

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

Daiane Dalla Nora

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DO
PERCEVEJO-MARROM**

Santa Maria, RS
2019

Daiane Dalla Nora

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DO PERCEVEJO-
MARROM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientador: Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Santa Maria, RS
2019

Dalla Nora, Daiane
isolamento e seleção de fungos para o controle do
percevejo-marrom / Daiane Dalla Nora.- 2019.
38 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2019

1. fungos entomopatogênicos 2. Beauveria bassiana
3. Controle biológico 4. Euschistus heros I. Seminoti
Jacques , Rodrigo Josemar II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados à Daiane Dalla Nora. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só pode ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Av. Roraima nº 1000, Cidade Universitária, Santa Maria – RS, CEP: 97105-900, Prédio 42, sala 3306. Fone (55) 3220-8256; E-mail: daiadallanora28@gmail.com

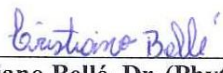
Daiane Dalla Nora

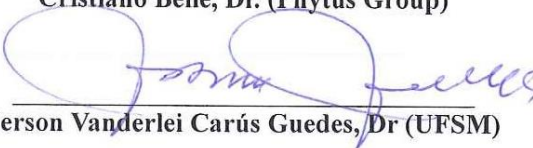
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DO PERCEVEJO-MARROM

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo**.

Aprovado em 15 de julho de 2019:


Rodrigo Josemar Semimoti Jaques, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Cristiano Bellé, Dr. (Phytus Group)


Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr (UFSM)

Aos meus pais Inês e Geraldo (in memoriam)

Dedico esse trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me iluminar nesse período.

Aos meus pais Geraldo Dalla Nora (In memoriam) e Inês Cherobini Dalla Nora pelos ensinamentos, apoio, por nunca me deixarem desistir e principalmente por acreditarem em mim. À minha irmã Sabrina Dalla Nora pelo carinho e força. Estendendo a todos os meus familiares que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao meu namorado Ricardo Rubin Balardin pelo carinho, apoio, compreensão, por participar ativamente das atividades de laboratório, e principalmente por me acolher em todos os momentos. Estendendo também aos seus pais Clarice Balardin e Ricardo Balardin por todo incentivo e conselhos dados nesse período.

Ao meu Orientador Prof. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques pela paciência em me orientar desde a graduação, tentando sempre me mostrar os melhores caminhos e, principalmente, por contribuir intensamente na minha formação, professor, meu muito obrigada.

À professora Zaida Inês Antonioli, pela convivência e ensinamentos que foram únicos, meu muito obrigada.

Ao amigo Cristiano Bellé por me auxiliar no planejamento e execução dos experimentos, e também pelos momentos de descontração e acolhimento quando pensei que nada daria certo, meu muito obrigada.

À minha amiga Macieli Piccin que ganhei no mestrado, por dividirmos alegrias e angústias, meu muito obrigada.

Ao professor Oderlei Bernadi pelo auxílio nas análises estatísticas, meu muito obrigada.

Aos colegas de laboratório de Biologia do Solo, Antônio Bassaco, Helena Trombeta, Joice Freiberg, Kelvin Salbego, Lisiane Sobucki, Reyllis Unfer, Rodrigo Ferraz, Nariane Andrade, Valéria Ortaça e Eduarda Calegari, pela convivência, risadas e parceria durante o mestrado. Em especial a Tiana Fredrich pela ajuda no laboratório de Biologia Molecular e ao Bruno Piovesan pelo auxílio na condução dos experimentos, meu muito obrigada.

Ao professor Jerson V. Carús Guedes, por disponibilizar os insetos para que os experimentos fossem realizados, estendendo a todos aqueles que trabalharam na criação, em especial à Regina Stacke e Mateus Cerveira pelo empenho e dedicação, meu muito obrigada.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) pela oportunidade em poder cursar um curso de Pós-Graduação de excelência, referência no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa.

RESUMO

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DO PERCEVEJO-MARROM

AUTOR: Daiane Dalla Nora

ORIENTADOR: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

O percevejo da espécie *Euschistus heros* pode ser controlado por fungos entomopatogênicos. Porém, poucas pesquisas foram realizadas sobre o controle biológico desta espécie e há somente um bioinseticida disponível no mercado. Por isto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar fungos entomopatogênicos e determinar a concentração de conídios necessária para o controle do percevejo *E. heros* em condições de laboratório. Foram isolados fungos de amostras de solo e de insetos doentes, o que correspondeu a 36 fungos isolados. A seleção foi realizada pela inoculação de 5µL de uma suspensão de 1×10^8 conídios mL⁻¹ no dorso dos percevejos adultos e avaliada a mortalidade por 15 dias. Os três fungos selecionados foram identificados por técnicas de biologia molecular e pertencem a espécie *Beauveria bassiana*. Dos 36 fungos isolados, foram selecionados o UFSM-1, UFSM-2 e UFSM-26 por causar 100% de mortalidade em adultos do percevejo-marrom, no qual foram testados em bioensaios para determinação da CL₅₀ e CL₉₀ e da mortalidade acumulada. Os fungos UFSM-1 e UFSM-2 destacaram-se pela alta virulência e rápida letalidade em *E. heros*, pois em 9 dias, 90% dos percevejos foram mortos com a aplicação de 5×10^9 conídios mL⁻¹ (CL₉₀). Para o fungo UFSM-26, a CL₉₀ foi de 8×10^{10} conídios mL⁻¹. Com a aplicação de 1×10^8 conídios mL⁻¹, os isolados UFSM-1 e UFSM-2 mataram 70% dos percevejos em 9 dias, enquanto o UFSM-26 matou 12%. Os isolados UFSM-1 e UFSM-2 são promissores agentes de controle biológico do *Euschistus heros* e por isto serão avaliados em futuros estudos.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana*, controle biológico, *Euschistus heros*.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION OF FUNGI FOR THE CONTROL OF THE BROWN STINK BUG

AUTHOR: Daiane Dalla Nora

ADVISOR: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

The stink bug species *Euschistus heros* can be controlled by entomopathogenic fungi. However, few researches have been done on the biological control of this species and there is only bio-insecticide available in the market. Therefore, the objective of this work was to isolate and select entomopathogenic fungi and determine the concentration of conidia necessary to control *E. heros* bug in laboratory conditions. Fungi were isolated from soil samples and from diseased insects. The selection was done by inoculating 5µL of a suspension of 1×10^8 conidia mL⁻¹ on the back of adult stink bugs and evaluating mortality for 15 days. The three fungi selected were identified by molecular biology techniques and belong to the *Beauveria bassiana* species. UFSM-1, UFSM-2 and UFSM-26 were selected from 36 isolates for causing 100% mortality in adults of the brown bug, which were tested in bioassays for determination of LC₅₀ and CL₉₀ and accumulated mortality. The fungi UFSM-1 and UFSM-2 got distinguished by the high virulence and rapid lethality in *E. heros*, because in 9 days, 90% of the stink bugs were killed with the application of 5×10^9 conidia mL⁻¹ (CL₉₀). For the fungus UFSM-26, the CL₉₀ was 8×10^{10} conidia mL⁻¹. With the application of 1×10^8 conidia mL⁻¹, UFSM-1 and UFSM-2 isolates killed 70% of the stink bugs in 9 days, while UFSM-26 killed 12%. The isolates UFSM-1 and UFSM-2 are promising biological control agents of *Euschistus heros* and therefore will be evaluated in future studies.

Key words: entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, biological control, *Euschistus heros*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1.1 Percevejo-marrom.....	12
1.1.2 Controle biológico.....	13
1.1.3 Fungos entomopatogênicos na agricultura.....	15
1.1.4 Controle biológico de percevejos.....	17
1.2 HIPÓTESE	18
1.3 OBJETIVO GERAL	18
1.3.1 Objetivos específicos.....	18
2 ARTIGO - Isolation and Evaluation of Entomopathogenic Fungi for Control of Neotropical Brown Stink Bug.....	21
Abstract	21
Introduction	21
Material and Methods	23
<i>Collection and isolation of soil fungi.....</i>	<i>23</i>
<i>Isolation of fungi from Euschistus heros</i>	<i>23</i>
<i>Rearing of Euschistus heros.....</i>	<i>24</i>
<i>Bioassays</i>	<i>24</i>
<i>Molecular identification of fungi.....</i>	<i>25</i>
<i>Statistical Analysis.....</i>	<i>26</i>
Results	26
Discussion	27
Conclusion.....	29
Acknowledgments	29
References	29
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa a maior área de cultivo no Brasil, com 35,8 milhões de hectares e produção de 114,3 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (CONAB, 2019). Por ser um cultivo rentável, as áreas monocultoras têm aumentado no país nos últimos anos. A baixa diversidade biológica nos monocultivos compromete as relações ecológicas e entre elas, está a regulação natural das espécies (CAMPOS, 2011). O cultivo da soja sem rotação de culturas durante muitos anos causa perda deste serviço ecossistêmico. Este não é um fato isolado, estima-se entre US\$ 4,3 e 20,2 trilhões ano⁻¹ foram perdidos em serviços ecossistêmicos diretos e indiretos nos cultivos agrícolas do mundo, de 1997 até 2011, os autores ainda destacam que estes cálculos podem estar subestimados (COSTANZA et al., 2014). Neste cenário, algumas espécies têm sido beneficiadas, em especial as populações de insetos-pragas de difícil controle.

O percevejo-marrom da espécie *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) é amplamente distribuída no Brasil (GODOY et al., 2010). Este inseto tem recebido grande destaque devido ao elevado potencial de dano na cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999), pois se alimenta diretamente do grão, o que diminui sua qualidade e massa (DEPIERI e PANIZZI, 2011; PANIZZI et al., 2012). O controle deste inseto é realizado principalmente com o uso de inseticidas químicos, o que favorece a seleção de populações resistentes e dificulta ainda mais o seu manejo (SOSA-GOMEZ e SILVA, 2010; PANIZZI et al., 2012; TUELHER et al., 2018).

A dependência e os problemas resultantes do uso destes inseticidas estimulam a busca por alternativas mais sustentáveis para controle das pragas agrícolas, como o controle biológico (LANCEY et al., 2015; KALVNADI et al., 2018). Este é caracterizado por ser um fenômeno natural e na agricultura, em larga escala é realizado pelo uso massivo de organismos que tenham efeitos deletérios em outros organismos (PARRA, 2014). E como prática associada, se faz necessário preservar os agentes do controle biológico no ambiente de cultivo, para que a regulação das espécies aconteça e se prolongue ao longo dos cultivos (JARONSKI, 2010; PELL et al., 2010). Quando comparado ao controle químico, o controle biológico tem ação mais lenta e por isto necessita ser utilizado no início da infestação da praga, o que acarreta em restrições de uso por produtores rurais (VAN LENTEREN et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos estão entre os agentes de controle biológico mais utilizados. Eles compõem grande parte dos inseticidas microbianos comercializados no

mundo e no Brasil são o princípio ativo de cerca de 60% dos bioinseticidas (LANCEY et al., 2015; MASCARIN et al., 2018). Os fungos entomopatogênicos têm a capacidade de regulação de diversas espécies de artrópodes-praga pela habilidade de infectar os hospedeiros através da cutícula e causar sua morte (VEGA et al., 2012; LANCEY et al., 2015). Na agricultura sua utilização é feita pela liberação de um grande número de propágulos, a fim de potencializar o equilíbrio ecológico entre o agente de controle e a praga alvo.

Dentre os diversos fungos entomopatogênicos estudados, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, é o mais utilizado no mundo no controle de diversos artrópodes (ARTHURS e DARA, 2018). É um fungo deuteromiceto, capaz de colonizar plantas, insetos e o solo, com ampla distribuição natural no mundo, entretanto sua ocorrência natural em ambientes agrícolas é influenciada pelas práticas de controle utilizadas na área (BOOMSMA et al., 2014). Os estudos com o uso de fungos entomopatogênicos para o controle do *E. heros* ainda são restritos. Evidências mostram que estes fungos podem ser usados no controle biológico do percevejo-marrom. Para o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1833, resultados promissores foram encontrados por Groth et al. (2017) no controle de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) na cultura do trigo. Diante da carência de informações sobre o controle biológico do *E. heros*, se faz necessário isolar e selecionar fungos entomopatogênicos e avaliar além de avaliar as concentrações de conídios que devem ser utilizadas para que o controle seja eficiente.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Percevejo-marrom

A espécie *E. heros* tem ocorrência em toda América do Sul, em especial nas regiões com temperaturas mais elevadas, entre 22°C e 28°C (PANIZZI, 2008). No Brasil, é amplamente distribuído, com maior ocorrência na região Centro-Oeste e no norte do Paraná, e se expandindo para regiões onde sua incidência não era comum, como o Rio Grande do Sul (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; CORRÊA-FERREIRA et al., 2010). Devido a todas estas características, a espécie é considerada a principal praga da cultura da soja na América do Sul (SOSA-GOMEZ et al., 2010; PANIZZI et al., 2012; SOUZA et al., 2017; PAZINI et al., 2019).

Os percevejos fitófagos são as pragas mais importantes da cultura da soja. Estes insetos afetam diretamente a qualidade do produto final, por provocarem murcha e má

formação de grãos e vagens, além de comprometerem a qualidade fisiológica das sementes (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999). As perdas causadas pelo ataque severo destes insetos podem comprometer a produtividade da cultura em até 30% (DEGRANDE e VIVAN, 2006).

A espécie *E. heros*, (Hemiptera, Pentadomidade) é conhecida como percevejo-marrom. Em média, desenvolve-se do ovo à fase adulta em 25 dias e tem cerca de 116 dias de longevidade, entretanto pode sobreviver por mais de 300 dias na lavoura (PANIZZI et al., 2012). Somente após o terceiro instar de desenvolvimento, começa a causar danos a cultura. Em um cultivo pode completar três gerações, dependendo da disponibilidade de alimentos e das condições ambientais (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999; PANIZZI et al., 2012).

O percevejo-marrom pode sobreviver em lavouras de soja mesmo sem a presença da cultura, pois tem a habilidade utilizar outras plantas como hospedeiras, se proteger sob a vegetação, buscar refúgios, até encontrar condições adequadas de sobrevivência (PANIZZI et al., 2012). Além disso, tem a capacidade de permanecer em estado de hibernação parcial, desde a colheita da soja até a nova semeadura (PANIZZI et al., 2012; CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999). Desta forma, quando ocorre a implantação da cultura a praga normalmente já está presente na área de cultivo (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Na soja, o maior aumento populacional do inseto ocorre entre os estádios de desenvolvimento V4 e V5, das plantas (PANIZZI et al., 2012). Os maiores danos são causados a partir do estágio R4, com tendência de aumento populacional nos estádios R5 e R7, quando pode atingir seu pico (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999). Bueno et al. (2015) em avaliação dos danos econômicos de percevejos em soja no estado do Paraná, ressaltaram que 99% dos espécimes coletados eram de *E. heros*. Isto pode estar relacionado com o aumento das áreas de monocultura, que resulta em maiores chances de sobrevivência do percevejo e favorece as pragas mais adaptadas ao ambiente de cultivo (CORRÊA-FERREIRA e MOSCARDI, 1995).

1.1.2 Controle biológico

Nos últimos anos há um constante aumento das populações de *E. heros* em lavouras de soja e isso está relacionado ao método de controle (BUENO et al., 2013; CORRÊA-FERREIRA et al., 2010). O controle de percevejos na soja, assim como de outras pragas, é realizado prioritariamente com inseticidas químicos, entretanto a pequena diversidade de princípios ativos favorece a seleção de organismos resistentes, quando as corretas recomendações de uso não são seguidas, ampliando assim o potencial de danos dos

percevejos (SOSA-GOMEZ et al., 2010; SOSA-GOMEZ e OMOTO, 2013; TUELHER et al., 2018).

O número de aplicações de inseticidas para o controle dos percevejos varia de duas a seis durante o ciclo da cultura soja, o que vai depender da época em que a cultura foi implantada e do nível de infestação da área (BUENO et al., 2013). Este tipo de controle preconiza o uso de produtos com amplo espectro, a fim de atingir outras pragas na mesma aplicação. Isso resulta na redução ou eliminação dos inimigos naturais e conseqüentemente menor regulação natural das pragas agrícolas (PARRA, 2014; SOSA-GOMEZ et al., 2010). Além disto, as aplicações excessivas destes produtos geram contaminação dos alimentos, do solo, da água, do ar e dos seres vivos (YADAV et al., 2015).

Diante dos problemas de alto custo, contaminação ambiental e perda de eficiência dos princípios ativos dos inseticidas químicos, o controle biológico é a alternativa mais sustentável em relação ao controle químico no controle das pragas agrícolas (MCCOY e FRANK, 2010; RESQUÍN-ROMERO et al., 2016). O controle biológico é uma importante estratégia no manejo de artrópodes, plantas daninhas e microrganismos, e está fundamentado nos conceitos de competição, herbivoria, parasitismo e/ou predação que acontecem naturalmente no ambiente (COSTANZA et al., 2014).

O controle biológico é dividido em clássico, quando o objetivo é controlar uma praga exótica invasora a longo prazo e consiste na introdução de um organismo na área, adaptação do mesmo a fim de resolver um problema pontual; natural, quando visa proteger inimigos naturais no ambiente de cultivo; e aplicado ou aumentativo, quando consiste na liberação inundativa de inimigos naturais na área de cultivo, sendo o mais aceito, considerado de mais rápida ação em relação aos demais (REDFIELD, 1958; BARRATT et al., 2018). Portanto, o controle biológico deve ser fundamentado em estratégias baseadas na ecologia, ou seja, na manutenção do equilíbrio natural das espécies, favorecendo a regulação natural dos organismos no ambiente de cultivo (GONTIJO, 2018). Para isto, um ambiente de cultivo que utiliza técnicas convencionais de controle de pragas, com o uso único de pesticidas químicos, precisa se adaptar e estabelecer práticas que protejam a cadeia natural das espécies (PELL et al., 2010). O controle biológico aplicado é fundamentado na expectativa de que o agente utilizado irá se multiplicar e se espalhar na área de cultivo, controlando a praga alvo por um tempo indeterminado, pois podem se multiplicar e se estabelecer na lavoura (JARONSKI, 2010).

Por isto, o controle biológico não está apenas fundamentado na liberação de organismos antagônicos. Ele deve integrar várias técnicas, como por exemplo, o uso de outros

pesticidas que apresentem menor ação sobre os agentes de controle liberados na área (SHIELDS et al., 2018). O controle biológico vem crescendo expressivamente nos últimos anos em todo o mundo (WYCKHUYS et al., 2019). Uma pesquisa na rede mundial de computadores resultou em 1735 sites que falam sobre controle microbiano de insetos, principalmente para nematoides e insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera (WYCKHUYS et al., 2018). Isto demonstra a elevada visibilidade pública e científica deste assunto. Entretanto, o controle biológico ainda é negligenciado por parte dos agricultores, pela falta de produtos disponíveis no mercado e escassez de informações sobre a possibilidade de utilização (WYCKHUYS et al., 2019). Além disto, outro fator de resistência é a ação mais lenta do controle biológico quando comparados aos produtos químicos. Porém, esta situação tende a mudar, tendo em vista a crescente adesão dos agricultores, técnicos e empresas a esta tecnologia no país.

1.1.3 Fungos entomopatogênicos na agricultura

Os fungos representam a maior parcela de organismos utilizados no controle microbiano de insetos, devido a capacidade de causar epizootias. As epizootias podem ser definidas como doenças que afetam os insetos em vários locais e épocas, e que podem acabar com populações inteiras (ALVES, 1998). Estes fungos ocorrem naturalmente nos ambientes e têm um papel fundamental na regulação natural das populações de insetos (ALVES, 1998; WANG et al., 2011).

As pesquisas com o objetivo de selecionar fungos entomopatogênicos para o controle microbiano de insetos existem há mais de 100 anos (MORA, 2017). No Brasil, os estudos que relacionam a doenças de insetos e seu uso para o controle de pragas iniciaram em 1964, com a utilização da espécie *M. anisopliae* no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854), importante praga na cultura da cana-de-açúcar (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos podem ser encontrados nos cinco filos fúngicos, Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota. Estes organismos têm a capacidade de infectar uma ampla gama de insetos hospedeiros, e atuam em todos os estádios de desenvolvimento dos insetos: ovos, larvas, pupas, ninfas e adultos (ARAÚJO e HUGHES, 2016). Cada inseto tem especificidades na quantidade de propágulos e de como o inóculo deve chegar até o inseto. Os percevejos são móveis no dossel das plantas e seu tamanho na fase adulta favorece a contaminação. Eles podem se contaminar através do contato direto com fungo pulverizado ou contato com a planta pulverizada (JARONSKI,

2010). A contaminação do inseto pode acontecer via tegumento, oral ou via sistema respiratório, de 12 a 18 horas após o contato com o fungo e em aproximadamente 72 horas o inseto pode estar totalmente colonizado (ALVES, 1998; JARONSKI, 2010). Desta forma, necessita-se de profundo conhecimento da ação do fungo na praga a ser controlada para que o controle biológico seja eficiente (WANG e WANG, 2017).

Quando a contaminação do inseto ocorre via tegumento, inicialmente os fungos entomopatogênicos aderem seus conídios na cutícula dos hospedeiros (VEGA et al., 2012). Os conídios germinam e formam apressórios (WANG e WANG, 2017). Após a germinação, degradam parte da cutícula até chegar a hemocele, onde o fungo irá crescer na forma de blastosporos ou hifas unicelulares, e se adapta a este ambiente no hospedeiro, se nutre e produz toxinas, além de privar hospedeiro de se nutrir. Desta forma o fungo consegue causar a morte do hospedeiro, esporulando na superfície do cadáver, permitindo sua dispersão (QU e WANG, 2018). A infecção pode acontecer também através da cutícula das partes bucais e dobras intersegmentares, que são regiões onde há maior umidade. Entretanto é importante destacar que a dependência da temperatura ou umidade ainda não é uma unanimidade entre os pesquisadores (JARONSKI, 2010). A habilidade de germinar na cutícula do hospedeiro permite que fungos entomopatogênicos resistam melhor as condições adversas do ambiente após a germinação e infecção, e dependa assim das condições que o inseto irá oferecer (ORTIZ-URQUIZA et al., 2015). A infecção via tegumento é a principal forma de infecção de fungos entomopatogênicos em insetos (WANG e WANG, 2017).

A grande maioria dos estudos com estes organismos buscam potencializar o controle biológico aplicado (inundativo), já que raramente os fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente em densidades capazes de controlar insetos em áreas cultivadas (SKINNER et al., 2014). A ocorrência espontânea destes fungos em áreas de cultivo de soja tem diminuído ao longo dos anos, pois são sensíveis aos fungicidas que pertencem aos grupos químicos dos triazóis e das estrobilurinas, amplamente utilizados no controle de doenças fúngicas (SOSA-GOMEZ, 2017).

O uso de fungos entomopatogênicos em cultivos agrícolas exige atenção com diversas variáveis, como a temperatura, radiação ultravioleta e umidade (JARONSKI, 2010). Dentre estes fatores, a radiação ultravioleta é considerada a principal causa da baixa persistência dos micoinseticidas no campo (FERNANDES et al., 2015). Para alguns fungos, como *B. bassiana*, a temperatura é um fator determinante para a infecção. As temperaturas ideais situam no intervalo de 23 °C a 28 °C e fora deste intervalo pode ocorrer a paralisação do crescimento fúngico (JARONSKI, 2010). A umidade é um fator importante para germinação

dos esporos, mas isto não é verdade absoluta, pois nem todos os fungos precisam de umidade alta para germinar (BUTT et al., 2016). Assim, a aplicação deste controle deve seguir uma série de preceitos, para que o fungo possa expressar sua máxima eficiência e o resultado desejado seja obtido (SINHA et al., 2016).

Os fungos entomopatogênicos podem ser considerados uma ferramenta eficaz no Manejo Integrado de Pragas (SKINNER et al., 2014). Os produtos biológicos apresentam algumas vantagens importantes no controle de pragas, como o tempo de atuação prolongado na área de cultivo (JARONSKI, 2010). A chave de todo este processo é criar um ambiente de cultivo infeccioso, buscando a atuação dos fungos entomopatogênicos nos primeiros insetos que podem se estabelecer na lavoura, o que previne o aumento descontrolado de pragas (JARONSKI, 2010).

1.1.4 Controle biológico de percevejos

O controle biológico de percevejos com parasitoides é bastante conhecido. Neste tipo de controle são utilizados microhimenópteros capazes de colonizar os ovos com diferenças nas densidades populacionais, que variam de acordo com a estação e as condições climáticas (CORRÊA-FERREIRA e MOSCARDO, 1995). Existem muitas espécies de microhimenópteros já conhecidas com este potencial. Laumann et al. (2008) em estudo para a avaliação do efeito de quatro espécies de *Trissolcus* sp. em *E. heros* na região central do Brasil, destacaram que o aumento populacional do parasitoide depois da liberação na cultura da soja foi maior que do percevejo, se mostrando eficaz como inimigo natural.

Outros estudos têm mostrado o efeito positivo da utilização de fungos entomopatogênicos no controle de diferentes espécies de percevejos fitófagos. Groth et al. (2017) encontraram resultados promissores do fungo *M. anisopliae* no controle de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) na cultura do trigo. Os três isolados do fungo *M. anisopliae* causaram 100% de mortalidade entre 8 e 10 dias após a aplicação do fungo. Sosa-Gomez e Moscardi (1998), em testes com fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* como agentes de controle de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837), *N. viridula* e obtiveram controle de 33 % em duas safras para a espécie *E. heros*. Os gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* já utilizados no controle em escala comercial de diversos artrópodes causadores de danos às plantas e são fungos promissores para a obtenção de bioinseticidas para o controle de *E. heros*.

No entanto, a utilização dos fungos entomopatogênicos no controle biológico dos percevejos a nível de campo ainda é pouco estudado, e os poucos resultados obtidos até o momento. Esta dificuldade é justificada pela defesa natural que estes insetos apresentam à infecção dos fungos entomopatogênicos (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999), devido a presença de compostos cuticulares, principalmente na epicutícula, como hidrocarbonetos insaturados de cadeia longa (LECUONA et al., 1997; ORTIZ-URQUIZA et al., 2015). Já foi relatado a resistência da espécie *Tibraca limbativentris* (Stal, 1860) a duas cepas de *M. anisopliae*, com percentagem de controle inferior a 50% após 11 dias da aplicação (QUINTELA et al., 2013). No Brasil há aproximadamente 150 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a base de fungos entomopatogênicos (mais de 75% desses formulados são de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch e *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (MASCARIN et al., 2018).

Devido à grande dificuldade no controle de percevejos na cultura da soja, é de suma importância que se desenvolvam novos estudos para a obtenção de bioinseticidas fúngicos eficientes no controle deste inseto. Por este motivo há uma constante necessidade da busca e seleção de isolados fúngicos com ampla virulência, a fim da obtenção de um controle cada vez mais eficaz (JOOP e VILCINSKAS, 2016). Para isto se faz necessário isolar fungos entomopatogênicos, testar sua capacidade de controle, selecionar e otimizar as condições de cultivo do fungo, testar doses, formular o bioinseticida, e realizar testes em casa de vegetação e no campo.

1.2 HIPÓTESE

Os fungos entomopatogênicos isolados do solo e de insetos doentes são capazes de controlar o percevejo *Euschistus heros* e ter diferentes respostas dependentes da concentração de conídios.

1.3 OBJETIVO GERAL

Isolar e selecionar fungos entomopatogênicos e determinar a concentração de conídios para o controle do percevejo *Euschistus heros*.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Isolar fungos entomopatogênicos a partir de amostras de solo e de insetos doentes.
2. Selecionar fungos entomopatogênicos eficientes no controle do percevejo *Euschistus heros* em condições de laboratório.
3. Identificar os fungos mais promissores por técnicas de biologia molecular.
4. Determinar as concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos eficientes no controle do percevejo *Euschistus heros*.

2 ARTIGO - Isolation and Evaluation of Entomopathogenic Fungi for Control of Neotropical Brown Stink Bug

Keywords

biological control, *Beauveria bassiana*, *Euschistus heros*, Pentatomidae

Abstract

Although the brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) is susceptible to entomopathogenic fungi, only a single formulation is currently available on the Brazilian market for its control. The objective of this work was to discover, isolate and evaluate novel entomopathogenic fungi with potential to control *E. heros* and determine effective conidial concentrations. Thirty-six different fungal isolates were obtained from soil samples and diseased insects and pure cultures of each were established on potato-dextrose agar. Suspensions of 1×10^8 conidia mL^{-1} were prepared from each isolate and a $5 \mu\text{L}$ aliquot was inoculated on the dorsum of adult stink bugs ($n = 8$ replications of 5 bugs each). Three isolates caused 100% mortality of bugs over a 15 days observation period. These were identified by molecular techniques as belonging to the *Beauveria bassiana* species complex and designated UFSM-1, UFSM-2 and UFSM-26. Further bioassays determined the LC_{50} , LC_{90} and cumulative mortality functions caused by these three isolates. Isolates UFSM-1 and UFSM-2 stood out as highly pathogenic, with an LC_{90} of 5×10^9 conidia mL^{-1} in 9 days, compared to an LC_{90} of 8×10^{10} conidia mL^{-1} for strain UFSM-26. Application of 1×10^8 conidia mL^{-1} of UFSM-1 and UFSM-2 isolates killed 70% of stink bugs in nine days, whereas the same concentration of UFSM-26 killed only 12%. Therefore, isolates UFSM-1 and UFSM-2 hold promise as novel agents for biological control of *E. heros*.

Introduction

Brazil is the second largest producer and exporter of soybeans, *Glycine max* L., in the world (Sosa-Gomez & da Silva 2010, Panizzi *et al* 2012, De Bastos Pazini *et al* 2019, CONAB 2019). The brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Pentatomidae: Hemiptera), is considered the main soybean pest in Brazil and causes significant losses in this crop throughout tropical and subtropical regions of South America (Sosa-Gómez & Silva 2010, De Bastos Pazini *et al* 2019). Its ability to diapause for a extended periods enables its survival even in the absence of host plants (Panizzi *et al* 2012). Due to its abundance and persistence in the field, control

of brown stink bug infestations is difficult, and chemical insecticides are often used in large quantities (De Bastos Pazini *et al* 2019). Organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids are the chemical groups most relied upon for stink bug control. All of these groups express broad spectrum activity, environmental toxicity, and can select for the evolution of resistance in targeted pest populations (Sosa-Gomez & da Silva 2010, Guedes 2017, Tuelher *et al* 2018), warranting a search for biological alternatives.

Entomopathogenic fungi have the capacity to produce epizootics in insect populations, including those of the brown stink bug. These fungi produce enzymes such as chitinases, proteases, esterases and lipases which degrade the stink bug cuticle, allowing the fungus to colonize the insect body, eventually leading to death (Joop & Vilcinskas 2016, Qu & Wang 2018). However, the natural abundance of entomopathogenic fungi is usually insufficient to control insect pests in agricultural crops, so artificial applications of fungal spores can be used to raise the amount of inoculum present (Jaronski 2010). Currently, products formulated from microorganisms are used for pest control on approximately 30 million hectares of crops worldwide and entomopathogenic fungi represent the largest portion of these bioinsecticides (Qu & Wang 2018). If efficacious biological control of the brown stink bug could be accomplished with a suitable entomopathogenic fungus it could contribute to a significant reduction of chemical insecticide use in Brazilian soybean fields.

To date, there is only one bioinsecticide registered for control of brown stink bug in Brazil, a combination of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (MAPA 2019). Moreover, there has been little research on pathogens for control of this species compared to other pests, probably due to its relatively high natural resistance to entomopathogenic fungi (Sosa-Gomez & Moscardi 1998). Stink bugs produce volatile organic substances in their exoskeleton that can suppress spore germination and mycelial growth (Lecuona *et al* 1997). For this reason, few studies have been successful in obtaining entomopathogenic fungi that effectively control the brown stink bug. The objective of the present study was to isolate and screen entomopathogenic fungi, obtained from soil and directly from stink bugs, for pathogenicity to *E. heros*, and to determine the conidial concentrations required for the more promising isolates to induce stink bug mortality under laboratory conditions.

Material and Methods

Collection and isolation of soil fungi

Soil was collected from commercial soybean fields in 15 kg samples. Each soil sample was mixed with 600 grams of ultrapure chitin and then divided into three pots, with the goal of enriching any chitinolytic fungi present. The pots were held in a greenhouse at 28 ± 2 °C for 60 days with periodic watering to maintain soil moisture. After this period, a 10 g soil sample from each pot was diluted to 10^{-5} in sterilized distilled water and plated on glass Petri dishes (9.0 cm diam.) containing potato dextrose agar (PDA) culture medium with 0.1 mg L^{-1} streptomycin (Waksman 1922). The plates were incubated at 26 ± 2 °C under a 12:12 photoperiod for 7 days. In order to obtain pure colonies, we prepared subcultures by using a sterilized platinum spatula to transfer small aliquots of fungi into slanted glass test tubes containing PDA medium and storing them at 4 °C.

Isolation of fungi from Euschistus heros

Samples of *E. heros*, both healthy and with symptoms of disease (Alves 1998), were collected from soybean fields in February and March of 2018, the period of their peak abundance in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The bugs were held in glass Petri dishes (9.0 cm diam.) in a climate-controlled chamber set to 26 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ RH, and a 14:10 (L:D) photoperiod, and provisioned with disinfected fresh green bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.) until they died. At death, the insects were immersed in a 1% (v/v) hypochlorite solution and then rinsed three times with sterilized water. The stink bug cadavers were then placed in glass Petri dishes (as above) with a damp piece of filter paper on the bottom to favor sporulation of any fungi. Small aliquots of conidia were obtained from the insect cadavers by scraping the surface of each with a sterilized platinum spatula. The conidia so obtained were then inoculated in Petri dishes with PDA medium (as above), and incubated at 26 ± 2 °C under a 12 hours photoperiod for seven days. Fungal subcultures were again established (as described above) to obtain pure colonies and these were stored at 4 °C in slanted glass test tubes containing PDA medium. In addition, four reference isolates of *B. bassiana* were obtained from the Agricultural Biotechnology Laboratory of the Western Paraná State University, Brazil (UNIOESTE).

Rearing of Euschistus heros

Brown stink bug eggs were obtained from an insect rearing facility, the Brazilian Agricultural Research Corporation, in January, 2018. The bugs were reared in a climate-controlled chamber at 26 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ RH, and a 14:10 (L:D) photoperiod. Adult bugs were held in screened, aluminum frame cages ($42 \times 30 \times 14$ cm) and provisioned with raw and dried peanuts, *Arachis hypogaea* L., soybeans, seeds of sunflower, *Helianthus annuus* L., and fresh green bean pods. Pieces of tissue paper were placed in the cages as an oviposition substrate. Egg masses were removed every 48 h and placed in glass Petri dishes (as above), ten per dish, with a moist ball of cotton. Upon eclosion, nymphs were transferred to ventilated polystyrene boxes ($3.5 \times 11.0 \times 11.0$ cm), 200 nymphs per box, where they were held under the same physical conditions as adult bugs until they molted to the adult stage. Adults were transferred to the larger oviposition cages (as described above), ca. 100 pairs in each.

Bioassays

Fungi were screened for pathogenicity by inoculating conidia on the dorsum of adult brown stink bugs (ca. 72 hours post-molting). The fungal isolates were grown in Petri dishes with PDA medium (as above), at 26 ± 2 °C under a 12 h photoperiod for 7 to 21 days, until sporulation of the fungus. Plates with sporulating fungi received 20 mL of a sterile Tween[®] 80 solution (0.1% v/v) and samples of the resulting conidial suspension were collected with a Drigalski spatula and transferred to a glass test tube. Conidial concentrations were determined in a Neubauer chamber and standardized to 1.0×10^8 conidia mL⁻¹ by dilution with distilled water and Tween[®] 80 solution (0.1% v/v). The control consisted of the sterile Tween[®] solution. Five μ L of the suspension was applied to the dorsum of each stink bug with a micropipette. The bugs were incubated at 26 ± 2 °C and 14:10 (L:D) photoperiod in 9.0 cm Petri dishes with moist filter paper on the bottom and provisioned with fresh green bean pods that had been disinfected with 1% (v/v) hypochlorite solution and rinsed three times with distilled water. Thirty-six fungi were evaluated with eight replications, each with five adult insects, plus a control. Stink bug mortality was tallied daily for 15 days and mortalities were adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925). To confirm fungi as the cause of death, Koch's Postulates were then performed.

Dead bugs were surface-disinfected with 1% (v/v) sodium hypochlorite, rinsed three times with sterilized distilled water, and incubated in a climate-controlled chamber set to $26 \pm$

2 °C, 60 ± 5% RH, and a 14:10 (L:D) photoperiod to induce sporulation of the fungus. Subsequently, conidia from the insect body were incubated on PDA medium to verify that the re-isolated fungus was the same as the inoculated fungus. Bugs killed by fungi had a characteristic blackened, dry appearance and external sporulation was evident before the end of the 15-day observation period.

We performed conidia concentration tests on the three best-performing isolates obtained in the previous test, plus the isolate Unioeste 97 as a *B. bassiana* reference. Using a micropipette, five µL of conidial suspension was applied to the dorsum of individual adult bugs (3-4 days post adult molt). Four concentrations were evaluated, ranging from 1.0×10^6 - 1.0×10^9 conidia mL⁻¹, all suspended in Tween[®] 80 solution (0.1% v/v). The negative control consisted of Tween[®] 80 solution in sterilized distilled water (0.1% v/v). Each concentration was tested with 10 replications, each with 12 brown stink bugs. The insects were incubated in ventilated containers, as used for rearing immature bugs, and held under the same physical conditions as the previous test. Mortality was evaluated during a 15-day observation period.

Molecular identification of fungi

The four fungi used in the spore concentration test were incubated on solid PDA medium for 15 days and a small quantity of spores were collected for DNA extraction using the ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep[®] kit (Zymo Research, USA), according to the manufacturer's instructions. A polymerase chain reaction (PCR) was performed for partial amplification of the EF-1 α elongation factor gene with the 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' and 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3' primers. Three µL of the fungal DNA were added to the final 25 µL PCR volume, containing 10 mM Tris HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.1 mM MgCl₂; 10 mM of each dNTP; 25 nmoles of each primer EF1 and EF2; 1.5 µL Taq DNA polymerase and ultrapure water to complete the reaction volume. A negative control without DNA was included in the PCR. Amplification reactions were performed in a thermal cycler (Applied Biosystems 2720, Thermo Fisher Scientific, USA) under the following conditions: 94 °C for 1 min, 35 cycles of 95 °C for 3 min, 95 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and 30 sec, and 72 °C for 10 min. At the end of the reaction, the amplified fragments were held at 4 °C. To verify amplification, a 1.5% agarose gel electrophoresis was performed in 1X TBE-stained TBE buffer (Invitrogen, Brazil). PCR products were purified with the Gen Elute PCR clean-up Kit[®] (Sigma, USA) and sequenced (ABI PRISM 3100, Thermo Fisher Scientific, USA). The sequences were analyzed using the

Staden Package 2.0.0b program (Staden 2003) to obtain consensus. Nucleotide sequences were aligned using the Clustal W and Clustal X programs (Thompson *et al* 1994), and sequences deposited in the databases were used for comparisons. The Neighbor-joining method, with Jukes-Cantor model, was used to estimate evolutionary distances. A phylogenetic tree was built using the MEGA 7.0 program, the Maximum Likelihood algorithm and bootstrap values were calculated with 1,000 replicates.

Statistical Analysis

All mortality data was adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925). Concentrations lethal to 50% and 90% of the population and their confidence intervals were estimated by probit analysis (Finney 1971) using the program 'PROC PROBIT' (SAS Institute, 2002). Data were considered significantly different from controls when conidial confidence intervals did not overlap with control confidence intervals. To compare control mortalities between fungi at the same conidial concentration, data were transformed to $\sqrt{x} + 1$ and the corrected mortality means were separated using Tukey's test ($\alpha = 0.05$) in the ExpDes.pt package of the program R (R Core Team 2014).

Results

A total of nine fungi were isolated from soil samples, out of which only three caused significant stink bug mortality, and another 27 were isolated directly from stink bugs, of which 17 (63%) caused mortality. The fungi designated UFSM-1, UFSM-2, isolated directly from *E. heros*, and UFSM-26, isolated from soil, all caused 100% adult bug mortality after the 15 days observation period, as did the reference isolate Unioeste 97. These four isolates were selected for concentration tests.

The three selected fungi were all identified by molecular techniques as *B. bassiana* (Fig 1), as well as the reference fungus, Unioeste 97(MN26876). Three fungi grouped within the same clade UFSM-2, UFSM-26 and Unioeste 97 with similarity bootstrap 95, with UFSM-1 belonging to another clade. DNA sequences were deposited at GenBank under accession number MN26877 (UFSM-1), MN26878 (UFSM-2) and MN26879 (UFSM-26).

Probit analysis was used to establish lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀ values) at nine and 15 days after application of the four *B. bassiana* isolates (Table 1). The reference fungus Unioeste 97 was the most pathogenic, but the isolates UFSM-1 and UFSM-2 presented

LC values close to Unioeste 97, indicating that they were highly pathogenic and rapidly lethal to brown stink bugs. The UFSM-26 fungus was the least pathogenic among the isolates tested, expressing the highest LC₅₀ and LC₉₀ over both observation periods, indicating higher conidial concentrations would be needed to kill the same number of insects compared to the other isolates.

Differences in pathogenicity among isolates became evident after six days at the highest conidial concentration, and after nine days at the lowest, mortality occurring faster at higher concentrations (Fig 2). The UFSM-1 and UFSM-2 fungi did not differ statistically from each other in terms of bug mortality after 15 days, but the UFSM-26 fungus caused less cumulative mortality than the others. Aggressive colonization of the stink bugs by fungal isolates was visually apparent at 15 days after inoculation (Fig 3). Characteristic white, powdery masses of sporulating fruiting bodies were observed on the surface of the bug cadavers, roughly in proportion to the pathogenicity of the fungus.

Discussion

We succeeded in identifying three strains of *B. bassiana* that all caused 100% mortality of adult *E. heros* after the 15 days observation period in the screening test. Because adult bugs are usually the life stage most resistant to infection, higher virulence can be expected against nymphal stages of *E. heros*. Genetic differences between the fungi were revealed by the molecular analysis, which grouped them in different clades.

The test of different conidial concentrations estimates the quantity of spores that would be necessary for effective control over a given time interval (Jaronski 2010). Fungal efficacy is directly linked to the number of propagules that come into contact with the host surface (Vega *et al* 2000). The actual number of spores deposited on the dorsum of each stink bug ranged from 5,000 conidia (for the concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹) to 5,000,000 (for the concentration of 1×10^9 conidia mL⁻¹). In field applications, crops are typically inundated with large quantities of spores, but only a small fraction of these actually contact the target (Mascarin & Jaronski 2016).

According to Wraight & Carruthers (1999), it is necessary to apply at least 1×10^{13} to 1×10^{14} conidia ha⁻¹ in order to assure that 1×10^4 to 1×10^5 conidia cm⁻² reach the plant surface. Even smaller amounts of the applied conidia can be expected to reach individual insects. As Mascarin *et al* (2013) noted with respect to *Bemisia tabaci* (Gennadius), the pathogenicity of fungi is directly affected by the initial quantity of spores that contact the insect. However,

adult stink bugs are highly mobile and frequently move within and among plants, which could ostensibly improve control efficacy by facilitating contact with conidia. Our results indicate that control efficacy will be reduced at spore concentrations lower than 5,000 conidia per bug.

Unlike chemical insecticides that can be lethal in a few hours, entomopathogenic fungi require 24 to 48 hours to infect the insect (Qu & Wang 2018), and onset of mortality occurs between the second and third day after application. The latent period between conidial contact and insect death will vary according to the strength of the insect's immune response and the virulence of the fungus (Wang & Wang 2017). Differences in the pathogenicity of fungal isolates to *E. heros* were evident on the third day after application, and likely reflect variation in infection times and fungal generation times (Joop & Vilcinskis 2016).

The data obtained on lethal concentrations and mortality established the following order of virulence: UNIO-97 > UFSM-1 = UFSM-2 > UFSM-26. It is well known that isolates of the same fungal species can vary significantly in their ability to infect and kill a particular arthropod, and *B. bassiana* species in particular exhibit substantial intraspecific variation in this regard (Mascarin & Jaronski 2016). For example, Ramos et al (2017) evaluated the natural occurrence of *B. bassiana* on the red banded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood), and found 150 isolates with discernable genetic differences. Xavier & Avila (2006) tested 11 isolates of *B. bassiana* against the burrowing bug *Scaptocoris carvalhoi* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae) and observed that mortality at 15 days post-exposure ranged from 11% to 79%. This variability probably reflects the evolution of different host-specific pathogenicity among isolates, which results in colonization specificity (Joop & Vilcinskis 2016).

The isolates UFSM-1, UFSM-2 and Unioeste 97 overcame the insect's immune responses relatively quickly. The *B. bassiana* fungus produces secondary metabolites such as destruxins that modify the activity of P-glycoprotein, a mediator of fungal detoxification in insects. These metabolites can be produced in different amounts by different isolates of the same species (Podsiadlowski et al 1998); subsequent work is warranted to determine whether their differential expression is related to pathogenicity in these isolates. Whereas the UFSM-26 isolate required a longer period of time to cause mortality, it is possible that this isolate impaired insect behavior and biology in ways that were not evaluated in this study, prior to causing death. For example, insects infected by fungi can exhibit suppressed feeding and/or reproduction (Joop & Vilcinskis 2016, Qu & Wang 2018).

Conclusion

Three isolates of *B. bassiana*, one isolated from soil and two from stink bug cadavers, were identified as pathogenic to *E. heros*. The isolates designated UFSM-1 and UFSM-2, both isolated directly from infected bugs, caused 50% mortality of adult *E. heros* six days post-inoculation, and 75% mortality at nine days, at the two highest concentrations tested. Cumulative mortality functions for these two isolates were not significantly different from the reference isolate Unioeste 97 for all concentrations tested. The isolate designated UFSM-26, isolated from the soil, was less virulent than the others.

Acknowledgments

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001, Federal University of Santa Maria, Post Graduate Program in Soil Science, Brazil. The authors are grateful to Professor Luis Francisco Angeli Alves of Agricultural Biotechnology Laboratory (UNIOESTE, Brazil), for providing the reference strains of *B. bassiana*; and Professor Oderlei Bernardi (UFSM, Brazil) for support in statistical analysis.

References

- Abbott, WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267
- Alves, SB (1998) Controle microbiano de insetos. FEALQ Publishers, Piracicaba, Brazil, 1163 pp
- CONAB- Boletim da Safra de Grãos (2019) <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> (last accessed 5.5.19)
- De Bastos Pazini J, Padilha AC, Cagliari D, Amaral Bueno F, Rakes M, Zotti MJ, Francisco, J, Martins S, Dionei Grützmacher A (2019). Differential impacts of pesticides on *Euschistus heros* (Hem.: Pentatomidae) and its parasitoid *Telenomus podisi* (Hym.: Platygasteridae). *Sci Reports* 9:6544
- Finney DJ (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Guedes RNC (2017) Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. *Pest Manag Sci* 73:479–484

- Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens
 BioControl 55:159–185
- Joop G, Vilcinskas A (2016) Coevolution of parasitic fungi and insect hosts. Zoology
 119:350–358
- Lecuona R, Clement, JL, Riba G, Joulie C, Juárez P (1997) Spore germination and hyphal
 growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. J Econ Entomol 90:119–123
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019)
 <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/registro-de-produtos-e-estabelecimentos> (last
 accessed 5.29.19)
- Mascarin GM, Jaronski ST (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a
 microbial insecticide. World J Microbiol Biotech 32:177
- Mascarin GM, Kobori NN, Quintela ED, Delalibera I (2013) The virulence of
 entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae)
 and their conidial production using solid substrate fermentation. Biol Control 66:209–
 218
- Panizzi AR, De A, Bueno F (2012) Insects that attack pods and grains of soybean. In:
 Hoffman-Campo CB, Correa-Ferreira BS, Moscardi F (eds) Bioecology of
 Neotropical Stink Bugs, pp. 335-420. (In Portuguese)
- Podsiadlowski L, Matha V, Vilcinskas A (1998) Detection of a P-glycoprotein related pump in
Chironomus larvae and its inhibition by verapamil and cyclosporin A. Comp Biochem
 Physiol - B Biochem Mol Biol 121:443–450
- Qu S, Wang S (2018) Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system.
 Dev Comp Immunol 83:96–103
- R Core Team (2014) R, A Language and Environment for Statistical Computing. R
 Foundation for Statistical Computing.
- Ramos Y, Portal O, Lysoe E, Meyling NV, Klingen I (2017) Diversity and abundance of
Beauveria bassiana in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from
 organic and conventional fields. J Invert Pathol 150:114–120
- SAS Institute (2002) SAS ver. 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC
- 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*. Brazil J Invert
 Pathol 71:115–120

- Sosa-Gómez DR, da Silva JJ (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos. *Paraná Brazil Pesqui Agropec Bras* 45:767–769
- Staden (2003) Staden Package <http://staden.sourceforge.net/> (last accessed 10.15.2019).
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680
- Tuelher ES, da Silva ÉH, Rodrigues HS, Hirose E, Guedes RNC, Oliveira EE (2018) Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *J Pest Sci* 91:849–859
- Vega FE, Dowd PF, Lacey LA, Pel JK, Jackson DM, Klein MG (2000) Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In: Lacey LK, Kaya HK (eds) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, pp. 153–177
- Waksman SA (1922) A method for counting the number of fungi. *Soil J Bacteriol* 7:339–341
- Wang C, Wang S (2017) Insect pathogenic fungi. Genomics, molecular interactions, and genetic improvements. *Annu Rev Entomol* 62:73–90
- Wraight SP, Carruthers RI (1999) Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. In: Hall FR, Menn JJ (eds) *Biopesticides: Use and Delivery*. Humana Press, NJ, pp. 233–270
- Xavier LMS, Avila CJ (2006) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin isolates to *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera, Cydnidae). *Rev Bras Entomol* 50:540–546

Figure captions

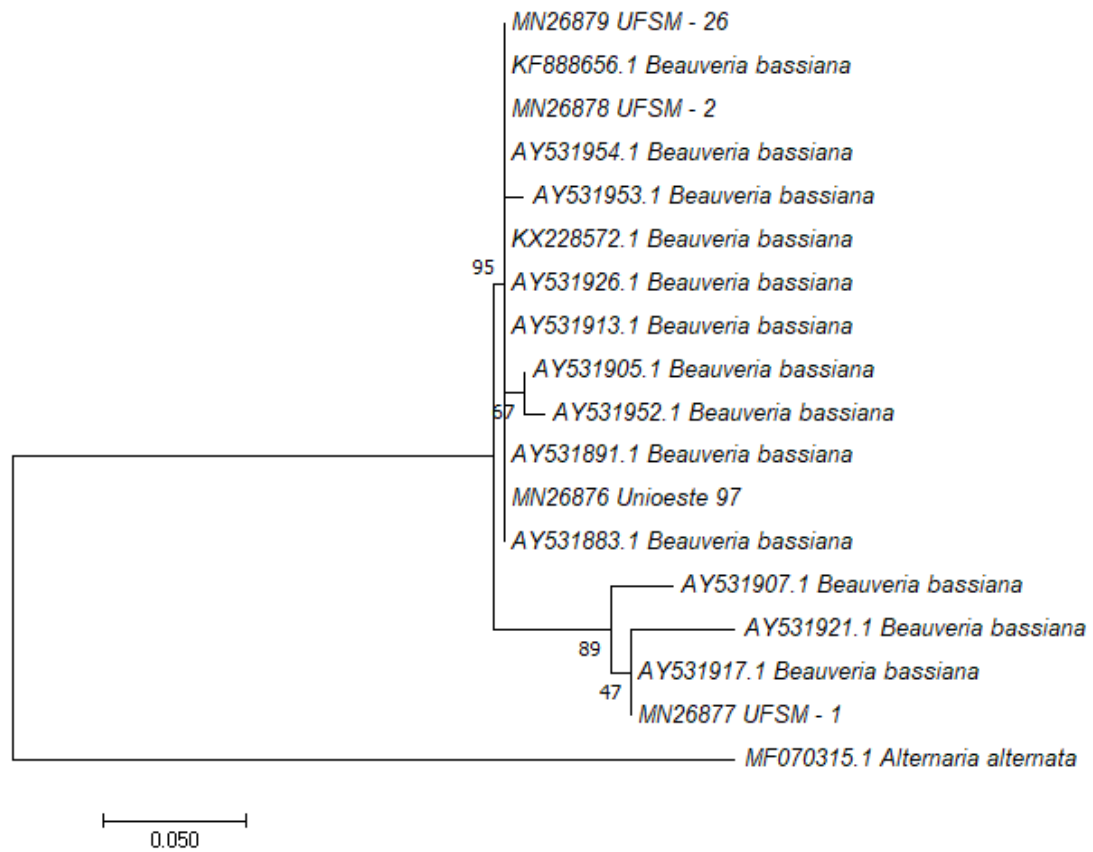
Fig 1 Phylogenetic tree of partial sequences of the elongation factor (EF-1 α) gene of the four fungi (UFSM-1, UFSM-2, UFSM-26 and Unioeste 97) of the species *Beauveria bassiana*, using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model. Bootstrap values are in percentage. *Alternaria alternata* was used as an outgroup.

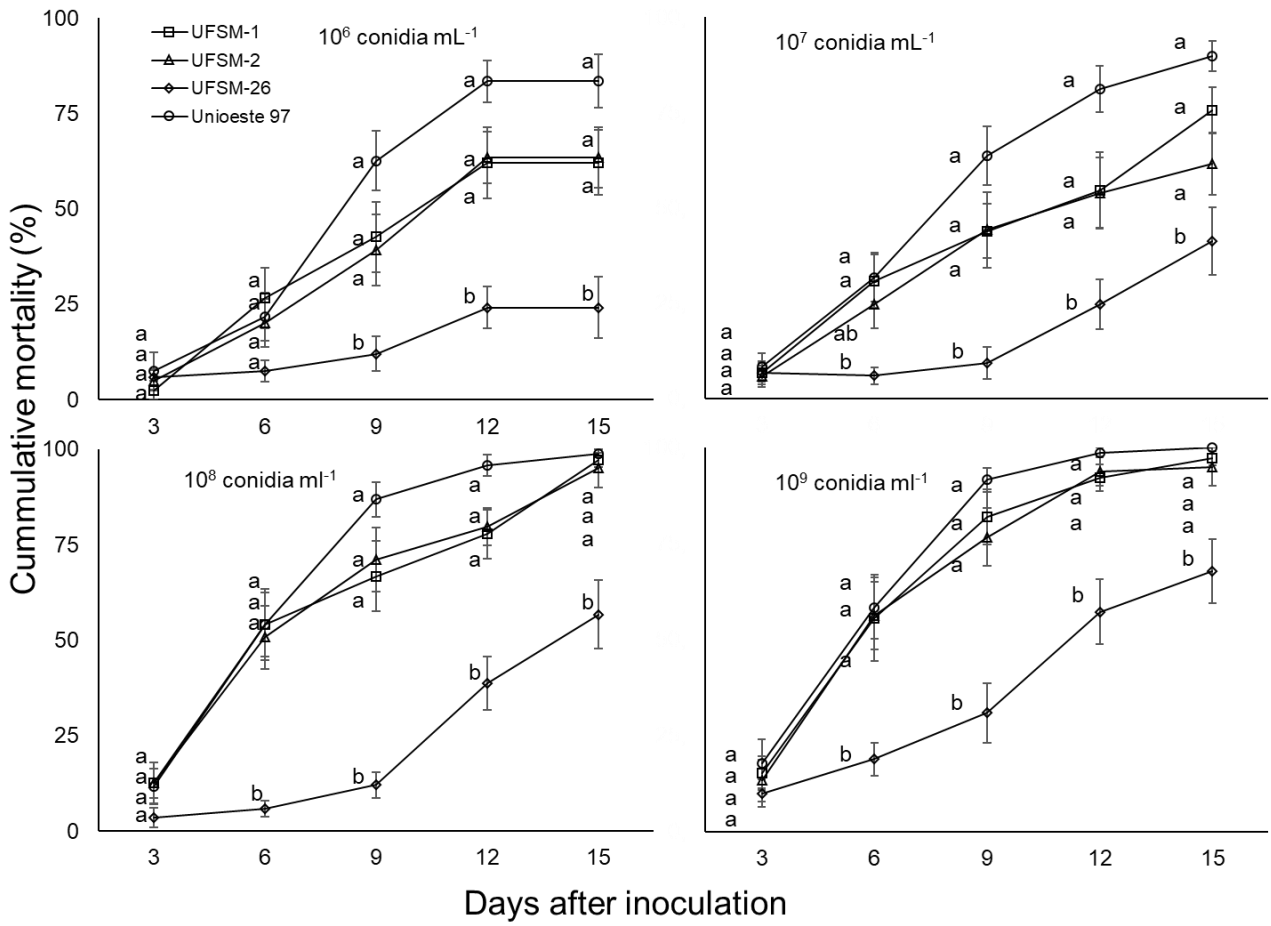
Fig 2 Cumulative corrected mortality (\pm SE) of *Euschistus heros* adults over 15 days following inoculation with *Beauveria bassiana* strains UFSM-1, UFSM-2, UFSM-26 and Unioeste 97 at concentrations of 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 conidia mL⁻¹. Means were separated by Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Fig 3 Sporulation of *Beauveria bassiana* strains UFSM-1 (A - B), UFSM-2 (C- D), UFSM-26 (E - F) and Unioeste 97 (G - H) on the body surface of *Euschistus heros* adults 15 days after inoculation with 1×10^9 conidia mL⁻¹.

Table 1. Conidial concentrations (in mL⁻¹) of four *Beauveria bassiana* isolates required to kill 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀) of *Euschistus heros* adults (n = 480 in all tests) 9 and 15 days after inoculation. Values bearing the same letter were not significantly different based on overlapping confidence limits.

Isolate	Angular coefficient ± SE	LC ₅₀ (95% CIs)	LC ₉₀ (95% CIs)	χ ² (3 df)
9 days post inoculation				
UFSM-1	0.39 ± 0.07	6.53 × 10 ⁶ (1.12 × 10 ⁶ – 2.02 × 10 ⁷) b	5.34 × 10 ⁹ (1.36 × 10 ⁹ – 7.13 × 10 ¹⁰) b	2.38
UFSM-2	0.40 ± 0.08	6.13 × 10 ⁶ (1.14 × 10 ⁶ – 1.85 × 10 ⁷) b	5.64 × 10 ⁹ (1.41 × 10 ⁹ – 7.30 × 10 ¹⁰) b	1.68
UFSM-26	0.92 ± 0.37	4.06 × 10 ⁹ (1.26 × 10 ⁹ – 1.48 × 10 ¹²) c	8.09 × 10 ¹⁰ (9.39 × 10 ⁹ – 1.03 × 10 ¹⁸) c	3.89
Unioeste 97	0.35 ± 0.07	2.05 × 10 ⁵ (6.42 × 10 ³ – 1.13 × 10 ⁶) a	4.88 × 10 ⁸ (1.60 × 10 ⁸ – 3.22 × 10 ⁹) a	4.11
15 days post inoculation				
UFSM-1	0.43 ± 0.09	2.53 × 10 ⁵ (8.07 × 10 ³ – 1.28 × 10 ⁶) b	2.10 × 10 ⁸ (6.23 × 10 ⁷ – 1.82 × 10 ⁹) b	3.00
UFSM-2	0.46 ± 0.09	3.92 × 10 ⁵ (1.86 × 10 ⁴ – 1.77 × 10 ⁶) b	2.42 × 10 ⁸ (7.37 × 10 ⁷ – 1.94 × 10 ⁹) b	4.34
UFSM-26	0.46 ± 0.10	6.17 × 10 ⁷ (5.89 × 10 ⁶ – 2.50 × 10 ⁸) c	2.55 × 10 ¹⁰ (3.85 × 10 ⁹ – 2.88 × 10 ¹²) c	0.41
Unioeste 97	0.44 ± 0.11	1.15 × 10 ⁴ (1.05 × 10 ² – 1.27 × 10 ⁵) a	6.18 × 10 ⁶ (1.56 × 10 ⁶ – 1.87 × 10 ⁷) a	1.59







REFERÊNCIAS

- ARTHURS, S.; DARA, S. K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Ed. Piracicaba, 1998. 1163 p.
- BARRATT, B. I. P. et al. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 155-167, 2018.
- BOOMSMA, J. J. et al. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 59, p. 467-485, 2014.
- BUENO, A. F. et al. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. **Crop Protection**, v. 71, p. 132-137, 2015.
- BUENO, A. F.; PAULA-MORAES, S. V.; GAZZONI, D. L.; POMARI, A. F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 439-447, 2013.
- BUTT, T. M. et al. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. **Advances in genetics**, p. 307-364, 2016
- CAMPOS, M. C. Modernização da agricultura, expansão da soja no Brasil e as transformações socioespaciais no Paraná. **Revista Geografar**, v. 6, n. 1, 2011.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: oitavo levantamento – maio 2019. Brasília: **Conab**, v. 6, n. 8 p.135. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> Acesso em: 21/05/2019.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MACHADO, E. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Sobrevivência e desempenho reprodutivo do PERCEVEJO-MARRON *Euschistus heros* (F.) na entressafra da soja. **Anais da Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, p. 81-83, 2010.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. **Biological Control**, v.5, n.2, p.196–202, 1995.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. Percevejos da soja e seu manejo. **EMBRAPA Soja - Circular Técnica (INFOTECA-E)**, n.24; p.45, 1999.
- COSTANZA, R. et al. Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, v. 26, p. 152-158, 2014.
- DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragmas da soja. **Boletim de Pesquisa da Soja**, n.10, p.153-179, 2006.
- DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 197-203, 2011.

FERNANDES, É. K. et al. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015.

GODOY, K.B.; ÁVILA, C. J.; DUARTE, M. M.; ARCE, C.C.M. Parasitismo e sítios de diapausa de adultos do PERCEVEJO-MARROM, *Euschistus heros* na região da Grande Dourados, MS. **Ciência Rural**, v.40, p.1199-1202, 2010.

GONTIJO, L. M. Engineering natural enemy shelters to enhance conservation biological control in field crops. **Biological Control**, v.130, p.155-163, 2018.

GROTH, M. Z. et al. Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Australian Journal of Crop Science**, v.11, n.3, p. 360, 2017.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina Embrapa soja, p. 70, 2000.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159-185, 2010.

JOOP, G.; VILCINSKAS, A. Coevolution of parasitic fungi and insect hosts. **Zoology**, v. 119, n. 4, p. 350-358, 2016.

KALVNADI, E. et al. Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 158, p. 32-42, 2018.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LAUMANN, R. A. et al. Comparative biology and functional response of *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) and implications for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) biological control. **Biological Control**, v. 44, n. 1, p. 32-41, 2008.

LECUONA, R. et al. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 1, p. 119-123, 1997.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 177, 2016.

MCCOY, E. D.; FRANK, J. H. How should the risk associated with the introduction of biological control agents be estimated? **Agricultural and Forest Entomology**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2010.

- ORTIZ-URQUIZA, A.; LUO, Z.; KEYHANI, N. O. Improving mycoinsecticides for insect biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1057-1068, 2015.
- PANIZZI, A. R. Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In: **Encyclopedia of Entomology**. 2007, p. 2585-2587.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. Insetos que atacam vagens e grãos. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília. In: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, 2012, cap.5, p. 335-420.
- PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.
- PAZINI, B. J. et al. Differential impacts of pesticides on *Euschistus heros* (Hem.: Pentatomidae) and its parasitoid *Telenomus podisi* (Hym.: Platygastridae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6544, 2019.
- PELL, J. K.; HANNAM, J. J.; STEINKRAUS, D. C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, n. 1, p. 187-198, 2010.
- QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 83, p. 96-103, 2018.
- QUINTELA, E. D. et al. Enhanced susceptibility of *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) to *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of chemical insecticides. **Biological Control**, v. 66, n. 1, p. 56-64, 2013.
- REDFIELD, A. C. O controle biológico de fatores químicos no meio ambiente. **Cientista americano**, v. 46, n. 3, p. 230-221, 1958.
- RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological control**, v. 92, p. 101-110, 2016.
- SHILELDS, M. W. et al. History, current situation and challenges for Conservation biological control. **Biological Control**, 2018.
- SINHA, K. K.; CHOUDHARY, A. Kr; KUMARI, P. Entomopathogenic fungi. In: **Ecofriendly Pest Management for Food Security**, cap. 15, 2016, p. 475-505.
- SKINNER, M. et al. Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. In: **Integrated Pest Management**. Academic Press, cap. 10, 2014. p. 169-191.
- SOSA-GOMEZ, D. R. Microbial control of soybean pest insects and mites. In: **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. Academic Press, cap. 13, 2017. p. 199-208.
- SOSA-GOMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and Field Studies on the Infection of Stink Bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, n. 2, p. 115-120, 1998.

SOSA-GOMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga. In: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2013, cap 10, p. 673-723.

SOSA-GOMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 767-769, 2010.

SOUZA, E. S. et al. Variable Levels of Resistance of Soybean Genotypes on the Performance of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 6, p. 2672-2678, 2017.

TUELHER, E. S. et al. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 849-859, 2018.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, n. 1, p. 1-20, 2012.

VEGA, F. E. et al. Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Springer, Dordrecht, 2000, cap. 3, p. 153-177.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens. **Insect Pathology**, v. 2, p. 171-220, 2012.

WANG, C.; WANG, S. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements. **Annual Review of Entomology**, v. 62, p. 73-90, 2017.

WANG, S. et al. Local adaptation of an introduced transgenic insect fungal pathogen due to new beneficial mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 51, p. 20449-20454, 2011.

WYCKHUYS, K. A. G. et al. Maximizing farm-level uptake and diffusion of biological control innovations in today's digital era. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 133-148, 2018.

WYCKHUYS, K. A. G. et al. Global disparity in public awareness of the biological control potential of invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 660, p. 799-806, 2019.

YADAV, I. C. et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 123-137, 2015.