

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAIAN GUILHERME PINTO DE OLIVEIRA

PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *EUSCHISTUS HEROS* (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) ALIMENTADOS EM DIETAS NATURAIS E SUA
RELAÇÃO COM A INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

CURITIBA

2014

DAIAN GUILHERME PINTO DE OLIVEIRA

PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *EUSCHISTUS HEROS* (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) ALIMENTADOS EM DIETAS NATURAIS E SUA
RELAÇÃO COM A INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

CURITIBA
2014

FICHA CATALOGRÁFICA
(versão final)

TERMO DE APROVAÇÃO
(versão final)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação!”

(Simone de Beauvoir)

À minha amada esposa e ao meu filho; à
minha querida mãe.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Depois de tantos momentos difíceis durante este período é complicado agradecer, pois posso cometer uma injustiça e esquecer de alguém. Mas vou tentar contemplar todos que contribuíram nesta minha trajetória.

Agradeço primeiramente a DEUS, por me conceder sua força e sabedoria e me sustentar com sua graça em todos os momentos;

Ao CNPq, à UFPR e ao programa de Pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade de capacitação;

À EMBRAPA-SOJA, principalmente à todos os membros do laboratório de Entomologia pelo apoio e auxílios prestados;

À UNIOESTE, instituição que me orgulho de ser egresso, por ter fornecido a estrutura para realização de grande parte do trabalho desenvolvido;

À Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, em especial a direção do *Campus* Realeza que fez o possível para que eu tivesse flexibilidade de horários e foi extremamente compreensiva nos diversos momentos que precisei me ausentar para cumprir as obrigações do doutorado;

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gómez pela orientação, mas acima de tudo, por toda a atenção e conhecimento fornecidos durante este nosso tempo de trabalho. É sempre bom termos pessoas competentes para tomarmos como exemplo profissional em nossas vidas e por isso também o agradeço;

Ao Dr. Luis F. A. Alves pela orientação e pelo suporte fornecido para que este trabalho pudesse ser realizado. Ainda em minha monografia, eu disse que esperava ser metade do profissional que o Dr. Luis é; não sei se chegarei lá um dia, mas o fato de ainda tê-lo como parte em meu caminho profissional demonstra que venho fazendo a coisa certa;

Ao Dr. Ítalo Delalibera Jr. por participar da avaliação e pela amizade e consideração a mim dedicadas;

À Dra. Lucia M. de Almeida, pela atenção em todos os momentos que precisei de sua ajuda nas disciplinas de Seminário do programa;

Ao Dr. Paulo H. G. Zarbin, por ter aceito participar da banca e por todos os auxílios prestados na realização do trabalho. Em sua pessoa aproveito para agradecer todos do laboratório de Semioquímicos da UFPR;

Ao Dr. Braulio Santos, por participar da avaliação deste trabalho e se demonstrar sempre tão solícito;

À Dra. Vanda Pietrowski, pelo auxílio e empréstimo de materiais;

Aos colegas do PPG em Entomologia André César e Thamara, por toda ajuda, atenção e amizade durante este período;

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Agrícola da UNIOESTE pela amizade e apoio incondicionais (Andreia, Amanda, Ana, Claudécir, Daliana, Marina, Mayara, Rafaela, Thomas);

À todos meus amigos, que souberam entender minha ausência e a falta de vida social neste período, mas principalmente aos amigos Roberto e Elaine, que estiveram sempre me ajudando nos momentos mais difíceis (ou seja, na maior parte do tempo!);

Em especial à toda minha família, minha e da minha esposa, que para mim são uma só, por serem o alicerce da minha vida (menção ao tio Marcos, por ter nos acolhido nas constantes idas à Cascavel);

E por último, gostaria de agradecer às duas mulheres que concedem sentido ao meu mundo e que fazem minha vida valer a pena, minha mãe Dirce e minha esposa Janaína, é muito bom tê-las comigo neste momento e sem dúvida tudo seria ainda mais difícil sem o apoio de vocês!!!

MUITO OBRIGADO!!

"No!
Try not!
Do or do not,
There is no try!"
(Master Yoda)

RESUMO

Euschistus heros é uma das principais pragas da soja no Brasil, e apresenta sérias dificuldades para seu controle. Em campo, estes insetos possuem baixa susceptibilidade a fungos entomopatogênicos, não sendo registrada a ocorrência de epizootias naturais. Assim, avaliou-se o efeito da alimentação em diferentes combinações de dietas naturais sobre os parâmetros biológicos destes insetos e o papel da cutícula, e suas características físico-químicas, nos estágios iniciais do processo de infecção pelos fungos *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*). As combinações de dietas testadas foram: Padrão (vagens de feijão+grãos de soja, amendoim, girassol), e nas demais foram oferecidas vagens de feijão mais o respectivo grão exclusivamente (Soja, Amendoim, Girassol, Ervilha ou Gergelim). Nas avaliações dos parâmetros biológicos, verificou-se que os insetos alimentados na dieta Padrão apresentaram o menor tempo de desenvolvimento e a maior viabilidade no ciclo, de 49,5%. A menor viabilidade foi obtida na dieta Ervilha, com valores inferiores a 30%, e 11% dos adultos desta dieta continham deformações. Na tabela de vida, o melhor desempenho em todos os índices também foi na dieta Padrão, e o pior foi observado nos insetos alimentados com Ervilha. Os valores da razão finita de aumento foram: Padrão=1,091, Soja=1,077, Amendoim=1,071, Girassol=1,076, Ervilha=1,058 e Gergelim=1,065. Quanto ao efeito na susceptibilidade, apenas em Gergelim a mortalidade ocasionada por *Ma* (55%) superou *Bb* (40%). Comparando-se entre as dietas, para ambos os fungos, os percevejos criados em Girassol e Gergelim sempre estiveram dentre os mais susceptíveis, em relação à Padrão. Avaliando o crescimento dos tubos germinativos sobre as asas, observou-se muita variação entre tratamentos, porém as asas dos percevejos criados em Amendoim figuraram dentre as que apresentaram o maior crescimento, para *Bb* e *Ma*. Para os ensaios de avaliação dos efeitos da cutícula sobre os fungos, os extratos cuticulares avaliados foram obtidos em adultos (brutos) e exúvias (brutos e frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas) dos percevejos alimentados nas dietas já descritas. Verificou-se aumento na adesão de conídios nos extratos brutos de adultos, com destaque para os insetos criados em Ervilha que apresentaram até quatro vezes mais conídios aderidos que o Controle, para *Bb* e *Ma*. Contrariamente, a adesão foi prejudicada em todos os tratamentos da fração metanólica, na qual os compostos polares presentes, além de não servirem como substrato de adesão, repeliram os conídios. A germinação e o tamanho do tubo germinativo dos fungos também foram influenciados pelos tratamentos, que apresentaram efeito suprimindo ou estimulando estes processos. As frações hexânicas e quase todos os tratamentos com extratos brutos estimularam a germinação/tamanho do tubo. Já os efeitos inibitórios foram observados nos extratos brutos de exúvias na maior concentração (50µg), para todos os tratamentos. As frações clorofórmicas e metanólicas dos extratos de exúvias tiveram efeito inibitório de germinação na maioria dos tratamentos, principalmente para *Ma*. Não ocorreu a formação de apressórios de *Bb* nas condições avaliadas. Entretanto, todos os tratamentos permitiram a formação de apressórios de *Ma*, sendo constatado com maior frequência, em 7,5%, no tratamento Soja. Concluiu-se que a dieta influencia os parâmetros biológicos de *E. heros* e proveem susceptibilidade diferencial aos fungos *Bb* e *Ma*. Também é possível ressaltar que ocorreu relação entre a dieta utilizada pelos insetos e as características físico-químicas da cutícula, ocasionando efeitos sobre os estágios iniciais da infecção pelos fungos.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; Interações tritróficas; Lipídios cuticulares; *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

Euschistus heros is a major pest of soybean in Brazil, and its control is very difficult. In field condition, the stink bug have low susceptibility to entomopathogenic fungi, not being registered the epizootic occurrence. Thus, we assessed the effect of feeding on natural diets on biological parameters of these insects and the role of the cuticle, and their physical and chemical characteristics in the early stages of the infection process by the fungi *Beauveria bassiana* (*Bb*) and *Metarhizium anisopliae* (*Ma*). The evaluated diets included a standard diet (beans pods + soybeans, peanuts and sunflower) and diets in which the bean pods were combined with only one type of grain, either soybeans, peanuts, sunflower, peas or sesame seeds. In evaluation of the biological parameters, it was found that the insects fed on standard diet had the shortest development period and the higher viability in the cycle, with 49.5%. The insects fed the pea diet exhibited less than 30% viability and 11% of adults had wing/legs deformations. The life table results demonstrated that the best indices was also in insects fed on standard diet, and the worst was observed when fed on pea. The finite rate of increase values for the treatment groups were: standard: 1.091; soybean: 1.077; peanut: 1.071; sunflower: 1.076; pea: 1.058; and sesame: 1.065. Regarding the susceptibility, the mortality to *Ma* (55%) was greater than that for *Bb* (40%) only in insects fed the sesame diet. Considering the effects of diet on their susceptibility, the stink bugs fed the sunflower or sesame diet were always among the most susceptible to both fungal species compared with those fed the standard diet. The growth of the germ tubes varied, but the wings of insects fed the peanut diet supported the largest *Bb* and *Ma* tubes. For assess the effects of the cuticle on fungi, the cuticular extracts evaluated were obtained in adults (crude) and in fifth instar exuviae (crude and hexanic, chloroformic and methanolic fractions) of insects fed on diets already described. Was verified an increase in the adhesion of conidia on crude extracts of adults, highlighting the extract of insects reared on peas, presenting up to four times more conidia adhered to the control treatment, for *Bb* and *Ma*. In contrast, the adhesion was affected in all treatments of the methanol fraction, in which the polar compounds does not served as a substrate to conidia adhesion, and causing repellency. Percentage of germination and germ tube size of the fungi were also influenced by treatments that show effects suppressing or stimulating these processes. The hexanic fractions and almost all treatments with crude extracts stimulated germination/tube size. The inhibitory effects were observed in crude extracts of exuviae at the highest concentration (50 µg) for all treatments. Also, the chloroform and methanolic fractions had inhibitory effects on the germination of most treatments, mainly for *Ma*. No appressoria formation was observed in the evaluated conditions to *Bb*. However, all treatments of *Ma* led to appressoria formation, being found more frequently (7,5%) in the soybean treatment. Based on these results, we concluded that the diet affects the biological parameters of *E. heros* and differentially affects their susceptibility to *Bb* and *Ma* fungi. We also emphasize that occurred relationship between diet used by *E. heros* and the physical and chemical characteristics of the cuticle, causing effects on the early stages of infection by fungi.

Key words: *Beauveria bassiana*; Tri-trophic interactions; Cuticular lipids; *Metarhizium anisopliae*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig. 1. Comprimento (μm) do tubo germinativo de conídios de *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $90\pm 10\%$; fotofase: 14hs). Tubos germinativos que apresentam mesmo tamanho e/ou coloração, não diferem entre si segundo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 42

Fig. 2. Comprimento (μm) do tubo germinativo de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22) sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $90\pm 10\%$; fotofase: 14hs). Tubos germinativos que apresentam mesmo tamanho e/ou coloração, não diferem entre si segundo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 42

CAPÍTULO II

Fig. 1. Formação de apressórios em conídios de *Metarhizium anisopliae* sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $90\pm 10\%$; fotofase: 14hs). Dietas: a) Padrão; b) Soja; c) Amendoim; d) Girassol; e) Ervilha; f) Gergelim; Escala = $14\mu\text{m}$ 84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela I. Duração média em dias dos ínstaes e do período ovo-adulto de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs)..... 34
- Tabela II. Porcentagem de viabilidade das fases de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) 34
- Tabela III. Razão sexual, porcentagem de adultos deformados, peso médio de machos e fêmeas e número de ovos por fêmea de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) 35
- Tabela IV. Tabela de vida de fertilidade de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) (Método Jackknife)..... 36
- Tabela V. Mortalidade confirmada (%) de *Euschistus heros* separadamente em cada combinação de dietas naturais, ocasionada por isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs)..... 37
- Tabela VI. Mortalidades total e confirmada (%) de *Euschistus heros*, criados em diferentes combinações de dietas naturais, ocasionada por *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) 38
- Tabela VII. Número total de hemócitos ($\times 10^4$) por microlitro de hemolinfa de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais e avaliados 24, 42 e 68 horas após a aplicação dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), sob condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) 40

CAPÍTULO II

- Tabela 1. Adesão de conídios (n° /campo de microscópio) dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22) sobre diferentes concentrações de extratos cuticulares, obtidos em adultos ($5\mu\text{g}$) e exúvias ($50\mu\text{g}$) de *Euschistus heros* alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos foram evaporados em lâminas de vidro à temperatura ambiente 68
- Tabela 2. Adesão de conídios (n° /campo de microscópio) do fungo *Beauveria bassiana* sobre frações de lipídios cuticulares ($50\mu\text{g}$) extraídos de exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos foram separados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados em lâminas de vidro a temperatura ambiente 69

Tabela 3. Adesão de conídios (nº/campo de microscópio) do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre frações de lipídios cuticulares (50µg) extraídos de exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados em lâminas de vidro a temperatura ambiente.....	70
Tabela 4. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em extratos de lipídios cuticulares (5µg) de <i>Euschistus heros</i> adultos, após 18 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação	71
Tabela 5. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> em extratos de lipídios cuticulares (5µg) de <i>Euschistus heros</i> adultos, após 20 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.....	72
Tabela 6. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em extratos de lipídios cuticulares (5µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 18 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação	73
Tabela 7. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> em extratos de lipídios cuticulares (5µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 20 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação	74
Tabela 8. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em extratos de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 18 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação	75
Tabela 9. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> em extratos de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 20 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação	76
Tabela 10 Germinação (%) de conídios do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 18 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.	78
Tabela 11. Tamanho do tubo germinativo (escala 0-5) de conídios do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de <i>Euschistus heros</i> , após 18 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.	79

Tabela 12. Germinação (%) de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação 80

Tabela 13. Tamanho do tubo germinativo (escala 0-5) de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação 82

Tabela 14. Análise qualitativa dos efeitos ocasionados pelos diferentes extratos cuticulares de adultos e exúvias de *Euschistus heros* nos conídios dos fungos *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
2 CAPÍTULO I - Parâmetros biológicos de <i>Euschistus heros</i> (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) e suscetibilidade à fungos entomopatogênicos em insetos alimentados com diferentes combinações de dietas naturais.....	23
Resumo	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	33
Discussão	42
Referências	49
3 CAPÍTULO II - Compostos cuticulares de <i>Euschistus heros</i> (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) criados em diferentes dietas naturais e seu papel nos estágios iniciais da infecção por fungos entomopatogênicos	57
Resumo	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	62
Resultados.....	67
Discussão	84
Referências	91
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

A área cultivada com soja (*Glycine max* (L.), Merrill) no Brasil tem crescido sem interrupção desde a década de 80, e na safra 2012/13 apresentou um acréscimo de 9,2% na área de plantio, e produção 24,5% superior ao volume colhido na safra anterior (CONAB, 2013).

A cultura está sujeita ao ataque de pragas desde a germinação até a colheita. Na fase vegetativa da planta, as principais pragas são as lagartas desfolhadoras, já no período reprodutivo os percevejos são responsáveis pelos principais prejuízos, ocasionando severos danos diretos e indiretos (CIVIDANES; PARRA, 1994; GALLO et al., 2002). Os percevejos mais abundantes na soja são *Euschistus heros* (F.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Nezara viridula* (L.), (Heteroptera: Pentatomidae) (PANIZZI, 1997), sendo que o percevejo-marrom já foi considerado a praga de maior importância para cultura no Brasil (PANIZZI; VIVAN 1997; SOSA-GÓMEZ et al., 2009).

A ocorrência de elevadas populações destes insetos frequentemente levam ao uso indiscriminado de produtos químicos para seu controle (CORRÊA-FERREIRA, 2005), o qual é realizado muitas vezes de maneira profilática (BUENO et al., 2013). Este controle é feito principalmente com o uso de inseticidas químicos de amplo espectro, existindo atualmente 31 produtos registrados para o controle de *E. heros*, sendo a maior parte deles piretróides, organofosforados e neonicotinóides (AGROFIT, 2013). Aponta-se, inclusive, que o uso em quantidades crescentes ano após ano, vem causando uma redução da susceptibilidade aos organofosforados, que provavelmente é resultado do emprego abusivo desses produtos há mais de 30 anos (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010).

Devido aos problemas que esta forma de controle pode ocasionar, deve-se optar pela utilização de estratégias menos prejudiciais ao homem e ao ambiente, agregadas dentro da filosofia do manejo integrado de pragas (MIP), o qual tem sido desenvolvido na cultura da soja desde a década de 70 (BUENO et al., 2012). Assim, a utilização de fungos entomopatogênicos como agentes microbianos de controle pode ser uma alternativa viável a ser estudada para o manejo de populações destes insetos (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1998).

As infecções por fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente nos percevejos em campo, principalmente por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae), porém, geralmente a incidência destas doenças é muito baixa (MOSCARDI et al., 1988) não sendo constatada a ocorrência de epizootias (SOSA-GÓMEZ et al., 1997). Mesmo assim, a possibilidade de uma aplicação prática destes fungos no controle dos percevejos na soja deve ser avaliada, visto que pelo hábito alimentar sugador destes insetos o uso de outros agentes microbianos como bactérias, vírus e protozoários se torna mais difícil (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1998; IHARA et al., 2008).

Trabalhos realizados com o objetivo de estudar a infecção por fungos sobre percevejos em condições de laboratório e campo indicam que as espécies de percevejos da soja *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii* apresentam susceptibilidade distinta aos fungos entomopatogênicos (MOSCARDI et al., 1985; SOSA-GÓMEZ et al., 1997; SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1998). Estudos têm demonstrado que existem percevejos tolerantes à infecção por estes fungos (SOSA-GÓMEZ et al., 1993), como é o caso do Percevejo-marrom *E. heros*.

Esta menor susceptibilidade pode ser resultante das barreiras estruturais do tegumento, assim como da composição química da cutícula do inseto, devido à presença de compostos antifúngicos nesta cutícula (JAMES et al., 2003). E também, da eficiência das reações de

defesa celulares e humorais do inseto (VILCINSKAS; GÖTZ, 1999). Porém, como não se conhece exatamente o processo pelo qual a tolerância ocorre, novas pesquisas são necessárias nesta área.

O notável sucesso evolutivo dos insetos é parcialmente devido à seu efetivo e altamente adaptado sistema de defesa contra microrganismos (BOGUS et al., 2007). O tegumento é considerado uma barreira física e química contra a ação dos fungos entomopatogênicos, visto que o modo de entrada destes patógenos no corpo do hospedeiro envolve a penetração ativa através da cutícula, usando a pressão mecânica das hifas em crescimento e a degradação enzimática de seus principais componentes, as proteínas, quitina e lipídeos (GILLESPIE et al., 2000; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). É no tegumento que ocorrem as três fases iniciais do processo de infecção, sendo a adesão, a germinação e formação de estruturas invasivas, e o início da fase de penetração, e as condições encontradas pelos fungos na cutícula podem influenciar os demais estágios de desenvolvimento da doença (ST LEGER, 1993).

Estudos prévios demonstraram que a composição da cutícula influencia na germinação dos conídios, ocasionando as diferenças de suscetibilidade de várias outras espécies de artrópodes aos fungos (BOUCIAS; LATGÉ, 1988; EL SAYED et al., 1991; KIRKLAND et al., 2004; WANG; ST. LEGER, 2005). Especificamente para o percevejo-verde-da-soja *N. viridula*, foi comprovado que a germinação de *M. anisopliae* neste inseto é afetada por hidrocarbonetos existentes na cutícula (SOSA-GÓMEZ et al., 1997), dando indícios que os mecanismos que tornam os insetos mais ou menos suscetível à ação dos fungos, entre outros, podem estar ligados à estrutura e à composição das camadas da cutícula. Porém, para *E. heros* esta relação ainda não foi estudada.

A susceptibilidade aos entomopatógenos também pode sofrer efeitos de fatores associados à planta hospedeira que os insetos utilizam como alimento (SOSA-GÓMEZ, 2012), e já foi demonstrado inclusive, que a dieta pode afetar os lipídios quantitativamente em

percevejos alimentados com diferentes genótipos de soja (PIUBELLI et al., 2003).

Assim, considerando a influência que a dieta pode exercer sobre toda a biologia e fisiologia dos percevejos, e a relação existente entre componentes cuticulares e a infecção por fungos entomopatogênicos, propõe-se esta pesquisa, com o objetivo de avaliar o efeito da alimentação de *E. heros* em diferentes combinações de dietas naturais sobre os parâmetros biológicos destes insetos e o papel da cutícula, e suas características físico-químicas, nos estágios iniciais do processo de infecção pelos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Espera-se compreender melhor os mecanismos que envolvem a tolerância destes percevejos à infecção pelos fungos, contribuindo para o conhecimento sobre as interações entre dieta, inseto-praga e seus entomopatógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Produtos indicados para o controle de *Euschitos heros***. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 28/11/2013.

BOGUS, M.I.; KEDRA, E.; BANIA, J.; SZCZEPANIK, M.; CZYGIER, M.; JABLONSKI, P.; PASZTALENIEC, A.; SAMBORSKI, J.; MAZGAJSKA, J.; POLANOWSKI, A. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. **Journal of Insect Physiology**, v.53, p.909-922, 2007.

BOUCIAS, D.G.; LATGÉ, J.P. Non-specific induction of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.51, p.168-171, 1988.

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, p.439–447, 2013.

BUENO, A.F.; PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L.; HIROSE, E.; MOSCARDI, F.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L.J.; ROGGIA, S. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Eds) **Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Embrapa, Brasília, DF, 2012. 859 p.

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

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra Brasileira: Grãos, safra 2012/2013, Sétimo levantamento, abril/2013. 2013**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_27_26_boletim_graos_abril_2013.pdf. Acesso em: 25 ago. 2013.

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.

EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M.; LEATHERS, T.D. Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, v.113, p.95-102, 1991.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. & VENDRAMINI, J. D. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 10. ed., 2002. 920p.

GILLESPIE, J.P.; BAILEY, A.M.; COBB, B.; VILCINSKAS, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of Insect Physiology and Biochemistry**, v.44, p.49-68, 2000.

IHARA, F.; TOYAMA, M.; MISHIRO, K.; YAGINUMA, K. Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. **Applied Entomology and Zoology**, v.43, n.4, p.503-509, 2008.

JAMES, R.R.; BUCKNER, J.S.; FREEMAN, T.P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.84, p.67-74, 2003.

KIRKLAND, B.H.; CHO, E.; KEYHANI, N.O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v.31, p.414-421, 2004.

MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; VILLAS BOAS, G.L.; LEITE, L.G.; ZAMATARO, C.E. Avaliação de fungos entomógenos sobre percevejos-pragas da soja, em laboratório. In: **Resultados de Pesquisa de Soja 1984-1985**, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil. 1985. p. 91-98.

MOSCARDI, F., CORRÊA-FERREIRA, B.S., DINIZ, M.C.; BONO, I.L.S. Incidência estacional de fungos entomógenos sobre populações de percevejos-pragas da soja. In: **Resultados de Pesquisa de Soja 1986-1987**, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil, 1988. p. 90.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N.O. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v.4, p.357-374, 2013.

PANIZZI, A.R. Entomofauna changes with soybean expansion in Brasil. In: **World Soybean Research Conference**, 5, Proceedings Kasetsart University Press, 1997. p. 166-169.

PANIZZI, A.R.; VIVAN, L.M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in over- wintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.82, p.213–217, 1997.

PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; ARRUDA, I.C.; LARA, F.M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, v.32, p.127-132, 2003.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. Pragas da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.P.; SOUZA, I.M. (Eds.) **Cultura da Soja nos Cerrados**, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, São Paulo, 1993. p. 299-331.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; BOUCIAS D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.31-39, 1997.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J., LOPES, N.I.O., CORSO, I.C.; ALMEIDA A.M.R.; MORAES G.C.P.; BAUR, M.E. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.1209-1216, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D.R. Implications of plant hosts and insect nutrition on entomopathogenic diseases. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**, CRC Press, 2012. 750p.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.115-120, 1998.

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

ST LEGER, R.J.; Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycetes fungal pathogens. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FREDERICI, B.A. (Eds.) **Parasites and pathogens of insects**, v.2. New York, Academic Press, 1993. p.211-229.

VILCINSKAS, A.; GÖTZ, P. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. **Advances in Parasitology**. v.43, p.267-313, 1999.

WANG, C.; ST LEGER, R.J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.937-947, 2005.

2 CAPÍTULO I - Parâmetros biológicos de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) e suscetibilidade à fungos entomopatogênicos em insetos alimentados com diferentes combinações de dietas naturais

As normas do trabalho encontram-se de acordo com a Revista Brasileira de Entomologia, para qual o artigo foi submetido.

**Parâmetros biológicos de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae)
e suscetibilidade a fungos entomopatogênicos em insetos alimentados com
diferentes combinações de dietas naturais**

Daian G. P. de Oliveira¹, Amanda C. Dudczak², Luis F. A. Alves², Daniel R. Sosa-Gómez³

¹UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul, Rodovia PR 182, Km 466, Caixa Postal 253, 85770-000, Realeza, PR, Brasil. Laboratório de Zoologia. daian.oliveira@uffs.edu.br

²UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Cascavel, PR, Brasil. luis.alves@unioeste.br

³EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPSO, Londrina, PR, Brasil. daniel.sosa-gomez@embrapa.br

Parâmetros biológicos de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) e suscetibilidade a fungos entomopatogênicos em insetos alimentados com diferentes combinações de dietas naturais

RESUMO. A influência de diferentes combinações de dietas naturais em parâmetros biológicos de *Euschistus heros* e na susceptibilidade à *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) foi avaliada. Testaram-se as dietas: Padrão (Vagens de feijão+grãos de soja, amendoim, girassol), e nas demais foram oferecidas vagens de feijão mais o respectivo grão exclusivamente (Soja, Amendoim, Girassol, Ervilha ou Gergelim). Avaliaram-se a susceptibilidade em ensaios com microaplicação sobre adultos (48h de emergência), e também o tamanho do tubo germinativo dos conídios fúngicos em asas dos percevejos. Verificaram-se índices mais adequados com os insetos alimentados na dieta Padrão, com menor tempo para o desenvolvimento e viabilidade do período ovo-adulto de 49,5%. A pior viabilidade foi obtida na dieta Ervilha, com valores inferiores a 30%, além de 11% dos adultos apresentando deformações. Na tabela de vida, o melhor desempenho em todos os índices também foi na dieta Padrão, e o pior foi observado nos insetos alimentados com Ervilha. Os valores da razão finita de aumento foram: Padrão|1,091, Soja|1,077, Amendoim|1,071, Girassol|1,076, Ervilha|1,058 e Gergelim|1,065. Avaliando-se a susceptibilidade, apenas em Gergelim a mortalidade confirmada ocasionada por *Ma* (55%) superou *Bb* (40%). Entre as dietas, para ambos os fungos, os percevejos criados em Padrão e Ervilha sempre estiveram dentre os menos susceptíveis. Quanto aos tubos germinativos, as asas dos percevejos criados em Padrão e Amendoim figuraram sempre dentre as que promoveram maior crescimento, para *Bb* e *Ma*. Desta forma, infere-se que a dieta pode influenciar os parâmetros biológicos de *E. heros* e proveem susceptibilidade diferencial aos fungos *Bb* e *Ma*.

PALAVRAS-CHAVE. *Beauveria bassiana*; Interações tritróficas; *Metarhizium anisopliae*; Percevejo-marrom-da-soja.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja *Glycine max* (L.) Merrill está sujeita ao ataque de insetos pragas desde a germinação até a colheita. Na fase reprodutiva os percevejos são responsáveis pelos principais prejuízos, ocasionando severos danos diretos e indiretos à cultura (Panizzi 2013). Dentre as espécies mais abundantes na soja, o percevejo-marrom *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) é considerado a praga de maior importância nas principais regiões produtoras do Brasil (Panizzi & Vivan 1997; Sosa-Gómez *et al.* 2009).

A ocorrência de elevadas populações destes insetos e a não utilização dos níveis de ação levam frequentemente ao uso indiscriminado de produtos químicos para seu controle (Corrêa-Ferreira 2005), o qual vem sendo realizado nas últimas três décadas com inseticidas químicos de amplo espectro de ação (Sosa-Gómez *et al.* 2009; Panizzi 2013).

Devido aos problemas que esta tática de controle pode ocasionar, devem-se buscar estratégias menos prejudiciais ao homem e ao ambiente, as quais devem se complementar dentro do manejo integrado de pragas (MIP).

Considerando-se para isso os entomopatógenos, o hábito alimentar sugador dos percevejos faz com que o uso de agentes microbianos como bactérias, vírus e protozoários seja pouco aplicável (Sosa-Gómez & Moscardi 1998; Ihara *et al.* 2008). Assim, a utilização de fungos entomopatogênicos para o controle dos percevejos poderia ser uma alternativa viável para o manejo de populações destes insetos-pragas (Sosa-Gómez & Moscardi 1998).

No entanto, apesar das infecções por estes fungos ocorrerem naturalmente em percevejos no campo, principalmente por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae), geralmente a incidência destas doenças é muito baixa (Moscardi *et al.* 1988) não sendo constatada a ocorrência de epizootias (Sosa-Gómez *et al.* 1997).

Neste sentido, trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar a infecção por fungos sobre os percevejos em condições de laboratório, e os resultados indicam que são necessárias altas concentrações de conídios para se atingir índices de mortalidade satisfatórios (Moscardi *et al.* 1985; Sosa-Gómez *et al.* 1997; Sosa-Gómez & Moscardi 1998).

Sabe-se que algumas espécies do complexo de percevejos da soja apresentam suscetibilidade distinta aos fungos entomopatogênicos, e que certas espécies possuem uma inerente tolerância à infecção por estes fungos (Sosa-Gómez *et al.* 1993; Sosa-Gómez *et al.* 1997). Contudo, são poucos os conhecimentos sobre os mecanismos que conferem esta maior tolerância aos percevejos, e quais as possíveis vias que poderiam influenciar na susceptibilidade aos fungos.

A tolerância à infecção pode acontecer por diferentes formas, tendo em vista a ampla gama de estratégias de defesa às infecções microbianas. Seja pela estrutura do integumento, ou a composição química da cutícula do inseto, que pode apresentar compostos antifúngicos nesta camada superficial do exoesqueleto (Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013), ou ainda a eficiência das reações de defesa celulares e humorais (Vilcinskas & Götz 1999).

Além disso, a susceptibilidade de insetos fitófagos pode sofrer efeitos de uma série de fatores associados à planta hospedeira que estes indivíduos utilizam como alimento e os impactos do estado nutricional dos insetos sobre as doenças envolvem mecanismos complexos e interações multitróficas (Sosa-Gómez 2012). O aporte nutricional pode inclusive afetar a produção de inóculo em cadáveres de insetos mortos por patógenos (Cory & Myers 2004).

Assim, neste trabalho avaliaram-se os efeitos que diferentes combinações de dietas naturais causam em parâmetros biológicos em todas as fases do desenvolvimentos de *E. heros*, e também na susceptibilidade destes percevejos aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Por meio de bioensaios de mortalidade pelos fungos, contagem de

hemócitos e efeito no tamanho do tubo germinativo dos conídios sobre a superfície cuticular dos insetos, buscou-se contribuir para melhor elucidar a interação patógeno/inseto-praga/dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação estoque de *E. heros* e combinações de dietas avaliadas. A criação estoque foi iniciada com ovos obtidos junto ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja (Londrina/PR), fazendo-se anualmente a inclusão de novas posturas de percevejos trazidos do campo. Os insetos foram mantidos em salas climatizadas ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), segundo metodologia de criação modificada de Silva *et al.* (2008). Logo após a eclosão, as ninfas foram mantidas em caixa de poliestireno cristal de $11\text{cm}\times 11\text{cm}$ e 3 cm de altura (Gerbox), com tampa, até o 4º ínstar, recebendo como alimento vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e grãos não umedecidos de soja, amendoim-cavalo (*Arachis hypogaea* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.). Após as ninfas atingirem o 5º ínstar foram transferidas para potes plásticos ($16\times 16\times 25\text{cm}$) com tela na lateral e tampa, oferecendo-se além da dieta já descrita, frutos de ligustro (*Ligustrum lucidum* Ait.). Foram oferecidas tiras de tecido de algodão para oviposição, e os ovos obtidos foram transferidos para caixas Gerbox contendo papel de filtro umedecido no fundo, sendo mantidos nas condições já descritas até a eclosão.

Para compor os tratamentos, posturas obtidas na criação estoque foram separadas em caixas Gerbox contendo a respectiva combinação de dieta natural exclusivamente, *ad libitum*, mantendo-se os insetos sob esta alimentação durante todo seu desenvolvimento, sendo: a) Padrão (Vagens frescas de feijão + grãos de soja, amendoim-cavalo, girassol); b) Soja (Vagens frescas de feijão + grãos de soja); c) Amendoim (Vagens frescas de feijão + grãos de

amendoim-cavalo); d) Girassol (Vagens frescas de feijão + grãos de girassol); e) Ervilha (Vagens frescas de feijão + grãos ervilha *Pisum sativum* L.); f) Gergelim (Vagens frescas de feijão + grãos de gergelim *Sesamum indicum* L.).

Biologia comparada de *E. heros* em diferentes combinações de dietas naturais.

Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: i) Viabilidade de ovos e período de incubação; ii) duração de cada estágio ninfal, viabilidade parcial (por ínstar) e total; iii) peso de adultos 48 horas após a emergência, razão sexual, porcentagem de insetos deformados, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, longevidade e número de ovos por fêmea (fecundidade).

Para avaliação dos parâmetros da fase de ovo, diferentes massas de ovos obtidos aleatoriamente da F1 de cada combinação de dieta foram separadas em caixas Gerbox, sobre papel de filtro umedecido, mantendo-se nas condições já descritas, utilizando-se 4 repetições de 50 ovos, para cada tratamento (n=200). As avaliações foram realizadas diariamente, anotando-se a duração do período e a porcentagem de eclosão.

No estudo dos parâmetros da fase ninfal, ninfas de 2º ínstar de *E. heros*, provenientes de diferentes massas de ovos da criação estoque foram individualizadas em gerbox, e alimentadas com as dietas avaliadas. As ninfas foram mantidas em ambiente controlado conforme descrito anteriormente. O experimento constou de 6 tratamentos (dietas a, b, c, d, e e f citadas anteriormente) e 4 repetições cada, com 50 a 60 ninfas por repetição. Após 24 horas foram descartadas as ninfas mortas por manipulação, ficando assim o número total de insetos variável, com "n" de 215, 186, 186, 186, 194 e 228, respectivamente para as dietas a, b, c, d, e e f. As avaliações foram realizadas diariamente até a emergência dos adultos, anotando-se as mudanças de ínstar, descartando-se os insetos mortos e trocando-se as dietas.

Os adultos obtidos de cada combinação de dieta, foram sexados, pesados e individualizados para posterior formação dos casais, verificando-se o número de adultos com deformações. Em cada tratamento, utilizaram-se 20 casais, individualizando-os em caixas Gerbox, considerando-se cada casal como uma repetição. Avaliou-se diariamente o número de ovos. Mesmo após a morte de um dos indivíduos do casal a repetição foi mantida para avaliar-se a longevidade.

Após o término do período de oviposição, com os resultados obtidos foi elaborada a tabela de vida de fertilidade para cada combinação de dieta, determinando-se os parâmetros: λ (razão finita de aumento), R_0 (taxa líquida de reprodução), r_m (razão infinitesimal de aumento) e T (duração média de uma geração), baseando-se em Silveira Neto *et al.*(1976). As tabelas de vida de fertilidade foram elaboradas a partir dos seguintes dados: duração do período ovo-adulto, viabilidade do ciclo, período de pré-oviposição, razão sexual, número diário de ovos por fêmea e mortalidade diária de machos e fêmeas.

Influência do substrato de alimentação na susceptibilidade de *E. heros* aos fungos. Os isolados Unioeste 22 (*M. anisopliae*) e Unioeste 46 (*B. bassiana*) obtidos na coleção do Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Unioeste, e previamente selecionados como patogênicos à *E. heros*, foram produzidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), incubando-se as placas por 7-10 dias ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) para conidiogênese. As suspensões foram preparadas misturando-se os conídios em solução estéril de Tween 80 (0,05%), agitando-se em vortex por 5 min, e ultrasonicando por 2 min para homogeneização, procedendo-se as diluições seriadas para contagem em câmara de Neubauer e padronização da concentração da suspensão a ser utilizada (Alves & Moraes 1998). A viabilidade dos conídios foi avaliada previamente segundo Oliveira (2010).

A susceptibilidade dos percevejos aos fungos foi avaliada em dois grupos de bioensaios: i) comparação em cada combinação de dieta, separadamente, da mortalidade ocasionada pelos isolados (dose de 10^5 conídios/inseto); ii) comparação entre as combinações de dietas, da mortalidade ocasionada em cada isolado (dose de 10^4 conídios/inseto). Os fungos foram inoculados em um volume de $1\mu\text{L}$ na articulação das coxas com o metatórax com o auxílio de uma seringa de vidro acoplada a um microaplicador automático (Microaplicador Bukard Manufacturing Co. Ltd, Uxbridge, GBR). Cada tratamento, em ambos ensaios, constaram de 4 repetições contendo 20 percevejos adultos não sexados com 48 horas de emergência, mantidos após o tratamento em gerbox com a respectiva dieta. Os ensaios foram mantidos em estufa incubadora ($26\pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60\pm 10\%$ e 14 horas fotofase) por 12 dias, avaliando-se diariamente a mortalidade e fazendo-se a troca da dieta, sendo os insetos mortos colocados em câmara úmida para confirmação do agente causal.

Contagem de Hemócitos não diferencial (CH). Buscando-se avaliar aspectos da resposta imune dos percevejos, foi realizada a CH dos insetos submetidos à infecção pelos fungos. Para isso, suspensões de 10^8 conídios/mL dos fungos foram inoculadas em percevejos adultos com 48 horas de emergência. Foram utilizadas 3 repetições/tratamento contendo 10 percevejos cada. A inoculação ocorreu com $3\mu\text{L}$ da suspensão, por aplicação tópica e a incubação foi realizada conforme já descrito. As avaliações foram realizadas 24, 42 e 68 horas após a inoculação e em cada tempo avaliado separaram-se aleatoriamente três percevejos de cada tratamento, constituindo-se as repetições. Os insetos foram imobilizados em freezer (-4°C) por 5 minutos e posteriormente com uma tesoura foi realizada uma incisão no espinho pronotal. Coletaram-se $5\mu\text{L}$ de hemolinfa com um micropipetador, transferindo-os para tubos de microcentrífuga contendo $195\mu\text{L}$ de solução tampão anticoagulante ($0,098\text{ M NaOH}$, $0,186\text{ M NaCl}$, $0,017\text{ M EDTA}$, $0,041\text{ M C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Mead *et al.* 1986). A quantificação dos

hemócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com microscópio de luz no aumento de 400 vezes.

Germinação sobre asas de *E. heros*. Utilizando-se a asa metatorácica direita dos percevejos foram avaliados o tamanho médio do tubo germinativo e a frequência de formação de apesórios dos fungos, em cada tratamento. As asas foram dispostas sobre lâminas de vidro colocando-se 5µL de água para auxiliar na fixação. Suspensões de conídios (10^8 /mL) dos fungos foram nebulizadas por 20 segundos com o auxílio de um nebulizador pneumático portátil (Soniclear[®], São Paulo, BRA) sobre as asas, as quais foram incubadas em câmara úmida ($26\pm 2^\circ\text{C}$ e 14 horas fotofase). Após 24h, o tamanho médio do tubo germinativo foi determinado com auxílio de um microscópio de contraste de fase, no aumento de $400\times$, registrando-se 20 medidas de tubos em cada tratamento com câmera fotográfica acoplada ao microscópio. As medidas foram realizadas sempre em conídios germinados que se encontravam entre as nervuras subcostal e R1 das asas, registrando-se e posteriormente analisando as imagens obtidas com o auxílio do programa BelView 7 (BEL Engineering[®], Monza, ITA).

Análises estatísticas. Todos os experimentos foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, sendo as análises realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS/STAT (Sas 2003). Nos experimentos de biologia comparada, avaliação da mortalidade pelos fungos e tamanho do tubo germinativo os dados foram avaliados quanto à variância pelo teste F (ANOVA), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Os parâmetros das tabelas de vida de fertilidade foram obtidos pelo método Jackknife e para as comparações foi utilizado o modelo do programa SAS/STAT (Maia &

Luiz 2006). As comparações de médias do ensaio de CH foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Biologia comparada de *E. heros* em diferentes combinações de dietas naturais.

Verificou-se que a dieta utilizada como alimento pelos percevejos pode influenciar parâmetros biológicos em todas as fases do desenvolvimento.

Na fase de ovo, a dieta Ervilha apresentou o maior tempo necessário para eclosão, em relação as dietas Padrão, Soja e Girassol. Esta mesma dieta apresentou a menor porcentagem de viabilidade de ovos com 62,4%, valores bem inferiores aos obtidos pelas dietas Padrão, Girassol e Gergelim, que apresentaram viabilidade acima dos 80% (Tabelas I e II).

Para fase de ninfa, as dietas Padrão e Soja figuraram dentre as de melhor desempenho, estando sempre entre os menores tempos de desenvolvimento e maiores valores de viabilidade (Tabelas I e II), quando observada diferença entre os tratamentos.

Na avaliação do período total ovo-adulto, a dieta Padrão promoveu o desenvolvimento em menor tempo, com os percevejos levando em média menos de 32 dias para completar o ciclo (Tabela I). Quanto à viabilidade total do ciclo, a dieta Girassol proporcionou os maiores valores com aproximadamente 55%. O pior desempenho foi verificado nas dietas Ervilha e Gergelim, com viabilidade de 27,5% e 32,4%, respectivamente (Tabela II).

Nos parâmetros avaliados na fase adulta, verificou-se que a dieta Ervilha prejudicou a fecundidade das fêmeas, as quais ovipositaram em média 164 ovos, após 40 dias (Tabela III). Dentre os demais tratamentos avaliados não foi verificada diferença significativa, e o número de ovos foi maior que o dobro do obtido na dieta Ervilha.

Tabela I. Duração média em dias dos ínstar e do período ovo-adulto de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs).

Dietas	Duração das fases						
	Fase de ovo	1° ínstar	2° ínstar	3° ínstar	4° ínstar	5° ínstar	Ovo-adulto
PADRÃO	6,0 ± 0,1 B	3,0 ± 0,0 A	6,0 ± 0,1 B	3,5 ± 0,1 C	4,7 ± 0,1 C	8,1 ± 0,2 B	31,4 ± 0,3 B
SOJA	5,9 ± 0,1 B	3,0 ± 0,0 A	7,1 ± 0,1 AB	4,3 ± 0,1 ABC	5,4 ± 0,1 BC	8,5 ± 0,3 AB	34,2 ± 0,3 A
AMENDOIM	6,7 ± 0,1 AB	3,0 ± 0,0 A	7,7 ± 0,2 A	4,9 ± 0,4 A	6,1 ± 0,2 AB	8,1 ± 0,4 B	36,6 ± 0,8 A
GIRASSOL	6,3 ± 0,3 B	3,0 ± 0,0 A	7,0 ± 0,5 AB	4,7 ± 0,1 AB	4,9 ± 0,1 C	8,1 ± 0,2 B	34,1 ± 0,7 A
ERVILHA	7,6 ± 0,6 A	3,0 ± 0,0 A	6,7 ± 0,4 AB	4,8 ± 0,2 AB	5,2 ± 0,4 BC	9,3 ± 0,3 AB	36,5 ± 0,9 A
GERGELIM	6,5 ± 0,3 AB	3,0 ± 0,0 A	6,4 ± 0,1 B	4,0 ± 0,1 BC	7,1 ± 0,3 A	9,5 ± 0,2 A	36,4 ± 0,5 A

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela II. Porcentagem de viabilidade das fases de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs).

Dietas	% de Viabilidade das fases					
	Fase de ovo	2° ínstar	3° ínstar	4° ínstar	5° ínstar	ovo-adulto
PADRÃO	84,0 ± 1,15 A	90,3 ± 1,8 A	86,9 ± 2,3 A	88,9 ± 2,8 AB	84,5 ± 4,2 A	49,5 ± 1,7 AB
SOJA	74,7 ± 5,81 AB	85,5 ± 6,0 A	69,6 ± 9,3 A	79,5 ± 5,1 ABC	93,2 ± 6,8 A	33,9 ± 3,6 ABC
AMENDOIM	74,6 ± 6,35 AB	91,3 ± 3,2 A	74,7 ± 9,5 A	74,9 ± 5,7 BC	90,6 ± 4,0 A	33,54 ± 1,9 ABC
GIRASSOL	82,7 ± 6,36 A	82,4 ± 1,9 A	93,0 ± 3,8 A	92,2 ± 2,8 A	93,5 ± 4,2 A	54,6 ± 2,3 A
ERVILHA	62,4 ± 5,99 B	78,9 ± 2,3 A	85,8 ± 4,3 A	86,9 ± 1,5 AB	75,7 ± 5,7 A	27,5 ± 1,2 C
GERGELIM	80,7 ± 2,40 A	87,0 ± 0,8 A	80,0 ± 6,4 A	65,9 ± 3,6 C	86,7 ± 5,2 A	32,4 ± 2,1 BC

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P<0,05). Dados originais apresentados. Para análise, as porcentagens médias foram transformadas em: $\arcsen\sqrt{x/100}$

A dieta Ervilha também apresentou a maior porcentagem de adultos deformados, sendo que aproximadamente 11% dos insetos possuíam algum tipo de alteração na perna e/ou asas. Na dieta Girassol a porcentagem de deformações foi de 5,7%, e nas demais os valores foram inferiores a 2,5% (Tabela III). As dietas Girassol, Ervilha e Gergelim promoveram uma razão sexual com desvio significativo, tendo maior incidência de machos do que a observada nas dietas Padrão, Soja e Amendoim.

Na avaliação do peso de adultos recém-emergidos, verificou-se que a dieta Gergelim promoveu nos machos os menores valores de peso (64,7 mg em média), em relação as dietas Girassol e Ervilha. As demais dietas apresentaram valores intermediários, não diferindo significativamente (Tabela III). Nas fêmeas, a dieta Gergelim também foi a que proporcionou adultos de menor peso, com 66,8 mg em média, valores estes bem inferiores aos obtidos pelas dietas Padrão, Soja e Amendoim. As dietas Girassol e Ervilha não apresentaram diferença de peso significativa em relação as demais (Tabela III).

Tabela III. Razão sexual, porcentagem de adultos deformados, peso médio de machos e fêmeas e número de ovos por fêmea de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório (26±2°C; UR: 60±10%; fotofase: 14hs).

Dietas	Número de ovos (após 40 dias)	Deformações	Razão sexual ¹	Peso (mg)	
				Machos	Fêmeas
PADRÃO	348,2 ± 31,3 A	1,9%	0,506 A	73,9 ± 2,26 AB	83,7 ± 2,28 A
SOJA	343,1 ± 34,5 A	1,2%	0,524 A	74,1 ± 2,16 AB	82,6 ± 2,60 A
AMENDOIM	379,4 ± 41,1 A	2,4%	0,473 A	73,5 ± 2,32 AB	82,1 ± 2,73 A
GIRASSOL	379,1 ± 32,5 A	5,7%	0,404 B	74,4 ± 2,73 A	74,3 ± 2,91 AB
ERVILHA	163,6 ± 35,8 B	10,8%	0,457 B	75,2 ± 2,10 A	77,1, ± 3,10 AB
GERGELIM	386,2 ± 45,4 A	1,9%	0,451 B	64,7 ± 2,25 B	66,8 ± 4,15 B

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P<0,05).

¹n° de fêmeas/(n° de machos + n° de fêmeas). Deformações e Razão Sexual (N): Padrão (163), Soja (184), Amendoim (185), Girassol (123), Ervilha (86), Gergelim (104).

Os resultados obtidos na tabela de vida de fertilidade (Tabela IV), de maneira geral, evidenciaram ainda mais o observado nas avaliações em cada fase do desenvolvimento dos percevejos, pois a dieta Padrão figurou sempre entre as de melhor resultado nos parâmetros analisados e as dietas Ervilha e Gergelim estiveram sempre entre os piores. Vale ressaltar também que as dietas Soja e Girassol não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela IV. Tabela de vida de fertilidade de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, em condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs) (Método Jackknife).

Dietas	Parâmetros ¹				
	Ro	T	TD	rm	λ
PADRÃO	87,0 A	50,9 D	7,89 E	0,0877 A	1,0917 A
SOJA	66,0 AB	56,4 C	9,32 D	0,0743 B	1,0771 B
AMENDOIM	69,9 AB	61,6 AB	10,04 C	0,0689 C	1,0714 C
GIRASSOL	84,9 A	59,9 BC	9,36 D	0,0740 B	1,0768 B
ERVILHA	27,8 C	58,9 BC	12,26 A	0,0561 E	1,0581 E
GERGELIM	57,4 B	63,7 A	10,91 B	0,0635 D	1,0655 D

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si segundo o teste t Student ($P < 0,05$). ¹ Taxa líquida de reprodução (Ro), intervalo médio entre gerações (T), tempo para população duplicar em número (TD), taxa intrínseca de crescimento (rm), razão finita de aumento (λ).

Analisando individualmente cada parâmetro, considerando a Taxa líquida de reprodução (Ro), as dietas Padrão e Girassol apresentaram valores equivalentes a quase 3 vezes o observado na dieta Ervilha. As dietas Soja e Amendoim também estiveram dentre as de maior Ro, porém, não diferindo significativamente da dieta Gergelim. No Intervalo médio entre gerações (T), para dieta Padrão foram necessários menos de 51 dias, em média. O pior desempenho neste parâmetro foi verificado em Gergelim seguida da Amendoim, demonstrando que pode se passar mais de 63 e 61 dias, respectivamente, entre as gerações criadas nestas dietas. Quanto ao Tempo para população duplicar em número (TD) observou-se que na dieta Padrão seriam necessários menos de 8 dias para que isso acontecesse. Já na dieta

Ervilha este tempo seria superior a 12 dias e na dieta Gergelim quase 11 dias, sendo estas as que apresentaram o pior desempenho neste parâmetro. Verificou-se que os insetos alimentados com a dieta Padrão apresentaram valores da Taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) maiores (0,0877) que nas dietas Ervilha e Gergelim, as quais proporcionaram os menores valores observados. Isso também ocorreu para Razão finita de aumento (λ), sendo em ordem decrescente de valores os obtidos nas dietas Padrão (1,0917), Soja (1,0771) e Girassol (1,0768), Amendoim (1,0714), Gergelim (1,0655) e o menor observado em Ervilha (1,0581) (Tabela IV).

Influência do substrato de alimentação na susceptibilidade de *E. heros* aos fungos. Na comparação da mortalidade ocasionada pelos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em cada combinação de dieta, somente para os insetos criados na dieta Gergelim foi possível observar diferença entre os fungos testados ($F=227,8$; C.V.=11,6; $P<0,0001$), sendo que o isolado Unioeste 22 de *M. anisopliae* foi mais virulento, ocasionando 55% de mortalidade confirmada contra 40% do isolado de *B. bassiana* Unioeste 46 (Tabela V).

Tabela V. Mortalidade confirmada (%) de *Euschistus heros* separadamente em cada combinação de dietas naturais, ocasionada por isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), em condições de laboratório ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs).

Dietas ¹	Tratamentos		
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle
PADRÃO	48,3 ± 2,7 a	43,3 ± 4,0 a	0,0 ± 0,0 b
SOJA	41,7 ± 1,1 a	35,0 ± 3,2 a	0,0 ± 0,0 b
AMENDOIM	61,7 ± 2,0 a	63,3 ± 3,7 a	0,0 ± 0,0 b
GIRASSOL	53,3 ± 2,9 a	51,7 ± 2,7 a	0,0 ± 0,0 b
ERVILHA	57,5 ± 3,9 a	52,5 ± 1,6 a	0,0 ± 0,0 b
GERGELIM	40,0 ± 2,6 b	55,0 ± 1,8 a	0,0 ± 0,0 c

Médias (\pm EPM) seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P<0,05$). Para análise, as porcentagens médias foram transformadas em $\arcsen\sqrt{x/100}$

Dose utilizada em microaplicação de $1\mu\text{L} = 10^5$ conídios; N = 240 insetos/ dieta

¹PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol; SOJA: vagens de feijão e grãos de soja; AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim; GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol; ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha; GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim.

Nas demais dietas, ambos os fungos ocasionaram valores de mortalidade que não diferiram entre si, demonstrando equivalência de atividade entre os isolados na concentração avaliada.

Comparando-se a mortalidade obtida em cada fungo, nas diferentes combinações de dietas, verificou-se que a dieta utilizada na alimentação pode influenciar a mortalidade ocasionada pelos fungos, observando-se diferenças significativas entre as dietas nas mortalidades total ($F=16,1$; C.V.=17,3; $P<0,0001$) e confirmada ($F=43,6$; C.V.=14,5; $P<0,0001$) para *B. bassiana*, e também total ($F=10,8$; C.V.=20,4; $P<0,0001$) e confirmada ($F=34,8$; C.V.=15,3; $P<0,0001$) para *M. anisopliae* (Tabela VI).

Tabela VI. Mortalidades total e confirmada (%) de *Euschistus heros*, criados em diferentes combinações de dietas naturais, ocasionada por *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), em condições de laboratório ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs).

Dietas ¹	% de Mortalidade			
	<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	Total	Confirmada	Total	Confirmada
CONTROLE	6,3 ± 1,3 C	0,0 ± 0,0 C	6,7 ± 1,2 C	0,0 ± 0,0 C
PADRÃO	25,0 ± 3,0 B	16,7 ± 2,2 B	52,1 ± 7,5 B	50,0 ± 2,2 AB
SOJA	52,1 ± 3,9 A	37,5 ± 1,5 A	81,3 ± 2,5 AB	52,1 ± 1,32 AB
AMENDOIM	52,1 ± 3,3 A	31,3 ± 2,5 A	85,4 ± 4,5 A	54,2 ± 2,6 A
GIRASSOL	52,1 ± 4,5 A	35,4 ± 3,3 A	70,8 ± 9,3 AB	58,3 ± 5,7 A
ERVILHA	39,6 ± 2,5 AB	27,1 ± 1,3 AB	58,3 ± 3,0 B	37,5 ± 2,6 B
GERGELIM	60,4 ± 2,5 A	41,7 ± 2,2 A	87,5 ± 3,4 A	47,9 ± 3,9 AB

Médias (\pm EPM) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P<0,05$). Para análise, as porcentagens médias foram transformadas em $\arcsen\sqrt{x/100}$

Dose utilizada em microaplicação de $1\mu\text{L} = 10^4$ conídios; N = 560 insetos/fungo.

¹PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol; SOJA: vagens de feijão e grãos de soja; AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim; GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol; ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha; GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim

Para o fungo *B. bassiana*, nas mortalidades total e confirmada é possível verificar que a análise estatística expressou exatamente o mesmo resultado entre as dietas. Os percevejos

criados nos tratamentos Soja, Amendoim, Girassol e Gergelim apresentaram maior mortalidade em relação aos do tratamento Padrão, no qual a mortalidade total e confirmada foi de apenas 25% e 16,7%, respectivamente. Já os percevejos do tratamento Ervilha apresentaram valores intermediários de mortalidade total e confirmada com 39,6% e 27,1%, respectivamente, não diferindo dos demais tratamentos.

Os maiores valores de mortalidade total por *M. anisopliae* foram observados nas dietas Amendoim (85,4%) e Gergelim (87,5%), em relação as dietas Padrão (52,1%) e Ervilha (58,3%). As dietas Soja e Girassol, propiciaram valores de mortalidade intermediários, que não diferiram das demais. Quanto à mortalidade, confirmada os maiores valores foram obtidos com os percevejos das dietas Amendoim (54,2%) e Girassol (58,3%), em relação aos do tratamento Ervilha (37,5%). Os percevejos alimentados com as dietas Padrão, Soja e Gergelim apresentaram mortalidade confirmada semelhante aos demais, não diferindo significativamente (Tabela VI).

Contagem de Hemócitos. Os resultados observados na avaliação geral da resposta imune dos percevejos a infecção pelos fungos mostraram-se pouco conclusivos, sendo observadas diferenças significativas somente nos ensaios com as dietas Padrão e Ervilha. Nos insetos provenientes das demais dietas, não foi verificada diferença significativa entre o número de hemócitos dos *E. heros* inoculados com os fungos e o tratamento controle, nem entre os períodos de avaliação (Tabela VII).

Tabela VII. Número total de hemócitos ($\times 10^4$) por microlitro de hemolinfa de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais e avaliados 24, 42 e 68 horas após a aplicação dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), sob condições de laboratório ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14hs).

Dietas	Tratamentos	Período de avaliação (horas após aplicação)		
		24 horas	42 horas	68 horas
PADRÃO	Controle	34,0 \pm 19,1 Aa	63,7 \pm 10,4 Aa	47,1 \pm 8,6 Aa
	<i>M. anisopliae</i>	20,3 \pm 2,8 Aa	42,5 \pm 9,8 Aa	23,6 \pm 0,9 Ba
	<i>B. bassiana</i>	17,5 \pm 2,1 Ab	52,1 \pm 4,8 Aa	12,2 \pm 1,0 Bb
SOJA	Controle	29,1 \pm 8,1 Aa	71,6 \pm 39,7 Aa	35,9 \pm 12,7 Aa
	<i>M. anisopliae</i>	76,7 \pm 30,6 Aa	83,8 \pm 51,7 Aa	65,7 \pm 37,7 Aa
	<i>B. bassiana</i>	93,9 \pm 18,5 Aa	38,7 \pm 16,8 Aa	77,7 \pm 41,9 Aa
AMENDOIM	Controle	39,1 \pm 3,3 Aa	75,5 \pm 35,7 Aa	24,5 \pm 5,0 Aa
	<i>M. anisopliae</i>	60,6 \pm 40,7 Aa	58,4 \pm 36,0 Aa	75,8 \pm 28,9 Aa
	<i>B. bassiana</i>	45,3 \pm 7,2 Aa	55,7 \pm 2,6 Aa	58,3 \pm 22,7 Aa
GIRASSOL	Controle	25,1 \pm 7,2 Aa	12,5 \pm 2,3 Aa	16,7 \pm 4,5 Aa
	<i>M. anisopliae</i>	15,3 \pm 3,4 Aa	17,7 \pm 0,3 Aa	18,4 \pm 2,6 Aa
	<i>B. bassiana</i>	20,1 \pm 1,3 Aa	20,1 \pm 5,8 Aa	25,1 \pm 7,5 Aa
ERVILHA	Controle	29,3 \pm 12,6 Aa	38,9 \pm 3,7 Aa	40,3 \pm 11, Ba
	<i>M. anisopliae</i>	29,2 \pm 10,2 Ab	44,5 \pm 5,1 Ab	110,6 \pm 29,3 Aa
	<i>B. bassiana</i>	34,9 \pm 21,5 Aa	56,2 \pm 20,2 Aa	40,8 \pm 10, Ba
GERGELIM	Controle	14,8 \pm 9,0 Aa	14,3 \pm 1,8 Aa	36,9 \pm 17,5 Aa
	<i>M. anisopliae</i>	30,4 \pm 12,4 Aa	23,6 \pm 5,2 Aa	27,5 \pm 6,7 Aa
	<i>B. bassiana</i>	13,9 \pm 2,1 Aa	14,4 \pm 1,4 Aa	12,3 \pm 3,1 Aa

Médias (\pm EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada dieta, não diferem entre si segundo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\text{Log}(\chi)$.

¹PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol; SOJA: vagens de feijão e grãos de soja; AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim; GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol; ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha; GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim.

Na dieta Padrão observou-se que os hemócitos dos insetos apresentaram redução do seu número em relação ao tratamento controle, 68 horas após a inoculação, em ambos os

fungos ($F=33,9$; $P=0,0273$). Comparando-se os períodos de avaliação, somente o fungo *B. bassiana* ocasionou aumento significativo no número de hemócitos, 42 horas após a aplicação ($F=52,7$; $P=0,039$), diferindo dos demais períodos avaliados.

Nos percevejos alimentados com Ervilha e inoculados com o fungo *M. anisopliae*, verificou-se que 68 horas após, o número de hemócitos aumentou de maneira significativa, em relação aos demais períodos avaliados ($F=34,3$; $P=0,0495$) e também em relação aos demais tratamentos ($F=15,8$; $P=0,0490$).

Germinação sobre asas de *E. heros*. As asas oriundas de percevejos criados nas diferentes combinações de dietas naturais serviram de substrato para germinação e o tamanho do tubo germinativo dos conídios de ambos os fungos foi influenciado pelos tratamentos avaliados (Figs. 1 e 2).

O fungo *B. bassiana* teve maior comprimento de tubo germinativo quando foi inoculado sobre as asas de insetos alimentados com a dieta Amendoim, em relação aos tratamentos Girassol, Ervilha e Gergelim ($F=5,9$; C.V.=10,1; $P=0,0003$) os quais prejudicaram o crescimento do fungo. Nos tratamentos Padrão e Soja, os tubos apresentaram maior tamanho quando comparados aos obtidos nos tratamentos Girassol e Gergelim (Fig. 1).

Já para o fungo *M. anisopliae*, os tratamentos Padrão, Amendoim e Gergelim proporcionaram o maior crescimento de tubos germinativos observado, comparando-se com os tratamentos Soja e Ervilha, os quais influenciaram negativamente este parâmetro do fungo ($F=7,5$; C.V.=7,5; $P<0,0001$) (Fig. 2). O tratamento Girassol diferiu somente do Gergelim, apresentando valores intermediários de crescimento.

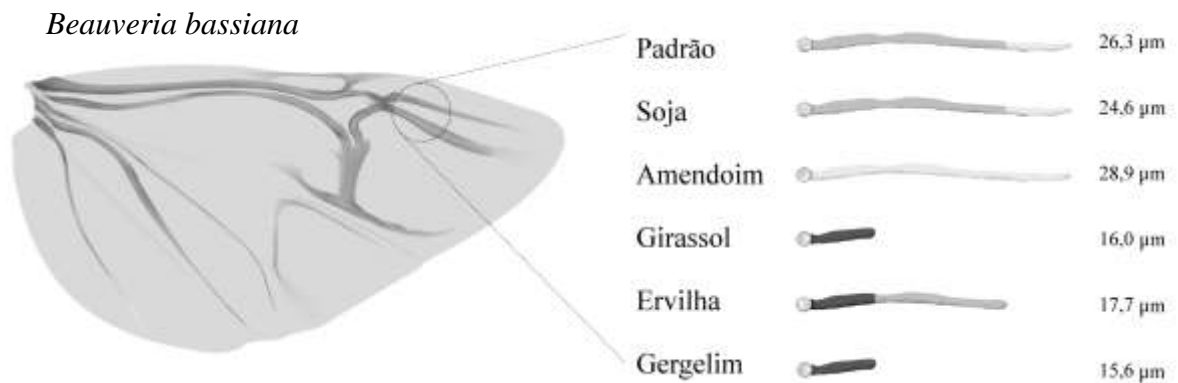


Fig. 1. Comprimento (μm) do tubo germinativo de conídios de *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $90\pm 10\%$; fotofase: 14hs). Tubos germinativos que apresentam mesmo tamanho e/ou coloração, não diferem entre si segundo teste de Tukey ($P < 0,05$).

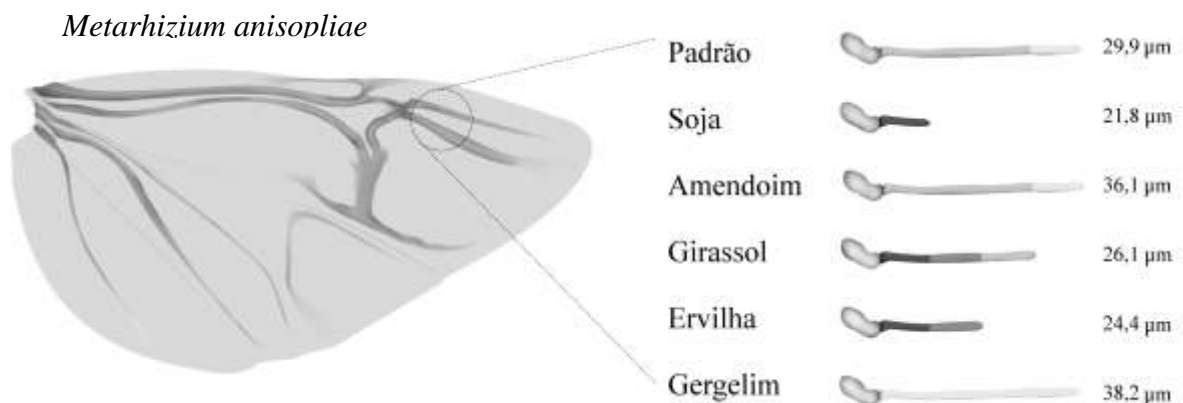


Fig. 2. Comprimento (μm) do tubo germinativo de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22) sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^\circ\text{C}$; UR: $90\pm 10\%$; fotofase: 14hs). Tubos germinativos que apresentam mesmo tamanho e/ou coloração, não diferem entre si segundo teste de Tukey ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram a importância da dieta para o adequado desenvolvimento de *E. heros* e a relação que o estado nutricional dos percevejos pode

apresentar com a susceptibilidade e com aspectos comportamentais dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Quanto ao efeito da dieta na biologia dos percevejos, sabe-se que a reprodução, sobrevivência, e o desenvolvimento do inseto como um todo são altamente afetados pelo recurso alimentar explorado (Panizzi & Slansky Junior 1991). Para *E. heros*, já foi comprovado que a dieta influencia inclusive na produção de feromônios (Moraes *et al.* 2008). De acordo com os dados aqui obtidos, na relação dieta/praga, o efeito negativo nos parâmetros biológicos de *E. heros* foi observado nos tratamentos com combinações restritivas (tratamentos Soja, Amendoim, Girassol, Ervilha, Gergelim), os quais continham somente um tipo exclusivo de fonte de nutrientes (grãos). Todas estas combinações de dietas propiciaram maior tempo para o desenvolvimento ovo-adulto, quando comparadas a dieta Padrão. Segundo Panizzi & Silva (2009), insetos fitófagos alimentados em dietas nutricionalmente inadequadas tendem a prolongar seu desenvolvimento para acumular a energia e reservas nutricionais necessárias à mudança de estágio. No Tratamento Padrão, ficou evidente que a diversidade de grãos, e conseqüentemente de nutrientes, disponíveis como alimento fornece condições mais adequadas para o desenvolvimento dos percevejos, uma vez que esta dieta sempre figurou dentre as que proporcionaram o menor tempo de duração dos estádios e estágios, maior viabilidade, maior fecundidade e fertilidade, e melhores índices na tabela de vida.

Resultados semelhantes foram obtidos por Azambuja *et al.* (2013), que avaliaram os parâmetros biológicos de *E. heros* criados em dieta natural padrão (vagens de feijão, grãos de amendoim e frutos de ligustro) comparando-as com dietas restritivas contendo somente partes de plantas (vagens de soja, sementes de soja, botões florais de algodão, maçã de algodão ou sementes de algodão). A dieta padrão testada, que apresentava variedade de fontes

nutricionais, figurou entre as de melhor desempenho para o desenvolvimento dos percevejos em todos os parâmetros avaliados pelos autores.

Os insetos necessitam de nutrientes em condições balanceadas quali e quantitativamente, e as variações encontradas nos resultados dos parâmetros biológicos nas dietas restritivas avaliadas no presente estudo evidenciam esta condição. Como exemplo, a dieta Girassol, apesar de apresentar ótimos resultados para alguns parâmetros (viabilidade, peso de machos, taxa líquida de reprodução), provocou elevado índice de adultos com deformações, o que pode estar associado à deficiência ou desbalanceamento de nutrientes (Parra 2010).

Analisando-se as qualidades nutricionais dos grãos avaliados nos tratamentos, tendo como base uma tabela referência (Unicamp-NEPA 2011), ressalta-se que apesar de possuir grande quantidade de lipídios (próximo à 50% da composição), as sementes de girassol possuem menor quantidade de carboidratos (menos de 17%) e proteínas (menos de 20%). Já a soja, possui equilibrada quantidade de carboidratos (mais de 38%) e proteínas (mais de 36%), e baixa quantidade de lipídios (menos de 15%). O amendoim apresenta mais de 46% de lipídios em sua composição e menores valores de carboidratos (20%) e proteínas (menos de 27%). O gergelim também tem elevado percentual de lipídios (40%), com menores valores de carboidratos (10%) e proteínas (20%) em sua composição. Todos estes grãos citados, mesmo com suas particularidades, apresentam elevado valor energético, acima de 400kcal em porções de 100g. Já os grãos de ervilha possuem baixo valor energético, menos de 74kcal, e em sua composição apresentam poucos nutrientes disponíveis, sendo menos de 13% de carboidratos, menos de 5% de proteínas e valores inferiores a 1% de lipídios.

Estas informações corroboram os resultados observados neste trabalho e também por Azambuja *et al.* (2013), demonstrando que ao oferecer uma variedade de grãos aos percevejos disponibilizam-se diferentes fontes nutricionais com qualidades e quantidades distintas, o que

influencia positivamente aspectos do desenvolvimento dos insetos, como constatado na avaliação dos parâmetros biológicos. Além disso, explicam o péssimo desempenho observado no tratamento Ervilha, pois fica claro que os nutrientes disponíveis nesta espécie não são suficientes para o desenvolvimento adequado dos percevejos. É importante evidenciar também, que segundo as informações nutricionais da mesma tabela, todos os grãos têm normalmente umidade inferior a 7%, o que demonstra a importância de oferecer as vagens frescas de feijão como fonte de água, a qual representa mais de 90% da composição das vagens.

A espécie de planta em que o inseto fitófago se alimenta pode afetar positiva e negativamente não só a sua biologia, como foi observado, mas também os seus inimigos naturais, de forma direta ou indireta, em complexas interações multitróficas (Legaspi *et al.* 1996; Silva *et al.* 2004). Para melhor compreender isto, as interações entre inimigos naturais/insetos-praga/plantas precisam ser estudadas, e evidências da influência da nutrição dos insetos sobre aspectos do desenvolvimento de seus predadores (Kennedy 2003; Pessoa *et al.* 2003; Silva *et al.* 2004), parasitoides (Harvey *et al.* 1995; Reis *et al.* 2003) e patógenos já foram relatadas (Salama & Abdel-Razek 1992; Poprawski & Jones 2000; Santiago-Alvarez *et al.* 2006).

No caso dos patógenos, as fontes nutricionais disponíveis para os insetos, quando inadequadas, podem influenciar a capacidade de investir mais recursos no sistema imunológico (Triggs & Knell 2012). Contudo, não foi possível observar aqui neste trabalho a influência da dieta na resposta imunológica, nas condições avaliadas. A contagem total de hemócitos apresentou resultados pouco elucidativos, não sendo verificada diferença nas avaliações realizadas, fazendo-se necessários novos estudos para compreender os possíveis efeitos para *E. heros*.

Especificamente para os fungos entomopatogênicos, o estado nutricional do inseto têm profundo impacto também sobre fatores determinantes para a evolução da doença, incluindo a velocidade de germinação dos conídios, a adesão à cutícula, a formação de apressórios e grampos de penetração, e a produção de micélio (Shah *et al.* 2005; Sosa-Gómez 2012), sendo que a nutrição inadequada (ou estresse nutricional) do inseto pode aumentar a susceptibilidade à estes fungos (Santiago-Alvarez *et al.* 2006; Lord 2010). A susceptibilidade também pode ser influenciada por componentes presentes na cutícula dos insetos, sendo que os conídios fúngicos podem sofrer efeito tóxico, fungistático, e ocasionalmente, para algumas espécies, até estimulante (Sosa-Gómez *et al.* 1997; Gillespie *et al.* 2000; Santiago-Alvarez *et al.* 2006).

Além disso, nas relações patógeno-hospedeiro deve-se considerar o estado nutricional do fungo previamente à infecção (James 2001; Sha *et al.* 2005; Gao *et al.* 2007; Rangel *et al.* 2008). Assim, o sucesso da infecção em situações naturais depende também das condições encontradas pelo patógeno durante o período vegetativo que dará origem às estruturas infectivas, neste caso, os conídios. Considerando-se que nas condições de nossos experimentos, todos os conídios foram provenientes do mesmo meio de cultura, o desenvolvimento do processo de infecção foi influenciado somente pela cutícula e pelo estado nutricional dos percevejos, e nos resultados obtidos aqui, foi possível observar estes efeitos na susceptibilidade aos fungos.

Primeiramente com relação à cutícula, é nela que as fases iniciais do processo de infecção ocorrem, a adesão, a germinação e formação de estruturas invasivas, e o início da fase de penetração, sendo que as condições encontradas pelo patógeno na superfície da cutícula podem influenciar fortemente o início da infecção e conseqüentemente os demais estágios de desenvolvimento da doença (Hajek & St Leger 1994; Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013). O ensaio de germinação demonstrou que a composição da cutícula sofre alterações de acordo com a dieta utilizada na alimentação, e estas diferenças foram significativas no efeito

sobre a germinação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, já que nas avaliações, o tamanho do tubo germinativo de ambos fungos variou dependendo da dieta. As asas oriundas da dieta Amendoim sempre estiveram dentre as com maior crescimento do tubo germinativo das duas espécies de fungo, e as das dietas Girassol e Ervilha sempre estiveram dentre as que influenciaram negativamente o crescimento, além das demais dietas que apresentaram resultados variados. É possível que o efeito positivo na germinação e crescimento visto no tratamento Amendoim, esteja relacionado à maior susceptibilidade dos insetos criados nesta dieta à *B. bassiana* e *M. anisopliae*, pois comparando-se aos dados de mortalidade, tanto total quanto confirmada, observa-se que a dieta Amendoim sempre esteve dentre as que produziram percevejos mais susceptíveis às duas espécies de fungo. Do mesmo modo, o efeito negativo observado nas asas da dieta Ervilha, se confirmou nos dados de mortalidade, pois os percevejos criados nesta dieta figuraram sempre dentre os de menor susceptibilidade.

Pode-se ainda relacionar os resultados da dieta Gergelim, que esteve entre os tratamentos com maior crescimento do tubo germinativo para *M. anisopliae*, e de maneira oposta, apresentou efeito negativo no crescimento do tubo de *B. bassiana*. No ensaio de comparação entre os isolados, os percevejos criados na dieta Gergelim já haviam demonstrado susceptibilidade diferencial entre os fungos, sendo mais susceptíveis ao isolado Unioeste 22 de *M. anisopliae*. É possível que algum componente da cutícula dos percevejos criados na dieta Gergelim seja prejudicial aos conídios de *B. bassiana* mas não aos de *M. anisopliae*. Nas demais dietas que apresentaram efeitos no crescimento germinativo não foi possível observar uma relação aos dados de mortalidade.

A dieta Padrão, apesar de produzir insetos dentre os menos susceptíveis para ambos os fungos, não apresentou efeito no crescimento germinativo dos conídios. Acredita-se que neste caso, os percevejos criados nesta dieta apresentavam melhor estado nutricional, conforme observado nos resultados dos parâmetros biológicos, e esta condição proporcionou maior

tolerância à infecção. Outros autores já verificaram o efeito do aporte nutricional na susceptibilidade de insetos à fungos entomopatogênicos e obtiveram resultados que corroboram os observados neste trabalho. Comparando-se dietas, Lord (2010) constatou que adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) alimentados com farelo de arroz, dieta considerada subótima para estes insetos, apresentaram mortalidade por *B. bassiana* duas vezes maior que os alimentados na dieta nutricionalmente mais adequada (farinha de trigo + levedo de cerveja). Santiago-Alvarez *et al.* (2006) verificaram, entre as dez dietas naturais avaliadas, que a mortalidade ocasionada por *B. bassiana* em *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) foi significativamente afetada pela planta utilizada como alimento por estes insetos, observando-se implicações na susceptibilidade, tempo de sobrevivência e produção de conídios em cadáveres, comprovando que os insetos que utilizam alimentos de melhor qualidade nutricional são menos susceptíveis aos agentes patogênicos.

Além do efeito do estado nutricional, os mesmos autores apontam que compostos presentes na cutícula dos insetos ou sequestrados das fontes de alimento podem influenciar negativamente os entomopatógenos, e isto já foi demonstrado para fungos (Nishida *et al.* 1992; Tallamy *et al.* 1998; Poprawski & Jones 2000; Poprawski *et al.* 2000; Klingen *et al.* 2002).

No presente trabalho, a avaliação da presença e a identificação de compostos antifúngicos na cutícula dos percevejos não foi realizada, no entanto, conforme foi observado nos resultados, estudos neste sentido são necessários. Essas informações poderiam auxiliar na compreensão da composição da cutícula de *E. heros*, contribuindo para aumentar o conhecimento sobre as relações multitróficas que envolvem a interação patógenos/insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- Alves, S.B. & Moraes, S.A. 1998. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. p. 765-777. In: S.B. Alves. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Azambuja, R., Degrande, P.E. & Pereira, F.F. 2013. Comparative biology of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. **Neotropical Entomology** **42**: 359–365.
- Corrêa-Ferreira, B.S. 2005. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **40**: 1067-1072.
- Cory, J.S. & Myers, J.H. 2004. Adaptation in an insect host-plant pathogen interaction. **Ecology Letters** **7**: 632–639.
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z. & Che, Y.S. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycological Research** **111**: 87–92.
- Gillespie, J.P., Bailey, A.M., Cobb, B. & Vilcinskas, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of Insect Physiology and Biochemistry** **44**: 49-68, 2000.
- Hajek, A.E. & St Leger, R.J. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology** **39**: 293-322.

Harvey, J.A., Harvey, I.F. & Thompson, D.J. 1995. The effect of host nutrition on growth and development of the parasitoid wasp *Venturia canescens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **75**: 213-220.

Ihara, F., Toyama, M., Mishiro, K. & Yaginuma, K. 2008. Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. **Applied Entomology and Zoology** **43**: 503-509.

James, R.R. 2001. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology** **77**: 99-107.

Kennedy, G.G. 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: Tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. **Annual Review of Entomology** **48**: 51-72.

Klingen, I., A. Hajek, R. Meadow & Renwick, J.A.A. 2002. Effect of brassicaceous plants on the survival and infectivity of insect pathogenic fungi. **BioControl** **47**: 411- 425.

Legaspi, J.C., Nordlund, D.A. & Legaspi Junior, B.C. 1996. Tri-trophic interactions and predation rates in *Chrysoperla* spp. attacking the silverleaf whitefly. **Southwestern Entomologist** **21**: 33-42.

Lord, J.C. 2010. Dietary stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology** **103**: 1542-1546.

Maia, A.H.N. & Luiz, A.J.B. 2006. Programa SAS para análise de tabelas de vida e fertilidade de artrópodes: o método Jackknife. **Comunicado Técnico 33**. Embrapa: Jaguariúna, 11p.

Mead, G.P., Ratcliffe, N.A. & Renwartz, L. R. 1986. The separation of insect hemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. **Journal of Insect Physiology 67**: 167-177.

Moraes, M.C.B., Borges, M., Pareja, M., Vieira, H.G., Sereno, F.T.P.S., Laumann, R.A. 2008. Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. **Physiological Entomology 33**: 43–50.

Moscardi, F., Corrêa -Ferreira, B.S.; Villas Boas, G.L., Leite, L.G. & Zamataro, C.E. 1985. Avaliação de fungos entomógenos sobre percevejos-pragas da soja, em laboratório. In: **Resultados de Pesquisa de Soja 1984–1985**, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil. p. 91–98.

Moscardi, F., Corrêa-Ferreira, B.S., Diniz, M.C. & Bono, I.L.S. 1988. Incidência estacional de fungos entomógenos sobre populações de percevejos-pragas da soja. In: **Resultados de Pesquisa de Soja 1986–1987**, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil, p. 90.

Nishida, R., Yokoyama, M. & Fukami, H. 1992. Sequestration of cucurbitacin analogs by new and old world chrysomelid leaf beetles in the tribe Luperini. **Chemoecology 3**: 19-24.

Oliveira, D.G.P. 2009. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável.** Piracicaba, 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N.O. 2013. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects 4**: 357-374.

Panizzi, A.R. 2013. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology 42**: 119–127.

Panizzi A.R. & Slansky Jr, F. 1991. Suitability of selected legumes and the effect of nymphal and adult nutrition in the southern green stink bug (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology 84**: 103–113.

Panizzi A.R. & Silva, F.A.C. 2009. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). In: Panizzi A.R. & Parra, J.R.R. (eds). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas.** Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p.465–522.

Panizzi, A.R. & Vivan, L.M. 1997. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in over- wintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata 82**: 213–217.

Parra, J.R.P. 2010. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico.** USP/ESALQ, 567p.

Pessoa, L.G.A., Souza, B., Silva, M.G. & Carvalho, C.F. 2003. Efeito de cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) sobre alguns aspectos biológicos das fases imaturas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Arquivos do Instituto Biológico 70**: 429-433.

Poprawski, T.J. & Jones, W.J. 2000. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia* whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Mycopathologia 151**: 11–20.

Poprawski, T.J., Greenberg, S.M. & Ciomperlik, M.A. 2000. Effect of host plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* induced mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology 29**: 1048–1053.

Rangel, D.E.N., Alston, D.G. & Roberts, D.W. 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research 112**: 1355–1361.

Reis, J., Oliveira, L. & Garcia, P. 2003. Effects of larval diet of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) on the performance of the parasitoid *Glyptapanteles militares* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology 32**: 180-186.

Salama, H.S. & Abedel-Razek, A. 1992. Effect of different kinds of food on susceptibility of some stored products insects to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Entomology** **113**:107–10.

Santiago-Álvarez, C., Maranhão, E.A., Maranhão, E. & Quesada-Moraga, E. 2006. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. **BioControl** **51**:519–32.

Sas Institute. **SAS/STAT. User's Guide**. Versão 9.1.3, Cary, NC, USA. 2002/2003.

Shah, F.A., Wang, C. S. & Butt, T.M.. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters** **251**:259-266.

Silva, C.G., Souza, B., Auad, A.M., Bonani, J.P., Torres, L.C., Carvalho, C.F. & Ecole, C.C. 2004. Desenvolvimento das fases imaturas de *Chrysoperla externa* alimentadas com ninfas de *Bemisia tabaci* criadas em três hospedeiros. **Pesquisa agropecuária brasileira** **39**: 1065-1070.

Silva, C.C., Laumann, R.A., Blassioli, M.C., Pareja, M. & Borges, M. 2008. *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa agropecuária brasileira** **43**: 575-580.

Silveira Neto, S., Nakano, O., Barbin, D. & Villa Nova, N. A. 1976. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo, Ceres, 419p.

Sosa-Gómez, D.R. 2012. Implications of plant hosts and insect nutrition on entomopathogenic diseases. In: Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. (Eds). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. CRC Press, p.195-210.

Sosa-Gómez, D.R., Silva, J.J., Lopes, N.I.O., Corso, I.C., Almeida, A.M.R., Moraes, G.C.P. & Baur, M.E. 2009. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology** **102**:1209–1216.

Sosa-Gómez, D.R., Gazzoni, D.L., Corrêa-Ferreira, B.S. & Moscardi, F. 1993. Pragas da soja e seu controle. In: Arantes, N.E.P., Souza, I.M. (Eds.). **Cultura da soja nos cerrados**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, São Paulo, p.299-331.

Sosa-Gómez, D.R., Boucias D.G. & Nation, J.L. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology** **69**: 31-39.

Sosa-Gómez, D.R. & Moscardi, F. 1998. Laboratory and Field Studies on the Infection of Stink Bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** **71**: 115-120.

Tallamy, D.W., Whittington, D.P., Defurio, F., Fontaine, D.A., Gorski, P.M. & Gothro, P.W. 1998. Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology** **27**:66–372.

Triggs, A. & Knell, R.J. 2012. Interactions between environmental variables determine immunity in the indian meal moth *Plodia interpunctella*. **Journal of Animal Ecology** **81**: 386–394.

Unicamp - NEPA. 2011. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. Campinas, 4^a ed., 161p.

Vilcinskas, A. & Götz, P. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. **Advances in Parasitology** **43**: 267-313.

Wang, C. & St Leger, R.J. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell** **4**: 937-947.

3 CAPÍTULO II - Compostos cuticulares de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) criados em diferentes dietas naturais e seu papel nos estágios iniciais da infecção por fungos entomopatogênicos

Daian Guilherme Pinto de Oliveira
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS
Rodovia PR 182, km 466, Caixa Postal 253,
CEP 85770-000 - Realeza, PR
email: daian.oliveira@uffs.edu.br/
daianguilherm@yahoo.com.br

Compostos Cuticulares de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) Criados em Diferentes Dietas Naturais e seu Papel nos Estágios Iniciais da Infecção por Fungos Entomopatogênicos

D.G.P. OLIVEIRA¹, L.F.A. ALVES², D.R. SOSA-GÓMEZ³

¹UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul, Rodovia PR 182, Km 466, Caixa Postal 253, 85770-000, Realeza, PR, Brasil. daian.oliveira@uffs.edu.br

²UNIOESTE, Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Cascavel, PR, Brasil. luis.alves@unioeste.br

³EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPSO, Londrina, PR, Brasil. daniel.sosa-gomez@embrapa.br

Compostos Cuticulares de *Euschistus heros* e seu Efeito sobre Fungos

Resumo - O presente estudo avaliou os efeitos de componentes cuticulares de *Euschistus heros* na adesão, germinação/tamanho do tubo germinativo e formação de apressórios de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma). Obtiveram-se os extratos cuticulares (brutos e frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas) em adultos e exúvias dos percevejos alimentados em seis combinações de dietas naturais: Padrão (Vagens de feijão+grãos de soja, amendoim, girassol), e nas demais ofereceram-se vagens de feijão mais o respectivo grão exclusivamente (Soja; Amendoim; Girassol; Ervilha ou Gergelim). Verificou-se que a adesão de conídios foi promovida em alguns tratamentos, como nos extratos brutos de adultos dos insetos criados em Ervilha, para Bb e Ma, apresentando até quatro vezes mais conídios aderidos que o Controle. Contrariamente, a adesão foi prejudicada em todos os tratamentos com a fração metanólica, na qual os compostos polares presentes além de não servirem como substrato de adesão, repeliram os conídios. A germinação e o tamanho do tubo germinativo dos fungos também foram influenciados pelos tratamentos, que apresentaram efeito suprimindo ou estimulando estes processos. As frações hexânicas e quase todos os tratamentos com extratos brutos estimularam a germinação/tamanho do tubo. Já os efeitos inibitórios foram observados nos extratos brutos de exúvias na maior concentração (50µg), para todos os tratamentos. As frações clorofórmicas e metanólicas dos extratos de exúvias tiveram efeito inibitório de germinação na maioria dos tratamentos, principalmente para Ma. Não ocorreu a formação de apressórios de Bb nas condições avaliadas. Entretanto, todos os tratamentos permitiram a formação de apressórios de Ma, sendo constatado com maior frequência, em 7,5%, no tratamento Soja. Concluiu-se que a toxicidade observada na germinação dos conídios parece estar relacionada à concentração dos compostos, e que ocorreu relação entre a dieta utilizada pelos insetos e as características físico-químicas da cutícula, ocasionando efeitos sobre os estágios iniciais da infecção pelos fungos.

Palavras-chave: Percevejo-marrom-da-soja, Lipídios cuticulares, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

Introdução

A pressão seletiva mútua na relação patógeno/hospedeiro levou a uma verdadeira corrida armamentista neste processo de co-evolução, e o estudo das doenças ocasionadas em insetos por entomopatógenos tem mostrado resultados surpreendentes (Ortiz-Uriza & Keyhani 2013), principalmente com relação às estratégias de defesa destes insetos.

A infecção por fungos em artrópodes pode sofrer inibição nos estágios de pré e pós-penetração e envolve múltiplas interações, não existindo um único fator determinante na patogenicidade (Gillespie *et al.* 2000). Por isso, é necessário que se estude mais a fundo, a começar pela cutícula do hospedeiro, que representa a primeira barreira defensiva contra a invasão e é o principal local onde essas interações iniciais do processo de infecção ocorrem (Ment *et al.* 2010).

Fungos entomopatogênicos, tais como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) infectam a cutícula a partir dos conídios, que aderem e germinam para formar estruturas de invasão durante a penetração (Wang & St. Leger 2005).

Os conídios, quando encontram a cutícula hospedeira, suas terminações apicais podem se alongar distalmente para formar um apressório, um importante local de adesão e produção de enzimas que ajudam no rompimento da cutícula e no estabelecimento da relação nutricional com o hospedeiro (St. Leger *et al.* 1991).

O primeiro contato ocorre com a epicutícula (chamada camada de cera ou cimento), que contém lípidos livres que consistem principalmente de compostos polares e não-polares alifáticos, os quais são extraíveis por solventes orgânicos (Lockey 1988, Andersen 2004). Variam em composição e podem ser considerados quimicamente nas seguintes classes de lipídios: ésteres, glicerídeos, ácidos graxos, esteróis e aldeídos (Blomquist & Jackson 1979, Lockey 1985). Por esta composição, além de ser a primeira camada na barreira contra a

infecção, a principal função dos lipídios epicuticulares em quase todos os insetos e artrópodes terrestres é impedir a evaporação passiva da água através da cutícula, pois formam a camada de cera (Gibbs *et al.* 1998).

Enquanto a composição de proteínas e quitina da procutícula parece ser muito similar em todos os insetos, os componentes que formam a epicutícula são bastante heterogêneos, mesmo entre espécies do mesmo gênero e, portanto, têm potencial de levar a diferentes respostas de patógenos a determinados insetos (Lockey 1985, 1988, Wang & St. Leger 2005, Golebiowski *et al.* 2008).

Já foi demonstrado que fenóis, quinonas e lipídios presentes na cutícula têm profundo efeito na adesão, germinação e diferenciação de apressórios dos conídios, e que podem inibir (ou, por vezes, estimular) o crescimento dos fungos (Sosa-Gómez *et al.* 1997, Gillespie *et al.*, 2000, James *et al.* 2003, Howard & Lord 2003, 2004). Os efeitos inibitórios podem ocorrer pela ação fungilítica ou fungistática dos componentes epicuticulares, ou ainda, esta camada de lipídios pode funcionar como uma barreira até a matriz de quitina do exoesqueleto do inseto, impedindo o conídio de entrar em contato com nutrientes e outros sinais que desencadeiam a germinação (James *et al.* 2003).

Vários estudos têm mostrado os efeitos dos lipídios epicuticulares (em compostos extraídos ou puros) nos processos iniciais da infecção pelos patógenos, conforme observado por Sosa-Gómez *et al.* (1997) para o percevejo-verde-da-soja *Nezara viridula* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) com o fungo *M. anisopliae*. Esse efeito também foi observado com outras espécies de fungos e pragas (Smith & Grula 1982, El Sayed *et al.* 1991, Butt *et al.* 1995, Kirkland *et al.* 2004, Ment *et al.* 2010, Boyle & Cutler 2012).

Neste sentido, considerando que o percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) apresenta uma inerente tolerância à infecção por fungos entomopatogênicos (Moscardi *et al.* 1985, Sosa-Gómez & Moscardi 1998, Sosa-Gómez *et al.*,

1997), é possível que os lipídios epicuticulares possam exercer importante papel na dinâmica da infecção neste caso, sendo que estudos são necessários para avaliar esta relação.

A evolução da doença também pode estar relacionada ao estado nutricional do inseto (Shah *et al.* 2005, Sosa-Gómez 2012), e condições nutricionais inadequadas podem facilitar o processo de infecção, aumentando a susceptibilidade aos fungos (Santiago-Alvarez *et al.* 2006, Lord 2010).

Assim, acredita-se que o alimento em que os percevejos são criados pode apresentar efeito qualitativo na composição lipídica da epicutícula, e o presente trabalho foi realizado visando a avaliar as possíveis relações existentes entre diferentes combinações de dietas naturais utilizadas por *E. heros* e sua influência nos estágios iniciais da infecção (adesão, germinação e formação de apressórios) pelos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Material e Métodos

Manutenção dos insetos e dos isolados fúngicos.

Todas as fases da criação estoque de *E. heros* foram mantidas em salas climatizadas com temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, segundo metodologia de criação modificada de Silva *et al.* (2008). Posterior à eclosão, as ninfas foram mantidas em gerbox até o 4º ínstar, recebendo como alimento vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos não umedecidos de soja, amendoim-cavalo (*Arachis hypogaea* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.). Após este período, as ninfas de 5º ínstar foram transferidas para recipientes plásticos (16×16×25cm) com abertura coberta por tela metálica na lateral e tampa, oferecendo-se além da dieta já descrita, frutos de ligustro (*Ligustrum lucidum* Ait.). Foram

oferecidas tiras de tecido de algodão para oviposição, e os ovos obtidos foram transferidos para gerbox contendo papel de filtro umedecido, até a eclosão.

Para compor os tratamentos avaliados, posturas obtidas na criação estoque foram separadas em gerbox contendo a respectiva combinação de dieta natural exclusivamente, mantendo-se os insetos sob esta alimentação durante todo seu desenvolvimento, sendo os tratamentos: a) Padrão (Vagens frescas de feijão + grãos de soja, amendoim-cavalo, girassol), b) Soja (Vagens frescas de feijão + grãos de soja), c) Amendoim (Vagens frescas de feijão + grãos de amendoim-cavalo), d) Girassol (Vagens frescas de feijão + grãos de girassol), e) Ervilha (Vagens frescas de feijão + grãos ervilha *Pisum sativum* L.), f) Gergelim (Vagens frescas de feijão + grãos de gergelim *Sesamum indicum* L.). Após 48 horas de emergência, as exúvias de 5º ínstar e os adultos criados em cada dieta foram coletadas com pinça e armazenados em frascos de vidro, mantendo-se em -20°C até a preparação dos extratos cuticulares.

Em relação aos fungos, os isolados Unioeste 46 (*B. bassiana*) e Unioeste 22 (*M. anisopliae*) obtidos na coleção do Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Unioeste, foram produzidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), incubando-se as placas por 7-10 dias (26±1°C) para conidiogênese. As suspensões foram preparadas misturando-se os conídios em água deionizada, agitando-se em vortex por 5 min, e ultrasonicando por 5 min para homogeneização, procedendo-se as diluições seriadas para contagem em câmara de Neubauer e padronização da concentração da suspensão a ser utilizada (Alves & Moraes 1998). A viabilidade dos conídios foi avaliada previamente segundo Oliveira (2010).

Obtenção e fracionamento dos extratos de compostos cuticulares de *E. heros*.

Foram realizadas extrações dos compostos cuticulares de adultos e de exúvias de 5º ínstar dos percevejos, para cada tratamento (Padrão, Soja, Amendoim, Girassol, Ervilha e

Gergelim) segundo metodologia adaptada de Sosa-Gómez *et al.* (1997). Para os adultos, 150 insetos criados em cada dieta testada foram prévia e duplamente lavados em água deionizada, e deixados em 30 mL de hexano P.A., por 5 min. em temperatura ambiente. O solvente foi retirado e transferido para frascos tipo Scott, previamente tarados, concentrando-se as amostras após evaporação com N₂ gasoso, fazendo-se a pesagem e ressuspensão em hexano para a concentração de 1 mg/mL, obtendo-se assim o extrato bruto. Os extratos brutos das exúvias de 5º ínstar foram obtidos mantendo-se 500 mg destas (também duplamente lavadas em água deionizada previamente) a 70°C por 20 horas, em frascos com tampa contendo 30 mL de hexano. As demais etapas transcorreram conforme já descrito, padronizando-se as amostras em hexano para a concentração de 10 mg/mL.

Para o estudo do efeito dos componentes cuticulares de diferentes afinidades de polaridade os extratos brutos de exúvias foram fracionados em colunas de sílica cromatográfica de 5 cm. Para separação, as colunas foram sequencialmente eluídas com 5 mL de hexano (Vetec[®]), CHCl₃ (Vetec[®]), e MeOH (Vetec[®]). Os solventes resultantes foram evaporados e a ressuspensão foi realizada (10 mg/mL), em hexano para as frações de hexano e CHCl₃, e em isopropanol para as frações metanólicas. Todos os extratos e frações obtidos foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

Efeito dos compostos cuticulares na adesão dos conídios.

Utilizando-se metodologia adaptada de Sosa-Gómez *et al.* (1997) foram realizados ensaios com os diferentes extratos obtidos de percevejos criados em cada dieta: i) extrato bruto de adultos (5 µg/gota), ii) extrato bruto de exúvias (50 µg/gota), iii) frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas dos extratos brutos de exúvias (50 µg/gota). Os componentes extraídos foram aplicados sobre lâminas de vidro em microgotas de 5 µL, evaporando-se os solventes em temperatura ambiente. Os resíduos dos extratos aderidos às lâminas foram

delimitados com PapPen (Kiyota, International Inc., EUA) e sobre eles foi aplicada uma suspensão (75 µL) contendo 2×10^6 conídios/mL, incubando-se por 2 min. em temperatura ambiente, e fazendo-se a lavagem com água deionizada. Um mínimo de 30 campos aleatórios no microscópio sob o aumento de 400× foram avaliados para estimar a densidade dos conídios em cada preparação.

Efeito dos compostos cuticulares sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos conídios.

Os mesmos extratos já citados foram avaliados, depositando-se 5 µL em lâminas de vidro contendo uma fina camada de água-agarose (2%) (UltraPure, Gibco[®], livre de nutrientes) ou meio BDA (Himedia[®]), e evaporando-se os solventes em temperatura ambiente. O tratamento Controle continha somente hexano, e também foi feita uma testemunha sem hexano omitida nos resultados. Suspensões de conídios contendo 10^8 /mL foram nebulizadas por 10 segundos nas lâminas (nebulizador pneumático portátil Soniclear[®]), as quais foram incubadas em câmara úmida a 26°C.

Após 18 e 20h, para *B. bassiana* e *M. anisopliae* respectivamente, a porcentagem de germinação e o tamanho do tubo germinativo foram determinados com microscópio de contraste de fase no aumento de 400× (adaptado de Sosa-Gómez *et al.* 1997). Foram contados no mínimo 100 conídios (germinados e não germinados) em cada lâmina, e registrados em campos aleatórios 20 medidas de tubos germinativos por tratamento com câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

No ensaio com os extratos brutos, as medidas foram realizadas posteriormente com o auxílio do programa BelView 7 (BEL Engineering[®], Monza, ITA). Já no ensaio com as frações, para que o tempo despendido na avaliação não influenciasse os resultados de germinação (visto o grande volume de repetições), as medidas dos tubos foram avaliadas

considerando-se uma escala de 0-5, sendo (0=ausência de tubo germinativo, 1=tubo menor que o tamanho do conídio, 2=tubo do tamanho do conídio, 3=tubo com até o dobro do tamanho do conídio, 4=tubo com até 4 vezes o tamanho do conídio, 5=tubo maior que 4 vezes o tamanho do conídio).

Em todos os testes, foram preparadas 10 repetições por tratamento e os ensaios foram realizados aplicando-se um gota de 5µL dos extratos nas concentrações de 5µg (extratos brutos de adultos), 50µg (extratos brutos de exúvias) e 50µg (frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas do extrato bruto de exúvias).

Formação de apressórios sobre asas de *E. heros*.

Utilizando-se a asa metatorácica direita de *E. heros*, foi avaliada a frequência de formação de apressórios dos fungos (adaptado de Wang & St. Leger 2005, Jarrold *et al.* 2007). Utilizaram-se as asas por serem finas, permitindo a avaliação. As asas oriundas de percevejos criados em cada dieta foram dispostas sobre lâminas de vidro colocando-se uma microgota (5 µL) de água para auxiliar na fixação. Suspensões de conídios (10^8 /mL) dos fungos foram nebulizadas por 20 segundos com o auxílio de um nebulizador pneumático portátil (Soniclear[®]) sobre as asas, as quais foram incubadas em câmara úmida ($26\pm 2^\circ\text{C}$ e 14 horas fotofase). Após 24h, a frequência de formação de apressórios foi registrada com microscópio de contraste de fase, no aumento de 400×, avaliando-se 20 conídios por lâmina, em cada tratamento (R=100), com câmera fotográfica acoplada ao microscópio. As avaliações foram realizadas sempre em conídios germinados que se encontravam entre as nervuras subcostal e R1 das asas, registrando-se e, posteriormente, analisando as imagens obtidas com o auxílio do programa já citado (BelView 7).

Análises estatísticas.

Todos os experimentos foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, sendo os dados transformados quando necessário (Transformação em $\arcsen\sqrt{x/100}$ para porcentagem de germinação, e $\text{Log}(\chi)$ para comprimento do tubo germinativo). As análises foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos Sas/Stat (Sas 2003) e Assistat (Silva & Azevedo 2006). Nos experimentos de adesão, germinação, e frequência de formação de apressórios os dados foram avaliados quanto à variância pelo teste F (ANOVA), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). As comparações de médias dos dados de tamanho do tubo germinativo nas frações foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Resultados

Efeito dos extratos brutos de compostos cuticulares na adesão dos conídios.

Verificou-se que os extratos de compostos cuticulares de adultos e exúvias de *E. heros* serviram como substrato para adesão dos conídios de ambos os fungos, e os resultados mostraram que a dieta de criação possivelmente conferiu características distintas à cutícula dos percevejos.

Nos extratos de adultos (Tabela 1), para *B. bassiana*, a maior adesão foi observada no tratamento Ervilha, seguido por Girassol e Gergelim. Os extratos Padrão, Soja e Amendoim não promoveram a adesão de conídios ($F=20,5$, $P < 0,0001$). Para *M. anisopliae*, os resultados foram semelhantes, com maior adesão em Ervilha, seguido por Gergelim e Padrão. Os tratamentos Soja, Amendoim e Girassol não diferiram da adesão mínima obtida no tratamento Controle (Hexano) ($F=17,7$, $P < 0,0001$).

Nos extratos de exúvias (Tabela 1), os conídios de *B. bassiana* apresentaram maior adesão nos tratamentos Soja, Amendoim, Ervilha e Gergelim, na comparação aos tratamentos Controle e Padrão (F=6,6, P<0,0001). Para *M. anisopliae*, a maior adesão foi proporcionada apenas pelo tratamento Gergelim, seguido por Padrão e Ervilha. Destaque negativo para os tratamentos Amendoim e Girassol, que promoveram menor adesão de conídios que o tratamento Controle (F=21,5, P<0,0001).

Tabela 1. Adesão de conídios (nº/campo de microscópio) dos fungos *Beauveria bassiana* (Unioeste 46) e *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22) sobre diferentes concentrações de extratos cuticulares crus, obtidos em adultos (5µg) e exúvias (50 µg) de *Euschistus heros* alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos foram evaporados em lâminas de vidro à temperatura ambiente.

Tratamentos ¹	N	Adultos (5µg de extrato/gota)		Exúvias (50 µg de extrato/gota)	
		Unioeste 46	Unioeste 22	Unioeste 46	Unioeste 22
CONTROLE	30	1,6 ± 0,1 C	1,9 ± 0,1 C	1,7 ± 0,1 C	4,1 ± 0,5 D
PADRÃO	30	1,8 ± 0,1 C	3,9 ± 0,6 B	1,7 ± 0,1 C	8,6 ± 0,3 B
SOJA	30	2,4 ± 0,4 C	2,2 ± 0,2 C	3,1 ± 0,1 A	5,5 ± 0,6 D
AMENDOIM	30	1,5 ± 0,1 C	1,5 ± 0,2 C	3,5 ± 0,3 A	2,5 ± 0,3 E
GIRASSOL	30	4,2 ± 0,4 B	1,2 ± 0,1 C	2,6 ± 0,2 B	3,1 ± 0,1 E
ERVILHA	30	6,6 ± 0,2 A	6,6 ± 0,2 A	4,2 ± 0,2 A	6,6 ± 0,7 C
GERGELIM	30	4,5 ± 0,4 B	4,5 ± 0,4 B	3,5 ± 0,4 A	10,9 ± 0,2 A
C.V.		26,5%	20,0%	25,3%	22,3%

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna, em cada fungo, não diferem entre si segundo teste de Scott-Knott (P<0,05). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de percevejos (adultos ou exúvias) criados nas dietas: PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano na lâmina.

Efeito das frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas na adesão dos conídios.

Foi possível observar para ambos os fungos, que poucos extratos favoreceram o processo de adesão (Tabelas 2 e 3).

Para o fungo *B. bassiana* na fração hexânica, os tratamentos Padrão e Soja conferiram menor adesão aos conídios que o tratamento Controle, e os demais tratamentos não diferiram

significativamente deste último ($F=3,3$, $P<0,05$). Na fração clorofórmica, os extratos dos percevejos criados em Soja, Amendoim e Girassol apresentaram maior adesão que no Controle e demais tratamentos ($F=4,6$, $P<0,0001$). A fração metanólica de nenhum tratamento forneceu substrato para adesão, podendo ter inclusive promovido a repelência dos conídios, tendo em vista os reduzidos valores em relação ao tratamento Controle ($F=43,6$, $P<0,0001$) (Tabela 2). Na comparação entre as frações, analisando-se as diferenças em cada tratamento, os valores verificados na fração clorofórmica sempre estiveram dentre os maiores números de conídios aderidos.

Tabela 2. Adesão de conídios (nº/campo de microscópio) do fungo *Beauveria bassiana* sobre frações de lipídios cuticulares (50µg) extraídos de exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos foram separados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados em lâminas de vidro a temperatura ambiente.

Tratamentos ¹	N	HEXANO	CLOROFÓRMIO	METANOL
CONTROLE	30	2,5 ± 0,1 Aa	2,5 ± 0,1 Ba	2,5 ± 0,1 Aa
PADRÃO	30	2,0 ± 0,2 Bb	3,0 ± 0,1 Ba	0,5 ± 0,1 Cc
SOJA	30	1,5 ± 0,2 Bb	3,9 ± 0,2 Aa	1,0 ± 0,1 Bb
AMENDOIM	30	3,0 ± 0,2 Aa	3,4 ± 0,2 Aa	0,5 ± 0,1 Cb
GIRASSOL	30	2,4 ± 0,1 Ab	3,4 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,1 Cc
ERVILHA	30	2,8 ± 0,2 Aa	2,8 ± 0,2 Ba	0,8 ± 0,0 Bb
GERGELIM	30	2,5 ± 0,2 Aa	2,6 ± 0,1 Ba	0,7 ± 0,1 Bb
C.V.		22,6%	15,4%	24,3%

Médias (\pm EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si segundo teste de Scott-Knott ($P<0,05$). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas: PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano na lâmina.

Quanto ao fungo *M. anisopliae* (Tabela 3), na fração hexânica, os tratamentos Amendoim e Girassol não diferiram do Controle. Já os tratamentos Padrão, Soja, Ervilha e Gergelim apresentaram adesão de conídios menor que os demais ($F=7,4$, $P<0,0001$). Contudo, na fração clorofórmica, os tratamentos Amendoim, Girassol, Ervilha e Gergelim prejudicaram

a adesão, apresentando valores inferiores à Controle, Padrão e Soja ($F=15,4$, $P<0,0001$). Na fração metanólica, tal como observado para o outro fungo, todos os tratamentos afetaram a adesão, apresentando menor número de conídios aderidos do que o observado no tratamento Controle ($F=14,0$, $P<0,0001$).

Tabela 3. Adesão de conídios (nº/campo de microscópio) do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre frações de lipídios cuticulares (50µg) extraídos de exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, alimentados em diferentes combinações de dietas naturais. Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados em lâminas de vidro a temperatura ambiente.

Tratamentos ¹	N	HEXANO	CLOROFÓRMIO	METANOL
CONTROLE	30	1,2 ± 0,1 Aa	1,2 ± 0,1 Aa	1,2 ± 0,1 Aa
PADRÃO	30	0,7 ± 0,1 Ba	1,0 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,0 Bb
SOJA	30	0,9 ± 0,1 Ba	1,0 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,0 Bb
AMENDOIM	30	1,4 ± 0,2 Aa	0,3 ± 0,0 Bb	0,2 ± 0,1 Bb
GIRASSOL	30	1,9 ± 0,2 Aa	0,6 ± 0,0 Bb	0,1 ± 0,0 Bc
ERVILHA	30	0,5 ± 0,1 Ba	0,4 ± 0,0 Ba	0,4 ± 0,1 Ba
GERGELIM	30	0,5 ± 0,1 Ba	0,2 ± 0,0 Bab	0,1 ± 0,0 Bb
C.V.		19,9%	21,2%	28,3%

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si segundo teste de Scott-Knott ($P<0,05$). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas: PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Efeito dos compostos cuticulares sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos conídios (extratos brutos).

Constatou-se que os extratos brutos de adultos e exúvias de *E. heros* em vários tratamentos apresentaram efeito, suprimindo ou estimulando a germinação e o tamanho do tubo germinativo dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

No ensaio com os extratos obtidos dos adultos (5µg), observou-se para o fungo *B. bassiana* (Tabela 4) que os tratamentos Padrão, Girassol, Ervilha e Gergelim promoveram a

germinação superando os valores do tratamento Controle (F=324,6, P<0,0001). O tubo germinativo dos conídios teve seu crescimento estimulado em quase todos os tratamentos e, em ambos os meios de cultura, com exceção do tratamento Soja no qual os tubos apresentaram em média 52,7 μm , não diferindo do Controle em meio BDA (F=48,4, P<0,0001).

Tabela 4. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Beauveria bassiana* em extratos de lipídios cuticulares (5 μg) de *Euschistus heros* adultos, após 18 horas de incubação (26 \pm 2°C, UR: 60 \pm 10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (μm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	5,5 \pm 0,4 Cb	87,2 \pm 2,7 Ba	9,1 \pm 0,5 Cb	48,3 \pm 1,9 Ba
PADRÃO	13,8 \pm 0,8 Bb	93,6 \pm 0,4 Aa	21,1 \pm 2,7 Bb	67,2 \pm 1,3 Aa
SOJA	6,0 \pm 0,7 Cb	94,1 \pm 0,3 Aa	16,8 \pm 1,5 Bb	52,7 \pm 0,9 Ba
AMENDOIM	6,5 \pm 0,8 Cb	95,4 \pm 0,5 Aa	16,9 \pm 0,8 Bb	66,5 \pm 4,4 Aa
GIRASSOL	10,8 \pm 1,3 Bb	96,1 \pm 0,6 Aa	19,9 \pm 1,5 Bb	65,4 \pm 3,2 Aa
ERVILHA	12,1 \pm 0,5 Bb	95,2 \pm 0,6 Aa	16,3 \pm 1,5 Bb	56,2 \pm 1,4 Ba
GERGELIM	22,3 \pm 2,2 Ab	92,9 \pm 0,9 Aa	28,7 \pm 2,9 Ab	84,5 \pm 4,4 Aa
C.V.	7,0%		5,9%	

Médias (\pm EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p=0,0001), comprimento do tubo germinativo (p=0,1936). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e $\text{Log}(\chi)$ (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de percevejos adultos criados nas dietas: PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Para *M. anisopliae* (Tabela 5), conforme observado no meio Agarose, todos os tratamentos causaram aumento na porcentagem de germinação (F=310,4, P<0,0001). Todos os tratamentos promoveram também o crescimento do tubo germinativo em meio Agarose, com destaque para o tratamento Gergelim que foi o único a apresentar crescimento superior ao Controle também em BDA, com média de 187,2 μm (F=20,5, P<0,0001).

Tabela 5. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em extratos de lipídios cuticulares (5µg) de *Euschistus heros* adultos, após 20 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (µm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	10,2 ± 0,8 Fb	91,9 ± 0,7 Aa	21,7 ± 1,8 Bb	89,1 ± 4,7 Ba
PADRÃO	66,7 ± 1,8 Bb	92,9 ± 1,1 Aa	46,2 ± 6,6 Ab	162,7 ± 10,7 Ba
SOJA	25,7 ± 0,7 Db	93,0 ± 0,6 Aa	35,2 ± 2,2 Ab	152,1 ± 8,7 Ba
AMENDOIM	15,7 ± 0,4 Eb	91,9 ± 0,8 Aa	48,2 ± 8,7 Ab	141,4 ± 9,3 Ba
GIRASSOL	75,3 ± 1,7 Ab	94,1 ± 0,6 Aa	43,8 ± 4,9 Ab	137,6 ± 9,1 Ba
ERVILHA	53,9 ± 0,9 Cb	94,9 ± 0,4 Aa	40,1 ± 3,1 Ab	126,7 ± 14,6 Ba
GERGELIM	55,9 ± 1,3 Cb	92,4 ± 0,3 Aa	54,5 ± 2,1 Ab	187,2 ± 7,3 Aa
C.V.	4,2%		7,3%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p<0,0001), comprimento do tubo germinativo (p=0,4886). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e $\text{Log}(\chi)$ (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de percevejos adultos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Nos extratos de exúvias na menor concentração (5µg), os conídios do fungo *B. bassiana* (Tabela 6) tiveram a germinação no meio Agarose promovida em todos os tratamentos (F=553,2, P<0,0001). Por outro lado, mesmo com pouca intensidade, foi observada influência negativa na germinação de conídios no meio BDA, ocasionada pelos tratamentos Padrão, Soja, Amendoim e Girassol. Não foi verificado efeito no tamanho dos tubos germinativos para nenhum tratamento (F=80,8, P<0,0001). Todos os extratos (5µg) de exúvias de percevejos apresentaram incremento na germinação de conídios de *M. anisopliae* (Tabela 7), somente no meio agarose (F=133,4, P<0,0001). Os tratamentos Padrão, Soja,

Ervilha e Gergelim produziram tubos germinativos mais longos também neste meio de cultura (F=17,7, P<0,0001).

Tabela 6. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Beauveria bassiana* em extratos de lipídios cuticulares (5µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 18 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (µm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	2,6 ± 0,7 Db	95,5 ± 0,4 Aa	9,6 ± 0,5 Ab	74,5 ± 0,7 Aa
PADRÃO	8,4 ± 0,6 Bb	92,2 ± 0,7 Ba	11,8 ± 0,4 Ab	48,3 ± 2,6 Aa
SOJA	10,2 ± 0,3 Bb	88,7 ± 0,5 Ba	12,3 ± 1,2 Ab	67,7 ± 6,8 Aa
AMENDOIM	5,3 ± 1,3 Cb	90,3 ± 0,5 Ba	10,9 ± 0,3 Ab	57,9 ± 3,3 Aa
GIRASSOL	5,7 ± 0,9 Cb	89,5 ± 0,7 Ba	8,3 ± 0,3 Ab	51,7 ± 2,7 Aa
ERVILHA	15,0 ± 0,4 Ab	95,5 ± 0,4 Aa	10,7 ± 0,5 Ab	63,2 ± 4,6 Aa
GERGELIM	14,7 ± 0,8 Ab	92,7 ± 0,8 Ba	13,1 ± 0,9 Ab	59,4 ± 4,1 Aa
C.V.	5,7%		6,2%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p<0,0001), comprimento do tubo germinativo (p=0,1199). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e Log (χ) (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Tabela 7. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em extratos de lipídios cuticulares (5µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (µm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	16,0 ± 2,8 Bb	96,6 ± 0,9 Aa	31,0 ± 6,7 Bb	120,5 ± 6,2 Aa
PADRÃO	26,9 ± 2,23 Ab	96,3 ± 0,4 Aa	37,1 ± 2,0 Ab	121,0 ± 3,6 Aa
SOJA	25,4 ± 2,9 Ab	93,3 ± 1,4 Aa	35,0 ± 3,0 Ab	119,2 ± 8,1 Aa
AMENDOIM	21,1 ± 1,3 Ab	95,3 ± 1,5 Aa	24,4 ± 3,1 Bb	87,8 ± 5,6 Aa
GIRASSOL	23,0 ± 1,4 Ab	94,6 ± 0,7 Aa	25,8 ± 3,2 Bb	103,2 ± 6,4 Aa
ERVILHA	30,8 ± 1,1 Ab	98,3 ± 0,8 Aa	50,0 ± 1,3 Ab	103,2 ± 14,7 Aa
GERGELIM	22,7 ± 1,2 Ab	96,6 ± 0,7 Aa	36,5 ± 3,5 Ab	111,5 ± 10,2 Aa
C.V.	7,3%		7,7%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p=0,0842), comprimento do tubo germinativo (p=0,2497). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e Log (χ) (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Já nos ensaios com os extratos de exúvias na maior concentração (50µg), para *B. bassiana* (Tabela 8) somente o tratamento Ervilha causou aumento na germinação de conídios, conforme observado no meio Agarose (F=197,8, P<0,0001). Por outro lado, os tratamentos Padrão, Amendoim e Girassol reduziram a germinação neste mesmo meio. No meio de cultura BDA, ressalta-se o efeito negativo na viabilidade ocasionado por todos os tratamentos, com destaque para Amendoim, Girassol e Gergelim, cujos extratos demonstraram forte inibição da germinação. Estes mesmos tratamentos afetaram de maneira mais acentuada também o crescimento de tubos germinativos visto no meio BDA (F=12,5, P<0,0001).

Tabela 8. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Beauveria bassiana* em extratos de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 18 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (µm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	7,3 ± 1,1 Bb	91,7 ± 0,8 Aa	11,2 ± 0,8 Ab	34,5 ± 2,4 Aa
PADRÃO	3,5 ± 0,9 Cb	58,0 ± 0,8 Ca	11,5 ± 1,2 Aa	19,2 ± 0,8 Ba
SOJA	9,7 ± 1,1 Bb	58,9 ± 0,9 Ca	10,4 ± 0,9 Ab	23,6 ± 1,1 Ba
AMENDOIM	2,5 ± 0,7 Ca	4,7 ± 0,3 Da	8,3 ± 0,6 Aa	9,6 ± 0,4 Ca
GIRASSOL	2,4 ± 0,7 Ca	3,9 ± 0,8 Da	10,6 ± 0,8 Aa	8,3 ± 0,5 Ca
ERVILHA	25,2 ± 2,3 Ab	65,9 ± 0,9 Ba	14,8 ± 1,1 Aa	25,9 ± 3,4 Ba
GERGELIM	6,3 ± 0,4 Ba	3,2 ± 0,3 Db	10,6 ± 0,8 Aa	13,7 ± 1,7 Ca
C.V.	11,7%		9,7%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p<0,0001), comprimento do tubo germinativo (p<0,0001). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e Log (χ) (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

O fungo *M. anisopliae* (Tabela 9) apresentou respostas semelhantes, com o tratamento Ervilha aumentando a germinação de conídios em meio Agarose, e todos os extratos reduzindo-a em meio BDA (F=124,5, P<0,0001). Os destaques negativos são dos tratamentos Padrão, Amendoim, Girassol e Gergelim, nos quais a germinação foi inferior aos 4% em ambos os meios de cultura. Estes mesmos tratamentos afetaram fortemente o crescimento de tubos germinativos em ambos os meios de cultura (F=10,0, P<0,0001), corroborando os resultados obtidos na avaliação da germinação.

Tabela 9. Germinação (%) e tamanho do tubo germinativo de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em extratos de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos foram evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	% de germinação		Tubo germinativo (µm)	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	22,8 ± 0,6 Bb	91,7 ± 0,8 Aa	23,7 ± 1,5 Aa	52,2 ± 2,2 Aa
PADRÃO	2,1 ± 0,3 Ca	3,5 ± 0,8 Ca	7,8 ± 0,3 Aa	9,9 ± 0,4 Aa
SOJA	24,0 ± 1,5 Bb	68,9 ± 0,6 Ba	23,7 ± 1,4 Aa	26,0 ± 2,5 Aa
AMENDOIM	0,8 ± 0,3 Da	0,5 ± 0,2 Da	4,2 ± 1,5 Ba	3,3 ± 1,2 Ba
GIRASSOL	0,5 ± 0,2 Da	0,0 ± 0,0 Da	4,5 ± 1,8 Ba	2,2 ± 1,4 Ba
ERVILHA	53,6 ± 5,9 Aa	70,0 ± 2,2 Ba	22,2 ± 2,6 Aa	17,8 ± 0,5 Aa
GERGELIM	0,4 ± 0,2 Da	3,1 ± 0,9 Ca	2,5 ± 1,6 Bb	13,5 ± 1,3 Aa
C.V.	19,1%		23,0%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Significância da interação: porcentagem de germinação (p<0,0001), comprimento do tubo germinativo (p=0,0241). Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação) e Log (χ) (comprimento do tubo germinativo). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Efeito das frações hexânicas, clorofórmicas e metanólicas sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos conídios

No estudo do efeito das frações, para o fungo *B. bassiana* (Tabela 10) praticamente todos os tratamentos promoveram incremento da germinação, em todas as frações, com exceção do tratamento Amendoim na fração metanólica, o qual não diferiu significativamente do Controle (F=99,1, P<0,0001). Com relação ao tamanho dos tubos germinativos (Tabela 11), foi possível observar que o tratamento Amendoim, nas frações hexânica e clorofórmica (em BDA), e o tratamento Gergelim (em Agarose) na fração clorofórmica afetaram o crescimento, apresentando menores valores que os observados no tratamento Controle.

Para o fungo *M. anisopliae* (Tabela 12), algumas frações demonstraram efeito positivo, promovendo a germinação de conídios em Agarose e, em contrapartida, reduzindo a porcentagem de germinação em BDA com relação ao tratamento Controle.

Na fração hexânica, todos os tratamentos demonstraram aumento de germinação no meio Agarose. Já no meio BDA, os tratamentos Padrão, Amendoim, Girassol e Gergelim reduziram a germinação de conídios ($F=32,6$, $P<0,0001$). Na fração clorofórmica, a germinação em Agarose foi maior em todos os tratamentos que continham os extratos, com relação ao Controle, destacando-se o tratamento Gergelim que apresentou valores superiores a 74% de viabilidade. No meio de cultura BDA, somente o tratamento Padrão não apresentou efeitos negativos na germinação ($F=29,8$, $P<0,0001$). Na fração metanólica, destaque para o aumento de germinação visto nos tratamentos Ervilha e Gergelim no meio Agarose, que demonstraram valores acima dos 58% de viabilidade. Todos os tratamentos prejudicaram a germinação no meio BDA, com destaque para os tratamentos Soja, Amendoim e Girassol que apresentaram os menores valores de viabilidade de conídios em ambos os meios de cultura ($F=43,1$, $P<0,0001$).

Tabela 10 Germinação (%) de conídios do fungo *Beauveria bassiana* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 18 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	HEXANO		CLOROFÓRMIO		METANOL	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	6,9 ± 1,2 Cb	87,5 ± 0,7 Aa	6,9 ± 1,2 Cb	87,5 ± 0,7 Aa	6,9 ± 1,2 Bb	87,5 ± 0,7 Aa
PADRÃO	34,6 ± 2,8 Ab	88,1 ± 2,1 Aa	32,3 ± 2,1 Ab	86,1 ± 1,4 Aa	31,7 ± 3,6 Ab	85,4 ± 1,5 Aa
SOJA	23,2 ± 2,1 Bb	85,2 ± 1,2 Aa	36,6 ± 1,5 Ab	87,8 ± 1,7 Aa	24,1 ± 0,1 Ab	84,8 ± 0,7 Aa
AMENDOIM	37,8 ± 1,6 Ab	84,2 ± 1,1 Aa	26,1 ± 1,0 Bb	87,8 ± 1,2 Aa	12,2 ± 1,6 Bb	86,3 ± 1,5 Aa
GIRASSOL	30,5 ± 2,1 Ab	87,4 ± 1,9 Aa	29,4 ± 1,3 Bb	87,1 ± 1,1 Aa	26,3 ± 3,3 Ab	79,7 ± 1,3 Aa
ERVILHA	27,5 ± 1,4 Bb	87,7 ± 0,5 Aa	24,2 ± 0,3 Bb	88,2 ± 2,0 Aa	32,8 ± 1,5 Ab	88,6 ± 1,1 Aa
GERGELIM	33,4 ± 0,9 Ab	85,4 ± 1,9 Aa	32,3 ± 0,6 Ab	89,6 ± 0,9 Aa	30,3 ± 3,4 Ab	85,2 ± 1,2 Aa
C.V.	7,9%		6,6%		8,9%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada eluente, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05). Interação significativa em todos os eluentes. Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Tabela 11. Tamanho do tubo germinativo (escala 0-5) de conídios do fungo *Beauveria bassiana* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 18 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	HEXANO		CLOROFÓRMIO		METANOL	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	2,2 ± 0,3 ABb	3,3 ± 0,3 Aa	2,3 ± 0,3 Ab	3,3 ± 0,3 ABa	2,2 ± 0,3 ABb	3,3 ± 0,3 Aa
PADRÃO	2,3 ± 0,4 Ab	3,3 ± 0,2 Aa	1,7 ± 0,3 ABb	3,0 ± 0,4 ABa	1,5 ± 0,2 Bb	3,2 ± 0,3 Aa
SOJA	1,4 ± 2,3 BCb	3,4 ± 0,4 Aa	2,3 ± 0,2 Ab	3,1 ± 0,3 ABa	1,4 ± 0,2 Bb	3,3 ± 0,3 Aa
AMENDOIM	1,3 ± 0,3 Cb	3,2 ± 0,4 Aa	1,8 ± 0,2 ABb	2,7 ± 0,3 Ca	1,8 ± 0,2 ABb	3,2 ± 0,3 Aa
GIRASSOL	1,9 ± 0,2 ABb	3,2 ± 0,2 Aa	1,9 ± 0,3 ABb	3,3 ± 0,2 ABa	2,3 ± 0,4 Ab	3,1 ± 0,3 Aa
ERVILHA	1,5 ± 0,2 BCb	3,3 ± 0,2 Aa	2,0 ± 0,3 ABb	3,3 ± 0,2 ABa	2,6 ± 0,3 Ab	3,3 ± 0,3 Aa
GERGELIM	2,4 ± 0,3 Ab	3,3 ± 0,2 Aa	1,4 ± 0,2 Bb	2,9 ± 0,2 BCa	1,4 ± 0,2 Bb	3,2 ± 0,3 Aa

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada eluente, não diferem entre si segundo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). As medidas dos tubos foram avaliadas considerando-se uma escala de 0-5, sendo (0=ausência de tubo germinativo, 1=tubo menor que o tamanho do conídio, 2=tubo do tamanho do conídio, 3=tubo com até o dobro do tamanho do conídio, 4=tubo com até 4 vezes o tamanho do conídio, 5=tubo maior que 4 vezes o tamanho do conídio). ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Tabela 12. Germinação (%) de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	HEXANO		CLOROFÓRMIO		METANOL	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	9,8 ± 0,5 Cb	86,4 ± 3,1 Aa	9,8 ± 0,5 Db	86,4 ± 3,1 Aa	9,8 ± 0,5 Db	86,4 ± 3,1 Aa
PADRÃO	60,6 ± 2,1 Aa	71,5 ± 1,1 Ba	54,0 ± 1,3 Cb	87,3 ± 0,5 Aa	46,5 ± 2,1 Bb	73,7 ± 1,0 Ba
SOJA	45,5 ± 1,7 Bb	79,9 ± 0,7 Aa	58,6 ± 2,2 Cb	73,1 ± 2,7 Ba	29,8 ± 2,1 Ca	40,0 ± 1,2 Da
AMENDOIM	49,2 ± 3,9 Bb	71,2 ± 1,5 Ba	58,8 ± 1,9 Cb	67,8 ± 3,6 Ca	28,7 ± 1,6 Ca	40,5 ± 1,9 Da
GIRASSOL	57,7 ± 2,4 Ab	72,7 ± 2,8 Ba	53,8 ± 1,5 Ca	64,7 ± 3,4 Ca	27,9 ± 0,6 Ca	39,7 ± 1,5 Da
ERVILHA	62,6 ± 1,6 Ab	82,1 ± 0,6 Aa	67,7 ± 1,7 Bb	76,9 ± 1,5 Ba	64,0 ± 1,3 Aa	69,8 ± 1,6 Ba
GERGELIM	62,7 ± 2,1 Aa	77,4 ± 1,6 Ba	74,6 ± 1,6 Aa	77,7 ± 1,1 Ba	58,1 ± 1,6 Aa	62,3 ± 3,4 Ca
C.V.	8,4%		8,5%		9,4%	

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada eluente, não diferem entre si segundo teste fatorial de Scott-Knott (P<0,05).

Interação significativa em todos os eluentes. Dados originais apresentados. Para análise, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ (porcentagem de germinação).

¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

O tamanho do tubo germinativo também foi influenciado pelos tratamentos (Tabela 13), sendo que na fração hexânica todos promoveram maior crescimento dos tubos no meio Agarose, se comparados ao Controle. No meio BDA, ao contrário, o tratamento Soja prejudicou o desenvolvimento do fungo, apresentando menor crescimento. Na fração clorofórmica, o tratamento Girassol nos meios Agarose e BDA afetou negativamente o crescimento dos tubos germinativos, tal como já havia sido verificado para germinação dos conídios. Na fração metanólica, somente nos tratamentos Soja e Amendoim não se superou o observado no Controle, e ressalta-se que estes mesmos tratamentos prejudicaram a germinação conforme já foi descrito anteriormente.

Para facilitar a discussão dos efeitos ocasionados pelos diferentes extratos cuticulares no desenvolvimento dos conídios fúngicos, consideraram-se as seguintes relações: i) Efeito positivo (quando o tratamento apresentou compostos que promoveram a germinação/tamanho do tubo no meio Agarose), ii) Efeito negativo (quando o tratamento reduziu a germinação/tamanho do tubo no meio BDA), iii) Efeito duplo (quando o tratamento continha compostos que promoveram a germinação/tamanho do tubo no meio Agarose, mas apresentou efeito prejudicial no meio BDA), iv) Não efeito (quando o tratamento não apresentou diferença relacionado ao Controle em nenhum parâmetro). A abordagem qualitativa foi sintetizada na Tabela 14.

Tabela 13. Tamanho do tubo germinativo (escala 0-5) de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em frações de lipídios cuticulares (50µg) obtidos em exúvias de 5º ínstar de *Euschistus heros*, após 20 horas de incubação (26±2°C, UR: 60±10%, fotofase: 14hs). Os extratos brutos foram fracionados por polaridade em colunas de sílica com Hexano, Clorofórmio e Metanol, e evaporados sobre meio Agarose-água ou BDA antes da aplicação.

Tratamentos ¹	HEXANO		CLOROFÓRMIO		METANOL	
	Agarose	BDA	Agarose	BDA	Agarose	BDA
CONTROLE	0,4 ± 0,2 Eb	4,0 ± 0,6 Aa	2,5 ± 0,7 BCb	3,5 ± 0,4 Ba	2,1 ± 0,5 CDa	2,9 ± 0,7 Ca
PADRÃO	1,9 ± 0,7 Cb	3,7 ± 0,6 ABa	3,0 ± 0,5 BCb	3,4 ± 0,7 Ba	3,5 ± 0,4 Aa	3,8 ± 0,5 ABa
SOJA	2,8 ± 0,7 Ba	3,1 ± 0,7 Ba	3,8 ± 0,4 Aa	4,1 ± 0,5 Aa	2,3 ± 0,5 Cb	3,2 ± 0,6 BCa
AMENDOIM	2,4 ± 0,7 Cb	4,0 ± 0,4 Aa	3,9 ± 0,4 Aa	4,3 ± 0,5 Aa	1,8 ± 0,7 Db	2,8 ± 0,6 Ca
GIRASSOL	4,2 ± 0,3 Aa	4,2 ± 0,5 Aa	1,9 ± 0,5 Da	2,9 ± 0,7 Ca	2,9 ± 0,3 Bb	4,3 ± 0,4 Aa
ERVILHA	2,7 ± 0,8 Bb	4,3 ± 0,5 Aa	3,1 ± 0,4 Bb	3,7 ± 0,5 ABa	3,1 ± 0,6 ABa	4,0 ± 0,5 Aa
GERGELIM	2,3 ± 0,7 Cb	4,2 ± 0,3 Aa	3,5 ± 0,6 Aa	3,9 ± 0,5 Aa	2,7 ± 0,6 Bb	4,2 ± 0,5 Aa

Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada eluente, não diferem entre si segundo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). As medidas dos tubos foram avaliadas considerando-se uma escala de 0-5, sendo (0=ausência de tubo germinativo, 1=tubo menor que o tamanho do conídio, 2=tubo do tamanho do conídio, 3=tubo com até o dobro do tamanho do conídio, 4=tubo com até 4 vezes o tamanho do conídio, 5=tubo maior que 4 vezes o tamanho do conídio) ¹Extratos de lipídios cuticulares obtidos de exúvias de 5º ínstar de percevejos criados nas dietas PADRÃO: vagens de feijão, grãos de amendoim, soja e girassol, SOJA: vagens de feijão e grãos de soja, AMENDOIM: vagens de feijão e grãos de amendoim, GIRASSOL: vagens de feijão e grãos de girassol, ERVILHA: vagens de feijão e grãos de ervilha, GERGELIM: vagens de feijão e grãos de gergelim, CONTROLE: evaporou-se previamente hexano sobre o meio.

Tabela 14. Análise qualitativa dos efeitos ocasionados pelos diferentes extratos cuticulares de adultos e exúvias de *Euschistus heros* nos conídios dos fungos *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*).

Tratamentos	Adultos (5µg)		Exúvias (5µg)		Exúvias (50µg)		Fração Hexânicas		Fração Clorofórmica		Fração Metanólica	
	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>	<i>Bb</i>	<i>Ma</i>
	PADRÃO	+	+	+	+	-	-	+	+	+/-	+	+
SOJA	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+/-	+	+/-
AMENDOIM	+	+	+	+	-	-	+	+	+/-	+/-	•	+/-
GIRASSOL	+	+	+	+	-	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
ERVILHA	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-
GERGELIM	+	+	+	•	-	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-

(+) Efeito positivo (quando o tratamento apresentou compostos que promoveram a germinação/tamanho do tubo no meio Agarose),

(-) Efeito negativo (quando o tratamento reduziu a germinação/tamanho do tubo no meio BDA),

(+/-) Efeito duplo (quando o tratamento continha compostos que promoveram a germinação/tamanho do tubo no meio Agarose, mas apresentou efeito prejudicial no meio BDA),

(•) Não efeito (quando o tratamento não apresentou diferença relacionado ao Controle).

Formação de apressório sobre asas de *E. heros*

No período avaliado, apesar de ter sido verificada germinação, não foi registrada a formação de apressórios em conídios de *B. bassiana* nas asas de percevejos de nenhum tratamento. Para o fungo *M. anisopliae*, em todas as dietas avaliadas observou-se essa estrutura fúngica (Fig. 1). No tratamento Soja, foi observado o maior índice de formação, sendo que 7,5% dos conídios avaliados apresentavam apressórios formados ($F=37,5$; $P<0,0001$; $C.V.=16\%$). Nos tratamentos Girassol e Amendoim observaram-se apressórios em 5% dos conídios avaliados, e nos demais tratamentos (Asas obtidas nas dietas Padrão, Ervilha, Gergelim) esta incidência foi menor, de apenas 2,5%.

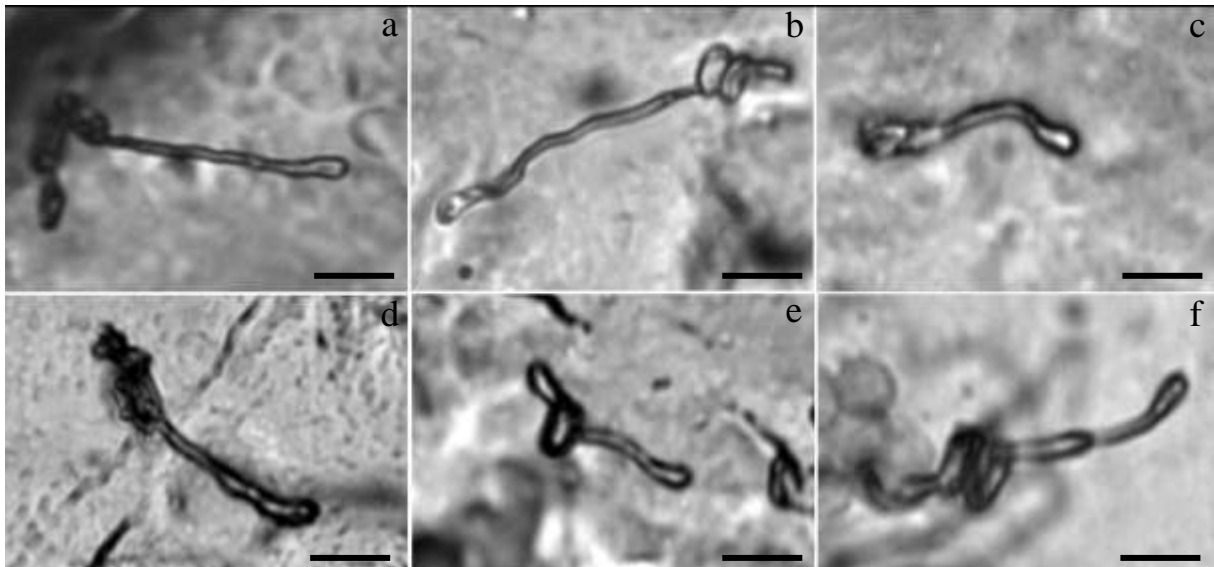


Fig. 1. Formação de apressórios em conídios de *Metarhizium anisopliae* sobre asas metatorácicas de *Euschistus heros* criados em diferentes combinações de dietas naturais, após 24 horas de incubação ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR: $90\pm 10\%$, fotofase: 14hs). Dietas: a) Padrão, b) Soja, c) Amendoim, d) Girassol, e) Ervilha, f) Gergelim, Escala = $14\mu\text{m}$.

Discussão

Foi demonstrado que alguns extratos brutos de adultos e exúvias de *E. heros* permitiram a adesão dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, enquanto outros não forneceram esta condição. Para melhor compreender esta relação é preciso levar em conta os processos que envolvem o primeiro contato entre fungo e hospedeiro. A interação da epicutícula com conídios fúngicos pode envolver complexos mecanismos de reconhecimento específicos, por exemplo as glicoproteínas, e não específicos como a eletrostática e a hidrofobicidade (Fargues 1984), tendo assim, papel essencial no processo de adesão dos fungos e conseqüentemente no início da infecção (Boucias *et al.* 1988).

Como se observou na avaliação das frações (hexânicas, clorofórmicas e metanólicas), somente as frações clorofórmicas dos tratamentos Soja, Amendoim e Girassol serviram como substrato para a adesão de conídios de *B. bassiana* e os compostos presentes não permitiram a adesão de *M. anisopliae*. Esta diferença de resposta para os compostos presentes nos extratos oriundos dos diferentes solventes, indica que pode ocorrer efeito da dieta de criação sobre a

composição da cutícula dos percevejos, e conseqüentemente, nos mecanismos de reconhecimento específicos.

Quanto aos mecanismos não específicos (eletrostática e hidrofobicidade), no outro lado da relação estão os conídios, que no caso de *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem uma camada hidrofóbica que ajuda na dispersão, provêem proteção contra a desidratação, mas sua principal função é auxiliar na adesão à cutícula do hospedeiro (Boucias *et al.* 1988, Hajek & Eastburn 2003). A importância destes mecanismos não específicos foi observada nos resultados, constatando-se para ambos os fungos, que além de não servir como substrato para a adesão, os compostos polares presentes na fração metanólica repeliram os conídios, visto o reduzido número registrado nas avaliações quando comparados ao Controle (somente a lâmina de vidro). Evidenciou-se esta relação entre a adesão dos conídios e a característica de polaridade destas frações de extratos, mostrando a baixa afinidade entre os conídios hidrofóbicos dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e os componentes polares dos extratos.

Baseando-se nessas observações, é provável que a hidrofobicidade esteja dentre os principais responsáveis pelas interações de adesão no modelo inseto/patógenos aqui estudado. Em seu trabalho, Boucias *et al.* (1988) demonstraram que lipídios extraídos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) tiveram pouco efeito na adesão de conídios, mas ressaltaram que a estrutura da superfície da cutícula tem importante função nesse processo. Assim, apesar de não ter sido estudada neste trabalho, não se pode desconsiderar a importância da topografia da cutícula dos insetos na adesão, e conseqüentemente, na susceptibilidade/resistência à infecção fúngica (Pedrini *et al.* 2007). Adicionalmente à estes fatores, Pedrini *et al.* (2007) indicam que níveis adequados de nutrientes e componentes epicuticulares podem servir como sinal para a adesão dos conídios nos insetos.

Com relação às etapas posteriores a adesão, estes fatores citados pelos autores também desempenham funções importantes, principalmente na germinação e no crescimento

vegetativo. Para que a infecção seja bem sucedida é necessário que os nutrientes utilizáveis pelos conídios estejam presentes e disponíveis na cutícula, e que na presença de componentes tóxicos, estes propágulos sejam capazes de ignorar ou superar este efeito (Smith & Grula 1982).

A comparação dos resultados obtidos nos meios de cultura Agarose e BDA permitiu inferir quais extratos possuem compostos com efeito promotor ou inibitório da germinação (Tabela 14). Enquanto a Agarose que é livre de nutrientes (de acordo com o fabricante) não favorece a germinação, o meio BDA contém fontes de carbono, nitrogênio e demais compostos essenciais ao desenvolvimento inicial dos conídios (Francisco *et al.* 2006, Gao *et al.* 2007). O fato da porcentagem de germinação de conídios em um tratamento com extrato cuticular ser superior ao Controle no meio Agarose comprova que os componentes presentes neste extrato serviram ao fungo como fontes nutricionais (exógenas). Em contrapartida, índices de germinação inferiores ao Controle no meio BDA demonstram o efeito negativo deste extrato na germinação, por apresentar compostos que inibem os conídios nesta fase. A mesma relação pode ser estabelecida com o crescimento do tubo germinativo.

Ressalta-se que foi observada germinação de conídios de ambos os fungos no meio Agarose no tratamento Controle. Principalmente o fungo *M. anisopliae*, que apresentou índices de germinação acima de 20% em um ensaio. Apesar de não se conhecer completamente os mecanismos, dependendo da espécie de fungo, sabe-se que o início do processo de germinação pode ser desencadeado também por fontes nutricionais endógenas (James 2001). Assim, tendo em vista o cuidado tomado no presente trabalho para que o meio Agarose não tivesse resíduos que pudessem servir como fonte de nutrientes para os fungos, e considerando a característica de ultrapureza da Agarose utilizada, é possível afirmar que os conídios dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* aqui testados tenham utilizado suas reservas endógenas para iniciar a germinação no meio ausente de nutrientes. Isso também foi

relatado por Ment *et al.* (2010), em seu trabalho com isolados de *M. anisopliae*. Porém, esse fenômeno não influenciou os resultados aqui obtidos e só evidenciou ainda mais o efeito dos extratos, pois foram observados diferentes implicações na relação entre extratos cuticulares/conídios fúngicos mesmo nos ensaios com maiores índices de germinação no Controle em Agarose.

Desta forma, constatou-se que a dieta em que os percevejos foram alimentados influenciou as características da epicutícula, conferindo propriedades diferentes entre os extratos/tratamentos. A condição de heterogeneidade na composição epicuticular tem potencial de levar a diferentes respostas aos patógenos (Wang & St. Leger 2005, Ortiz-Uriza e Keyhani 2013), e foi exatamente isso o observado. Diversos tratamentos (extratos brutos e frações) promoveram a germinação e também o crescimento do tubo germinativo das duas espécies de fungo, demonstrando que os compostos presentes nos extratos, na ausência de fontes disponíveis, podem servir como substrato nutricional desencadeando o desenvolvimento inicial de um maior número de conídios. O efeito promotor da germinação também foi observado por Gindin *et al.* (2009) e Ment *et al.* (2010) para *M. anisopliae*, com extratos de lipídios cuticulares de diferentes espécies de carrapatos.

Aqui, destaca-se o tratamento Ervilha, que nos extratos brutos de adultos e exúvias sempre apresentou efeito positivo sobre os fungos, mesmo nos extratos na maior concentração (50µg). Outro ponto a se destacar é que nesta maior concentração ficou evidente que o efeito negativo na germinação e no crescimento de tubos germinativos é diretamente proporcional à concentração dos compostos cuticulares. Todos os extratos de exúvias na maior concentração demonstraram efeitos inibitórios não observados na menor.

Desde trabalhos mais antigos (Smith & Grula 1982, Kerwin 1984, Latge *et al.* 1987) até recentemente, vários outros autores já relataram a presença de inibição da germinação e desenvolvimento de fungos entomopatogênicos. Sosa-Gómez *et al.* (1997) demonstraram que

extratos obtidos em exúvias de *N. viridula* inibiram a germinação de *M. anisopliae*. James *et al.* (2003) constataram que lipídios cuticulares extraídos de ninfas de *Bemisia argentifolii* (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) prejudicaram a germinação de *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Ascomycota: Cordycipitaceae). Também para *B. bassiana*, extratos cuticulares hexânicos de *Blissus leucopterus hirtus* (Heteroptera: Lygaeidae) apresentaram ação inibitória na germinação de conídios (Boyle & Cutler 2012).

Apesar da dificuldade em se estabelecer comparações exatas com esses trabalhos listados, em função da diferença de metodologia para obtenção/padronização dos extratos cuticulares e as particularidades de cada inseto e espécie fúngica, acredita-se que não somente o qualitativo, mas a quantidade de compostos utilizada pelos autores esteja relacionada à resposta de inibição observada. Uma vez que, analisando-se a metodologia desses trabalhos, verifica-se que a padronização da concentração de compostos foi diferente da realizada aqui, e possivelmente a concentração testada pelos autores foi maior que 5µg por repetição.

Corroborando nossa afirmação, ressalta-se o trabalho de Sosa-Gomez *et al.* (1997), no qual os autores obtiveram em uma fração de lipídios cuticulares polares efeito promotor da germinação de conídios na concentração de 5µg, e o mesmo extrato na concentração de 50µg inibiu fortemente a germinação de *M. anisopliae* em meio de cultura BDA. Isto confirma que a ação fungistática de certos componentes cuticulares pode estar vinculada também à concentração em que estes ocorrem (Smith & Grula 1982, Ortiz-Uriza e Keyhani 2013), e a habilidade dos conídios em superar esta barreira tem papel essencial para o sucesso da infecção, podendo inclusive explicar a resistência aos patógenos (Szafranek *et al.* 2001, Kirkland *et al.*, 2004). É possível que esta habilidade dos conídios esteja ligada à capacidade de utilizar os compostos como fonte de nutrientes, os quais seriam degradados e metabolizados quando em menor concentração. Já em maiores concentrações, os fungos podem não ter capacidade de utilização destes compostos, visto que já foi comprovada a

influência da concentração de carbono e da relação carbono/nitrogênio no desenvolvimento de fungos entomopatogênicos (Gao *et al.* 2007).

Considerando-se as propriedades de cada eluente, o fracionamento dos compostos cuticulares resultou, presumivelmente, que os extratos hexânicos continham predominância de compostos não polares, os extratos clorofórmicos compostos de polaridade intermediária a moderada, e os extratos metanólicos (polar prótico) eram formados por compostos cuticulares polares.

As avaliações com estas frações apresentaram resultados variados, com ocorrência de efeito promotor do desenvolvimento e não-efeito para *B. bassiana*, e todas as frações apresentando inibição sobre a germinação de conídios do fungo *M. anisopliae*. Variação de resultados semelhante foram observadas por Jarrold *et al.* (2007), que avaliando-se o efeito de extratos de asas de *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) sobre um isolado de *M. anisopliae* var. *acridum*, os autores observaram pouco ou nenhum efeito sobre a germinação em extratos de asas em pentano e clorofórmio, enquanto que em um extrato de metanol a germinação foi significativamente reduzida. Especificamente para extratos cuticulares polares em metanol, é comum trabalhos relatarem o efeito inibitório na germinação de fungos entomopatogênicos (Boucias & Latge 1988, Latge *et al.* 1987, Lecuona *et al.* 1997, Sosa-Gomez *et al.* 1997, Hajek & Eastburn 2003). Outros solventes polares como o diclorometano também mostraram-se capazes de extrair compostos cuticulares com ação tóxica para conídios (Ment *et al.* 2010).

Como visto, no presente estudo, todas as frações metanólicas (compostos polares), apesar de servirem como substrato para germinação de *M. anisopliae* em Agarose, apresentaram efeito detrimental sobre este fungo. Para *B. bassiana* isto não foi observado, e em alguns extratos (percevejos alimentados nas dietas Padrão, Ervilha e Gergelim) os compostos da fração em metanol promoveram a germinação. Aliás, de maneira geral, o fungo

M. anisopliae se mostrou sempre mais sensível à ação dos compostos cuticulares do que *B. bassiana*. Inferindo-se que o efeito inibitório de certos compostos cuticulares pode ser seletivo para as diferentes espécies de fungos entomopatogênicos (Wang & St Leger, 2005)

Os efeitos de inibição também variam de acordo com o parâmetro analisado. Foram constatados efeitos de inibição de componentes cuticulares simultaneamente sobre a germinação e o crescimento de tubos germinativos. Entretanto, alguns tratamentos afetaram somente um dos parâmetros nas avaliações, demonstrando que as vias pelas quais a inibição do desenvolvimento ocorre podem ser muitas.

Com relação à penetração na cutícula do hospedeiro por fungos entomopatogênicos, esta ocorre pela combinação de processos mecânicos e enzimáticos (Golebiowski *et al.* 2008), e a formação de apressórios está relacionada ao estabelecimento da relação nutricional entre o patógeno e o hospedeiro (Wang & St. Leger 2005). Nos ensaios realizados com o isolado Unioeste 22, apesar da diferença na frequência de ocorrência, a formação de apressórios foi verificada nas asas oriundas de todos os tratamentos. Isto demonstra que os insetos criados nas diferentes dietas aqui avaliadas, apresentavam minimamente as condições necessárias para o desenvolvimento inicial de *M. anisopliae* (Wang & St. Leger 2005). Por outro lado, o fato de não ter sido verificada formação de apressórios para o isolado Unioeste 46 de *B. bassiana* não deve ter relação com as características da cutícula, visto que em nenhum tratamento esta formação ocorreu. Isto pode estar relacionado ao tempo e/ou método de avaliação utilizado aqui, pois segundo Wang & St. Leger (2005) a formação pode ser estimulada, dentre outros fatores, por superfícies hidrofóbicas e níveis apropriados de nutrientes. Ambos requisitos parecem ser contemplados neste caso, pois além de se conhecer a condição hidrofóbica das asas dos insetos, acredita-se que como muitos conídios de *B. bassiana* germinaram, existiam nutrientes disponíveis nestas asas. É provável que tenha relação com as condições necessárias à penetração, pois os conídios deste isolado podem não

ter encontrado pontos adequados para prosseguir com a infecção (regiões intersegmento, bases de artículos e cerdas).

Desta forma, conclui-se que existe relação entre o alimento utilizado pelos percevejos e as características físico-químicas de suas cutículas, as quais demonstraram atividade (positiva e/ou negativa) sobre os estágios iniciais do desenvolvimento dos fungos. A identidade química dos componentes da cutícula de *E. heros* e as respectivas ações nos conídios fúngicos precisam ser explorados mais especificamente, sendo necessários novos estudos.

Referências

- Alves SB, Moraes SA (1998) Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. p. 765-777. In: S.B. Alves. (ed.). Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Andersen SO (2004) Chlorinated tyrosine derivatives in insect cuticle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 1079–1087.
- Blomquist GJ, Jackson LU (1979) Chemistry and biochemistry of insect waxes. *Progress in Lipid Research* 17: 319-345.
- Boucias DG, Latge JP (1988) Non-specific induction of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 168–171.

- Boucias DG, Pendland JC, Latge JP (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied Environmental Microbiology* 54: 1795–1805.
- Boyle D, Cutler GC (2012) Effects of insect activity, soil, and cuticular factors on virulence of *Beauveria bassiana* toward *Blissus leucopterus hirtus*. *Journal of Pest Science* 85: 505–512.
- Butt TM, Ibrahim L, Clark SJ, Beckett A (1995) The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research* 99: 945–950.
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD (1991) Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 113: 95–102.
- Fargues J (1984) Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In Aist J, Roberts DW (ed.) *Infection processes of fungi*. Rockefeller Foundation Study Center, Bellagio, Italy. p. 90-110.
- Francisco EA, Mochi DA, Correia ACB, Monteiro AC (2006) Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciência Rural* 36: 1309-1312.

- Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111: 87–92.
- Gibbs AG, Louie AK, Ayala JA, (1998) Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? *Journal of Experimental Biology* 210: 71–80.
- Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B, Vilcinskas (2000) A Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Physiology and Biochemistry* 44: 49-68.
- Gindin G, Ment D, Rot A, Glazer I, Samish M (2009) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to tick eggs and the effect of egg cuticular lipids on conidia development. *Journal of Medical Entomology*, 46: 531-538.
- Golebiowski M, Malinski E, Bogus MI, Kumirska J, Stepnowski P (2008) The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 619–627
- Hajek A, Eastburn CC (2003) Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 82 12–22

- Howard RW, Lord JC (2003) Cuticular lipids of the booklouse, *Liposcelides bostrychophola*: hydrocarbons, aldehydes, fatty acids, and fatty acid amides. *Journal of Chemical Ecology* 29: 615–627.
- James RR (2001) Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 99-107.
- James RR, Buckner JS, Freeman TP (2003) Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 67–74.
- Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK (2007) The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research* 111: 240-249.
- Kerwin JL (1984) Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fannia canicularis*. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 158–161.
- Kirkland BH, Cho EM, Keyhani NO (2004) Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31: 414–421.

- Latge JP, Sampedro L, Brey P, Diaquin M (1987) Aggressiveness of *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid-influence of cuticular extracts on ballistospore germination of aggressive and non-aggressive strains. *Journal of General Microbiology* 133: 1987-1997.
- Lecuona RE, Clement JL, Riba G, Joulie C, Juárez MP (1997) Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *Journal of Economic Entomology* 89: 119-123.
- Lockey KH (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89: 595–645.
- Lockey KH (1985) Insect cuticular lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81: 263-273.
- Lord JC (2010) Dietary stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology* 103: 1542-1546.
- Lord JC, Howard RW (2004) A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry conidia. *Mycopathologia* 158: 211–217.
- Ment D, Gindin G, Rot A, Soroker V, Glazer I, Barel S, Samish M (2010) Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3521-3528,

- Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Villas Boas GL, Leite LG, Zamataro CE (1985) Avaliação de fungos entomógenos sobre percevejos-pragas da soja, em laboratório. In: Resultados de Pesquisa de Soja 1984–1985, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil. p. 91–98.
- Oliveira DGP (2009) Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável. Piracicaba, 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO (2013) Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374.
- Pedrini N, Crespo R, Juárez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 124–137.
- Santiago-Álvarez C, Maranhão EA, Maranhão E, Quesada-Moraga (2006) Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. *BioControl* 51:519–32.
- Sas Institute (2003) SAS/STAT. User’s Guide. Versão 9.1.3, Cary, NC, USA. 2002/
- Shah FA, Wang CS, Butt TM (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251: 259-266.

- Silva CC, Laumann RA, Blassioli MC, Pareja M, Borges M (2008) *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 43: 575-580.
- Silva FAS, Azevedo CAV (2006) A new version of the Assistat-Statistical assistance software. In: World congress on computers in agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396.
- Smith RJ, Grula EA (1982) Toxic components on the larval surface of the Corn-Earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 15-22.
- Sosa-Gómez DR (2012) Implications of plant hosts and insect nutrition on entomopathogenic diseases. In Panizzi AR, Parra JRP (Eds) *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. CRC Press, p.195-210.
- Sosa-Gómez DR, Boucias DG, Nation JL (1997) Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 31-39.
- Sosa-Gómez DR, Moscardi F (1998) Laboratory and field Studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 115-120.

- St. Leger RJ, Goettel M, Roberts DW, Staples RC (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 168–179.
- Szafranek B, Maliński E, Nawrot J, Sosnowska D, Ruszkowska M, Pihlaja K, Trumpakaj Z, Szafranek J (2001) In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Archive for Organic Chemistry* 3: 81-84.
- Wang C, St. Leger, RJ (2005) Developmental and transcriptional responses to host and non-host cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum*. *Eukaryotic Cell* 4: 937-947.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de tese se propôs a explorar as possíveis relações entre o substrato de alimentação utilizado por *E. heros* e a inerente tolerância apresentada por estes percevejos à infecção por fungos entomopatogênicos. A hipótese inicial de pesquisa foi levantada baseando-se em resultados obtidos com *N. viridula*, e acreditava-se que o percevejo-marrom também poderia possuir compostos químicos em sua cutícula com efeito fungistático sobre *B. bassiana* e/ou *M. anisopliae*, e que a composição desta cutícula poderia estar ligada às fontes exploradas como alimento. Desta forma, podemos pontuar o que se considerou inicialmente:

- a) A dieta influencia os parâmetros biológicos dos percevejos;
- b) Pode influenciar também a composição da cutícula dos insetos, e conseqüentemente suas características físico-químicas;
- c) Dado o modo de infecção dos fungos entomopatogênicos, se os parâmetros biológicos e a composição da cutícula são influenciados, percevejos alimentados em diferentes dietas apresentam susceptibilidade diferencial aos fungos;
- d) Existe relação entre os compostos químicos (cuticulares) dos percevejos e a susceptibilidade aos fungos, sendo que alguns compostos apresentam ação inibitória sobre os conídios destes entomopatógenos.
- e) A tolerância intrínseca de *E. heros* aos fungos está relacionada aos estágios iniciais do processo de infecção (adesão, germinação, formação de apressórios e penetração);

Analisando-se os resultados como um todo é possível inferir que alguns destes aspectos foram ratificados neste estudo, por exemplo, foi possível confirmar que a dieta afeta os parâmetros biológicos de *E. heros* e a combinação testada que oferecia as melhores

condições nutricionais (Padrão) qualitativa e quantitativamente, produziu os insetos com características mais favoráveis a sua sobrevivência.

Pôde-se verificar também que a cutícula de percevejos alimentados com dietas distintas apresenta diferentes características físico-químicas, as quais foram constatadas nos ensaios de efeito sobre a adesão, germinação, crescimento do tubo germinativo (extratos e sobre as asas) e formação de apressórios. No entanto, não é possível afirmar se existem e quais são as diferenças na composição química da cutícula destes percevejos. É preciso uma melhor compreensão do funcionamento das vias biossintéticas no percevejo e como a dieta pode estar relacionada com a composição da cutícula. Para isso, estudos de caracterização química são necessários, e pretende-se dar continuidade ao trabalho aprofundando-se exatamente nesta questão.

Quanto ao descrito no item "c", comprovou-se que a dieta influencia a relação patógeno/hospedeiro de uma maneira ampla, visto a diferença de susceptibilidade apresentada pelos percevejos alimentados em diferentes combinações de substratos. Foi possível relacionar este efeito dieta×susceptibilidade com: i) o estado nutricional dos insetos submetidos a infecção (e os desdobramentos que esta condição pode gerar); ii) a presença de compostos na cutícula com ação sobre os fungos. Ressalta-se que não se pode indicar apenas um destes fatores como determinante da maior/menor susceptibilidade dos insetos, porém, ambos parecem ter papel importante. Pois, os percevejos criados na dieta Padrão, que como foi relatado encontravam-se em melhor condição nutricional, estiveram sempre dentre os menos susceptíveis. Mas por outro lado, os insetos oriundos da dieta Ervilha, que apresentaram evidente efeito negativo da dieta, também estiveram dentre os menos susceptíveis. Além disso, nos ensaios com os extratos cuticulares, os extratos dos percevejos da dieta Ervilha se destacaram por apresentar compostos que sempre favoreceram a germinação e o crescimento do tubo germinativo. Isso perpassa inclusive o aspecto levantado

no item "d", demonstrando a relação entre os compostos cuticulares dos percevejos e a susceptibilidade aos fungos, além de destacar a complexidade destas interações.

No que diz respeito ao último aspecto da hipótese, não é possível afirmar que a tolerância de *E. heros* aos fungos esteja ligada somente aos eventos iniciais (pré-penetração) do processo de infecção. Apesar de se ter obtido indicativos que estes processos desempenham função importante na dinâmica e sucesso da doença, os estágios pós-infecção precisam ser melhor estudados. A dificuldade de se fazer a contagem diferencial de hemócitos para *E. heros*, pois não se tem metodologia desenvolvida, levou a se realizar a contagem total (não diferencial) que foi pouco elucidativa no presente trabalho. Na busca pela continuidade dos estudos, espera-se realizar mais ensaios avaliando-se a resposta imune destes percevejos, bem como a dinâmica do crescimento de hifas na hemolinfa, o que poderá auxiliar na melhor compreensão dos estágios da infecção que ocorrem subsequentes aos que foram avaliados aqui.

Pensando-se em perspectivas futuras, apesar do enfoque da tese ter sido sobre questões básicas de patologia dos percevejos, pode se considerar nossas contribuições também para uma abordagem aplicada, no intuito de melhorar as estratégias de controle de *E. heros* com fungos entomopatogênicos. Visto que eles tem sido relatados em diversas espécies cultivadas, é possível, que dependendo da cultura ou até mesmo do genótipo utilizado como alimento pelos percevejos, a susceptibilidade à infecção seja maior. Isso reflete nas medidas necessárias para se iniciar e aumentar o controle natural desses insetos e na tomada de decisão do momento da aplicação em uma eventual utilização do controle microbiano aplicado.

Assim, como a compreensão total de um fenômeno natural é bastante complexa, após todas as considerações e discussões realizadas, ressalta-se que além de direcionar e subsidiar estudos futuros, o presente trabalho gerou informações inéditas e relevantes para área, contribuindo para compreender melhor, mesmo que parcialmente, as interações dieta/inseto-praga/entomopatógenos.