duração médio (\pm EP) do segundo ínstar até a fase adulta de <i>E. heros</i> criados nas 5 dietas testadas. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.....	28
Tabela 6. Taxa de mortalidade média (\pm EP) de <i>E. heros</i> criados nas 5 dietas. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.....	35
Tabela 7. Razão sexual (\pm EP), peso (\pm EP) (mg) e comprimento (\pm EP) (mm) de machos e fêmeas de adultos de <i>E. heros</i> criados nas 2 dietas selecionadas para a terceira etapa. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.....	36
Tabela 8. Número médio (\pm EP) de ovos e taxa de eclosão média (\pm EP) das ninfas colocadas por fêmeas de <i>E. heros</i> criados nas 2 dietas selecionadas para a terceira etapa. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.....	37
Tabela 9. Avaliação da taxa de mortalidade média (\pm EP) em relação aos tratamentos e controles. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.....	39
Tabela 10. Avaliação da taxa de mortalidade média (\pm EP) diária em relação ao Tratamento com reinoculações e Controles. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.	41
Tabela 11. Taxa de mortalidade de <i>E. heros</i> nos ensaios seletivos utilizando-se diferentes isolados de bactérias entomopatogênicas. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.	43
Tabela 12. Concentração letal média (CL_{50}) das estirpes n. 9, n. 28, n. 30 e n. 49 em ninfas de segundo ínstar de <i>E. heros</i> (análise de Probit).....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	04
2.1 Objetivo geral	04
2.2 Objetivos específicos.....	04
3. REVISÃO DE LITERATURA	05
3.1 Cultura da Soja	05
3.2 <i>Euschistus heros</i>	05
3.2.1 Aspectos Bioecológicos	06
3.2.2 Danos Causados à Cultura da Soja	07
3.2.3 Medidas de Controle Adotadas na Cultura da Soja	08
3.3 Produtos Biológicos.....	09
3.3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner, 1911)	10
3.4 Dietas Artificiais Desenvolvidas para a Criação de <i>E. heros</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Determinação da Metodologia de Ensaio Seletivo e de Dose	14
4.1.1 Ensaio para avaliar o desenvolvimento de <i>E. heros</i> criados em 4 dietas artificiais e selecionar a dieta mais adequada	14
4.1.1.1 Obtenção dos ovos de <i>E. heros</i>	14
4.1.1.2 Preparo da dieta natural.....	14
4.1.1.3 Preparo das dietas artificiais	15
4.1.1.4 Metodologia para a criação dos percevejos <i>E. heros</i> em diferentes dietas	17
4.1.2 Ensaio para determinar a forma de inoculação da bactéria-teste e o tempo necessário para avaliar a mortalidade de <i>E. heros</i>	22
4.1.3 Ensaio para determinar a necessidade de reinocular a bactéria-teste ao longo do período de avaliação	23
4.2 Ensaio para Avaliação da Toxicidade de Estirpes de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>E. heros</i>	24
4.2.1 Obtenção dos percevejos <i>E. heros</i>	25
4.2.2 Preparo da dieta artificial	25
4.2.3 Origem e preparo das estirpes de <i>Bacillus</i> spp.....	25
4.2.4 Bioensaios Seletivos.....	25

4.2.5 Bioensaios para Determinação da Dose-Resposta.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Determinação da Metodologia de Ensaios Seletivo e de Dose	28
5.1.1 Ensaio para avaliar o desenvolvimento de <i>E. heros</i> criados em 4 dietas artificiais e selecionar a dieta mais adequada	28
5.1.2 Ensaios para determinar a forma de inoculação da bactéria-teste e o tempo necessário para avaliar a mortalidade do <i>E. heros</i>.....	38
5.1.3 Ensaios para determinar a necessidade de reinocular a bactéria-teste ao longo do período de avaliação	40
5.2 Ensaios para Avaliação da Toxicidade de Estirpes de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>E. heros</i>	42
5.2.1 Bioensaios Seletivos	42
5.2.2 Bioensaios para Determinação da Dose-Resposta.....	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vocação nata à atividade agrícola, devido à sua condição climática ser de um país tropical. A produção agrícola nacional também foi impulsionada pelo uso de três tecnologias consideradas essenciais pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que são: o plantio direto na palha, a viabilização da segunda safra de verão (safrinha) e a resistência genética às principais doenças (MAPA, 2017).

A produção brasileira de cereais, leguminosas e oleaginosas na safra de 2020 foi de cerca de 254 milhões de toneladas, sendo a de soja responsável por 48% deste valor (IBGE, 2021). Na safra 2020/21 a produção de soja foi de 135,4 milhões de toneladas, sendo esta a maior já obtida pelo Brasil até então (EMBRAPA, 2021).

Apesar do clima tropical favorecer a biodiversidade no Brasil e possibilitar a produção de diversas culturas agrícolas, por outro lado, o ataque de pragas nas culturas é mais severo (SINDIVEG, 2021). Na cultura da soja, o percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) é considerado uma das principais pragas pelos danos causados à cultura e também pela dificuldade no seu controle. O dano é causado por ninfas a partir do terceiro ínstar até os percevejos adultos (PANIZZI et al., 2012). Tais insetos alimentam-se diretamente dos grãos, prejudicando o rendimento e a qualidade das sementes. Além disso, os constantes ataques desses insetos reduzem o número de sementes e, em menor escala, interferem no número de vagens por planta e no número de sementes por vagem de soja (DEPIERI & PANIZZI, 2011).

Euschistus heros são insetos com o hábito de se alojarem na parte abaxial das folhas, nos períodos mais quentes ao longo do dia, e nos períodos mais frescos saem para se alimentar. A dificuldade de detectá-los na planta impossibilita que seu controle seja feito de forma eficiente (AGRO BAYER, 2018).

Entre as alternativas mais comuns para o controle de pragas têm-se os defensivos químicos, presentes no cotidiano da atividade agrícola há mais de 70 anos. A utilização de inseticidas pelos produtores rurais justifica-se por ser um método simples e que não necessita de conhecimentos técnicos aprofundados sobre processos básicos dos ecossistemas agrícolas (MORANDI et al., 2009; HALFELD-VIEIRA et al., 2016). Porém, este modelo agrícola não é sustentável, pois pode levar à: (a) ocorrência de novas epidemias e desequilíbrios severos, como as pragas secundárias (PAULA JÚNIOR et al., 2016), (b) a contaminação dos alimentos,

do solo e da água, (c) intoxicação de agricultores, (d) alteração na ciclagem da matéria orgânica e nutrientes, (e) eliminação de organismos benéficos, (f) desequilíbrios biológicos e (g) resistência de pragas aos princípios ativos utilizados (SOUZA, 2013; MORANDI et al., 2009).

Existem 69 marcas comerciais de produtos químicos disponíveis para combater *E. heros* apenas na cultura da soja (AGROFIT, 2021), entretanto, a baixa diversidade de modos de ação associados ao uso abusivo desses produtos tem selecionado populações resistentes da praga aos princípios ativos utilizados (SOSA-GÓMEZ & SILVA, 2010). Diante disso, nenhum deles apresenta a eficiência requerida pelo produtor. Assim, existe uma grande demanda para encontrar novos princípios ativos que sejam eficazes no controle de *E. heros*, contribuindo também para a elaboração de novos produtos comerciais que sejam à base de biológicos (da COSTA et al., 2020).

O cenário contemporâneo da agricultura visa conciliar o aumento da produtividade das culturas agrícolas com a melhora na sanidade dos alimentos cultivados, desprovidos de resíduos tóxicos, e com valores nutritivos maiores. Busca-se também zelar pela preservação dos recursos naturais de produção – como a água, o solo, entre outros – para que as gerações futuras possam usufruí-los (AGUIAR MENEZES, 2003).

Os agentes de controle biológico são uma alternativa para o controle de pragas. Esses agentes são os seus próprios inimigos naturais, tais como os macrorganismos (parasitoides e predadores) e os microrganismos (bactérias, fungos e vírus) (COSTA et al., 2006). Em 2020, houve o maior número de registro de defensivos agrícolas considerados de baixo impacto no Brasil, sendo que ao todo foram 76 produtos registrados. Esses produtos foram elaborados a partir de agentes biológicos de controle de pragas, tais como vírus e bactérias, que visam atacar somente as pragas de lavoura e, conseqüentemente, não causam efeitos tóxicos aos seres humanos e nem são nocivos ao meio ambiente (MAPA, 2021).

As vantagens oriundas do controle feito pelos organismos antagonistas são diversas, destacando-se: custo reduzido, diminuição dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (AGUIAR MENEZES, 2003), a capacidade de estabelecimento, colonização e dispersão dos agentes de controle biológico no meio ambiente (ÁVILA et al., 2005).

No caso dos percevejos, os principais métodos de controle biológico utilizados são: o parasitoide de ovos *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Scelionidae), e os fungos entomatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuillemin (1912) (Hypocreales:

Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. (1883) (Hypocreales: Clavicipitaceae). Para a cultura da soja, dentre as vinte espécies de parasitoides de ovos já identificadas, as principais são: *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Scelionidae), sendo os mais abundantes; *Trissolcus basalus* (Wollaston, 1858) (Hymenoptera: Scelionidae) (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999).

Até o momento existem vinte e dois produtos biológicos disponíveis no mercado nacional para o controle de *E. heros*, dos quais: um é feito a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, isolado HD-1 (S1450), três são produzidos a base de *Beauveria bassiana*, onze são feitos à base de *B. bassiana* + *M. anisopliae*, três são produzidos a base de *M. anisopliae* e quatro são feitos à base de *T. podisi* (AGROFIT, 2021).

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillales: Bacillaceae) apresenta alta variabilidade genética e apresenta grande potencial para controlar insetos. Essa bactéria é encontrada em diversos ambientes e é responsável pela produção de cristais formados por proteínas distintas com atividade inseticida, proporcionando o controle de pragas sem acarretar danos à saúde dos animais, seres humanos e plantas (SOUZA et al., 1999).

A nível mundial, há diversos laboratórios a procura de estirpes de *B. thuringiensis* que produzam novas toxinas, com o propósito de utilizá-las como doadoras de genes para a síntese de plantas transgênicas resistentes a insetos ou para a formulação de novos bioinseticidas (PRAÇA et al., 2003).

A grande limitação para a seleção de estirpes tóxicas é a inexistência de uma metodologia precisa e confiável para testes com percevejos. Desta maneira, o intuito desse trabalho foi estabelecer e validar uma metodologia para a seleção de novas estirpes de *Bacillus* spp. para o controle de *E. heros*.

2. JUSTIFICATIVA

O controle de *E. heros* é um fator importante para assegurar a produtividade de várias culturas de interesse econômico, entre as quais a soja merece destaque devido o tamanho da área cultivada e volume de inseticidas utilizados. É evidente que os danos diretos e indiretos impactam no aumento do custo de produção das lavouras e na redução da produção.

É de suma importância encontrar agentes de controle biológico que sejam eficientes para controlar tal inseto-praga, pois é preciso ampliar e diversificar os métodos de controle disponíveis no mercado. Assim, a busca para encontrar estirpes do gênero *Bacillus* que possam ser utilizadas como agentes de controle dos *E. heros* é relevante, tornando-as mais uma ferramenta para ser incorporada ao manejo dessa praga.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria com atividade entomocida a diversos organismos, tais como insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera mas pouco se conhece sobre seu efeito sobre a ordem Hemiptera. Assim, é importante estudar a ação dessa bactéria também para o controle de insetos da ordem Hemiptera. Dessa forma, evidencia-se a relevância dessa pesquisa ao selecionar estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *E. heros*.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *E. heros*.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar uma dieta artificial para realização de ensaios com *E. heros*
- Determinar uma metodologia de ensaio para selecionar estirpes tóxicas de *Bacillus* spp. a *E. heros*
- Selecionar as estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *E. heros* através de bioensaios seletivos e de ensaios de dose-resposta.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura da Soja

A soja (*Glycine max* (L) Merrill, Fabaceae) é uma planta herbácea cultivada no Brasil para a produção de grãos. A soja em grãos é o principal produto da exportação do agronegócio brasileiro, contribuindo com 28,8% de todas as exportações nesse setor e atingiu uma receita no valor aproximado de US\$3,1 bilhões, em agosto de 2021 (CNA, 2021).

Na safra 2020/21, a produção de soja brasileira foi de 135,4 milhões de toneladas, sendo esta a maior produção já obtida pelo Brasil até então. Grande parte da produção nacional de soja é liderada por cinco estados, sendo eles: Mato Grosso (26,5%), Rio Grande do Sul (14,9%), Paraná (14,7%), Goiás (10,1%) e Mato Grosso do Sul (8,4%) (CONAB, 2021).

No Brasil, estima-se que na próxima década a área plantada de soja aumentará 26,9%, ou seja, ultrapassará 48,9 milhões de hectares e é considerada a cultura que mais expandirá a sua área de cultivo. Porém, um dos desafios encontrados pelos produtores rurais para os próximos anos, será aumentar a produtividade por hectare da soja, que atualmente é estimada em 3,57 toneladas por hectare (MAPA, 2021).

Os principais fatores que afetam a produtividade e causam danos econômicos para a cultura são os problemas fitossanitários, sendo que muitas vezes podem inviabilizar o seu cultivo. Entre os principais problemas fitossanitários os percevejos (*E. heros*; *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae); e *Piezodorus guildinii* Westwood, 1837 (Hemiptera: Pentatomidae)) merecem destaque devido à dificuldade de controle e quantidade de inseticidas químicos sintéticos utilizados (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012). Dentre o complexo dos percevejos causadores de danos, destaca-se *E. heros* por ser a espécie mais frequente, abundante e bem distribuída em todas as regiões de cultivo de soja no Brasil, bem como é a espécie com mais casos de resistência comprovada (IRAC, 2021).

3.2 *Euschistus heros*

Dentre os insetos pertencentes à família Pentatomidae, as espécies de *Euschistus* são as mais comuns encontradas pelo mundo. Apesar da soja ser atacada por vários pentatomídeos fitófagos, *E. heros* é responsável pelos danos mais severos causados à cultura da soja

(TURNIPSEED & KOGAN, 1976).

3.2.1 Aspectos Bioecológicos

Os adultos de *E. heros* possuem uma longevidade média de 116 dias. A oviposição ocorre em pequenas massas de coloração amarela, aproximadamente de 5 a 8 ovos por massa. Os principais locais de deposição dos ovos são nas folhas ou nas vagens de soja (VILLAS-BÔAS & PANIZZI, 1980).

As ninfas recém-eclodidas possuem hábito gregário e ficam sobre os ovos até alcançarem o segundo ínstar. A alimentação das ninfas inicia-se no segundo ínstar, no entanto, os danos causados às sementes ocorrem quando as ninfas atingem o terceiro ínstar, no qual elas atingem um tamanho médio de 3,63 mm (GRAZIA et al., 1980). Em relação à cultura da soja, geralmente *E. heros* consegue completar três gerações (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012).

A duração do ciclo biológico de *E. heros* pode ser influenciado por diversos fatores entre os quais a temperatura é o mais impactante. De acordo com Cividanes (1992), a duração média da fase de ovo até adulto é de 28,4 dias a temperatura de 25°C (Figura 1)

A capacidade reprodutiva das fêmeas de *E. heros* pode variar de acordo com: tipo de alimento ingerido (ou se há a interrupção ou não da alimentação), e/ou troca do alimento de ninfa para adulto (PINTO & PANIZZI, 1994).

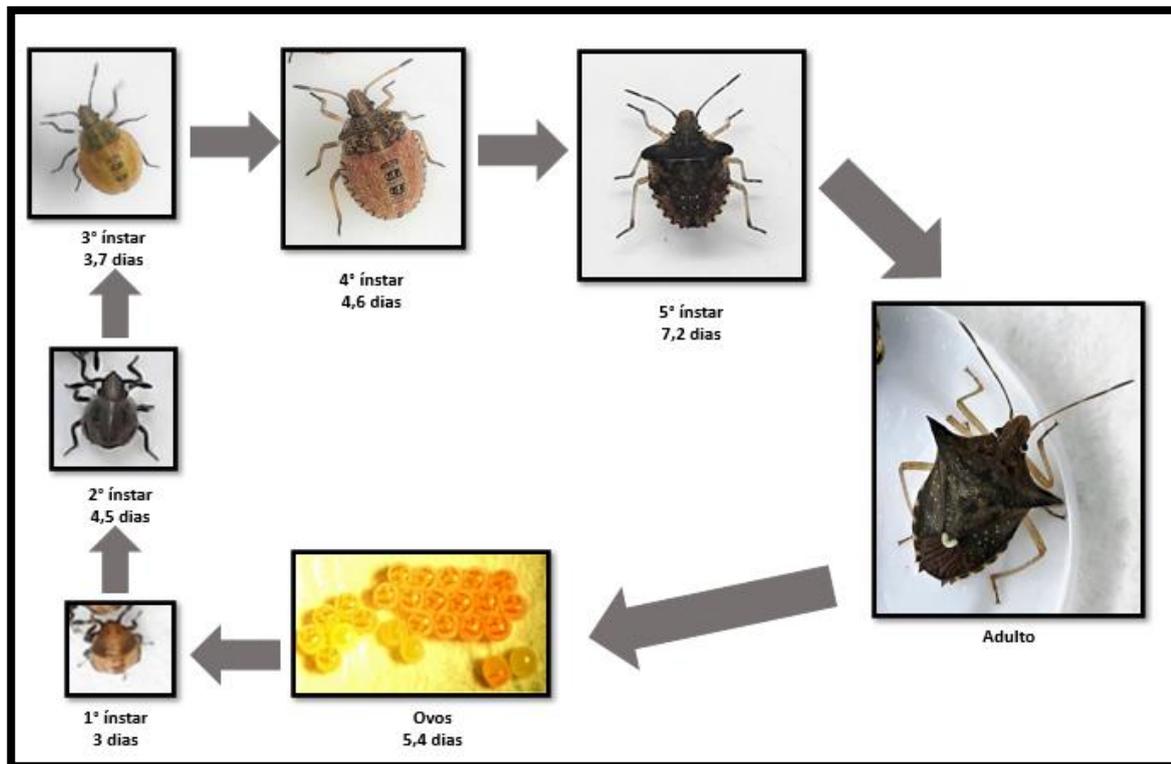


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do percevejo-marrom *Euschistus heros*, baseado em Cividanes (1992).

3.2.2 Danos Causados à Cultura da Soja

Dentre as perdas ocasionadas pelo ataque desses insetos às vagens e aos grãos da soja, têm-se: abortamento de vagens, atrofiamento de grãos, redução (na massa, no tamanho e no teor de óleo) dos grãos, queda na germinação e no vigor das sementes, casos de distúrbios fisiológicos na planta de soja – como o retardamento da maturação e redução na produtividade da lavoura (PANIZZI et al., 2012). Tais insetos alimentam-se diretamente dos grãos ou sementes, prejudicando o rendimento e a qualidade dos mesmos. Além disso, os constantes ataques desses insetos reduzem o número de grãos ou sementes por vagem e, em menor escala, interferem no número de vagens por planta (PANIZZI & SLANSKY, 1985).

Nas sementes de soja, pode-se também observar a transmissão de microrganismos concomitantemente acontecendo com os danos diretos causados por *E. heros*, a exemplo: a inoculação de fungos por tais insetos (PANIZZI & SLANSKY, 1985).

3.2.3 Medidas de Controle Adotadas na Cultura da Soja

Com o intuito de proteger as lavouras de soja dos ataques de *E. heros*, deve-se considerar no manejo da cultura os seguintes aspectos: (a) uso racional dos defensivos químicos, com o intuito de preservar os diversos agentes de controle biológico responsáveis em atacar os percevejos dentro e fora das lavouras (BUENO et al., 2012), (b) evitar a semeadura de lavouras de soja muito cedo ou muito tarde em relação às áreas do seu entorno, pois tendem a serem atacadas mais intensamente pelos percevejos (CORRÊA-FERREIRA, 2012), (c) os danos causados pelo *E. heros* na soja não ocorre antes do surgimento das vagens nas plantas (CORRÊA-FERREIRA, 2005), (d) o pano-de-batida é considerado o método de maior confiabilidade para o monitoramento de percevejos na lavoura até momento, necessitando o acompanhamento mínimo semanal, com diversas amostragens para acompanhar a distribuição espacial e densidade média populacional das pragas presentes (CORRÊA-FERREIRA, 2012).

A adoção do controle químico, no caso dos percevejos, deve ser feita na área plantada quando a densidade média desses insetos atingir o nível de ação, sendo: dois percevejos por pano-de-batida, para lavouras destinadas à produção de grãos para a indústria; ou de um percevejo por pano-de-batida, nas lavouras destinadas à produção de sementes (BUENO et al., 2013; BUENO et al., 2015).

Apesar da rotação de produtos com mecanismos de ação distintos ser uma das premissas da estratégia para o manejo da resistência em relação aos percevejos, há diversas marcas comerciais de inseticidas disponíveis no mercado para o seu controle, porém, as mesmas estão reduzidas a poucos mecanismos de ação (BUENO et al., 2013). Além disso, para que os percevejos que atacam a cultura da soja sejam controlados, é necessário múltiplas aplicações dos produtos químicos disponíveis, devido à baixa susceptibilidade dos insetos da ordem Hemiptera aos princípios ativos dos inseticidas (TEMPLE et al., 2009; SOSA-GOMEZ & SILVA, 2010).

Além disso, sabe-se o uso indiscriminado dos inseticidas químicos induz a diversos problemas, tais como: redução da biodiversidade, seleção de populações resistentes dos insetos-alvo, causam danos aos organismos não-alvos e também levam à emergência de novas

pragas (SCHÜNEMANN et al., 2018).

3.3 Produtos Biológicos

Atualmente estão registrados mais de 300 produtos biológicos à disposição dos agricultores brasileiros para realizarem o biocontrole em suas lavouras. A participação dos produtos biológicos de controle (PBC) dentro do mercado de bioinsumos é cada vez mais importante, porque eles são os principais agentes responsáveis pelo crescimento desse setor (CropLife, 2021). Em 2021, o mercado brasileiro de bio defensivos deverá alcançar US\$237,8 milhões, bem como sua taxa de crescimento anual está prevista em 20%. Em comparação à indústria convencional de agrotóxicos, a indústria de biocontrole cresce num ritmo de 5,3 vezes mais rápido (MONNERAT et al., 2020). Apesar desses números promissores, o número de produtos biológicos para o controle de percevejos ainda é pequeno, o que reflete uma carência de pesquisas com esse objetivo.

Com relação ao mercado de produtos químicos agrícolas brasileiros, os produtos biológicos participam com cerca de 1% a 2% dos US\$9,6 bilhões gerados nesse mercado. Entre 2010 a 2016, o número de produtos biológicos registrados para uso na agricultura – no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – passou de 7% para 60% em relação aos produtos químicos. (VIVIAN & QUERINO, 2020).

Com o intuito de minimizar a dependência dos produtores rurais por insumos importados e aumentar a oferta de matéria-prima para o setor agrícola, foi lançado em 2020 pelo MAPA o Programa Nacional de Bioinsumos, cujo foco é o melhor aproveitamento da biodiversidade nacional e, concomitantemente em parceria com o setor produtivo, estão sendo fomentadas e incentivadas o uso de um conjunto de práticas sustentáveis na produção agrícola, com o intuito do desenvolvimento e o uso sustentável da vasta diversidade biológica brasileira (MAPA, 2021).

Para o controle de *E. heros*, em relação a todas as culturas agrícolas, até o momento têm-se vinte e dois produtos biológicos disponíveis no mercado nacional, dos quais: um é feito a partir de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, isolado HD-1 (S1450) (produto microbiológico), três são produzidos a base de *B. bassiana* (produto microbiológico), onze são feitos à base de *B. bassiana* (produto microbiológico) + *M. anisopliae* (produto microbiológico), três são

produzidos a base de *M. anisopliae* (produto microbiológico), e quatro são feitos à base de *Telenomus podisi* (produto biológico) (AGROFIT, 2021).

3.3.1. *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911)

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, sendo aeróbica ou anaeróbica facultativa, pertencente ao gênero *Bacillus*, da família Bacillaceae, classe Bacilli, ordem Bacillales, filo Firmicutes e do reino Monera. Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, algumas são consideradas nocivas aos humanos e aos animais – como o *Bacillus anthracis* e *B. cereus* – e também há *B. thuringiensis* – considerado um agente patogênico de insetos. Por esse motivo, tem-se explorado muitos destes para serem aplicados biotecnologicamente e também nas indústrias (HOU et al., 2005; RUIZ-GARCÍA et al., 2005a, b; BISCHOFF et al., 2006; ROONEY et al., 2009).

Devido à sua ampla capacidade de distribuição, *B. thuringiensis* é encontrado em diversos ambientes. É responsável pela produção de cristais formados por proteínas distintas com atividade inseticida, proporcionando o tratamento específico das culturas sem acarretar danos à saúde dos animais, seres humanos e plantas (SOUZA et al., 1999).

Apesar do primeiro isolamento desta bactéria ter ocorrido em 1902, foi em 1960 que a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi isolada, conhecida também como HD-1 (DULMAGE, 1970). Esta estirpe apresentou toxicidade até 200 vezes maior em relação às estirpes anteriormente usadas em produtos comerciais. Hoje em dia, tal estirpe é tida como padrão e também como base de alguns produtos à base de *B. thuringiensis* usadas no controle de Lepidoptera (SANTANA, 2014).

O isolamento de diversas estirpes de *B. thuringiensis* tem sido realizado em diversas partes do mundo e são usadas principalmente contra asordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (SOUZA et al., 1999). A maioria dos produtos disponibilizados no mercado são oriundos de formulações a base das seguintes estirpes: HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HARRISON & BONNING, 2000); *B. thuringiensis* subsp. *azaiwai* e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BRAVO et al., 2011), comprovadamente tóxicas a essas três ordens. No entanto, pesquisas são necessárias para avaliar a eficiência de *B. thuringiensis* também para o controle de insetos da ordem Hemiptera, devido a carência de estudos nessa área.

Há uma relação direta entre a produção de cristais e a ação entomopatogênica do *B. thuringiensis*, sendo que a síntese dos mesmos ocorre a partir do segundo estágio de esporulação (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas,

que são codificadas pelos genes *cry* e são conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas cristal (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Atualmente, têm-se 818 genes *cry*, classificados em 78 grupos de proteínas Cry, com subdivisões distintas, encontrando-se clonados e sequenciados (CRICKMORE et al., 2020).

Apesar de *B. thuringiensis* produzir as proteínas Cry e Cyt, o mesmo pode produzir outras toxinas, incluindo-se proteínas com atividade inseticida, tais como: fosfolipases, quitinases, enterotoxinas, hemolisinas, β -exotoxina e a α -exotoxina (HANSEN & SALAMITOU, 2000).

O mecanismo de ação das proteínas Cry, consiste em seis etapas, que são: a solubilização do cristal, o processamento das toxinas, a união ao receptor, a inserção na membrana, a agregação e a formação de poros, e por fim, a citólise. Após a ingestão dos cristais provenientes do *B. thuringiensis* pelas larvas dos insetos susceptíveis, os mesmos sofrem com a ação do pH intestinal e de proteases, levando-os à solubilização e a ativação das toxinas presentes. No tecido epitelial do intestino da larva, tais toxinas ligam-se a receptores, levando ao desequilíbrio osmótico celular. Essa alteração causa o intumescimento e à ruptura das células, ocasionando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto. Após a ingestão da toxina, a larva do inseto cessa a sua alimentação, entrando em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia. No entanto, sobre as fases de pupa e de adulto dos insetos a atividade entomocida de *B. thuringiensis* é inexistente (MONNERAT & BRAVO, 2000).

3.4 Dietas Artificiais Desenvolvidas para a Criação de *E. heros*

Nas últimas três décadas, no Brasil, a busca por uma dieta artificial que possibilitasse a criação massal de percevejos pentatomídeos tornou-se um assunto de relevância. Pois, assim, seria possível a criação massal de parasitoides de ovos para serem usados no controle biológico (MENDOZA et al., 2016).

A primeira dieta artificial desenvolvida no Brasil, foi feita por Panizzi et al. (2000) para a criação de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae), através da modificação da dieta elaborada por Kamano (1980) para criar o inseto *Riptortus clavatus* (Thunberg, 1783) (Hemiptera: Alydidae) (MENDOZA et al., 2016).

Fortes et al. (2006), posteriormente, fez um estudo comparando o desempenho de *N. Viridula* e *E. heros* criados em dois tipos de óleos – de soja e de girassol – quando adicionados à dieta de Panizzi et al. (2000). Por fim, foi constatado que os insetos de *E. heros* criados sob a

dieta com óleo de soja obtiveram resultados superiores em relação aos criados em dieta a base de óleo de girassol, todavia, o desempenho destes foi inferior ao dos insetos criados com dieta natural.

Siqueira (2007) fez um trabalho adicionando os frutos imaturos de *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae) liofilizados na dieta artificial, a base de óleo de soja, desenvolvida por Fortes et al. (2006), para a criação do percevejo-marrom. Os resultados desta pesquisa demonstraram que, à medida que se aumentava a proporção de ligustro na composição das dietas testadas, isso acarretava no aumento do período ninfal de desenvolvimento dos insetos entre o 2º - 5º ínstar e também elevou a taxa de mortalidade.

Portilla et al. (2015), avaliou o desempenho do percevejo *N. viridula* submetido à duas dietas artificiais desenvolvidas para a criação de *Lygus* spp. Uma das dietas baseava-se em gema de ovo de galinha fresco (DGF) e a outra continha gema de ovo de galinha seca (DGS). Insetos criados na DGF obtiveram 100% de sobrevivência do primeiro ao quinto ínstar, 97,3% deles atingiram a fase adulta, houve alta longevidade dos machos e fêmeas adultos, e maior taxa de fecundidade. Todavia, as fêmeas criadas na DGS tiveram maiores taxa de fertilidade e eclosão dos ovos.

Mendoza et al. (2016), realizou uma pesquisa para elaborar uma dieta artificial para a criação de *E. heros* em laboratório. Os insetos criados em duas dietas artificiais liofilizadas apresentaram uma viabilidade de 68% no período de ovo-adulto, taxas de fecundidade superiores (282 ovos/fêmea) aos criados na dieta natural, e permitiram o desenvolvimento de 10 gerações sem degeneração nos mesmos. Todavia, quando foi comparado o peso dos insetos adultos criados nessas dietas artificiais em relação aos criados em dieta natural, eles foram 17% menos pesados.

As dietas propostas por Mendoza et al. (2016) foram promissoras para a criação do percevejo, no entanto, devido aos altos custos do processo de liofilização dos seus ingredientes, isso acabou sendo um empecilho para o seu uso em larga escala para a criação de *E. heros* (HAYASHIDA et al., 2018).

Hayashida et al. (2018), avaliou dietas artificiais para a criação de *E. heros*, com intuito de otimizar a criação massal do *T. podisi* voltada para o seu usufruto no controle biológico. Nesta pesquisa, apesar de todas as dietas artificiais terem permitido o desenvolvimento do percevejo, os valores obtidos em relação à longevidade dos insetos adultos, tempo de

desenvolvimento ninfal e a taxa de fertilidade foram inferiores em relação aos valores obtidos pelos insetos criados em dieta natural. Em contrapartida, devido aos altos custos para a manutenção de uma criação de *E. heros* a base de dieta natural, é válido considerar a criação deles sob dieta artificial devido à redução nos custos para mantê-los, além de que, foi constatado que é possível a substituição dos componentes liofilizados por componentes in natura (HAYASHIDA et al., 2018).

As pesquisas publicadas com dietas artificiais tiveram como único objetivo avaliar a viabilidade para a criação massal de algumas espécies de percevejos. Desta maneira, não há na literatura uma dieta cujo objetivo seja realizar ensaios para avaliar a toxicidade de estirpes de *Bacillus* spp. contra *E. heros*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação da Metodologia de Ensaios Seletivo e de Dose

4.1.1 Ensaio para avaliar o desenvolvimento de *E. heros* criados em 4 dietas artificiais e selecionar a dieta mais adequada

A primeira etapa dessa pesquisa envolveu avaliar o desenvolvimento de *E. heros* criados em 4 dietas artificiais, comparando com o desempenho de insetos criados em dieta natural, como controle. Os experimentos foram realizados no laboratório da Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na cidade de Brasília, DF. No laboratório de Bactérias Entomopatogênicas – LBE, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram cultivadas e avaliadas todas as estirpes de bactérias utilizadas nessa pesquisa.

4.1.1.1 Obtenção dos ovos de *E. heros*

Os ovos de *E. heros* utilizados nesse ensaio foram oriundos da colônia de criação de percevejos mantidas na Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essa criação de insetos está estabelecida há mais de cinco anos.

Conforme metodologia descrita por Silva et al. (2008), os percevejos foram criados sob dieta natural a base de vagens, sementes de girassol, sementes de soja, sementes de amendoim e folhas de boldo.

As posturas foram coletadas das gaiolas dos percevejos adultos, armazenadas em placas de Petri que continham uma vagem e foram acondicionadas até o dia do preparo do ensaio, em sala com temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($50 \pm 10\%$) e fotofase (14 horas) controlados.

4.1.1.2 Preparo da dieta natural

A dieta natural fornecida aos insetos era composta por vagens de feijão-verde, sementes de amendoim, sementes de girassol e sementes de soja. A água fornecida aos insetos era autoclavada e colocada em discos de algodão sobre fundos de copos plásticos de 50 mL.

4.1.1.3 Preparo das dietas artificiais

Para selecionar a dieta artificial mais adequada para ser usada nos ensaios seletivos e de dose, foi feita uma revisão na literatura para encontrar quais as dietas artificiais já estudadas para a criação de *E. heros*. Desta maneira, foram selecionadas quatro dietas artificiais, sendo nomeadas como D1, D2, D3 e D4.

A dieta D1 foi baseada em uma das dietas usadas para a criação de *E. heros* descrita em Hayashida et al. (2018). Todos os ingredientes (Tabela 1) foram misturados, a massa da dieta foi homogeneizada e cortaram-se pedaços padronizados (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm). Logo após, a dieta foi colocada numa estufa com temperatura constante de 60°C, durante 4 horas. Em seguida, ela foi colocada em potes plásticos e armazenada em geladeira.

Tabela 1. Ingredientes da dieta artificial D1 para a criação de *E. heros* em condições de laboratório.

Ingredientes	Quantidade
Amendoim moído	35 g
Sacarose	5 g
Vagens de feijão verde batidas	30 g
Sementes de soja trituradas	10 g
Sementes de girassol trituradas	10 g
Gérmen de trigo	10 g
Nipagin	1 g
Ácido Sórbico	0,4 g

Uma das dietas descritas por Portilla et al. (2015) usada para a criação em massa do percevejo *N. viridula*, foi escolhida para ser testada para a criação de *E. heros* nessa pesquisa. Porém, esta dieta foi modificada e renomeada como D2.

Os ingredientes da dieta D2 foram divididos em dois grupos: A e B (Tabela 2). Primeiramente, foram pesados todos os ingredientes secos de cada grupo e armazenados, separadamente. Para o preparo do grupo A, numa panela em fogo baixo, foi aquecido os 100 mL de água destilada e depois de fervê-la, os demais ingredientes foram adicionados e a mistura foi homogeneizada durante cinco minutos. Após diminuir a temperatura para 30°C, foram adicionados os ingredientes do grupo B e, novamente, a massa foi homogeneizada por cinco

minutos. Depois, a massa foi cortada em pedaços padronizados (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm), colocada em potes plásticos e armazenada em geladeira.

Tabela 2. Ingredientes da dieta artificial D2 para a criação de *E. heros* em condições de laboratório.

Grupo A	
Ingredientes	Quantidade
Gérmen de trigo	20 g
Farinha de feijão branco	30 g
Farinha de soja	5 g
Gemas de ovos de galinha	2
Água destilada autoclavada	100 mL
Grupo B	
Ingredientes	Quantidade
Levedo de cerveja	0,6 g
Lecitina de soja	1 g
Mistura de Vanderzant modificada*	0,8 g
Mel	3,3 g
Nipagin	0,2 g

*Composição da mistura de Vanderzant: ácido ascórbico 2,7 g, solução de biotina 20 µL, Pantetonato de Cálcio 0,01 g, Cloreto de colina 0,5 g, Ácido fólico 0,0025 g, Inositol 0,2 g, Niacinamida 0,01 g, Cloridrato de piridoxina 0,0025 g, Riboflavina 0,005g, Cloridrato de tiamina 0,0025 g, vitamina B₁₂ 0,1g, adicionada em água destilada autoclavada até que a mistura pesasse 10 gramas.

A terceira e quarta dietas escolhidas, foram baseadas nas dietas descritas por Fortes et al. (2006) para a criação de *N. viridula* e *E. heros*, sendo que elas foram adaptadas e nomeadas como D3 e D4 (Tabela 3). Ambas as dietas foram preparadas da mesma maneira: todos os ingredientes foram pesados, misturados num béquer e homogeneizados por 5 minutos. Depois, as massas das dietas D3 e D4, separadamente, foram cortadas em pedaços padronizados (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm). Em seguida, as dietas foram colocadas numa estufa com temperatura constante de 60°C, durante 4 horas. Por último, as dietas D3 e D4 foram colocadas em potes plásticos e armazenadas em geladeira.

Tabela 3. Composição das dietas D3 e D4 para a criação de *E. heros* em condições de laboratório.

Componentes	Dietas	
	D3	D4
Gérmen de trigo	12,5 g	12,5 g
Proteína de soja	20 g	20 g
D-glicose	5 g	5 g
Fécula de batata	5 g	5 g
Sacarose	5 g	5 g
Celulose	7,5 g	7,5 g
Óleo de soja	12,5 mL	-
Óleo de girassol	-	12,5 mL
Solução vitamínica*	5 mL	5 mL
Água destilada autoclavada	30 mL	30 mL

*Composição da solução vitamínica: ácido nicotínico 0,05 g, pantotenato de cálcio 0,05 g, cloridrato de tiamina 0,0125 g, riboflavina 0,025 g, cloridrato de piridoxina 0,0125 g, ácido fólico 0,0125 g, vitamina B₁₂ 0,05 g, adicionada em 50 mL de água destilada.

4.1.1.4 Metodologia para a criação dos percevejos *E. heros* em diferentes dietas

A metodologia utilizada nesse experimento para avaliar o desempenho dos *E. heros* criados em diferentes dietas, foi semelhante ao descrito por Fortes (2005), com algumas modificações. Também foram adotadas mudanças para as condições do Laboratório da Plataforma de Criação de Insetos, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Nas salas para acondicionamento dos ensaios, os insetos foram mantidos sob temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($50 \pm 10\%$) e fotofase (14 horas) controlados.

Primeiramente, as placas para cultivo celular marca TPP usadas tanto para o controle como para os tratamentos, mediam nove centímetros de diâmetro e foram revestidas por papéis filtro com as mesmas medidas das placas. Depois, em cada placa foram colocados 15 ovos de *E. heros*, escolhidos ao acaso. Nas placas designadas como controle, que eram formadas pela dieta natural, foram colocados: uma vagem inteira e um fundo de copo plástico de 50 mL que continha duas sementes de soja, uma semente de girassol e uma semente de amendoim (Figura 2). Após a eclosão das primeiras ninfas nessas placas (controle), em cada uma delas também

foi adicionado um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL.

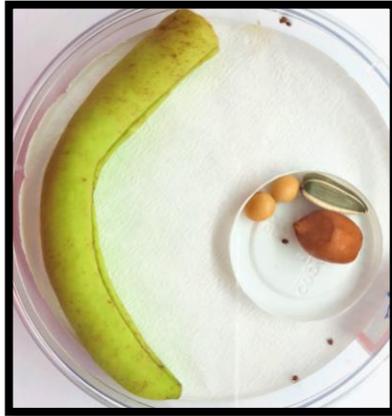


Figura 2. Montagem das placas TPP para os insetos criados em dieta Natural (controle).

Nas placas TPP com as dietas artificiais (D1, D2, D3 e D4), designadas como tratamentos, foram colocados: um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL e um pedaço de dieta (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm) sobre outro fundo de copo plástico de 50 mL (Figura 3).



Figura 3. Montagem das placas TPP para os insetos criados em dieta artificial.

Ao longo de todo o experimento, tanto no controle como nos tratamentos, diariamente foram contabilizados o número de insetos vivos e mortos, para então, serem calculados as durações médias de cada ínstar até a fase adulta dos insetos criados em todas as dietas, separadamente. A manutenção da água era diária, enquanto que, os pedaços das dietas, as vagens e as sementes eram trocadas a cada 48 horas. Numa sala com temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$),

umidade relativa ($50 \pm 10\%$) e fotofase (14 horas), foram armazenados todos os insetos criados nas diferentes dietas.

Desses 15 ovos colocados em cada placa TPP, no controle e nos tratamentos, apenas os 10 primeiros insetos que emergiram foram mantidos nas placas. O intuito de reduzir o número de insetos por placa, foi para que eles pudessem ter um espaço mais adequado para movimentação e também facilitar à sua alimentação.

A partir do momento que oitenta por cento dos insetos em cada placa alcançavam o terceiro ínstar, tanto no controle como nos tratamentos, eles eram remanejados para caixas Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) e ficaram acondicionados nelas até alcançarem a fase adulta. Todas as caixas foram revestidas embaixo com papéis filtro com as mesmas medidas das caixas.

Nas caixas Gerbox designadas como controle, foram colocadas: um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL, uma vagem inteira e dois fundos de copos plásticos de 50 mL que continham três sementes de soja, uma semente de girassol e uma semente de amendoim (Figura 4).

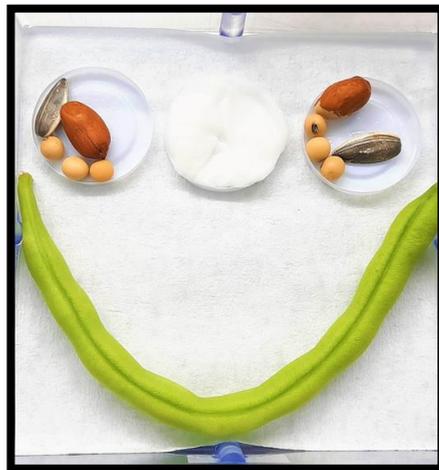


Figura 4. Montagem das caixas Gerbox para os insetos criados em dieta Natural (controle).

Para as caixas Gerbox destinadas aos tratamentos foram colocadas: um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL e três pedaços de dieta artificial em três fundos de copos plásticos de 50 mL (Figura 5).



Figura 5. Montagem das caixas Gerbox para os insetos criados em dieta artificial (4 tratamentos).

No intervalo de 7 dias após chegarem a fase adulta, no controle e nos tratamentos, foi feito a sexagem de todos os insetos e a contagem do número de machos e fêmeas. Dessa maneira, foi calculado o número de gaiolas necessárias para colocar os insetos adultos, tanto do controle como dos tratamentos. Todas as gaiolas utilizadas, tanto no controle como nos tratamentos, foram feitas com potes plásticos transparentes de 1000 mL, com doze centímetros de diâmetro, e foram revestidas no fundo com papéis filtro com as mesmas medidas dos potes. Em cada gaiola, havia 10 insetos adultos e a proporção, entre machos e fêmeas, foi igual (Figura 6).



Figura 6. Gaiolas dos insetos adultos criados em: (a) dieta natural e (b) dieta artificial.

Nas gaiolas, designadas como controle, foram colocadas duas vagens inteiras, dois discos de algodão umedecidos com 3,5 mL de água autoclavada colocados em dois fundos de copos plásticos de 50 mL, dois fundos de copos plásticos de 50 mL que continham uma semente de amendoim, uma semente de girassol e três sementes de soja.

Já nas gaiolas denominadas como tratamentos, foram colocadas dois discos de algodão umedecidos com 3,5 mL de água autoclavada sobre dois fundos de copos plásticos de 50 mL, e quatro pedaços de dieta artificial (2,0 cm x 2,0 cm x 1,0 cm) sobre quatro fundos de copos plásticos de 50 mL (Figura 7).

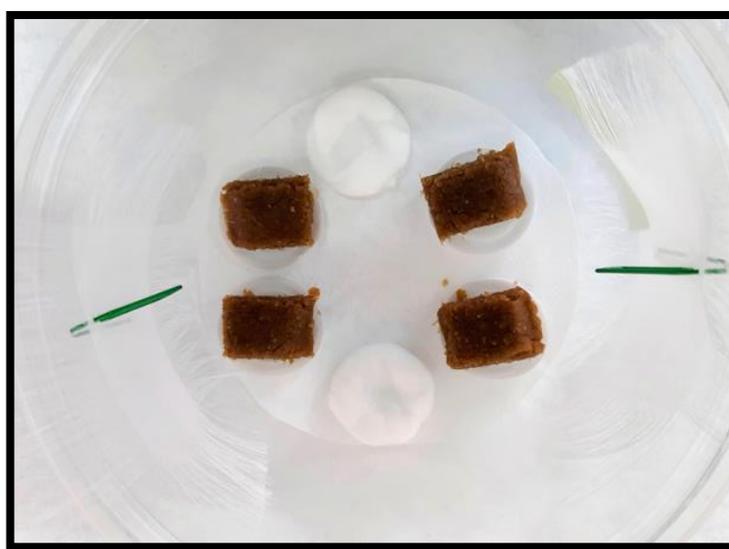


Figura 7. Montagem das gaiolas, em potes plásticos, para os insetos adultos criados em dieta artificial (tratamentos).

Para facilitar a oviposição das fêmeas, nas gaiolas do controle e dos tratamentos, foram colocados dois pedaços de tecido voil (9,0 cm x 8,0 cm) suspensos nas laterais dos potes, presos com o auxílio de cliques. Além disso, com o intuito de melhorar a ventilação nas gaiolas, em cada tampa foi feita uma abertura de onze centímetros de diâmetro e sob este, colocou-se um pedaço de voil (29 cm x 22 cm).

Ao longo de 14 dias, em cada gaiola do controle e dos tratamentos, foram feitas duas coletas de ovos semanalmente. Desta maneira, os ovos eram coletados e armazenados, separadamente, em placas de TPP que eram revestidas com papel filtro no fundo. Para o controle e os tratamentos, foram contabilizados o número de ovos por fêmea e o número de ninfas que emergiram.

Em cada gaiola do controle e dos tratamentos, foram escolhidos 3 machos e 3 fêmeas ao acaso para avaliação do tamanho e peso. Os insetos foram coletados 7 dias após transferência para a gaiola. Para aferir o tamanho dos insetos escolhidos, com o auxílio de um paquímetro, na parte dorsal de cada inseto, mediu-se a distância entre a cabeça e o final do abdômen. Assim, foi constatado o tamanho médio dos insetos adultos no controle e nos tratamentos, separadamente.

Os insetos adultos selecionados também foram pesados individualmente, com o auxílio de uma balança de precisão. Após, foi calculado o peso médio alcançado pelos machos e fêmeas adultos, separadamente, em cada tratamento e no controle.

A dieta na qual os insetos de *E. heros* obtiveram os melhores resultados em relação aos seguintes parâmetros de avaliação: maior taxa de sobrevivência e menor tempo médio de duração de cada ínstar foi a dieta artificial D1.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.8 (FERREIRA, 2008).

4.1.2 Ensaios para determinar a forma de inoculação da bactéria-teste e o tempo necessário para avaliar a mortalidade de *E. heros*

Na segunda etapa envolvida para elaboração da metodologia de avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus* spp. contra *E. heros*, foi necessário selecionar a forma mais adequada para inocular a bactéria. Foram testadas três formas de inocular a bactéria-teste: via água, via dieta, ou por ambas simultaneamente.

A estirpe utilizada foi selecionada em ensaios preliminares realizados no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas como tóxica a *E. heros*. Essa estirpe foi cultivada em meio de cultura Embrapa líquido (MONNERAT et al., 2007), por 72 horas em incubador rotativo, a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 200 rpm, até a sua completa esporulação. A presença dos esporos e cristais foi confirmada através da observação das suspensões bacterianas em microscópio de contraste de fases.

Esse experimento foi constituído por 3 tratamentos e dois controles, sendo que, cada um deles era composto por cinco placas TPP (repetições). O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado.

Primeiramente, na capela de fluxo laminar, sob luz UV, foram esterilizados todos os utensílios que seriam utilizados no seu preparo, durante 20 minutos. Depois, cada placa TPP, com nove centímetros de diâmetro, foi revestida por papel filtro com a mesma medida da placa. Em cada uma das placas, dos dois controles e dos 3 tratamentos, foram colocados: um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água destilada autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL.

Os controles foram feitos à base de dieta natural e dieta artificial. Em cada uma das placas controle, com dieta natural, foram colocadas: uma vagem de feijão-verde inteira. Em contrapartida, nas placas formadas para o controle com dieta artificial foram colocadas: um pedaço de dieta (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm) sobre um fundo de copo plástico de 50 mL. Por último, em cada placa foram colocados dez insetos de segundo ínstar do percevejo *E. heros*.

No tratamento com inoculação da bactéria via água, inoculou-se 1 mL da bactéria no disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água destilada autoclavada. No tratamento com inoculação da bactéria na dieta, os pedaços de dieta foram perfurados e inoculados com 1 mL da bactéria. No tratamento com inoculação da bactéria em ambos água e dieta, o disco de algodão e a dieta perfurada foram inoculados com 500 µL da bactéria em cada. Após a inoculação da bactéria nas placas dos três tratamentos, por último, em cada uma das placas foram colocados dez insetos de segundo ínstar de *E. heros*.

Diariamente, ao longo do experimento, nos controles e nos tratamentos, a água foi reabastecida e foi contabilizado o número de insetos vivos e mortos, separadamente. Todavia, a troca de todas as dietas ocorreu a cada 48 horas.

Ao final dos ensaios dessa segunda etapa da pesquisa, foi possível averiguar a maneira mais adequada de inoculação da bactéria-teste e também verificar até quantos dias ela é capaz de causar a mortalidade nos percevejos.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.8 (FERREIRA, 2008).

4.1.3 Ensaios para determinar a necessidade de reinocular a bactéria-teste ao longo do período de avaliação

A terceira etapa da pesquisa foi feita após terem sido selecionados a dieta artificial, a forma de inocular a bactéria-teste e o tempo necessário para avaliação dos ensaios contra *E.*

heros. Assim, para determinar a necessidade de reinocular a bactéria-teste ao longo dos ensaios, nessa etapa foram realizados ensaios no qual a bactéria era reinoculada a cada 48 horas. A esterilização dos materiais utilizados nesses ensaios foi feita conforme descrito para os ensaios da etapa anterior.

Esse experimento foi constituído por dois controles e dois tratamentos, sendo que, cada um deles era composto por cinco placas TPP (repetições). O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Os controles também foram feitos à base de dieta natural e dieta artificial. As placas dos controles, bem como dos tratamentos, foram preparadas e montadas conforme descrito para os ensaios no item 4.1.2.

Ambos os tratamentos foram feitos com a inoculação da bactéria-teste nos discos de algodão. A diferença entre os tratamentos foi que, no primeiro, a bactéria foi inoculada apenas no dia em que o ensaio foi preparado, no segundo tratamento, houve a reinoculação da bactéria a cada 48 horas em cada uma das placas. As bactérias foram cultivadas conforme descrito no item 4.1.2.

Diariamente, ao longo do experimento, nos controles e nos tratamentos, a água foi reabastecida e foi contabilizado o número de insetos vivos e mortos, separadamente. Todavia, a troca de todas as dietas ocorreu a cada 48 horas.

Ao final dessa terceira etapa da pesquisa, foi possível averiguar se é necessário que haja mais de uma inoculação da bactéria-teste ao longo dos ensaios para avaliação da toxicidade das bactérias contra *E. heros*.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.8 (FERREIRA, 2008).

4.2 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. CONTRA *E. heros*

Após a determinação da metodologia para avaliar a toxicidade das estirpes de *Bacillus* spp. contra *E. heros*, foi possível realizar os ensaios seletivos e encontrar as estirpes que causaram 100% de mortalidade dos percevejos. Essas estirpes foram submetidas a bioensaios de dose-resposta para determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população (CL₅₀).

4.2.1 Obtenção dos percevejos *E. heros*

Os percevejos de segundo ínstar foram fornecidos pela Plataforma de Criação de insetos e mantidos em dieta natural feita a partir de sementes de girassol, soja, amendoim e folhas de boldo, descrita na seção 4.1.1.1.

4.2.2 Preparo da dieta artificial

Os bioensaios foram realizados com a dieta artificial selecionada no item anterior. O preparo e o armazenamento dessa dieta foram feitos conforme descrito no tópico 5.1, com exceção, que os pedaços da dieta foram cortados em tamanhos maiores (1,0 x 1,5 x 1,0 cm).

4.2.3 Origem e preparo das estirpes de *Bacillus* spp.

As estirpes de *Bacillus* spp. foram oriundas da Coleção de Bactérias de Invertebrados, do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas. Essas estirpes foram escolhidas aleatoriamente e ao longo do trabalho foram identificadas quanto a espécie por outro grupo de pesquisa. Elas foram cultivadas em meio de cultura Embrapa líquido (MONNERAT et al., 2007), por 72 horas em incubador rotativo, a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 200 rpm, até a sua completa esporulação. A presença dos esporos e cristais foi confirmada através da observação das suspensões bacterianas em microscópio de contraste de fases.

4.2.4 Bioensaios Seletivos

Foram utilizadas 50 estirpes de *Bacillus* spp. da Coleção de Bactérias de Invertebrados.

Inicialmente, na capela de fluxo laminar, sob luz UV, foram esterilizados todos os utensílios que seriam utilizados no seu preparo, durante 20 minutos. Depois, cada placa TPP, com nove centímetros de diâmetro, foi revestida por papel filtro com a mesma medida da placa. Em cada uma das placas, do controle e dos tratamentos, foram colocados: um disco de algodão umedecido com 3,5 mL de água destilada autoclavada sobre um fundo de copo plástico de 50 mL e um pedaço de dieta (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm) sobre um fundo de copo plástico de 50 mL.

O controle foi feito apenas à base de dieta artificial e, após a sua montagem, foram colocados dez insetos de segundo ínstar do percevejo *E. heros*. Nos tratamentos com as estirpes bacterianas, foram inoculadas 1 mL dos cultivos em cima dos discos de algodão umedecidos

com 3,5 mL de água destilada autoclavada, previamente colocadas dentro das placas de TPP. Cada tratamento foi composto por três placas TPP (repetições), nas quais foram colocados dez insetos de segundo ínstar.

A cada 48 horas, os algodões umedecidos foram trocados em todos os tratamentos e no controle. No controle, os algodões foram trocados e umedecidos com 3,5 mL de água autoclavada, enquanto que nos tratamentos os algodões foram umedecidos com 3,5 mL de água destilada autoclavada e foram reinoculadas 1 mL das bactérias testadas. A última leitura e o descarte ocorreram após 7 dias do início dos ensaios.

As placas foram armazenadas em sala apropriada, com fotoperíodo de 14/10 horas e temperatura de 28 ± 2 °C. A avaliação dos testes foi feita diariamente com a contagem do número de ninfas vivas e mortas. Esse ensaio foi feito em triplicata, em três períodos diferentes. A Figura 8 apresenta todas as etapas envolvidas para a montagem dos bioensaios seletivos, conforme previamente descrito.

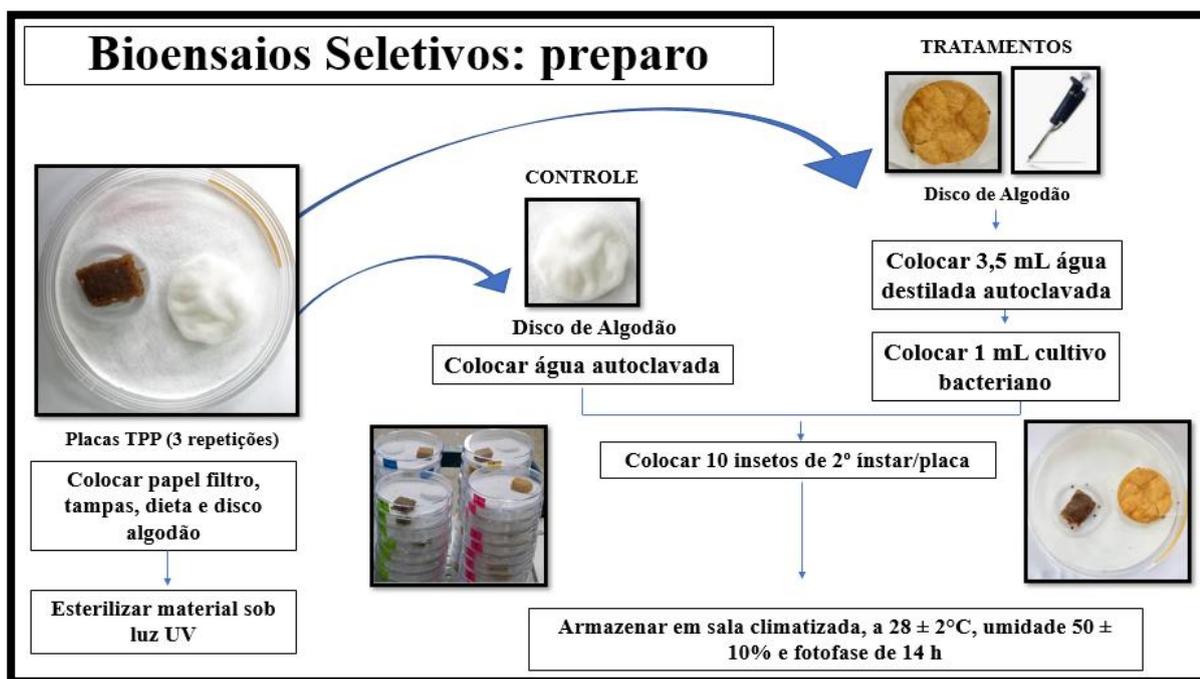


Figura 8. Montagem dos bioensaios seletivos a base de dieta artificial, em placas TPP, para os insetos de segundo ínstar de *E. heros*.

4.2.5 Bioensaios para Determinação da Dose-Resposta

As estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas selecionadas no item anterior foram cultivadas em meio de cultura desenvolvido pela empresa Profarm® em um biorreator de 50 litros da marca ENGCO®. O período total de fermentação variou entre 48h e 72h, até a esporulação total, e a quantificação de esporos das estirpes foi feita através do plaqueamento em placas de Petri com meio Embrapa sólido segundo metodologia descrita em Monnerat et al. (2020). As concentrações de esporos/mL das quatro estirpes bacterianas, após a fermentação estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de esporos das amostras de *Bacillus* spp. utilizadas nos ensaios para determinação das doses-resposta.

Amostra	Concentração das amostras (esporos/mL)
n. 9	$3,9 \times 10^{10}$
n. 28	$4,6 \times 10^9$
n. 30	$5,2 \times 10^9$
n. 49	$3,0 \times 10^9$

O acompanhamento, a troca e as leituras desses ensaios foram realizadas conforme descrito para os ensaios seletivos. As taxas de mortalidade foram analisadas por meio do programa Probit (FINNEY,1971) para determinar a CL₅₀.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Metodologia de Ensaios Seletivo e de Dose

5.1.1 Ensaio para avaliar o desenvolvimento de *E. heros* criados em 4 dietas artificiais e selecionar a dieta mais adequada

Os insetos criados com a dieta D2 apresentaram tempo de desenvolvimento superior aos criados sob dieta Natural, apresentando um período de alongamento desde o segundo ínstar (Tabela 5).

Tabela 5. Tempo de duração médio (\pm EP) do segundo ínstar até a fase adulta de *E. heros* criados nas 5 dietas testadas. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Dieta	Tempo de duração médio (dias)				
	2° Ínstar	3° Ínstar	4° Ínstar	5° Ínstar	Adulto
Natural - DN	$3,91 \pm 0,04$ a	$7,15 \pm 0,12$ a	$6,86 \pm 0,18$ a	$8,51 \pm 0,23$ a	$11,65 \pm 0,21$ a
Artificial - D1	$4,07 \pm 0,03$ ab	$7,73 \pm 0,16$ a	$6,99 \pm 0,20$ a	$8,37 \pm 0,35$ a	$12,45 \pm 0,33$ a
Artificial - D2	$4,00 \pm 0,01$ ab	$10,35 \pm 0,21$ b	$11,52 \pm 0,18$ b	$11,60 \pm 0,39$ b	-
Artificial - D3	$4,32 \pm 0,05$ b	$9,62 \pm 0,31$ b	$12,18 \pm 0,26$ bc	$13,74 \pm 0,45$ c	-
Artificial - D4	$4,10 \pm 0,03$ ab	$9,59 \pm 0,28$ b	$13,76 \pm 0,43$ c	$14,64 \pm 0,46$ c	-

Médias com a mesma letra na mesma coluna são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$).

Os insetos de *E. heros* criados com a dieta artificial D1 (Figuras 9 a 14) apresentaram um comportamento semelhante aos criados com a dieta natural (Figuras 15 a 19), em relação ao tempo de duração médio entre o segundo ínstar até a fase adulta dos indivíduos de *E. heros*, ou seja, foram estatisticamente iguais. Porém, na pesquisa de Hayashida et al. (2018), os insetos criados em dietas artificiais obtiveram tempo de desenvolvimento ninfal inferior em relação aos valores obtidos pelos insetos criados em dieta natural, ou seja, esses resultados diferem dos obtidos nessa pesquisa.

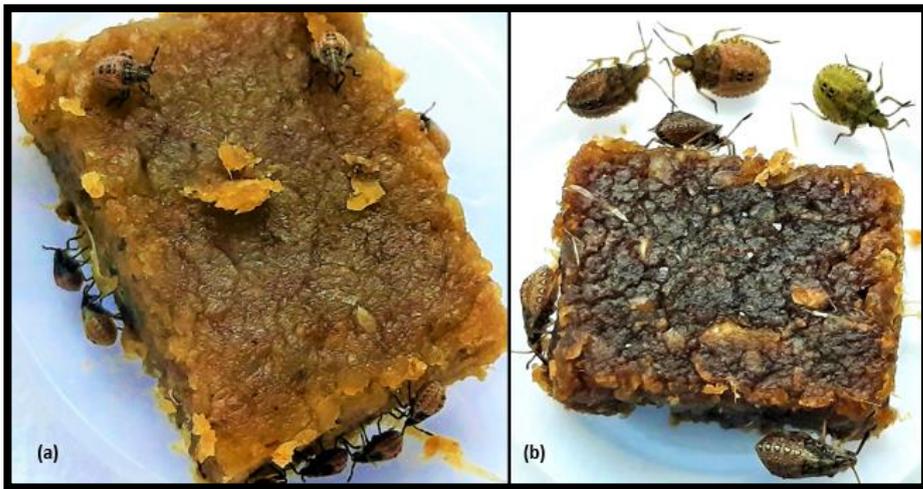


Figura 9. *E. heros* criados na dieta artificial D1: (a) insetos de 3º ínstar, (b) insetos de 4º ínstar.

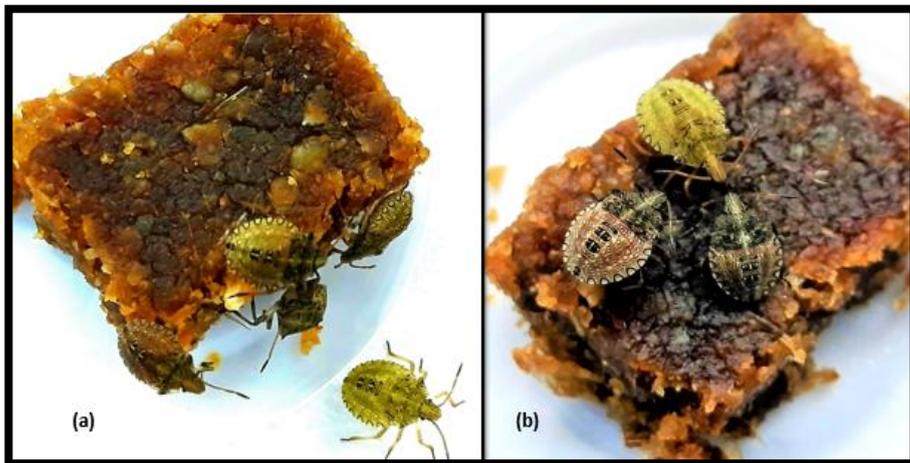


Figura 10. *E. heros* criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4º ínstar.

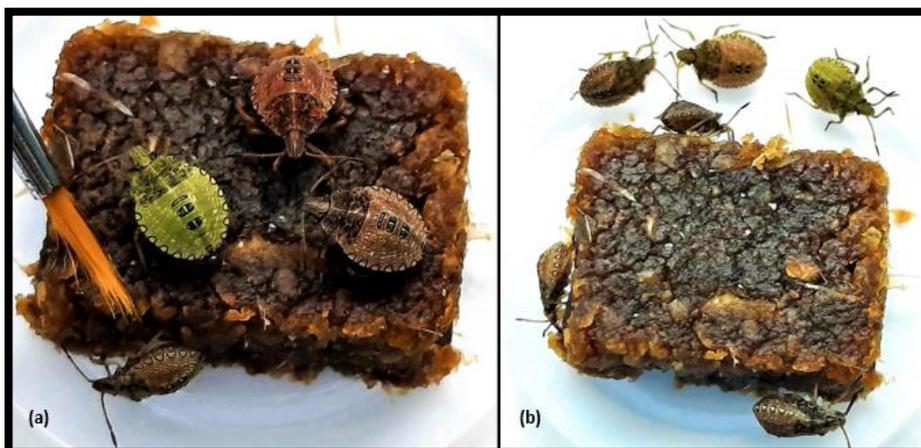


Figura 11. *E. heros* criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4º ínstar.

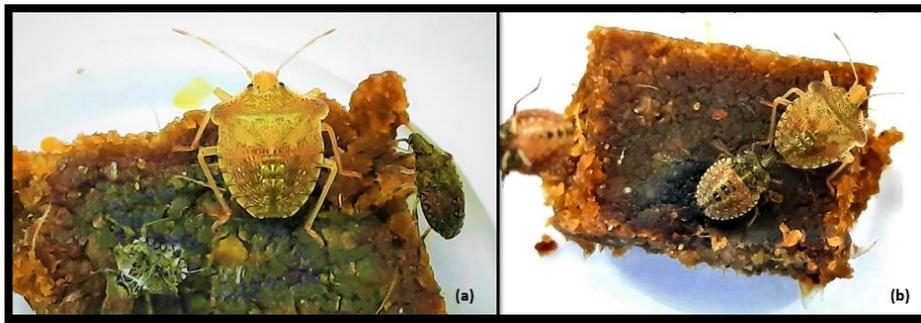


Figura 12. *E. heros* criados na dieta artificial D1: (a) e (b) insetos de 4° e 5° ínstaes.

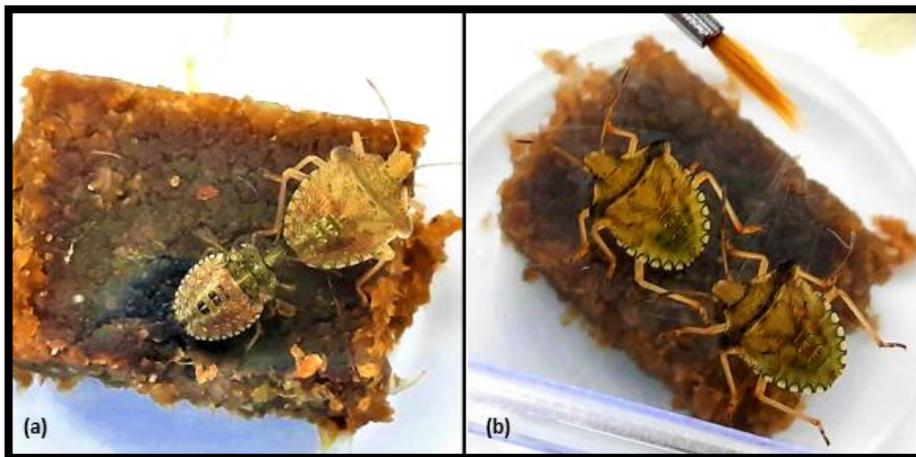


Figura 13. *E. heros* criados na dieta artificial D1: (a) insetos de 4° e 5° ínstaes, (b) insetos de 5° ínstar.



Figura 14. *E. heros* criados na dieta artificial D1: inseto de 5° ínstar e insetos adultos.



Figura 15. *E. heros* criados na dieta natural: insetos de 3º ínstar.

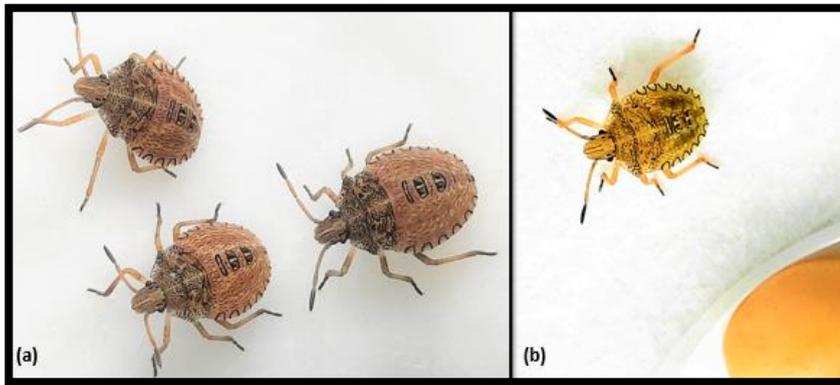


Figura 16. *E. heros* criados na dieta natural: (a) insetos de 4º ínstar, (b) inseto de 5º ínstar.



Figura 17. *E. heros* criados na dieta natural: (a) insetos de 4º e 5º ínstars, (b) insetos de 5º ínstar.

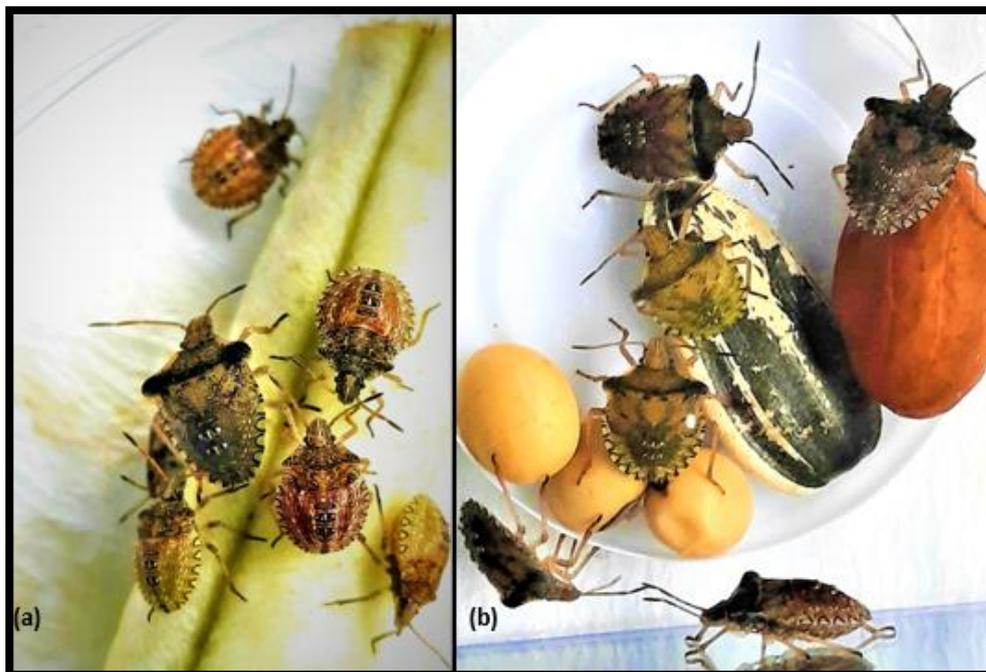


Figura 18. *E. heros* criados na dieta natural: (a) insetos de 4° e 5° ínstaes, (b) insetos de 5° ínstar.

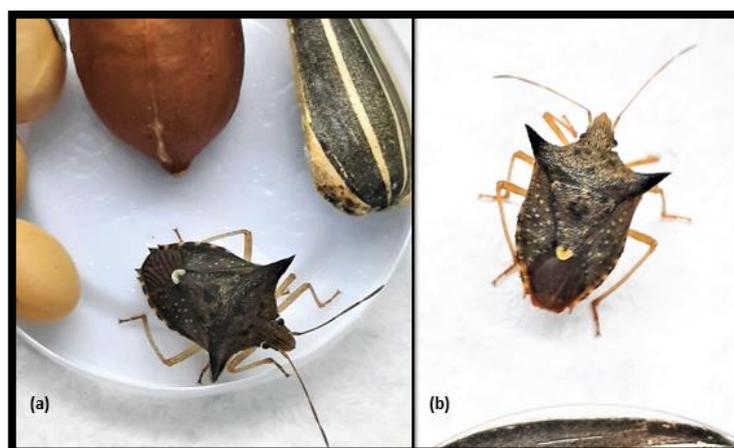


Figura 19. *E. heros* criados na dieta natural: (a) e (b) insetos adultos.

Ao comparar os resultados alcançados entre os insetos criados com a mesma dieta, designada como D1 nessa pesquisa, o tempo de duração médio do 3° e 4° ínstaes dos insetos avaliados por Hayasahida et al. (2018) foram menores, porém, o tempo de duração médio do 5° ínstar foi menor para os insetos criados nessa pesquisa.

A dieta artificial D3 apresentou os insetos com o maior alongamento no tempo médio em relação à dieta Natural entre o segundo ao quinto ínstar, demonstrando-se ser a menos adequada para o desenvolvimento dos insetos nessa pesquisa.

A diferença no tempo de duração médio de cada estágio ninfal, entre os insetos criados nas dietas artificiais, tornou-se mais evidente a partir do terceiro ínstar. Nesta, evidenciou-se o comportamento semelhante entre os insetos criados sob as dietas D2, D3 e D4, exceto, os insetos que foram submetidos à dieta D1, pois eles não tiveram um alongamento significativo em relação às demais.

Além disso, desde o terceiro ínstar, os insetos que foram criados com as dietas D2, D3 e D4, tiveram um alongamento significativo no tempo de duração médio nas suas fases de desenvolvimento subsequentes. Siqueira (2007) também observou um aumento no período ninfal de desenvolvimento dos insetos de *E. heros* entre o 2º e o 5º ínstar criados em dieta artificial.

Nas dietas artificiais D2, D3 e D4, os insetos chegaram apenas ao quinto ínstar de desenvolvimento dos *E. heros*, enquanto que os insetos criados na dieta artificial D1 alcançaram a fase adulta, assim como os insetos que foram criados sob a dieta natural. O resultado obtido pelos insetos de *E. heros* criados com a dieta D1, nessa pesquisa, foi semelhante ao resultado obtido por Hayashida et al. (2018) nos quais os insetos de *E. heros*, quando foram criados com a mesma dieta, também conseguiram completar o seu desenvolvimento até a fase adulta.

Portilla et al. (2015) ao avaliar o desempenho do percevejo *N. viridula* submetido a uma dieta artificial semelhante à dieta D2, usada nessa pesquisa, obteve resultados superiores em relação às taxas de sobrevivência do primeiro ao quinto ínstar e 97,3% dos insetos atingiram a fase adulta. É provável que essa dieta artificial seja mais apropriada para a criação de *N. viridula* do que para a criação de *E. heros*.

O alongamento do ciclo de vida dos insetos quando utilizadas dietas artificiais também foram observados por Panizzi et al. (2000) e Fortes (2005) no Brasil, e no exterior, por outros autores como Jensen e Gibbens (1973) e Noda e Kamano (2002). Porém, Corrêa-Ferreira (1985) não constatou a mesma tendência. Assim, embora o ciclo dos insetos *E. heros* que foram criados nas dietas D2, D3 e D4 possam ter sofrido variações em virtude do alimento seco, não foi necessariamente isto que levou ao prolongamento do ciclo dos percevejos (FORTES, 2005). De qualquer maneira, é possível que uma dieta com qualidade nutricional inapropriada induz ao alongamento do ciclo biológico dos percevejos (PANIZZI & ROSSINI, 1987).

As taxas de mortalidade obtidas pelos insetos de *E. heros* criados nas 5 dietas testadas foram estatisticamente iguais do quinto até o trigésimo quinto dia de ensaio. Porém, a partir do quadragésimo dia, houve um aumento significativo na taxa de mortalidade dos insetos criados na dieta D2, tornando-a estatisticamente diferente das demais (Tabela 6).

Os insetos criados nas dietas Natural e D1 foram os únicos que chegaram à fase adulta. Assim, eles foram selecionados para realizar as próximas etapas de avaliação em relação ao desenvolvimento dos insetos *E. heros*, que envolviam os seguintes parâmetros: razão sexual dos adultos, taxas de fecundidade e fertilidade, tamanho e peso médios dos adultos.

Quando foi avaliado o número de adultos deformados presentes em ambas as dietas – natural e artificial D1 – esses valores foram inferiores à taxa média de 4% em relação ao número total de adultos crescidos sem nenhuma deformidade, sendo que, os insetos deformados criados nessas dietas apresentaram vestígios de má formação nas asas externas e as exúvias ainda presas nos insetos (Figura 20).

Tabela 6. Taxa de mortalidade média (\pm EP) de *E. heros* criados nas 5 dietas. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Dieta	Taxa de mortalidade média (%)								
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	35 dias	40 dias	45 dias
DN	0,00 \pm 0,00 a	2,00 \pm 1,41 a	2,00 \pm 1,41 a	5,00 \pm 2,19 a	9,00 \pm 2,88 a	10,00 \pm 3,02 a	13,00 \pm 3,38 a	17,00 \pm 3,78 a	21,00 \pm 4,09 a
D1	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	1,00 \pm 1,00 a	7,00 \pm 2,56 a	8,00 \pm 2,73 a	10,00 \pm 3,02 a	14,00 \pm 3,49 a	17,00 \pm 3,78 a	21,00 \pm 4,09 a
D2	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	1,00 \pm 1,00 a	3,00 \pm 1,71 a	12,00 \pm 3,27 a	24,00 \pm 4,29 a	36,00 \pm 4,82 b	45,00 \pm 5,00 b
D3	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	2,00 \pm 1,41 a	4,00 \pm 1,97 a	10,00 \pm 3,02 a	12,00 \pm 3,27 a	16,00 \pm 3,68 a	20,00 \pm 4,02 a
D4	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a	1,00 \pm 1,00 a	3,00 \pm 1,71 a	5,00 \pm 2,19 a	7,00 \pm 2,56 a	11,00 \pm 3,14 a	15,00 \pm 3,59 a	17,00 \pm 3,78 a

Médias com a mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$).

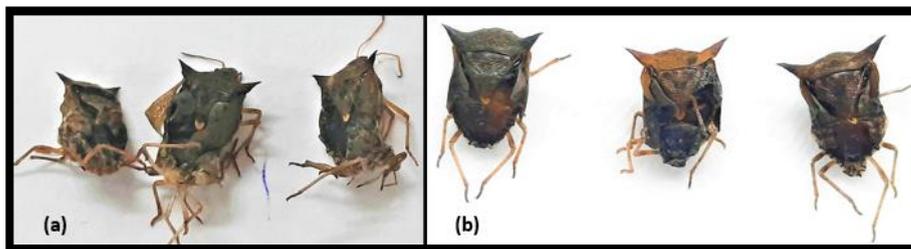


Figura 20. *E. heros* adultos com deformações: (a) com vestígios de exúvias presas e (b) nas asas externas.

A razão sexual obtida pelos insetos criados nas 2 dietas selecionadas – Natural e Artificial D1 – foram estatisticamente iguais (Tabela 7). Em Hayashida et al. (2018), a razão sexual obtida pelos insetos de *E. heros* criados em dieta natural e com a dieta renomeada como D1, nessa pesquisa, também apresentaram razão sexual semelhante.

Tabela 7. Razão sexual (\pm EP), peso (\pm EP) (mg) e comprimento (\pm EP) (mm) de machos e fêmeas de adultos de *E. heros* criados nas 2 dietas selecionadas para a terceira etapa. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Dieta	¹ Razão sexual (RS)	Peso Médio (mg)		Comprimento Médio (mm)	
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Natural	$0,60 \pm 0,06$ a	$94,70 \pm 1,35$ b	$105,24 \pm 5,39$ b	$10,65 \pm 0,06$ b	$11,13 \pm 0,07$ b
Artificial - D1	$0,56 \pm 0,06$ a	$69,65 \pm 3,15$ a	$73,31 \pm 5,29$ a	$10,16 \pm 0,08$ a	$10,69 \pm 0,08$ a

Médias com a mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$). ¹RS = fêmea / (fêmea + macho)

Porém, quando foram avaliados os valores obtidos em relação aos comprimentos e às pesagens dos machos e fêmeas dos adultos de *E. heros* criados nessas 2 dietas, o desempenho dos insetos criados na dieta Natural foi superior aos criados na dieta Artificial D1, sendo estatisticamente diferentes entre si (Tabela 7). Em Mendoza et al. (2016), os insetos de *E. heros* criados em dieta artificial também obtiveram pesos inferiores em relação aos pesos dos insetos adultos criados em dieta natural.

A dieta D1 também teve um desempenho inferior quando comparada à dieta Natural, no que tange os critérios de avaliação relacionados à quantidade de posturas de ovos depositados pelas fêmeas e em relação à viabilidade dos mesmos, com exceção, da taxa de eclosão dos ovos obtida na primeira leitura, em que ambas foram estatisticamente iguais (Tabela 8). As taxas de

fecundidade dos *E. heros* criados em dieta artificial na pesquisa de Mendoza et al. (2016), foram superiores aos insetos de *E. heros* criados nas dietas natural e artificial D1, desta pesquisa.

Tabela 8. Número médio (\pm EP) de ovos e taxa de eclosão média (\pm EP) das ninfas colocadas por fêmeas de *E. heros* criados nas 2 dietas selecionadas para a terceira etapa. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Dieta	Gaiolas de Adultos			
	7 dias após a montagem das gaiolas		14 dias após a montagem das gaiolas	
	Média de Ovos/Fêmea	Taxa Média de Eclosão das ninfas (%)	Média de Ovos/Fêmea	Taxa Média de Eclosão das ninfas (%)
Natural - DN	43,49 \pm 1,98 b	7,36 \pm 1,17 a	21,07 \pm 3,01 b	18,80 \pm 3,93 b
Artificial - D1	17,44 \pm 1,54 a	12,07 \pm 2,64 a	4,83 \pm 0,78 a	0,00 \pm 0,00 a

Médias com a mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$).

Nessa pesquisa, devido às taxas de fertilidade e a viabilidade dos ovos dos insetos criados com a dieta D1 terem sido inferiores aos obtidos pelos insetos criados em dieta natural, esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Hayashida et al. (2018). Porém, ao comparar os valores obtidos entre os insetos de *E. heros* criados com a mesma dieta, designada como D1 nesse trabalho, os valores obtidos pelos insetos criados por Hayashida et al. (2018) foram superiores.

Todavia, na pesquisa feita por Mendoza et al. (2016), os insetos de *E. heros* criados em duas dietas artificiais apresentaram taxas de fecundidade superiores aos insetos criados na dieta natural, ou seja, esses resultados foram discrepantes quando comparados aos resultados obtidos nessa pesquisa.

Apesar dos menores pesos terem sido obtidos entre os adultos de *E. heros* criados na dieta D1, além das suas baixas taxas de oviposição das fêmeas e viabilidade dos ovos em relação à dieta Natural, tais resultados não foram prejudiciais para a sua escolha. Pois, na pesquisa desenvolvida por Fortes (2005), os valores obtidos pelos insetos de *E. heros* criados em dieta natural foram diferentes em relação aos obtidos nessa pesquisa. Apesar dos pesos médios obtidos entre os machos e as fêmeas de adultos nessa pesquisa terem sido superiores as taxas

de fecundidade e fertilidade alcançadas pelas fêmeas foram superiores no trabalho de Fortes (2005).

É provável, que tais reduções tenham sido ocasionadas por características dessa população de percevejos, características do ambiente de criação desses insetos e também pelas modificações no preparo de ambas as dietas – Natural e D1.

Em relação às dietas que continham óleo de girassol (dieta D4) e óleo de soja (dieta D3), no decorrer do 1º ao 5º Ínstar o desempenho delas foi semelhante. Esses resultados diferem dos obtidos na pesquisa de Fortes et al. (2006), quando foi constatado que os insetos de *E. heros* criados sob a dieta com óleo de soja obtiveram resultados superiores em relação aos criados em dieta a base de óleo de girassol, porém, o desempenho desses insetos foi inferior ao dos insetos criados a base de dieta natural, sendo este um resultado parecido ao obtido nessa pesquisa.

A melhor dieta artificial foi aquela à base de amendoim, gérmen de trigo, sacarose, sementes de girassol, sementes de soja e vagens de feijão verde – dieta D1, com uma duração de 31,5 dias em relação aos 31,49 dias obtidos quando eles foram criados em dieta natural, sendo esta a dieta usada na sequência desta pesquisa.

5.1.2 Determinação da forma de inoculação da bactéria-teste e do tempo de avaliação

Analisando-se os dados obtidos nas taxas de mortalidade dos insetos de *E. heros* submetidos aos diferentes métodos de inoculação da bactéria-teste (Tabela 9), observou-se que a diferença estatística entre os tratamentos ocorreu a partir do segundo dia de avaliação.

Entre o quinto e o sexto dia de ensaio, todos os tratamentos com bactéria foram estatisticamente iguais entre si e diferentes quando foram comparados a ambos os controles – dietas natural e artificial (Tabela 9).

No último dia de avaliação, houve uma diferença estatística entre os tratamentos, sendo que, a inoculação da bactéria via Água apresentou uma maior taxa de mortalidade dos insetos submetidos ao seu tratamento em relação aos demais, ou seja, foi estatisticamente diferente aos outros tratamentos - inoculação da bactéria via Dieta e inoculação da bactéria via Água + Dieta (Tabela 9).

Assim, pode-se concluir que a maneira mais eficiente de inocular a bactéria-teste é via sua fonte de água, o que também facilitou tanto o preparo do ensaio como possibilitou uma melhor homogeneização da bactéria ao inoculá-la apenas no disco de algodão.

Tabela 9. Avaliação da taxa de mortalidade média (\pm EP) em relação aos tratamentos e controles. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Tratamento	Taxa de mortalidade média em dias após a primeira inoculação (%)				
	1 dia	2 dias	5 dias	6 dias	7 dias
Dieta Natural (Controle)	$1,67 \pm 1,67$ a	$10,00 \pm 3,91$ a	$13,33 \pm 4,43$ a	$13,33 \pm 4,43$ a	$13,33 \pm 4,43$ a
Dieta Artificial (Controle)	$1,67 \pm 1,67$ a	$3,33 \pm 2,34$ a	$8,33 \pm 3,60$ a	$8,33 \pm 3,60$ a	$8,33 \pm 3,60$ a
Bactéria na Água	$11,67 \pm 4,18$ c	$45,00 \pm 6,48$ b	$85,00 \pm 4,65$ b	$91,67 \pm 3,60$ b	$95,00 \pm 2,84$ c
Bactéria na Dieta	$5,00 \pm 2,84$ b	$21,67 \pm 5,36$ ab	$68,33 \pm 6,06$ b	$70,00 \pm 5,97$ b	$71,67 \pm 5,87$ b
Bactéria na Água + Dieta	$6,67 \pm 3,25$ a	$28,33 \pm 5,87$ ab	$66,67 \pm 6,14$ b	$70,00 \pm 5,97$ b	$70,00 \pm 5,97$ b

Médias com a mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais, pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$)

5.1.3 Determinação da necessidade de reinoculação da bactéria-teste

No experimento para avaliar a necessidade de reinoculação da bactéria ao longo do experimento, foi constatada que é necessário reinoculá-la no decorrer do ensaio. A partir da análise dos dados da Tabela 10, foi observado um aumento gradativo nas taxas de mortalidade dos insetos-alvo à medida que ocorreram as reinoculações da bactéria, a cada dois dias, no tratamento com inoculação da bactéria via Água. Com 24 horas após o início do ensaio, houve diferença estatística na taxa de mortalidade entre os controles e o tratamento com reinoculação da bactéria na Água (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da taxa de mortalidade média (\pm EP) diária em relação ao Tratamento com reinoculações e Controles. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14h.

Tratamento	Taxa de mortalidade média em dias após a primeira inoculação (%)						
	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
Controle Dieta Natural	0,00 \pm 0,00 a	1,67 \pm 1,17 a	2,50 \pm 1,43 a	4,17 \pm 1,83 a	4,17 \pm 1,83 a	5,00 \pm 2,00 a	9,17 \pm 2,65 a
Controle Dieta Artificial	0,83 \pm 0,83 a	1,67 \pm 1,17 a	4,17 \pm 1,83 a	5,00 \pm 2,00 a	5,83 \pm 2,15 a	6,67 \pm 2,29 a	6,67 \pm 2,29 a
Bactéria na Água	11,67 \pm 4,18 b	43,33 \pm 6,45 b	60,00 \pm 6,38 b	91,67 \pm 3,60 b	96,67 \pm 2,34 b	100,00 \pm 0,00 b	100,00 \pm 0,00 b

Médias com a mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0.05$).

5.2 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. CONTRA *E. heros*

5.2.1 Bioensaios Seletivos

Conforme observado na Tabela 11, nos ensaios seletivos contra *E. heros*, das 50 estirpes avaliadas, 26 (uma estirpe de *Bacillus tropicus* e uma estirpe de *Bacillus megaterium*) apresentaram taxas de mortalidade que oscilaram entre 10 a 46,67%, 24 (uma estirpe de *Bacillus amyloliquefaciens* e uma estirpe de *Bacillus safensis*) apresentaram taxas de mortalidade entre 50-80% e 4 tiveram taxas de mortalidade igual a 100%.

As respectivas taxas de mortalidade das amostras foram: uma estirpe de *Bacillus amyloliquefaciens* (74%), uma estirpe de *Bacillus tropicus* (30%), uma estirpe de *Bacillus safensis* (80%), uma estirpe de *B. megaterium* (26,7%), cinco estirpes de *Bacillus cereus* (26,7-73,3%), duas estirpes de *Bacillus cereus* lato sensu (50% e 100%), 15 estirpes identificadas como *Bacillus* sp. (26,7-60%) e 24 estirpes de *B. thuringiensis* (23,3-100%). Esse é o primeiro relato de mortalidade causada pelas espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. safensis* em *E. heros*.

Como apenas 10% das estirpes avaliadas tiveram percentuais de mortalidade contra *E. heros* elevado (igual ou superior a 80%) é possível inferir que o modo de alimentação do percevejo sugador e o seu sistema digestivo dificultem a ação de *B. thuringiensis*. Melatti et al. (2010) encontraram em torno de 1,25 % das estirpes de *B. thuringiensis* avaliadas eficazes contra o pulgão do algodoeiro, com taxas de mortalidade superiores a 50%.

Wellman-Desbiens e Côtê (2004), por outro lado, observaram a facilidade dos insetos desfolhadores, como Lepidoptera e Coleoptera, e os insetos filtradores, como Diptera de conseguir ingerir a bactéria. Assim, foi demonstrado como o modo de alimentação tem grande influência na susceptibilidade dos insetos às proteínas Cry.

Dentre as estirpes do gênero *Bacillus* avaliadas, apenas quatro amostras apresentaram taxas de mortalidade igual a 100% nos ensaios seletivos, sendo elas: n. 9, n. 28, n. 30 e n. 49. Com exceção da amostra n. 30, que foi identificada como *Bacillus cereus* lato sensu, as amostras n. 9, n. 28 e n. 49 foram identificadas como *B. thuringiensis*.

Tabela 11. Taxa de mortalidade de *E. heros* nos ensaios seletivos utilizando-se diferentes isolados de bactérias entomopatogênicas. Temp.: 25 ± 1°C, UR: 60 ± 10%, fotofase: 14h.

Amostra		Taxa de mortalidade (%)	Amostra		Taxa de mortalidade (%)
Nº	Identificação	7 dias	Nº	Identificação	7 dias
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	73,3	26	<i>Bacillus thuringiensis</i>	76,7
2	<i>Bacillus</i> sp.	26,7	27	<i>Bacillus thuringiensis</i>	76,7
3	<i>Bacillus</i> sp.	53,3	28	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
4	<i>Bacillus tropicus</i>	30	29	<i>Bacillus thuringiensis</i>	10
5	<i>Bacillus</i> sp.	60	30	<i>Bacillus cereus lato sensu</i>	100
6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	63,3	31	<i>Bacillus thuringiensis</i>	53,3
7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	50	32	<i>Bacillus cereus</i>	46,7
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	40	33	<i>Bacillus megaterium</i>	26,7
9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	34	<i>Bacillus safensis</i>	80
10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	23,3	35	<i>Bacillus cereus</i>	50
11	<i>Bacillus thuringiensis</i>	30	36	<i>Bacillus</i> sp.	23,3
12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	63,3	37	<i>Bacillus</i> sp.	60
13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	53,3	38	<i>Bacillus thuringiensis</i>	36,7
14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	43,3	39	<i>Bacillus thuringiensis</i>	36,7
15	<i>Bacillus thuringiensis</i>	73,3	40	<i>Bacillus</i> sp.	36,7
16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	50	41	<i>Bacillus</i> sp.	10
17	<i>Bacillus cereus</i>	73,3	42	<i>Bacillus thuringiensis</i>	33,3
18	<i>Bacillus</i> sp.	60	43	<i>Bacillus thuringiensis</i>	23,3
19	<i>Bacillus cereus</i>	26,7	44	<i>Bacillus</i> sp.	10
20	<i>Bacillus</i> sp.	26,7	45	<i>Bacillus</i> sp.	40
21	<i>Bacillus</i> sp.	26,7	46	<i>Bacillus cereus</i>	56,7
22	<i>Bacillus</i> sp.	40	47	<i>Bacillus thuringiensis</i>	26,7
23	<i>Bacillus</i> sp.	33,3	48	<i>Bacillus</i> sp.	30
24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	46,7	49	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
25	<i>Bacillus thuringiensis</i>	60	50	<i>Bacillus cereus lato sensu</i>	50

Wellman-Desbiens e Côté (2004), ao solubilizar com tripsina proteínas presentes em *B. thuringiensis* das subsp. *thuringiensis*, *morrisoni*, *tolworthi* e *darmstadiensis*, após sete dias de ensaio, concluíram que elas foram responsáveis pela mortalidade de 77-100% das ninfas de segundo ínstar do percevejo *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). Os autores constataram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* possuem proteínas que são capazes de controlar pragas pertencentes à ordem Hemiptera. Esses resultados corroboraram àqueles

encontrados por Melatti (2008) para o pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii* e também para *E. heros*, como foi demonstrado nessa pesquisa, na qual foram encontradas quatro estirpes tóxicas.

Desta maneira, essas quatro estirpes foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho, sendo que elas foram submetidas a bioensaios de dose para determinação de CL₅₀ (concentração letal necessária para matar 50% da população testada).

5.2.2 Bioensaios para Determinação da Dose-Resposta

Para as quatro amostras que foram selecionadas para a realização dos ensaios de dose-resposta, a Tabela 12, mostra os resultados referentes aos seus valores da CL₅₀ e os seus respectivos intervalos de confiança (90%), que foram calculados usando o programa de análise de Probit.

Tabela 12. Concentração letal média (CL₅₀) das estirpes n. 9, n. 28, n. 30 e n. 49 em ninfas de segundo ínstar de *E. heros* (análise de Probit).

Estirpe	CL ₅₀ (esporos/mL) (x 10 ⁴) *	Intervalo de confiança (90%)
n. 9	215,1	29,57 - 1604,00
n. 28	14,94	2,61 - 63,16
n. 30	0,58	0,56 - 37,08
n. 49**	-	- -

*CL₅₀: Concentração de esporos/mL necessária para matar 50% da população de ninfas em teste.

**Não foi possível calcular

Nos resultados dos ensaios de dose a estirpe de *B. cereus* (n. 30) apresentou a menor CL₅₀ dentre as estirpes testadas, com o valor de 0,58 x 10⁴ esporos/mL. A segunda estirpe que apresentou menor valor absoluto de CL₅₀ foi a estirpe de *B. thuringiensis* (n. 28) com 14,94 x 10⁴ esporos/mL.

Em relação às amostras n. 30 e n. 9, a estirpe de *B. thuringiensis* (n. 9) apresentou uma dose de CL₅₀ de 215,1 x 10⁴ esporos/mL. Apesar de apresentarem valores absolutos distintos, estatisticamente as estirpes n. 9, n. 28 e n. 30 são semelhantes, pois seus intervalos de confiança se sobrepõem. Dessas estirpes duas são *B. thuringiensis* e uma é *Bacillus cereus* lato sensu, que apresentam composição de toxinas distintas, indicando que a toxicidade é causada por pelo menos dois mecanismos de ação diferentes.

A amostra que demonstrou ser a menos promissora foi a estirpe de *B. thuringiensis* (n. 49), porque não foi possível calcular a sua CL₅₀ (Tabela 12). Apesar da amostra n. 49 ter apresentado uma taxa de mortalidade de 100% dos insetos de *E. heros* nos ensaios seletivos, as mortalidades foram nulas ao serem testadas as suas diluições para controlar esse percevejo.

A quantidade de pesquisas referentes à atividade tóxica de *B. thuringiensis* contra insetos da ordem Lepidoptera responsáveis por grandes perdas na cultura da soja é bem maior, quando comparada ao número diminuto de pesquisas disponíveis sobre a ação entomopatogênica dessa bactéria para o controle de insetos da ordem Hemiptera (SCHÜNEMANN et al., 2014). Esse fato se deve provavelmente à facilidade de testar insetos desfolhadores em comparação aos sugadores.

Apesar de ainda ser desconhecido o modo de ação das proteínas de *Bacillus thuringiensis* contra os insetos da ordem Hemiptera, a descoberta de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a esses insetos é de suma importância. Para que estirpes de *Bacillus thuringiensis* tenham uma atividade tóxica efetiva sobre Hemiptera, é fundamental que haja a ativação proteolítica da toxina no intestino desses insetos. Desta forma, devem ser considerados os seguintes aspectos relevantes para uma adequada avaliação dos efeitos da toxina sobre esses insetos: o pH intestinal dos insetos, as diferenças existentes entre as enzimas proteolíticas e a estratégia que será adotada para avaliação. Desta maneira, para alcançar um manejo sustentável dessas pragas, é necessário que sejam realizados estudos para aperfeiçoar os processos de aplicação de *Bacillus thuringiensis* para o controle de Hemiptera (LI et al., 2011; SCHÜNEMANN et al., 2014). Ademais, para o controle de Hemiptera utilizando-se estirpes de *B. thuringiensis* é necessário adotar melhorias nos seus processos, visto que os diversos estudos disponíveis avaliam o mecanismo de ação das toxinas do *B. thuringiensis* em Lepidoptera e os insetos das diferentes ordens possuem peculiaridades que vão desde a ingestão da toxina até a sua ativação no intestino (CHOUGULE & BONNING, 2012; CRISTOFOLETTI et al., 2003; LI et al., 2011).

Os resultados da CL₅₀ dessa pesquisa demonstram que as estirpes selecionadas nos bioensaios anteriores são altamente tóxicas a *E. heros*. Em um trabalho com *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), Soares-da-Silva et al. (2015) isolaram estirpes de *B. thuringiensis* oriundas de amostras de solo do estado do Amazonas (Brasil) e fizeram ensaios para avaliar a toxicidade contra esse inseto. Das 57 estirpes identificadas como *B. thuringiensis*, seis estirpes foram tóxicas para o controle de larvas de *A. aegypti*, sendo que apenas duas

estirpes obtiveram a CL₅₀ com valores semelhantes às estirpes padrões. Os valores das CL₅₀ mais baixos foram $0,0011 \times 10^5$ esporos/mL e $0,0014 \times 10^5$ esporos/mL, enquanto que as demais estirpes selecionadas obtiveram valores de CL₅₀ ($\times 10^5$ esporos/mL) entre 0,26 e 0,59. Lobo et al. (2018) também isolaram estirpes de *B. thuringiensis* oriundas de amostras de solo da região do cerrado do estado do Maranhão (Brasil) e fizeram ensaios para avaliar a toxicidade contra *A. aegypti*. Dentre os 300 isolados de *B. thuringiensis*, 12 apresentaram atividade larvicida e apenas 3 causaram 100% de mortalidade nas larvas de *A. aegypti*. As CL₅₀ das estirpes mais tóxicas apresentaram valores entre $0,004 \times 10^7$ esporos/mL e $0,32 \times 10^7$ esporos/mL. Da Silva et al. (2010) realizaram a caracterização de 1073 isolados de *B. thuringiensis* e selecionaram 60 isolados, que continham a classe do gene *cry35Ba* para fazer bioensaios contra larvas de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Corculinidae). Dos isolados testados, quatro causaram mortalidade superior a 50% e os mais virulentos obtiveram valores das CL₅₀ entre $4,70 \times 10^3$ esporos/mL a $7,03 \times 10^5$ esporos/mL. Comparativamente a esses trabalhos, os valores de CL₅₀ obtidos pelas estirpes selecionadas na presente pesquisa indicam que elas sejam promissoras para futuramente serem incorporadas em programa de manejo integrado de pragas.

Zorzetti et al. (2017) avaliaram 47 estirpes de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de primeiro ínstar de *Ecdytoplopha aurantiana* (Lima, 1927) (Lepidoptera: Tortricidae) e nos ensaios seletivos dentre as estirpes avaliadas, 10 apresentaram taxas de mortalidade acima de 85% e os seus valores estimados para a CL₅₀ ficaram entre $1,05 \times 10^7$ esporos/mL e $1,54 \times 10^8$ esporos/mL. Gonçalves et al. (2018) fez bioensaios para avaliar a toxicidade de produtos à base de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de segundo ínstar de *Spodoptera albula* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae). Dos sete biopesticidas testados, três (Agree, DiPel SC e XenTari) levaram às taxas de mortalidade superiores a 80% nas larvas de *S. albula* e os valores das CL₅₀ (10^5 esporos/mL) foram de 0,022, 0,38 e 1164,64, respectivamente. Ao comparar o desempenho das estirpes selecionadas na presente pesquisa, pôde-se inferir que elas foram similares aos obtidos nesse trabalho.

Essa pesquisa buscou selecionar estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *E. heros*, bem como determinar uma metodologia de ensaios seletivos e de dose. Assim, utilizando-se essa metodologia como ferramenta, novas pesquisas devem ser feitas para selecionar mais estirpes de *Bacillus* spp. com atividade entomocida a *E. heros*. Esses ensaios, posteriormente, também podem servir para identificar estirpes e genes de *B. thuringiensis* para serem utilizadas, de forma sistêmica ou no desenvolvimento de plantas transgênicas, possibilitando estratégias de manejo alternativas contra esses insetos.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a seleção de duas estirpes de *B. thuringiensis* e uma de *B. cereus* lato sensu altamente tóxicas a *Euschistus heros*, causando 100% de mortalidade. Adicionalmente foi relatado pela primeira vez que as espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. safensis* apresentaram toxicidade a *E. heros*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRO BAYER BRASIL. **Importância do Monitoramento e Desafios ao Manejo**. 2018. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/alvos/percevejo-marrom#tab-4>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021. Disponível em:

<https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 out. 2021.

AGUIAR MENEZES, E.L. **Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 44, 2003.

ÁVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A; SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p.30, 2005 – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 117).

BISCHOFF, K. M.; et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol Lett** 28, p. 1761–1765. 2006.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BUENO, A. de F.; SOSA-GOMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F.; BUENO, R.C.O. de F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 493-629.

BUENO, A. de F.; BORTOLOTTI, O.C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. de 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.

BUENO, A. F.; PAULA-MORAES, S.V.; GAZZONI, D. L.; POMARI, A.F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 439-447, 2013.

CHOUGULE, N.P.; BONNING, B.C. Toxins for transgenic resistance to Hemipteran pests. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 405-429, 2012.

CIVIDANES, F.J. **Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L.,1758), *Piezodorus guildinni* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr.,1798), (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico.** 1992. 100 f. Tese de doutorado – ESALQ/USP,1992.

CONAB. Soja em números (safra 2018/19), 2019. In: **Embrapa Soja**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. Criação massal do percevejo verde *Nezara viridula* (L.). Documentos. **EMBRAPA-CNPSO**, v. 11, p. 1-16, 1985.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. Amostragem de pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 631-672.

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

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

COSTA, V.A.C.; BERTI FILHO, E.; SATO, M.E. Parasitoides e predadores no controle de pragas. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: Prol, 2006. p.25-34.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. ***Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature**. Disponível em:<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 20 jan. 2020.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; DERAISON, C.; RAHBÉ, Y.; TERRA, W.R.

Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 1, p. 11-24, 2003.

CROPLIFE Brasil. **Produtos biológicos**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/>>. Acesso em 20 out.2021.

da COSTA, F.S.S.; PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; dos SANTOS, R.C.; SOARES, C.M.S.; MONNERAT, R.G. *Bacillus thuringiensis* effect on the vegetative development of cotton plants and the biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy* **2020**, 10, 1889. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121889>

da SILVA, N.; THULER, A.M.G.; De ABREU, I.L.; DAVOLOS, C.C.; POLANCZYK, R.A.; LEMOS, M.V.F. Characterization and selection of *Bacillus thuringiensis* isolates effective against *Sitophilus oryzae*. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Brazil), v. 67, n. 4, p. 472-478, 2010.

DEPIERI, R.A.; PANIZZI, A.R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 197-203, 2011.

DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of AD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 15, p. 232-239, 1970.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (Safrá 2020/21)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FINNEY, D.J. Probit analysis. **Cambridge University Press**, Cambridge, pp. 333, 1971.

FORTES, P. **Desenvolvimento de uma dieta artificial para a criação de *Nezara viridula* (L.,1758) e *Euschistus heros* (F.,1798) e sua relação com *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858)**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

FORTES, P.; MAGRO, S.R.; PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R. Development of a dry artificial diet for *Nezara viridula* (L.) and *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 567-572, 2006.

GONÇALVES, K.C.; JÚNIOR, A.L.B.; DUARTE, R.T.; MOREIRA, L.F.; DO NASCIMENTO, J.; POLANCZYK, R.A. *Spodoptera albula* susceptibility to *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 157, p. 147-149. 2018.

GONZÁLEZ-ZAMORA, J.E.; CAMÚNEZ, S.; AVILLA, C. Effects of *Bacillus thuringiensis* cry toxins on developmental and reproductive characteristics of the predator *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) under laboratory conditions. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 1246-1253, 2007.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília, Embrapa, 2016. 853p.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. 2000. In: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application (Charles, J. et al; eds), pp. 41-46, **Kluwer Academic Publishers**.

HARRISON, R.L.; BONNING, B.C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: **Biology and biotechnology control of insect pest**. Edited by Jack E, Rechaige and Nancy A. Rechal. By CRC Press LLC. p. 243-280, 2000.

HAYASHIDA, R.; BUENO, A. de F.; HERMEL, A.O.; HIRAKURI, M.H.; SILVA, F.A.C.; ROGGIA, S. *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) fitness on artificial diets: an approach to optimize mass rearing of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) for augmentative biological control. **Journal of Economic Entomology**, v.111, n 4, p. 1605-1613, 2018.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: **Embrapa**, 2012. 859p.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v.53, p. 242-255, 1989.

HOU, C. T.; LABEDA, D. P.; ROONEY, A. P. Evaluation of microbial strains for linoleic acid hydroxylation and reclassification of strain ALA2. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 167–171. 2005.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2021. Disponível em:

<<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/6588#resultado>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

IRAC Brasil (Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas. **Manejo da resistência do percevejo-marrom a inseticidas**. 2020. Disponível em: < https://www.irac-br.org/files/ugd/6c1e70_23289b96aa09446f8e8a4091352aecaf.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2021.

JENSEN, R.L.; GIBBENS, J. Rearing the southern green stink bug on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 269-271, 1973.

LI, H.; CHOUGULE, N.P.; BONNING, B.C. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* δ endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2011.

LOBO, K.S.; SOARES-da-SILVA, J.; da SILVA, M.C.; TADEI, W.P.; POLANCZYK, R.A.; PINHEIRO, V.C.S. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, p. 5-12, 2018.

MAPA. **Brasil lidera produtividade agropecuária mundial**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-lidera-productividade-agropecuaria-mundial>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

MAPA. **Projeções do agronegócio – Brasil 2020/21 a 2030/31**. 2021. Disponível em:< <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2020-2021-a-2030-2031.pdf/view>>. Acesso em: 20.out. 2021.

MAPA. **Sustentabilidade e inovação**. 2021. Disponível em:< <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/campanhas/retrospectiva2020/sustentabilidade-inovacao>>. Acesso em: 20 out.2021.

MELATTI, V.M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; MARTINS, E.S.; SUJII, E.; BERRY, C.; MONNERAT, R.G. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 5, p. 1-4, 2010.

MENDOZA, A.C.; DA ROCHA, A.C.P.; PARRA, J.R.P. 2016. Lyophilized artificial diet for rearing the neotropical *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p.41.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, É.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 163-200.

MONNERAT, R.; PRAÇA, L.B.; da SILVA, E.Y.Y.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; SOARES, C.M.; QUEIROZ, P.R. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2020. 46 p. – (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 369)

MORANDI, M.A.B.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.

NODA, T.; KAMANO, S. Artificial rearing of *Nezara viridula* (L.) and *N. antennata* Scott (Heteroptera: Pentatomidae) with semi-solid meridic diets. **Applied Entomology and Zoology**, v. 37, n. 1, p. 43-50, 2002.

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

PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P.; SANTOS, C.H.; CARVALHO, D.R. Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1709-1715, 2000.

PANIZZI, A.R.; ROSSINI, M.C. Impacto de várias leguminosas na biologia de ninfas de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 47, p. 507-512, 1987.

PANIZZI, A.R.; SILVA, F.A.C. Seed-sucking bugs (Heteroptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). Insect bioecology and nutrition for integrated pest management. Boca Raton: **CRC Press**, 2012. p. 295-324.

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

PAULA JÚNIOR, T.J.; MORANDI, M. A. B.; VENZON, M. **Manejo Integrado de Doenças e Pragas Utilizando o Controle Biológico**. In: HALFELD-VIEIRA, B.A., MARINHO; PRADO, J.S., NECHET, K.L., MORANDI, M.A.B., BETTIOL, W. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. Brasília, Embrapa, 2016.

PINTO, S.B.; PANIZZI, A.R. Performance of nymphal and adult *Euschistus heros* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 549-555, 1994.

PORTILLA, M.; SNODGRASS, G.; STREETT, D.; LUTTRELL, R. Demographic parameters of *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) reared on two diets developed for *Lygus* spp. **Journal of Insect Science**, v.15, n. 1, p. 165, 2015.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p.34.

ROONEY, A. P.; et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2429–2436. 2009

RUIZ-GARCÍA, C.; et al. *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, p. 1279– 1285. 2005b.

RUIZ-GARCÍA, C.; et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, p. 191– 195. 2005a.

SANTANA, F.S. da C. *Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: a avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*. 2014. 99p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, v. 2014, p. 135675. 2014.

SCHÜNEMANN, R.; ROGGIA, S.; MURARO, D.S.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Insecticidal potential of *Bacillus thuringiensis* for the biological control of neotropical brown stink bug. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, p. 131-138. 2018

SILVA, C.C.; LAUMANN, R.A.L.; BLASSIOLI, M.C.; PAREJA, M.; BORGES, M. *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 575-580, 2008.

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal). São Paulo: **Proteção de Cultivos**. 2021. Disponível em: <<https://sindiveg.org.br/protacao-de-cultivos/>>. Acesso em: 20 out. 2021.

SIQUEIRA, F. **Adição de frutos de *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae) em dieta artificial seca para a criação do percevejo-marrom *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae)**. 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Londrina, 2007.

SOARES-da-SILVA, J.; PINHEIRO, V.C.S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANCZYK, R.A.; TADEI, W.P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J.D. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 767-769, 2010.

SOUZA, J.R. **Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro**. 2013. 64p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SOUZA, M.T. de; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, p. 43-49, 1999.

TEMPLE, J.H.; LEONARD, B.R.; DAVIS, J.A.; FONTENOT, K. Insecticide efficacy against red banded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood), a new stink bug pest of Louisiana soybean. **Mid-south Entomologist**, v. 2, p. 68-69, 2009.

TURNIPSEED, S.G.; KOGAN, M. 1976. Soybean entomology. **Annu. Rev. Entomolo.**, v. 21, p. 247-282.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **World Agricultural Production**. 2021. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

VILLAS-BÔAS, G.L.; PANIZZI, A.R. Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius, 1789) em soja (*Glycine max* L. Merrill). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 9, p. 105-113, 1980.

WELLMAN-DESBIENS, É.; CÔTÉ, J.C. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) nymphal population. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 2, p. 251-258, 2004.

ZORZETTI, J.; RICIETTO, A.P.S.; FAZION, F.A.P.; MENEGUIM, A.M.; NEVES, P.M.O.J.; VILAS-BOAS, L.A.; RODRIGUES, R.B.; VILAS-BÔAS, G.T. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Eubacteriales: Bacillaceae) strains for *Ecdytolopha aurantiana* (Lima) (Lepidoptera: Tortricidae) control. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 86-92, 2017