



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**MORFOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO E ASPECTOS
BIOLÓGICOS DO PERCEVEJO-MARROM *Euschistus heros*
(FABRICIUS, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae)
ALIMENTADO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA**

Londrina
2018

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**MORFOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO E ASPECTOS
BIOLÓGICOS DO PERCEVEJO-MARROM *Euschistus heros*
(FABRICIUS, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae)
ALIMENTADO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros.

Coorientador: Dr. Samuel Roggia.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moscardi, Maurício Lara.

Morfologia do tubo digestivo e aspectos biológicos do percevejo-marrom *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com diferentes genótipos de soja / Maurício Lara Moscardi. - Londrina, 2018.
60 f.

Orientador: Ângela Maria Ferreira Falleiros.

Coorientador: Samuel Roggia.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis* - Tese. 2. Isoflavonoides - Tese. 3. Controle alternativo - Tese. 4. Intestino médio - Tese. I. Falleiros, Ângela Maria Ferreira. II. Roggia, Samuel. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**MORFOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO E ASPECTOS BIOLÓGICOS
DO PERCEVEJO-MARROM *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794)
(Heteroptera: Pentatomidae) ALIMENTADO COM DIFERENTES
GENÓTIPOS DE SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Ferreira
Falleiros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sheila Michele Levy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniela de Oliveira Pinheiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

Suplentes

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela saúde e disposição para superar todos os obstáculos e desafios.

Aos meus pais, Flávio (in memoriam) e Rosa Maria, meus irmãos Gustavo e Rodolfo, e a minha noiva Viviane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por possibilitar um novo aprendizado a cada dia de minha vida.

À minha orientadora, professora Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros, pela orientação, compreensão, paciência, pelos “puxões de orelha” e, sobretudo, pela amizade nestes muitos anos de convivência.

Aos meus familiares, meus pais Flávio (*in memorian*) e Rosa Maria, meus irmãos Gustavo e Rodolfo, por todo apoio, compreensão e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha noiva, Viviane Dutra, por toda paciência, ajuda e compreensão, por todos os dias ao meu lado e por todo o amor.

Ao Dr. Samuel Roggia, pelas sugestões e conselhos durante o curso.

À minha banca, Dr. Maurício Ventura, Dra. Sheila Levy, Dra. Daniela Pinheiro e Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo, por aceitarem o convite para participar deste momento.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Agronomia e aos professores do Departamento de Agronomia.

Aos meus amigos de todas as horas, Leonardo, Diogo, Ricardo, João, por inúmeras vezes terem me apoiado, pela amizade e companheirismo. Com certeza a presença de vocês foi imprescindível para a conclusão desta etapa e essencial nas horas de descontração, descanso e alegria.

Aos profissionais da UEL e da Embrapa, Renata, Andreia, Thiago, Davi, Jovenil, Serginho, Ivanilda e Vilma, pela constante ajuda, pelas conversas e todos os momentos divertidos.

Aos funcionários do Departamento e da Pós-graduação em Agronomia, à Universidade Estadual de Londrina, à Embrapa Soja e à CAPES.

A todos os amigos que torceram por mim.

MOSCARDI, Maurício Lara. **Morfologia do tubo digestivo e aspectos biológicos do percevejo marrom *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com diferentes genótipos de soja**. 2018. 60f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Dentre estes, destaca-se o percevejo marrom (*Euschistus heros*). Como este inseto possui resistência a alguns inseticidas, a busca por métodos alternativos de controle tem aumentado, como é o caso das plantas resistentes. Algumas cultivares de soja apresentam flavonoides, que são geralmente encontrados em maior abundância nos genótipos resistentes a pragas. Outra alternativa são genótipos de soja que contêm genes de *Bacillus thuringiensis*, sendo que o sistema digestório de *E. heros* pode ser afetado por estes dois mecanismos de resistência. O objetivo deste trabalho é analisar, morfológica e quimicamente, através de técnicas microscópicas, os efeitos pós ingestivos de diferentes genótipos de soja no trato digestivo de *E. heros*, bem como a biologia deste inseto alimentado com estes genótipos. Para análises morfológicas, os tubos digestivos foram observados em microscopia de luz (coloração HE) e eletrônica de transmissão. Para o estudo histoquímico, foi realizada a detecção de polissacarídeos neutros, polissacarídeos ácidos e proteínas totais. Para os parâmetros de biologia, foi considerado a duração do instar, viabilidade dos insetos por instar e período ninfa-adulto. Também foram avaliados o peso dos insetos adultos após a emergência, a longevidade, tanto total como somente das fêmeas, a razão sexual e a oviposição. Também foi realizado um teste de preferência alimentar, com e sem chance de escolha. Morfológicamente, os insetos alimentados com os genótipos de soja apresentaram alterações em relação à testemunha, principalmente nas células digestivas, bastante evidentes na região apical dessas células. Histoquimicamente, ambos os tratamentos apresentaram alterações, sendo que a maior alteração se deu com a alta positividade do tratamento BRS 391 ao método para proteínas totais. Quanto a biologia, nenhum dos parâmetros biológicos observados apresentou diferença significativa em relação à testemunha. Os resultados de preferência alimentar indicam que pode haver não preferência ou repelência do percevejo *E. heros* ao genótipo BRS 391 e preferência ao genótipo BRS 1001IPRO. O percevejo *E. heros* apresenta preferência alimentar pelo genótipo BRS 1001IPRO e não preferência pelo genótipo BRS 391. Os genótipos causam alterações morfológicas e histoquímicas no epitélio do intestino médio de *Euschistus heros*, indicando que ambos os genótipos podem estar associados com a quebra de resistência do inseto aos inseticidas.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Isoflavonoides. Controle alternativo. Intestino médio.

MOSCARDI, Maurício Lara. **Morphology of the digestive tract and biological aspects of the brown stink bug *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) fed with different soybean genotypes.** 2018. 60p. Thesis (Doctoral degree in Agronomy) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The soybean crop is subject to insect attack from germination to its harvest. In this context, the brown stink bug (*Euschistus heros*) stands out. As this insect has resistance to some insecticides, the search for alternative control methods has increased, as is the case of resistant plants. Some soybean cultivars have flavonoids, which are usually more found in the pest-resistant genotypes. Another alternative is soybean genotypes that contain *Bacillus thuringiensis* genes, and the *E. heros* digestive system can be affected by these two mechanisms of resistance. The objective of this work is to analyze, morphologically and chemically, through microscopy techniques, the post ingestive effects of different soybean genotypes on the digestive tract of *E. heros*, as well as the biology of this insect fed with these genotypes. For morphological analysis, the digestive tubes were observed under light microscopy (HE staining) and transmission electron microscopy. For the histochemical study, the detection of neutral polysaccharides, acid polysaccharides and total proteins was performed. For the biology parameters, were considered the instar duration, insect viability per instar and nymph-adult period. The weight of adult insects after emergence, longevity, both total and only females, sex ratio and oviposition were also evaluated. A food preference test was also performed, with and without a choice. Morphologically, the insects fed with the soybean genotypes showed alterations in relation to the control, mainly in the digestive cells, evident in the apical region of these cells. Histochemically, both treatments showed alterations, and the greatest change occurred with the high positivity of the BRS 391 treatment to the total protein method. None of the biological parameters observed presented a significant difference in relation to the control. The food preference results indicate that there may be no preference or repellency of the *E. heros* to the BRS 391 genotype and preference to the BRS 1001IPRO genotype. *E. heros* has a food preference for the BRS 1001IPRO genotype and no preference for BRS 391 genotype. Also, the genotypes cause morphological and histochemical changes in the midgut epithelium of *Euschistus heros*, indicating that both genotypes may be associated with insect resistance breaking.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Isoflavonoids. Alternative control. Midgut.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	12
2.2 Resistência de plantas a insetos	14
2.3 Percevejo-marrom, <i>Euschistus heros</i> (F.)	17
2.4 Intestino médio dos insetos	19
REFERÊNCIAS	22
3 ARTIGO A – EFEITOS PÓS INGESTIVOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA NO INTESTINO MÉDIO DE <i>Euschistus heros</i> (FABRICIUS, 1794) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)	28
3.1 RESUMO	28
3.2 ABSTRACT	29
3.3 INTRODUÇÃO	30
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.4.1 Genótipos de soja utilizados	32
3.4.2 Morfologia	32
3.4.2.1 Microscopia de luz	32
3.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	33
3.4.3 Histoquímica	34
3.4.3.1 Detecção de Polissacarídeos Neutros (reação do PAS)	34
3.4.3.2 Detecção de Polissacarídeos Ácidos	34
3.4.3.3 Detecção de Proteínas Totais	35
3.5 RESULTADOS	35
3.5.1 Morfologia	35
3.5.1.1 Microscopia de luz	35
3.5.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	37
3.5.2 Histoquímica	38
3.5.2.1 Polissacarídeos neutros	38

	3.5.2.2 Glicogênio	39
	3.5.2.3 Polissacarídeos ácidos	41
	3.5.2.4 Proteínas totais	41
3.6	DISCUSSÃO	42
3.7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	45
4	ARTIGO B – ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Euschistus heros</i> (FABRICIUS, 1794) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) ALIMENTADO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA	48
4.1	RESUMO	48
4.2	ABSTRACT	49
4.3	INTRODUÇÃO	50
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	51
	4.4.1 Genótipos de soja utilizados	51
	4.4.2 Aspectos biológicos de <i>E. heros</i> alimentado com diferentes genótipos de soja	52
	4.4.3 Preferência alimentar de <i>E. heros</i> a diferentes genótipos de soja	52
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
	4.5.1 Aspectos biológicos de <i>E. heros</i> alimentado com diferentes genótipos de soja	54
	4.5.2 Preferência alimentar de <i>E. heros</i> a diferentes genótipos de soja	56
4.6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	57
5	CONCLUSÃO GERAL	60

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) MERRILL) é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo este o segundo maior produtor mundial do grão. A sojicultura tem grande importância no sistema agroindustrial, tanto na exportação quanto na importação de grãos ou de derivados.

No Brasil, a cultura da soja apresenta sensíveis avanços tecnológicos que propiciam incremento na produtividade de grãos nas diversas regiões produtoras do país, sendo que os insetos-praga constituem um dos principais problemas enfrentados pelos produtores (PICANÇO; GUEDES, 1999). Segundo Hoffmann-Campo et al. (2000), a cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita.

No complexo de insetos-praga que atacam a soja, podemos citar os que atacam as folhas, como a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) e a mosca Branca (*Bemisia argentifoli*); as que atacam as vagens, como o percevejo marrom (*Euschistus heros*), percevejo barriga verde (*Dichelops melacantus*), percevejo verde-pequeno (*Piezodorus guildinii*) e percevejo verde (*Nezara viridula*), entre outras (GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

Dentre as pragas, os percevejos têm grande destaque, como o *Euschistus heros*, onde, segundo Gallo et al. (2002), quando atacam as vagens, os prejuízos podem chegar a 30%. O percevejo-marrom, *E. heros*, é o mais abundante nas lavouras brasileiras, causando danos em todas as regiões produtoras de soja.

O método de controle do percevejo-marrom mais utilizado nas lavouras brasileiras é o controle químico, com o uso de piretróides, neonicotinóides e organofosforados. Sosa-Gómez et al. (2001) observaram que há resistência de *E. heros* a alguns inseticidas, aumentando a busca por métodos alternativos de controle. O controle desta praga com a utilização de extratos vegetais, parasitoides e plantas resistentes são exemplos de métodos observados na literatura.

Em relação às plantas resistentes, a resistência dessas aos insetos aparece como mais uma ferramenta, apresentando como principal característica a compatibilidade com os demais métodos de controle aplicáveis (químico, biológico e cultural) (KOGAN, 1986). No contexto da utilização de plantas resistentes, algumas

cultivares de soja, de acordo com Hoffmann-Campo (1995), apresentam um complexo de flavonoides, principalmente isoflavonas, que são geralmente encontrados em maior abundância em genótipos resistentes a pragas, portanto estariam envolvidos na defesa das plantas contra herbívoros (CHEN, 2008), como *N. viridula* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (1818) (PIUBELLI et al. 2003; 2005).

Estes compostos têm diferentes efeitos sobre os herbívoros, a ativação pode levar a uma inibição de digestão devido a formação de pontes de hidrogênio, ou pela formação de ligações covalente, com proteínas e enzimas digestivas (APPEL, 1993). Outras funções podem estar relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos, antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas.

Outra alternativa para defesa das plantas que vem sendo amplamente estudada é a utilização de plantas geneticamente modificadas e conseqüentemente, seus impactos sobre insetos não-alvo. As plantas transgênicas resistentes as lagartas, contêm genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que codificam toxinas letais para determinados grupos de insetos, sendo que o sistema digestório de *E. heros* pode ser afetado por este grupo de plantas.

Nos insetos, o mecanismo de alimentação, sua estrutura e a química digestiva se processam no sistema digestório (TERRA; FERREIRA, 1994). Segundo Moscardi e Carvalho (1993), o intestino médio (IM) é o principal local de digestão, absorção do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos. Alterações nesta região podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000).

As hipóteses deste trabalho são: o genótipo BRS 391, que possui um complexo de isoflavonoides em sua estrutura, promove alterações morfológicas, químicas e/ou comportamentais no percevejo *E. heros* e; a alimentação com soja geneticamente modificada (genótipo *Bt*) promove alterações morfológicas, químicas e/ou comportamentais no percevejo *E. heros*.

Diante do exposto, e pelo pouco conhecimento sobre o assunto, o objetivos do trabalho são: analisar morfológica e quimicamente, através de técnicas de microscopia de luz e eletrônica, os efeitos pós ingestivos de isoflavonoides, no trato digestivo de *E. heros*; analisar morfológica e quimicamente, através de técnicas

de microscopia de luz e eletrônica, os efeitos pós ingestivos de genótipos de soja *Bt*, no trato digestivo de *E. heros* e; avaliar a biologia de *E. heros*, alimentados com diferentes genótipos de soja, realizando um comparativo entre os diferentes genótipos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A soja, devido a sua grande importância no mercado mundial, é amplamente cultivada em diversos países, onde seus grãos são uma das principais fontes de proteínas utilizadas na alimentação humana e animal (EMBRAPA, 2005).

Segundo Missão (2006), há uma diversidade muito grande de produtos e sub-produtos extraídos desses grãos, como o farelo e o óleo de soja, sendo o primeiro utilizado como complemento alimentar na ração para gados e o segundo na alimentação humana, principalmente na preparação de alimentos. Bansal et al. (2013) ainda citam biocombustíveis, produtos industriais e cosméticos como produtos extraídos dessa cultura.

A soja cultivada atualmente é muito diferente dos seus ancestrais. Barbosa e Assumpção (2001) relatam que essas plantas eram rasteiras, e sua evolução teve início com o surgimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, as quais foram domesticadas e melhoradas por cientistas chineses.

No Brasil, a soja teve como primeiro registro histórico em 1882, na Bahia, onde Gustavo Dutra cultivou os primeiros germoplasma dessa cultura trazidos dos Estados Unidos, na Escola de Agronomia da Bahia. Entretanto, outros registros históricos indicam que a soja “amarela” foi inicialmente cultivada na Estação Agrônômica de Campinas, em 1891, para teste como planta forrageira (COSTA; MANICA, 2006).

Nos anos de 1900 e 1901 o Instituto do Estado de São Paulo promoveu a primeira distribuição de sementes para produtores paulistas, e neste mesmo período surgiram os primeiros registros da cultura no Rio Grande do Sul e em 1914 foram encontrados registros do plantio de soja para a produção de sementes e não mais como planta forrageira (COSTA; ALMEIDA, 2007).

Na década de 60 a soja ainda tinha uma importância secundária em nosso país, sendo uma opção de cultivo no verão, em sucessão à cultura do trigo. Pouco depois houve um incentivo governamental para a produção de aves e suínos,

gerando uma demanda interna por farelo de soja, o que levou a um crescimento na produção da cultura. Em 1970 houve uma explosão do preço da soja no mercado mundial e, a partir daí, a cultura ganhou destaque entre produtores, indústria, empresas públicas e privadas (EMBRAPA, 2005).

Segundo a CONAB (2017), na safra 2016/2017 a produção de soja no Brasil alcançou a marca de 114 milhões de toneladas, sendo o país o segundo maior produtor mundial do grão.

Conforme dados da EMBRAPA (2005), a soja (*G. max*) pertence à classe das dicotiledôneas, família leguminosa e subfamília Papilionoides. Seu sistema radicular é pivotante, com a raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número, ricas em nódulo de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. O caule é herbáceo, ereto com porte variável, coberto de pêlos brancos ou pardos. Este é bastante ramificado. As folhas são alternadas, longas pecioladas, compostas de três folíolos ovalados ou lanceolados. Na maioria das variedades as folhas amarelam à medida que os frutos amadurecem e caem quando as vagens estão maduras. As flores apresentam coloração branca, amarela ou violácea, dependendo da variedade. Os frutos são vagens achatadas, pubescentes, de cor cinza, amarela palha ou preta. As sementes possuem forma arredondada, achatada ou alongada. A coloração é variada (o comércio prefere as sementes amarelas) e o tamanho também é variado. A soja tem o seu total desenvolvimento entre 100 a 160 dias desde a emergência até a maturação, sendo dividido em uma fase vegetativa e outra reprodutiva. Neste período, ela pode sofrer diversas injúrias que podem prejudicar sua produção, onde os insetos-praga têm grande importância (VERNETTI, 1983; GALLO et al., 2002).

Segundo Hoffmann-Campo et al. (2000), a cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Após a germinação, durante os estádios vegetativos, vários insetos como o bicudo-da-soja (*Sternechus subsignatus*), a lagarta elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), os corós (*Scarabaeoidea*) e os percevejos-castanhos-da-raiz (*Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*) causam danos à cultura. Posteriormente, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) e outros desfolhadores atacam, além da mosca Branca (*Bemisia argentifoli*). Estas pragas tem maior ocorrência verificada durante as fases vegetativas até o início da floração (HOFFMANN-

CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

Na fase reprodutiva, surgem os percevejos sugadores de vagens e sementes (*Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euschistus heros*), que causam danos desde a formação das vagens até o final do enchimento dos grãos. A soja pode, também, ser atacada por outras espécies de insetos, consideradas pragas esporádicas, cujos aumentos populacionais são determinados por alterações climáticas, ou outros fatores, como, por exemplo, os sistemas de produção específicos de cada região (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

O controle das principais pragas da soja deve ser feito com base nos princípios do “Manejo de Pragas”. O Manejo Integrado de Pragas da Soja (MIP-Soja) é uma tecnologia que utiliza um conjunto de técnicas econômica e ambientalmente sustentáveis para o manejo eficiente de pragas que atacam as lavouras de soja (BUENO et al., 2012)

Levando em conta os conceitos do MIP, para o controle destas pragas, a resistência de plantas a insetos aparece como mais uma ferramenta, apresentando como principal característica a compatibilidade com os demais métodos de controle aplicáveis (químico, biológico e cultural), resultando dessa forma em efeitos sinérgicos favoráveis (KOGAN, 1986).

2.2 Resistência de plantas a insetos

O termo resistência, nas plantas, está atribuído diretamente a qualidades genéticas herdadas, que resultam em uma planta que será menos danificada do que outra (chamada de suscetível), onde ambas estão sujeitas às mesmas condições ambientais, mas que não possuem as mesmas características de resistência (PAINTER, 1951; GULLAN; CRANSTON, 2007).

As características de resistência, por sua vez, podem sofrer influência por parte da planta (idade, condição fisiológica, parte atacada), dos insetos (espécie, biótipo, fase de desenvolvimento) e/ou do ambiente (temperatura, umidade, nutrientes etc), determinando a manifestação de forma positiva ou negativa

da resistência (LARA, 1991).

Painter (1951) propôs, à resistência de plantas a insetos, uma divisão empírica, na qual os mecanismos são divididos em três categorias: não preferência, antibiose e tolerância. O autor explica que a não-preferência é quando a cultivar é menos utilizada pela praga na alimentação, oviposição e/ou abrigo, em comparação com outros cultivares sob as mesmas condições. Posteriormente, Kogan e Ortman (1978) atribuíram a esta categoria o termo antixenose, que consiste em parte ao mecanismo de não-preferência citado por Painter (1951), mas considerando como fatores adicionais ou complementares a influência dos metabólitos secundários das plantas e as defesas morfológicas, os quais em conjunto provocam uma resposta negativa no inseto, durante o processo de seleção do hospedeiro.

A segunda categoria de resistência, a antibiose, é aquela na qual o inseto se alimenta normalmente do cultivar, mas este exerce um efeito adverso sobre a biologia do inseto, causando mortalidade na fase imatura, atraso no desenvolvimento, redução de tamanho, peso, fecundidade, fertilidade e período de oviposição (GALLO et al., 2002). Esse tipo de resistência é causada por fatores como presença de substâncias químicas, antimetabólitos, enzimas, toxinas, inibidores de crescimento, níveis reduzidos de nutrientes, exsudatos viscosos de tricomas glandulares e/ou altas concentrações de componentes vegetais indigeríveis (LARA, 1991; GALLO et al., 2002).

A tolerância, terceira categoria de resistência, ocorre quando a cultivar é pouco danificada em comparação às demais, sem alterar o comportamento e a biologia do inseto. Nesta categoria está envolvida apenas características da planta, e não da interação inseto-planta. Dessa forma, a planta apresenta a capacidade de tolerar o ataque, recuperando-se do desfolhamento ou outro dano provocado pela alimentação da praga (PAINTER, 1951; GULLAN; CRANSTON, 2007).

Geralmente as características de resistência apresentadas nas três categorias estão relacionadas a causas físicas, químicas e/ou morfológicas das plantas, sendo que as químicas são as mais importantes, pois desempenham funções na escolha do hospedeiro, como também na quantidade de alimento que esses insetos irão ingerir (SRIVASTAVA et al., 1999).

De acordo com Hoffmann-Campo (1995), na cultura da soja os compostos fenólicos presentes nas plantas em forma de flavonóides, são geralmente encontrados em maior abundância em genótipos resistentes à pragas. Muitas vezes, dependendo de sua concentração, podem ser atraentes, deterrentes, repelentes ou tóxicos às pragas (PIUBELII, 2004).

Estes compostos têm diferentes efeitos sobre os herbívoros, sendo que a sua ativação ocorre por oxidação, levando em consequencia, a precipitação de proteínas. Dessa maneira, essa ativação pode levar a uma inibição de digestão devido a formação de pontes de hidrogênio, ou pela formação de ligações covalente, com proteínas e enzimas digestivas (APPEL, 1993).

Appel (1993) relatou que os radicais de hidroxila formados durante a oxidação dos compostos fenólicos possuem ação tóxica e são responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal. Em larvas de Lepidoptera, a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibe a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991). Os flavonoides podem interagir e penetrar nas bicamadas lípidicas das membranas celulares, alterando as barreiras e a permeabilidade destas (LIMA et al., 1999; SILVA et al., 2001). Alguns estudos sugerem que a resistência no estágio reprodutivo da soja para percevejos e lagartas poderia estar relacionada à concentração de flavonoides nas sementes (RAO; CHATTOPABHYAY; CHANDRASEKHARA REDDY., 1990; HOFFMANN-CAMPO; HARBORNE; McCAFFERY, 2001; PIUBELLI et al., 2003).

Como forma de aprimorar a resistência de plantas a insetos, outra tecnologia vem sendo bastante difundida e estudada: A utilização de plantas geneticamente modificadas, mais especificamente as plantas com gene *Bt* (da bactéria *Bacillus thuringiensis*). Segundo Fischhoff et al. (1987), essa tecnologia de transformação era muito complexa, sendo que as primeiras plantas *Bt* surgiram em 1987, quando houve a inserção de genes *Cry* (as quais codificavam a síntese de proteínas inseticidas) em plantas de tomate e tabaco. Entretanto, essas plantas apresentavam baixos níveis de expressão desses genes, o que levou ao aperfeiçoamento das técnicas aplicadas.

A partir desse aperfeiçoamento, o uso de plantas *Bt* tem crescido juntamente com a agricultura mundial desde 1996, porém o primeiro cultivo liberado

para comercialização no Brasil foi apenas em 2005, com o algodão *Bt* (Bollgard®) e, somente em 2010, foi liberado a primeira geração da soja *Bt*, combinada com a tecnologia RR, que confere também tolerância ao herbicida Glifosato (Roundup®) (STEWART Jr. et al., 1996; JOUANIN et al., 1998; MACRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008; MAPA, 2012).

O gene da bactéria *Bt* é introduzido nas culturas devido ao seu amplo espectro de utilização como bioinseticida em várias culturas agronomicamente importantes. Essa bactéria apresenta algumas características que se assemelha a outras bactérias, pois pode manter um período de latência na forma de endospóros sob condições desfavoráveis. Durante a esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam nas extremidades dos esporos sob a forma de cristais (PEFERÖEN, 1997), os quais são compostos de várias proteínas *Cry*, que apresentam atividade tóxica comprovada contra larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (HONGY; ZINIU; WANGXI, 2000). Porém, há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Himenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthraphera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros (BRAR et al., 2006; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; SCHNEPF et al., 1998).

O modo de ação dessas proteínas pode ser caracterizado em larvas de lepidópteros, no qual, após a ingestão pelo inseto, as proteínas *Cry* são solubilizadas (pH alcalino) e convertidas em pequenos polipeptídeos no lúmen do intestino médio das lagartas. Esses polipeptídeos associam-se a sítios específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio, provocando a lise osmótica das células por meio da formação de poros na membrana celular (SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2004;).

2.3 Percevejo-marrom, *Euschistus heros* (F.)

Os percevejos são pragas de importância mundial. Segundo Corrêa-Ferreira e Panizzi (1999), na cultura da soja, a colonização por esta praga inicia-se em meados ou final do período vegetativo (Vn) ou logo após a floração (R1 e R2).

Estes pentatomídeos se alimentam através da inserção de seus estiletes em diferentes estruturas das plantas, porém sugam preferencialmente a vagem e atingem o grão. Dessa forma, causam perdas no rendimento, na qualidade dos grãos e no poder germinativo de sementes de soja (PANIZZI; SLANSKY, 1985; BELORTE et al., 2003)

Além do dano direto, os percevejos podem promover a inoculação de patógenos, como o fungo *Nematospora coryli* Peglion que causa a deterioração do grão/semente, semelhante ao ataque de bactérias (DEGRANDE e VIVAN, 2009). Segundo Sosa-Gómez e Moscardi (1995), além destes danos, percevejos podem causar retenção foliar, uma vez que esses insetos injetam toxinas quando se alimentam dos ramos das plantas. Esse fenômeno causa danos diretos, pois prejudicam a formação dos grãos e dificultam a colheita mecanizada. Segundo os autores, a espécie *Piezodorus guildinii* é a que provoca maior retenção foliar, seguida de *Nezara viridula* e *Euschistus heros*. As espécies que são comumente encontradas nas lavouras do Brasil são *E. heros*, *P. guildinii*, *N. viridula* (CORRÊA-FERREIRA; PERES, 2003) e *Dichelops* spp. (PANIZZI; CHOCOROSQUI, 1999).

O percevejo *E. heros* é nativo da Região Neotropical (América Tropical) e era considerada uma espécie de baixa ocorrência nos anos 70. Atualmente adaptou-se as diferentes condições de clima das regiões brasileiras, tornando-se o percevejo mais abundante nas lavouras de soja do país. Este percevejo está bem adaptado aos climas mais quentes, sendo que de acordo com Hoffmann-Campo et al. (2000), são mais abundante do norte do Paraná ao Centro Oeste do Brasil, porém são encontrado em todas as regiões produtoras de soja do Brasil (CORRÊA FERREIRA; PANIZZI, 1999).

O adulto de *E. heros* apresenta coloração geral marrom escura, uma faixa branca em forma de meia lua no final do escutelo e dois espinhos laterais no protórax (GALLO et al., 2002), a longevidade média do adulto do percevejo-marrom-da-soja são 116 dias (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Seus ovos apresentam coloração amarela, sendo depositados em pequenas massas, contendo de cinco a oito ovos, nas folhas ou nas vagens das plantas (VILLAS-BÔAS; PANIZZI, 1980). As ninfas, são marrons ou cinza próximo às ecdises, e bordo do corpo na forma serrada (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Os imaturos de *E. heros* do primeiro ao

terceiro instar, apresentam comportamento gregário, estes pentatomídeos se alimentam muito pouco durante os dois primeiros instares, ficando juntos ou próximos aos restos do córion dos ovos, e a partir do terceiro instar se distribuem pela planta ou plantas vizinhas causando danos pela sucção dos grãos no interior das vagens (GRAZIA et al., 1980; SOUZA et al., 2013). A duração média de ovo a adulto é de 28,4 dias a 25°C (CIVIDANES; PARRA, 1994) e vários fatores interferem na duração do ciclo biológico (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012).

E. heros pode passar por até três gerações no ciclo da cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999). Após a colheita, os percevejos buscam talhões mais tardios ou abrigos, nos quais podem se alimentar de plantas hospedeiras. Nestes refúgios, completa a quarta geração e entra em dormência (diapausa), utilizando a palhada da cultura anterior ou áreas de plantas espontâneas nas suas proximidades, para se proteger da ação de parasitóides e predadores. Durante este período, que dura cerca de sete meses, os insetos não se alimentam, porém conseguem sobreviver através de reservas de lipídios armazenadas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

2.4 Intestino médio dos insetos

Nos insetos, o mecanismo de alimentação e a química-digestiva se processam no sistema digestivo. Modificações estruturais, morfológicas e biológicas desenvolveram-se diferentemente nas várias ordens destes artrópodes, ao longo da evolução, envolvendo adaptações desde mandíbulas diferenciadas, que permitem a tomada de alimentos estruturalmente variados; tubos digestivos mais ou menos complexos; presença ou ausência de glândulas acessórias; tipos celulares associados à química digestiva com diversos níveis de organização e complexidade, além de organismos simbiotes presentes em algumas ordens de insetos (TERRA; FERREIRA, 1994). Segundo Moscardi e Carvalho (1993), o Intestino médio (IM) é o principal local de digestão, absorção do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos.

O IM tem como função a produção e secreção de enzimas digestivas, absorção de água, nutrientes e manutenção da homeostase. Possui origem endodérmica, sendo um tubo de diâmetro variável formado por um epitélio simples ou pseudoestratificado, apoiado sobre uma membrana basal, em torno da qual dispõem uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais (SNODGRASS, 1993; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

Este se constitui num tubo simples (ventrículo) de onde podem se expandir divertículos (cecos gástricos) usualmente na sua extremidade proximal. Em hemíptera, o intestino médio é diferenciado em três regiões, sendo o primeiro, segundo e terceiro ventrículos. Os dois primeiros ventrículos são estruturas saculares imediatamente posteriores ao esôfago, enquanto o terceiro é um tubo delgado. De um modo geral, o terceiro ventrículo gira para frente e fica próximo ao primeiro ventrículo, frequentemente se enrolando ao redor deste, sendo mantido no lugar por tecido conjuntivo. Este complexo forma a câmara filtro (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Segundo os autores, os entomologistas acreditam que a câmara filtro seja um dispositivo que permite que a água da seiva ingerida passe diretamente da porção anterior do IM para o intestino posterior, concentrando a seiva antes da sua digestão na parte posterior do IM.

Os insetos, de modo geral, possuem, no lúmen do IM, uma membrana acelular, quitino protéica, chamada de matriz ou membrana peritrófica, que auxilia nos processos digestivos e protege a superfície do epitélio (SILVA; LEMOS; SILVA, 2012). Já as ordens Hemiptera e Thysanoptera possuem membranas perimicrovilares em suas células intestinais (SILVA et al., 1995) ao invés da matriz peritrófica. Segundo Terra, Costa e Ferreira (2006), sua função é semelhante ao descrito para a membrana peritrófica de outros insetos.

O epitélio do IM dos insetos é formado de uma forma geral, por células digestivas, regenerativas e endócrinas (SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 2000; NEVES et al., 2002).

As células digestivas, ou colunares, são as mais numerosas e apresentam funções de síntese e secreção de enzimas digestivas, absorção de água e de nutrientes (TERRA; FERREIRA, 1994; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996).

Podem apresentar diferenças estruturais de acordo com o estado fisiológico do inseto. Assim, células ativas apresentam núcleo volumoso e com polaridade determinada pela distribuição das estruturas celulares no seu citoplasma. Dessa forma, na região basal ocorrem dobras associadas a mitocôndrias, na região mediana encontram-se o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, além das vesículas de secreção. Já a região apical apresenta as microvilosidades, microfilamentos e mitocôndrias (TERRA, 1990; CHAPMAN, 1998). Estas células normalmente apresentam núcleo alongado, superfície apical com inúmeras microvilosidades e projeções citoplasmáticas (TERRA; COSTA; FERREIRA, 2006).

As células regenerativas podem ser observadas sozinhas, em pares ou formando grupos (ninhos) na base do epitélio e apresentam características de células indiferenciadas, cuja função principal é promover a substituição das células epiteliais em descarte, promovendo a manutenção da integridade do epitélio do IM (CRUZ-LANDIM; SILVA DE MORAES; SERRÃO, 1996; CHAPMAN, 1998; NEVES; SERRÃO; GITIRANA, 2003).

As células endócrinas são melhor observáveis ao microscópio eletrônico e estão localizadas na base do epitélio (LEVY et al., 2004). Essas são caracterizadas por apresentarem grande quantidade de grânulos citoplasmáticos. Algumas de suas funções estariam relacionadas com o controle hormonal dos movimentos peristálticos, regulação da síntese enzimática e secreção, controle da proliferação e diferenciação das células regenerativas. Existem dois tipos de células endócrinas: as abertas, nas quais a membrana apical forma várias microvilosidades que estão em contato com o lúmen do IM e as células fechadas, as quais a membrana apical não forma microvilosidades, não estando em contato com o lúmen do IM (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; GÜL et al., 2001; ROST-ROSZKOWSKA et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**. California, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.
- BANSAL, R.; JUN, T.; MIAN, M. A. R.; MICHEL, A. P. Developing Host-Plant Resistance for Hemipteran Soybean Pests: Lessons from Soybean Aphid and Stink Bugs. In: EL-SHEMY, H. A. **Soybean: Pest resistance**. Rijeka, Croatia: In Tech, 2013. 288p.
- BARBOSA, M. Z.; ASSUMPÇÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**. São Paulo, v.31, n.11, p. 7-17, nov. 2001.
- BERLOT, L. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.169-175, 2003.
- 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. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 37-74.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.
- BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v.166, p.38-46, nov. 2004.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: Structure and function**. 4ed. Cambridge: Havard United Press, 1998.
- CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**. V. 15, p. 101-114, 2008.
- CIVIDANES, F. J.; PARRA, J. R. P. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos da soja. II. *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 12, p. 1841-1846, 1994.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf, acesso em 28/10/2017.

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

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PERES, W. A. A. Comportamento da população dos percevejos-pragas e a fenologia da soja. In: CORRÊA-FERREIRA, B.S. (Org.). **Soja orgânica: alternativas para o manejo dos insetos-pragas**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 27-32.

COSTA, A. J. D.; ALMEIDA, M. J. M. O complexo agroindustrial paranaense: soja transgênica versus soja convencional. In: ECOPAR, n.5, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, p. 1-20. 2007.

COSTA, J. A.; MANICA, I. **Cultura da Soja**. Porto Alegre: Ceres, 1996. 233p.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA de MORAES, R. L. M.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Computational Biology**, v.1, p. 29-40, 1996.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção**: Tecnologia e produção de soja na região central do Brasil 2006. 1.ed. Londrina: Embrapa-CNPSo, 2006.

EMBRAPA. **Histórico da soja no Brasil**. 2005. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=113&cod_pai=35>. Acesso em: 10 mai. 2014.

FELTON, G. W.; DONATO, K.; DEL VECCHIO, R. J.; DUFFEY, S. S. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**. California, v.15, n.12, p.2667-2694, 1989.

FELTON, G. W.; DUFFEY, S. S. Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insects. In: HEDIN, P. (Ed.) **Naturally occurring pest bioregulators**. Washington: American Chemical Society, 1991. p.166-197.

FISCHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, G. P.; McCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v.5, p.808-813, 1987.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350p.

GRAZIA, J.; DEL VECCHIO, M. C.; BALESTIERI, F. M. P.; RAMIRO, Z. A. Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja (*Glycine max* (L.) Merrill): I – *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 9, p. 39-51, 1980.

GÜL, N.; SAYAR, H.; ÖZSOY, N.; AYVALI, C. A. A study on endocrine cells in the midgut of *Agrotis segetum* (Denn and Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish Journal of Zoology**. v. 25, p. 193-197, 2001.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**. v. 55, p. 593-608, 2010.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner). 1995. **Tese** (Doutorado em Botânica) - 165 p. The University of Reading, Reading. 1995.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; McCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. n. 98, p. 181-194. 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70p. (Circular Técnica Nº 30)

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified *Cry1Ac* endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.522-531. 2008.

HONGY, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Composition and ecological distribution of *Cry* protein and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, p.191-197, out. 2000.

JOUANIN, L.; BOTTINO-BONADÉ, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, n.1, p.1-11, jan.1998.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Journal Research**. Iowa State v.60, p. 501-527, 1986.

KOGAN, M.; ORTMAN, E. E. Antixenosis – a new term proposed to replace Painter's "Non-preference" modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society America**. Lanham, v.24, p-175-176, 1978.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.; ARREBOLA, N. R.; TOLEDO, L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera:

Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Journal of Biology**, v.64, n.3, p. 1-6, 2004.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S.; FILHO, J. T. S. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, 1999.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A. G.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; McPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* for control Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.2, p.577-587, abr. 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **OGM Autorizados para Plantio e Comercialização no Brasil**. 2012. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/organismos-geneticamente-modificados/plantas-autorizadas>>, acesso em 16 de julho de 2016.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Ciências Empresariais**, Maringá, v.3, n.1, p 7-15, jan./jun. 2006.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. n. 29: p. 615-632. 2000.

MOSCARDI, F.; CARVALHO, R. C. Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.

NEVES, C. A.; BHERING, L. L.; SERRÃO, J. E.; GITIRANA, L. B. F.M.R. Famide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Micron**. N. 33, p. 453-460, 2002.

NEVES, C. A.; SERRÃO, J. E.; GITIRANA, L. B. Ultrastructure of midgut endocrine cells in *Meipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 63, p.683-690, 2003.

PAINTER, R. H. **Insect resistance in crop plants**. New York, 1951.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja manejo integrado de insetos e outros artrópodes-pragas**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. cap. 5, p. 335-420.

PANIZZI, A. R.; CHOCOROSQUI, V. R. Pragas, elas vieram com tudo. **Cultivar**, v. 11, p. 8-10, 1999.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY, F. Jr. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, n. 1, p. 184-214, 1985.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use *Bt* genes in crops. **Trends Biotechnology**, v.15, p.173-177, maio, 1997.

PICANÇO, M. C.; GUEDES, R. N. C. Manejo integrado de pragas no Brasil; situação atual, problemas e perspectivas. **Ação Ambiental**. v. 2, p. 23-26, 1999.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effects on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**. n. 29, p. 1232-1232. 2003.

PIUBELLI, G. C. Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas - Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2004. 152 p.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? **Journal of Chemical Ecology**. v. 31, p. 1509-1525, 2005.

RAO, K. V.; CHATTOBABHYAY, S. K.; CHANDRASEKHARA REDDY, G. Flavonoids with mosquito larval toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 38, p. 1427-1430. 1990.

ROST-ROSZKOWSKA, M. M.; CHECHELSKA, A.; FRADCZAK, M.; SALITRA, K. Ultrastructure of two types of endocrine cells in the midgut epithelium of *Spodoptera exiqua* Hübner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Zoologica Poloniae**, v.53, n. 1- 4, p. 27-35, 2008.

SCHNEPF, E.; CRIKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, set. 1998.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. **Journal of Apicultural Research**. N. 39, p. 9-17, 2000.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. Digestão em Insetos. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; SILVA NETO, M. A. C. (Ed.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCT-EM. 1ed.: v. 1, 2012, p. 1-32.

SILVA, C. P.; RIBEIRO, A. F.; GULBENKIAN, S.; TERRA, W. R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvians* (Hemiptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**. v. 41. p. 1093-1103, 1995.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T. de; NAGEM, T. J.; PINTO, A. da S.; ALBINO, L. F. T.; ALMEIDA, M. R. de; MORAES, G. H. K. de; PINTO, J. G. Efeito hipolipidêmico dos

flavonóides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, v.51, n.3, p. 258-264, abr. 2001.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. 2nd Ed. London: Cornell University Press, 1993. 667p.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F. **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2006. 66p. (Documentos, 269)

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 2, p. 317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n. 2, p. 401-404, 1995.

SOUZA, L. A.; BARBOSA, J.C.; GRIGOLLI, J. F. J.; FRAGA, D. F.; MALDONADO Jr, W.; BUSOLI, A. C. Spatial distribution of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 412-418, 2013.

SRIVASTAVA, R.; SHUKLA, Y. N.; KUMAR, S. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**. v. 21, p. 59-76, 1999.

STEWART, Jr., C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. **Plant Physiology**, v.112, p.121-129, 1996.

TERRA, W. R. Evolution of digestive system of insects. **Annual Review of Entomology**. v. 35, p. 181-200. 1990.

TERRA, W. R.; COSTA, R. H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. N. 78, p. 225-269, 2006.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative biochemistry and physiology**. 109, p. 1-62. 1994.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**: tradução da 7ª edição de Borror and DeLong's introduction to the study of insects. São Paulo, Cengage Learning, 2011. 809p

VERNETTI, F. J. Genética da soja: características qualitativas. In: VERNETTI, F. J. (Ed.) **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p. 93-124.

VILLAS BOAS, G. L.; PANIZZI, A. R. Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 2, p. 105-113, 1980.

3 ARTIGO A – EFEITOS PÓS INGESTIVOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA NO INTESTINO MÉDIO DE *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE).

3.1 RESUMO

Os percevejos são pragas associadas à cultura da soja, que se alimentam de vagens, sendo de grande importância econômica e considerados um dos principais problemas entomológicos dessa cultura. Dos percevejos que atacam a soja, a espécie *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), o percevejo-marrom é um dos principais. Já foi observado que há resistência de *E. heros* a alguns inseticidas, fazendo-se necessária a busca por métodos alternativos de controle. O objetivo deste trabalho é analisar morfológica e quimicamente, por meio de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, os efeitos pós ingestivos de diferentes genótipos de soja no intestino médio de *E. heros*. Foram utilizadas as sojas BRS 284 (testemunha) e os tratamentos BRS 391 e BRS 1001IPRO. Foram coletados 20 tubos digestivos por tratamento, processados e analisados morfológicamente em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Foram realizadas reações histoquímicas, para a detecção de polissacarídeos neutros, polissacarídeos ácidos e proteínas totais. Os insetos alimentados com os genótipos de soja (BRS 391 e BRS 1001IPRO) apresentaram alterações em relação à testemunha, principalmente nas células digestivas, bastante evidentes na região apical dessas células. Histoquimicamente, ambos os tratamentos apresentaram alterações, sendo que a maior alteração se deu com a alta positividade do tratamento BRS 391 ao método para proteínas totais. Conclui-se, portanto, que as sojas BRS 391 e 1001IPRO causam alterações morfológicas e histoquímicas no epitélio do intestino médio de *Euschistus heros*, indicando que ambos os genótipos podem estar associados com a quebra de resistência do inseto aos inseticidas.

Palavras-chave: percevejo-marrom, histologia, histoquímica, microscopia eletrônica.

3.2 ABSTRACT

Stink bugs are pests associated with soybean cultivation, which feed on pods, being of great economic importance and considered one of the main entomological problems of this crop. Of the stink bugs that attack soybean, the species *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), the brown stink bug, is one of the most important. It has already been observed that there is resistance of *E. heros* to some insecticides, making it necessary to search for alternative methods of control. The objective of this work is to analyze morphologically and chemically, by light and transmission electronic microscopy techniques, the post ingestive effects of different soybean genotypes on the midgut of *E. heros*. Were used the genotypes BRS 284 (control), and treatments BRS 391 and BRS 1001IPRO. 20 digestive tubes were collected per treatment. They were processed and analyzed morphologically in light and transmission electronic microscopy. Histochemical reactions were performed for the detection of neutral polysaccharides, acid polysaccharides and total proteins. The insects fed with soybean genotypes (BRS 391 and BRS 1001IPRO) showed alterations compared to control, especially in the digestive cells, quite evident in the apical region of these cells. Histochemically, both treatments showed alterations, and the greatest change occurred with the high positivity of the BRS 391 treatment to the total protein method. It is concluded that the BRS 391 and 1001IPRO soybeans cause morphological and histochemical changes in the epithelium of the midgut of *Euschistus heros*, indicating that both genotypes may be associated with insect resistance breaking.

Index terms: brown stink bug, histology, histochemistry, electronic microscopy.

3.3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) MERRILL) é um dos principais produtos agrícolas do Brasil e segundo a CONAB (2017), a produção alcançou 114 milhões de toneladas na safra 2016/2017, sendo o país o segundo maior produtor mundial do grão. Esta produção faz com que a sojicultura tenha grande importância no sistema agroindustrial, tanto na exportação quanto na importação de grãos ou derivados.

No Brasil, a cultura da soja apresenta avanços tecnológicos que propiciam incremento na produtividade de grãos nas diversas regiões produtoras, porém os insetos-praga constituem um dos principais problemas enfrentados pelos produtores (PICANÇO; GUEDES, 1999), os quais podem atacar a cultura em todas as fases de desenvolvimento.

No complexo de insetos-praga que atacam a soja, os que atacam as vagens, como o percevejo marrom (*Euschistus heros*), percevejo barriga verde (*Dichelops melacanthus*), percevejo verde-pequeno (*Piezodorus guildinii*) e percevejo verde (*Nezara viridula*), entre outros (GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006) estão entre os mais prejudiciais para a cultura, podendo causar até 30% de dano (GALLO et al. 2002). Dentre os percevejos, o percevejo-marrom, *E. heros*, é o mais abundante nas lavouras brasileiras, causando danos em todas as regiões produtoras de soja.

O método de controle do percevejo-marrom mais utilizado nas lavouras brasileiras é o controle químico, com o uso de piretróides, neonicotinóides e organofosforados. Sosa-Gómez, Corso e Morales (2001) observaram que há resistência de *E. heros* a alguns inseticidas, fazendo-se necessária a busca por métodos alternativos de controle. O controle desta praga com a utilização de extratos vegetais, parasitoides e plantas resistentes são exemplos de métodos observados na literatura.

Em relação às plantas resistentes, a resistência dessas aos insetos aparece como mais uma ferramenta, apresentando como principal característica a compatibilidade com os demais métodos de controle aplicáveis (químico, biológico e cultural) (KOGAN, 1986). No contexto da utilização de plantas resistentes, algumas

cultivares de soja, de acordo com Hoffmann-Campo (1995), apresentam um complexo de flavonoides, principalmente isoflavonas, que são geralmente encontrados em maior abundância em genótipos resistentes a pragas e portanto estariam envolvidos na defesa das plantas contra herbívoros (CHEN, 2008), como *N. viridula* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (1818) (PIUBELLI et al. 2003; 2005).

Estes compostos têm diferentes efeitos sobre os herbívoros, a ativação pode levar a uma inibição de digestão devido a formação de pontes de hidrogênio, ou pela formação de ligações covalente, com proteínas e enzimas digestivas (APPEL, 1993). Outras funções podem estar relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos, antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas.

Outra alternativa para defesa das plantas que vem sendo amplamente estudada é a utilização de plantas geneticamente modificadas e conseqüentemente, seus impactos sobre insetos não-alvo. As plantas transgênicas resistentes as lagartas, contêm genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que codificam toxinas letais para determinados grupos de insetos, sendo que o sistema digestório de *E. heros* pode ser afetado por este grupo de plantas.

Nos insetos, o mecanismo de alimentação, sua estrutura e a química digestiva se processam no sistema digestório (TERRA; FERREIRA, 1994), sendo que o intestino médio (IM) é o principal local de digestão, absorção do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos, e alterações nesta região podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000).

Diante do exposto, e pelo pouco conhecimento sobre o assunto, o objetivo do trabalho é analisar morfológica e quimicamente, por meio de técnicas de microscopia de luz e eletrônica, os efeitos pós ingestivos de diferentes genótipos de soja no intestino médio de *E. heros*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Genótipos de soja utilizados

Foram utilizados três genótipos de soja: BRS 284 (genótipo testemunha), BRS 391 (genótipo resistente à percevejos e que contém os isoflavonoides daidzeína, genisteína e gliciteína) e o BRS 1001IPRO (genótipo *Bt*).

3.4.2 Morfologia

3.4.2.1 Microscopia de luz

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja e no Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia, na Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, utilizando-se câmara climatizada tipo B.O.D. com temperatura de 26°C (± 2 °C), umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$) e fotofase de 14 h.

Foram utilizados insetos de criação provenientes da Embrapa Soja. Após eclosão, os percevejos foram transferidos para placas de Petri, sendo colocados cinco indivíduos por placa. Os insetos foram alimentados a partir do segundo instar com vagens dos diferentes genótipos de soja, sendo que cada genótipo foi considerado um tratamento. O alimento era renovado a cada dois dias, até atingirem a fase adulta, quando foram coletados 20 tubos digestivos por tratamento.

Para a coleta, adultos de *E. heros* foram anestesiados por resfriamento a -4°C, imobilizados e dissecados sob microscópio estereoscópio, com

solução salina para insetos (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL).

Os tubos coletados foram fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por 6 horas. Após a fixação, o material foi lavado em solução de tampão fosfato 0,1M e pH 7,2, desidratado em série crescente de álcool etílico (70, 95 e 100%), incluídos em resina histológica (Leica Historesin[®]) utilizando moldes apropriados de polietileno, seguindo as recomendações do fabricante.

O material emblocado foi cortado com 5 µm de espessura, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo e colocado em lâminas de vidro previamente limpas com álcool etílico-éter.

Para as análises morfológicas do tubo digestivo, os cortes foram hidratados em água destilada (5 minutos); corados pela Hematoxilina de Harris (16 minutos); lavados em água corrente (10 minutos); corados com Eosina aquosa (20 minutos); lavados em água destilada (5 minutos); desidratados em álcool etílico 95% (5 minutos) e 100% (5 minutos); diafanizados em três banhos de xilol (10 minutos/banho) e montados em bálsamo do Canadá. Após secagem, os IM foram analisados e documentados em fotomicroscópio de luz com câmera de captura de imagens acoplada, do Departamento de Histologia da UEL.

3.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), os IM coletados foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,3), lavados em tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,3), por três vezes (5 minutos cada banho), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão (30 minutos). O material foi desidratado em série crescente de álcool etílico (50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e em óxido de propileno, infiltrado em misturas de óxido de propileno e Araldite[®] (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 100% Araldite[®], sendo 12 horas de descanso para cada mistura) e incluído em Araldite[®] puro. Os cortes semifinos foram corados com solução de azul de Toluidina e examinados ao microscópio de luz, para

seleção dos blocos. Os cortes ultrafinos foram contrastados com solução alcoólica saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo, analisados e fotografados ao MET, modelo Tecnai-12 (FEI) do LMEM/PROPPG/UEL.

3.4.3 Histoquímica

3.4.3.1 Detecção de Polissacarídeos Neutros (reação do PAS)

Para detecção de polissacarídeos neutros (grupamentos 1,2-glicol) os cortes foram tratados com ácido periódico 0,1% a 56°C em estufa (15 minutos) e Reativo de Schiff (60 minutos), lavados em água sulfurosa, lavados em água corrente, contra-corados com Hematoxilina de Harris, lavados em água corrente, desidratados em séries crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizados em xilol, montados em bálsamo do Canadá e analisados (PEARSE, 1985). Para controle da reação foi efetuado o bloqueio pela acetilação segundo McManus e Cason (1950).

Para a detecção de glicogênio os cortes foram previamente incubados com a alfa amilase a 0,5% (\pm 37°C em estufa) por duas horas (FIORE-DONNO & BAUME, 1996), lavados em água corrente e destilada e submetido à técnica do PAS e analisados.

3.4.3.2 Detecção de Polissacarídeos Ácidos

Para esta técnica os cortes passaram por água destilada e solução de Azul de Alcian, por 30 minutos em pH 2,5 (polissacarídeos ácidos sulfatados), conforme protocolo de Pearse (1985). Os cortes foram lavados em água corrente, contra-corados com Hematoxilina de Harris, lavados em água corrente, desidratados

em séries crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizados em xilol, montados em bálsamo do Canadá e analisados.

3.4.3.3 Detecção de Proteínas Totais

Foi feito o tratamento dos cortes em água destilada e depois em solução de Azul de Bromofenol 0,1% em álcool etílico 95% (15 minutos), lavagem dos cortes em solução aquosa de ácido acético a 0,5% (5 minutos), rápida diafanização em Xilol e montagem com Bálsamo do Canadá, conforme Coello (1989).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Morfologia

3.5.1.1 Microscopia de luz

O IM de *E. heros* divide-se em três regiões, sendo a anterior (IMA), média (IMM) e posterior (IMP). A região anterior (IMA) ou câmara fluxo (CF), foco deste trabalho, morfologicamente apresenta-se como uma câmara, de formato oval, e é responsável pela maior parte do metabolismo da digestão. O IMM e IMP são um tubo longo, fino e enrolado. O IMA, histologicamente é constituído, da luz para a periferia, uma camada epitelial (CE) e camada muscular (CM). Na CE, foi possível identificar dois tipos celulares, as células digestivas (Cd) e as regenerativas (Cr). As Cd, mais abundantes, são alongadas, com algumas protusões, com borda em escova, núcleo na região mediana, citoplasma basófilo e pouco vacuolizado. As Cr são células pequenas, isoladas, basófilas, com núcleo central, encontradas em pouca quantidade, principalmente na região basal do epitélio. A CM está constituída

por feixes de fibras transversais (músculo circular), mais próximas da base da CE, que acompanham as dobras desta, e por feixes de fibras longitudinais (músculo longitudinal), que acompanham a CE em toda sua extensão. (Figura 1A).

Os percevejos alimentados com os dois genótipos BRS 391e BRS 1001IPRO apresentaram alterações histológicas na câmara fluxo em relação à testemunha, principalmente nas células digestivas. Ambos os tratamentos promoveram desorganização nestas células, que apresentaram citoplasma vacuolizado e com espaços entre elas. A CF dos percevejos tratados com o genótipo BRS 391 apresentou Cr em ninhos (Figura 1B), enquanto que as Cd dos percevejos tratados com o genótipo BRS 1001IPRO, apresentaram além do citoplasma bastante vacuolizado, grande número de protusões citoplasmáticas (Figura 1C).

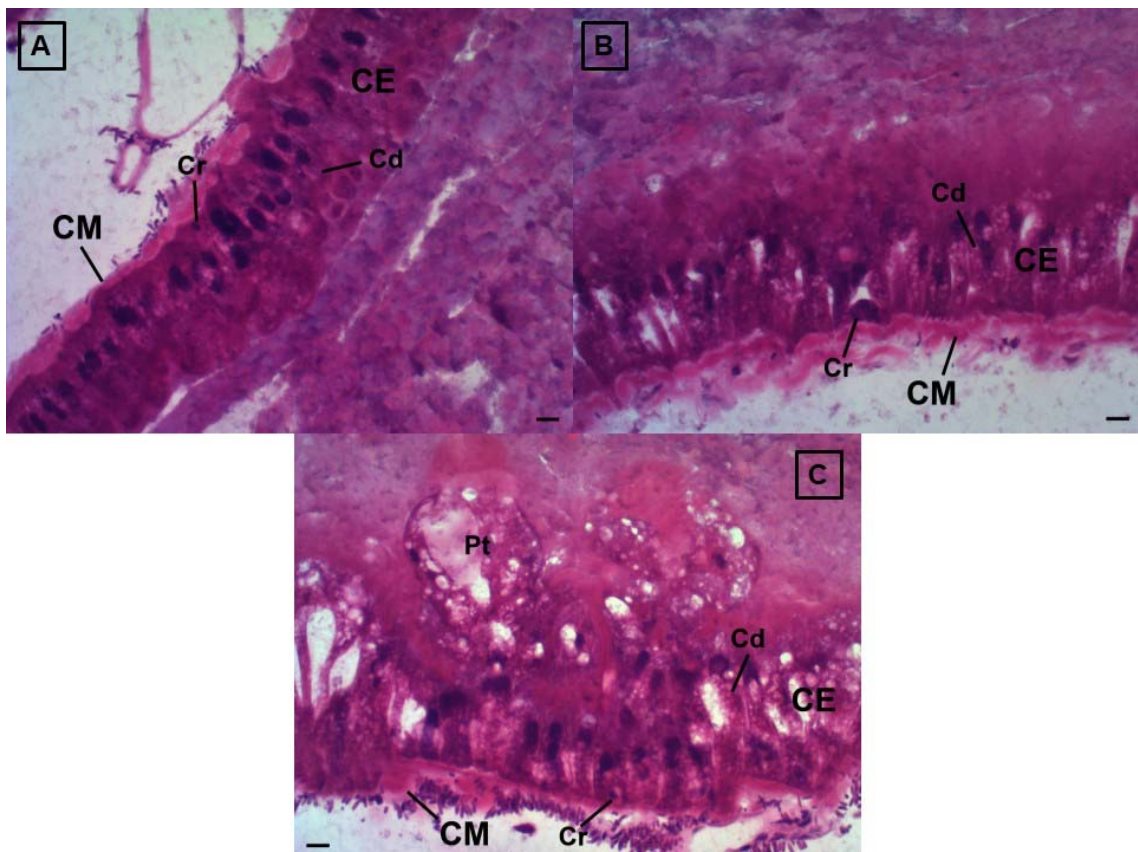


Figura 1. Fotomicrografia do IMA de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. A: BRS 284 (Testemunha); B: BRS 391 e C: BRS 1001IPRO. CE

– Camada epitelial; Cd – Célula digestiva; Pt – Protusões; Cr – Célula regenerativa e CM – Camada muscular. HE. Barra: 10 µm.

3.5.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As alterações ultraestruturais foram observadas na região apical das células digestivas (Figura 2). As Cd, das câmaras fluxo dos percevejos submetidos aos dois tratamentos apresentaram baixo número de mitocôndrias nesta região, quando comparado à testemunha. Além disso, no tratamento BRS 1001IPRO (Figuras 2C e 2D), foi possível observar regiões sem as microvilosidades (Mv), bem como ausência pontual de membrana perimicrovilar (Mpmv).

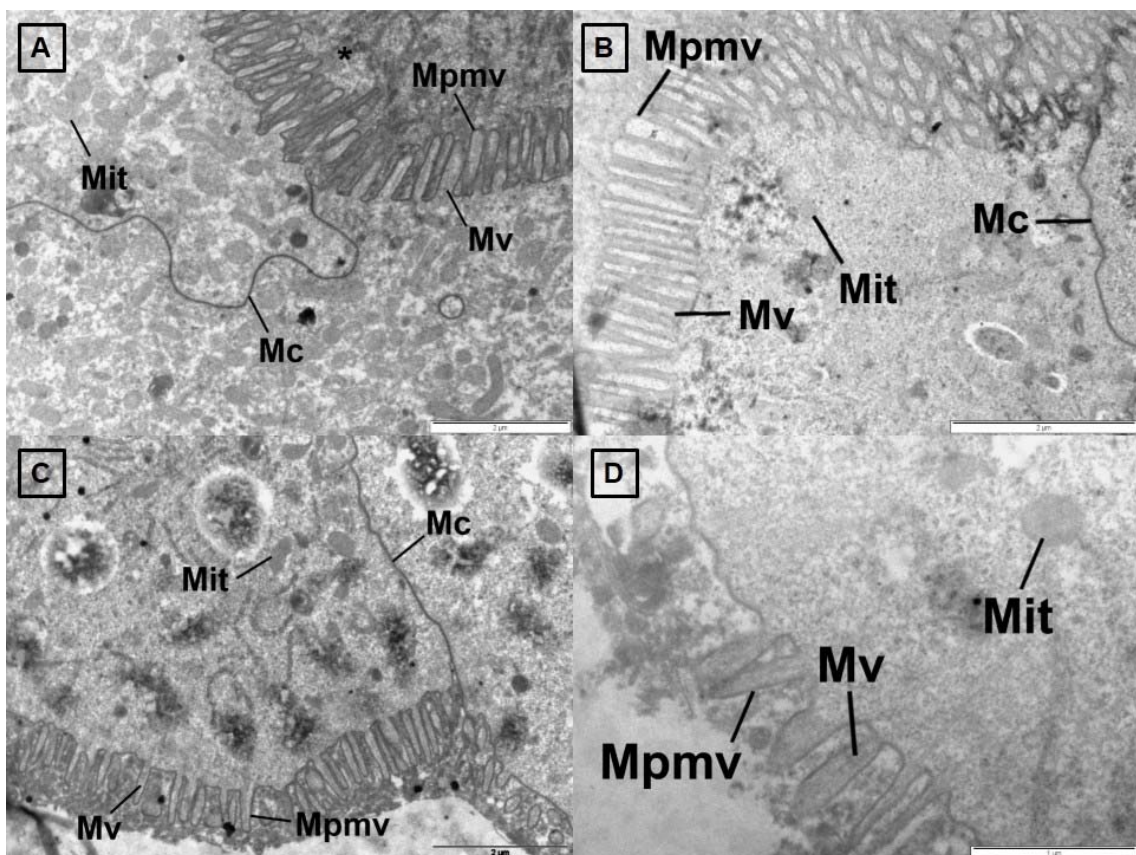


Figura 2. Eletromicrografia (MET) ou Micrografia eletrônica (MET) de corte das células digestivas do intestino médio anterior de adultos de *E. heros*, alimentados com diferentes genótipos de soja. A: BRS 284 (Testemunha); B: BRS 391; C: BRS

1001IPRO. Barra: 2 μm . D: BRS 1001IPRO, com detalhes para as falhas nas microvilosidades e rupturas na membrana perimicrovilar Barra: 1 μm . Mv - microvilosidades; Mpmv – Membrana perimicrovilar; * - Glicocálice; Mc – Membrana celular e Mit – Mitocôndria.

3.5.2 Histoquímica

3.5.2.1 Polissacarídeos neutros

Os resultados da detecção histoquímica de carboidratos neutros pelo método do Ácido Periódico-Schiff (PAS) estão descritos na tabela 1 e podem ser observados na Figura 3.

Tabela 1. Resultados da reação do PAS, para detecção de polissacarídeos neutros, no intestino médio anterior (IMA) de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja.

Tratamento	Camada epitelial		
	Células digestivas	Células regenerativas	Camada muscular
BRS 284	+++	+	+++
BRS 391	+++	+	+
BRS 1001IPRO	++	+	+++

Legenda: (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte.

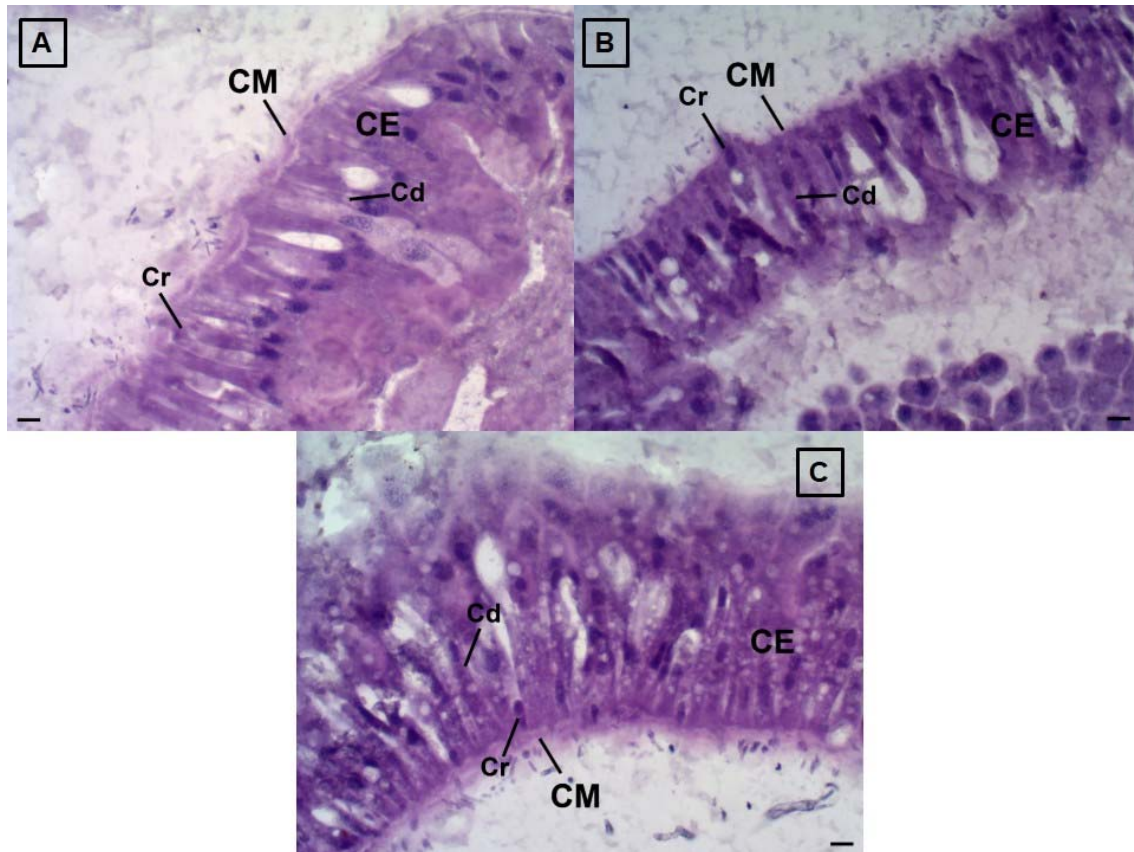


Figura 3. Fotomicrografias do intestino médio anterior de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. A: BRS 284 (Testemunha); B: BRS 391 e C: BRS 1001IPRO. Detecção histoquímica de polissacarídeos neutros (PAS). CE – Camada epitelial; Cd – Célula digestiva; Cr – Célula regenerativa e CM – Camada muscular. Barra: 10 μ m.

3.5.2.2 Glicogênio

Os resultados da detecção histoquímica para o glicogênio (método PAS + alfa amilase) estão descritos na tabela 2 e podem ser observados na Figura 4.

Tabela 2. Resultados para detecção de glicogênio no intestino médio anterior (IMA) de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. Reação do PAS precedido pela alfa-amilase.

Tratamento	Camada epitelial		
	Células digestivas	Células regenerativas	Camada muscular
BRS 284	++ ou +	+	+
BRS 391	+	+	+
BRS 1001IPRO	++	+	+

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte.

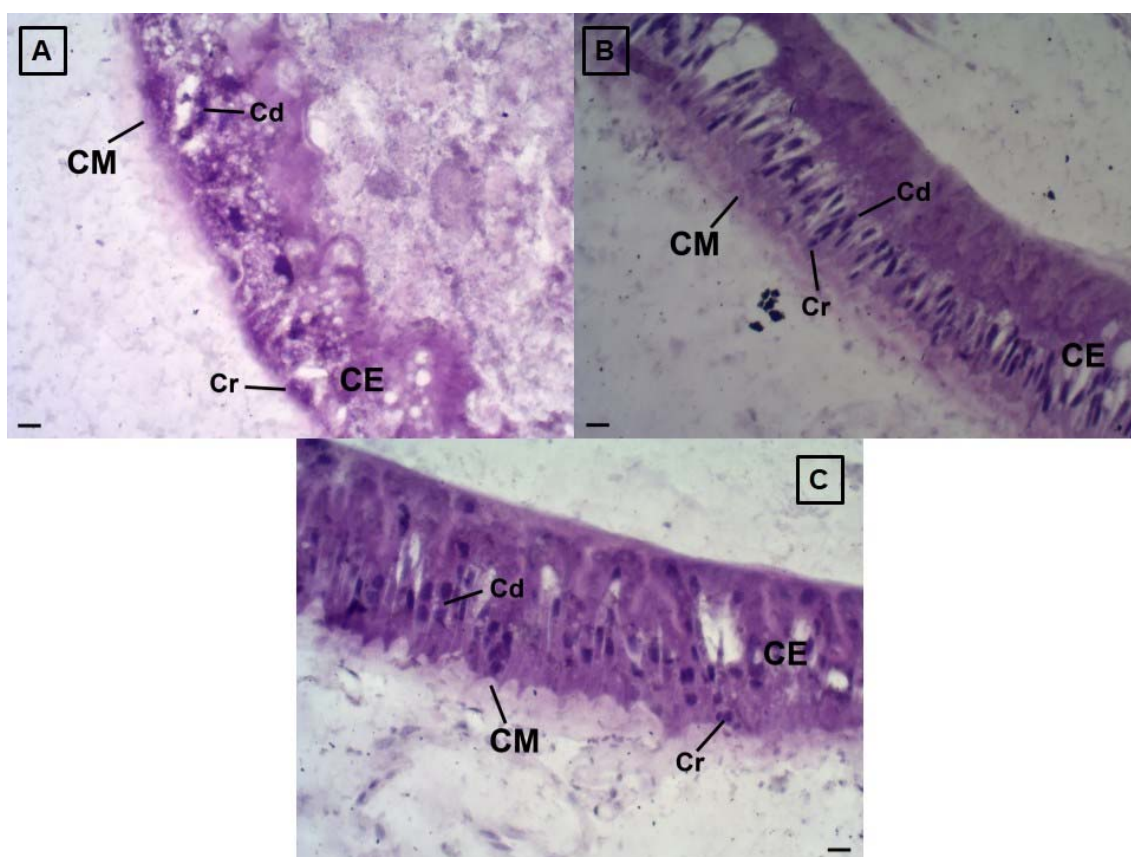


Figura 4. Fotomicrografias do intestino médio anterior de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. A: BRS 284 (Testemunha); B: BRS 391 e C: BRS 1001IPRO. Detecção histoquímica com alfa amilase seguido de PAS para exclusão do glicogênio. CE – Camada epitelial; Cd – Célula digestiva; Cr – Célula regenerativa e; CM – Camada muscular. Barra: 10 μ m.

3.5.2.3 Polissacarídeos ácidos

A detecção de polissacarídeos ácidos não apresentou positividade de reação em todos os tratamentos.

3.5.2.4 Proteínas totais

Os resultados da detecção de proteínas totais pelo método de azul de bromofenol estão expressos na tabela 3 e podem ser observados na Figura 4.

Tabela 3. Resultados para detecção de proteína totais no intestino médio anterior (IMA) de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. Método de azul de bromofenol segundo Coello (1989).

Tratamento	Camada epitelial		
	Células digestivas	Células regenerativas	Camada muscular
BRS 284	+++	++	+
BRS 391	++++	++++	++
BRS 1001IPRO	+++	+++	++

Legenda: (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte.

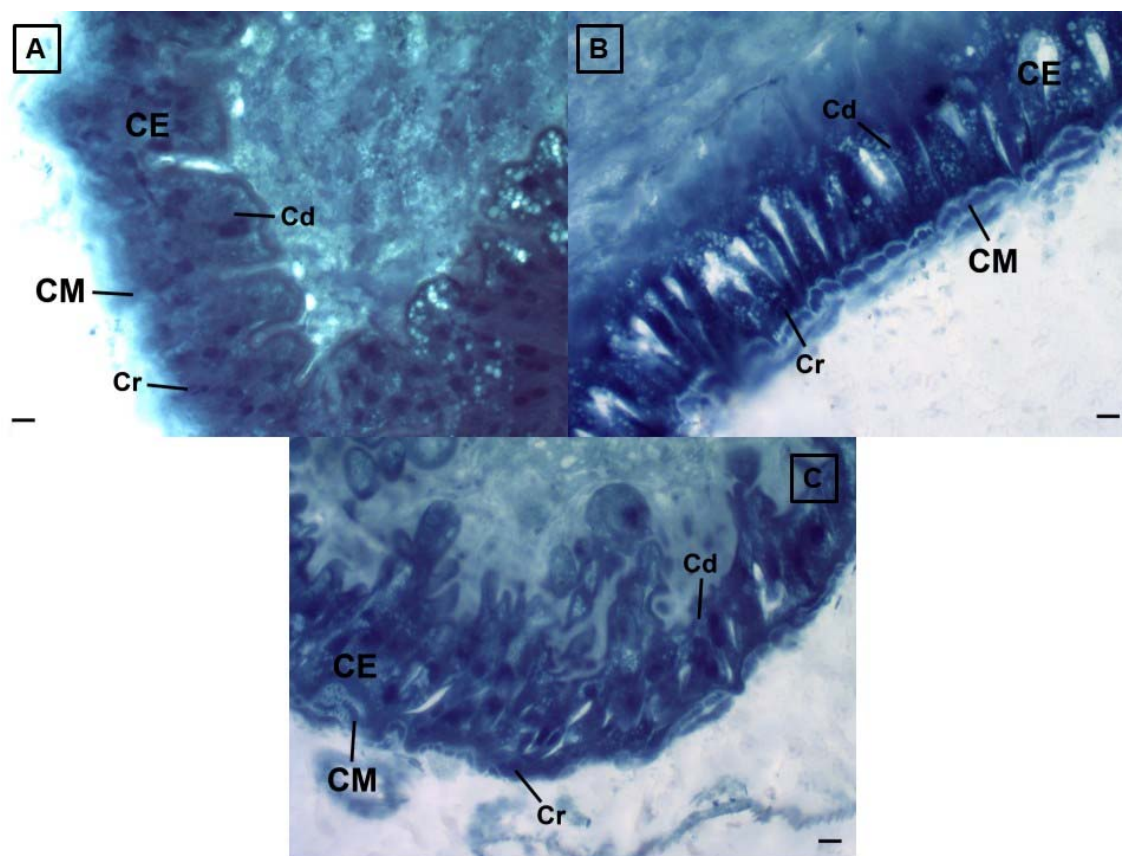


Figura 4. Fotomicrografias do intestino médio anterior de adultos de *E. heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. A: BRS 284 (Testemunha); B: BRS 391 e C: BRS 1001IPRO. Detecção histoquímica de proteínas totais com azul de bromofenol. CE – Camada epitelial; Cd – Célula digestiva; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular. Barra: 10 μ m.

3.6 DISCUSSÃO

A camada epitelial do IM, porção anterior (IMA) de *E. heros*, estudado no presente trabalho, formada por células digestivas (colunares) e regenerativas, é semelhante a outros hemípteros observados na literatura, como em *Triatoma vitticeps* (Hemiptera: Reduviidae) (ROCHA, 2009). Lehane e Billingsley (1996) explicam que, em triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae), o IMA é formado por uma camada de células colunares que estão envolvidas na produção e secreção de

moléculas, e na absorção de nutrientes, que é facilitada pelas microvilosidades existentes em seu epitélio luminal.

Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão mostraram alterações nas microvilosidades e na membrana perimicrovilar, para o tratamento BRS 1001IPRO. Terra, Costa e Ferreira (2006) citam que as membranas das células digestivas possuem modificações representadas pelas microvilosidades e dobras basolaterais, que participam de processos fisiológicos importantes para o inseto, além de apresentarem papéis funcionais diferentes ao longo do epitélio do IM, se envolvendo com a digestão terminal na superfície celular, absorção, homeostase e mecanismos de secreção de enzimas digestivas. Terra e Ferreira (2005) explicam que as membranas perimicrovillares possam funcionar como uma espécie de membrana peritrófica (proteção contra abrasão, barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão e barreira que dificulta ou impede a entrada de micro-organismos no epitélio) nos Hemiptera que apresentam digestão luminal de polímeros (hematófagos, predadores e sugadores de seiva), onde essa estrutura provavelmente surgiu para permitir a absorção de aminoácidos presentes em baixas concentrações.

Foi observado também, na microscopia eletrônica de transmissão, alteração no número de mitocôndrias, na região apical das células digestivas, para os dois tratamentos, em relação à testemunha. Sousa (2009), estudando os efeitos do algodão Bt no trato alimentar de *Alabama argilacea* (Lepidoptera; Noctuidae), observou alteração nas microvilosidades das células colunares, podendo ser em menor número, mais curtas e algumas em degeneração. Também foi observado pelo autor que houve uma menor variação morfológica das mitocôndrias na região apical destas células. As mitocôndrias são as fontes de força celular, responsáveis pelo acúmulo da energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) necessária para o desenvolvimento das funções celulares (NELSON; COX, 2000).

A presença de grânulos PAS positivos nas células digestivas do intestino médio de *E. heros* são corroboradas pelos resultados encontrados em outros insetos, de diferentes ordens, como em *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTTO; GREGÓRIO, 2008), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae) (CORREIA et al., 2009), *A. argilacea* (SOUZA et

al., 2009), *Triatoma infestans* (Hemíptera: Reduviidae) (BURGOS; GUTIERREZ, 1976), *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Romaleidae) (WANDERLEY-TEIXEIRA, 2006), entre outros. Terra e Ferreira (1991) explicam que os polissacarídeos encontrados nestas células têm como funções a absorção de produtos da digestão e produção de enzimas, e podem variar em concentração de acordo com a região do intestino médio.

As células regenerativas de todos os tratamentos apresentaram positividade ao método PAS. Por estarem envolvidas no processo de renovação epitelial, é comum que estas células apresentem o material PAS positivo (LEHANE; BILLINGSLEY (1996).

Quando submetidos ao teste para detecção de glicogênio, todos os tratamentos apresentaram alguma redução da positividade, indicando a presença do glicogênio. O genótipo BRS 391 apresentou maior redução da positividade nas células digestivas, Enquanto o genótipo BRS 1001IPRO apresentou maior redução da positividade na camada muscular. Estas reduções podem indicar que estejam tendo maior gasto energético em consequência do tratamento, para sustentar suas funções vitais. Segundo Kilby (1965), o glicogênio e outros carboidratos são importantes no metabolismo dos insetos, pois são considerados fontes de energia importantes que podem ser mobilizados e utilizados em situações que exija seu gasto, como metamorfose, reprodução e defesa.

Para proteínas totais, o epitélio dos percevejos alimentados com o tratamento BRS 391 apresentou maior positividade ao método de azul de bromofenol. Rocha (2009) estudando *T. vitticeps* em diferentes períodos de privação alimentar, observou que quanto mais aumentava o período de jejum, maior era a concentração de proteínas nas células digestivas do IM. Dean, Locke e Collins (1985) explicam que a presença de proteínas pode estar relacionada a diversos fatores, como a ecdise e fonte de reserva de energia, principalmente em períodos de falta de alimento, formação de tecidos ou injúrias. A alta positividade ao método de azul de bromofenol no IM dos percevejos alimentados com o tratamento BRS 391 infere que este fato também tenha ocorrido com o presente trabalho.

3.7 CONCLUSÃO

As sojas BRS 391 e 1001IPRO causam alterações morfológicas e histoquímicas no epitélio do intestino médio de *Euschistus heros*. Assim, o uso destes genótipos pode resultar em melhoria como métodos alternativos para o controle desta praga, uma vez que ambos podem estar associados com a quebra de resistência do inseto aos inseticidas.

REFERÊNCIAS

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**. California, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.

BURGOS, M. H.; GUTIÉRREZ, L. S. The intestine of *Triatoma infestans*. **Journal of Ultrastructure Research**. v.57, p.1-9, 1976.

CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**. v. 15, p. 101-114, 2008.

COELLO, S.A. A new staining schedule for formalin-fixed, glycol methacrylate-embedded fish ovaries. **Journal of Fish Biology**, v.34, p.195-213, 1989.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf, acesso em 28/10/2017.

CORREIA, A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. V.; TORRES, J. B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. **Neotropical Entomology**. v.38, p.83-91, 2009.

DEAN, R. L.; LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Structure of fat body. In: KERBUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, p.155-210, v.3

FIORE-DONNO, G.; BAUME, L.J. Étude histochemique de la dentinogenese humaine. **Helvetica odontologica acta**. v. 10, Supplementum IV, 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.

VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner). 1995. **Tese** (Doutorado em Botânica) - 165 p. The University of Reading, Reading. 1995.

KILBY, B. A. Intermediary metabolism and the insect fat body. In: GOODWIN, T. W. **Aspects of insects biochemistry**. New York: Academic Press, 1965. p.39-48.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Journal Research**. Iowa State v.60, p. 501-527, 1986.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.

MCMANUS, J. F. A.; CASON, J. F. Carbohydrates Histochemistry Studied by Acetylations Techniques. I Periodic Acid Methods. **The Journal of Experimental Medicine**. Rockefeller, v.91, p. 651-654, 1950.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 29: p. 615-632. 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3rd. ed. New York: Worth Publishers. 2000. 1255p.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Vol. 2, 4^a ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York. 1985. 1055p.

PICANÇO, M. C.; GUEDES, R. N. C. Manejo integrado de pragas no Brasil; situação atual, problemas e perspectivas. **Ação Ambiental**. v. 2, p. 23-26, 1999.

PINHEIRO, D. O.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E. A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical entomology**, v. 37, n. 4, p. 413-419. 2008.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effects on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**. v. 29, p. 1232-1232. 2003.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**. v. 31, p. 1509-1525, 2005.

ROCHA, L. L. V. Morfologia, ultra-estrutura e imunohistoquímica do intestino médio de *Triatoma vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). 2009. 90p. **Tese**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F. **Manual de Identificação de**

insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2006. 66p. (Documentos, 269)

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 2, p. 317-320, 2001.

SOUSA, M. E. C. Análise morfológica e ultra-estrutural do mesêntero de *Alabama argilácea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) frente à toxina Cry1Ac. 2009, 62p. **Dissertação**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.

SOUSA, M. E. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A.; SIQUEIRA, H. A.; SANTOS, F. A.; ALVES, L. C. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009.

TERRA, W. R.; COSTA, R. H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 78, p. 225-269, 2006.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**. v.12, p.28-38, 1991.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative biochemistry and physiology**. v.109, p. 1-62. 1994.

TERRA W. R.; FERREIRA C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (eds.). **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier BV, Oxford. 2005, p. 171–224.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; CUNHA, F. M.; COSTA, M. K. C. M.; VEIGA, A. F. S. L.; OLIVEIRA, J. V. Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.66, n.4, p.1045-1049, 2006.

4 ARTIGO B – ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1794) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) ALIMENTADO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA.

4.1 RESUMO

A cultura da soja sofre com o ataque de insetos-praga, desde a sua germinação até a colheita. Na fase reprodutiva, os percevejos são responsáveis pelos principais prejuízos, sendo o percevejo-marrom, *Euschistus heros*, o principal. A aplicação de inseticidas é a maneira mais utilizada para o controle deste inseto, porém é cara e ineficaz, devido à resistência do *E. heros* à inseticidas ao longo do tempo. Deste modo, métodos alternativos têm sido utilizados, e busca por cultivares resistentes a estes insetos vem aumentando. Nesse processo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes genótipos de soja na biologia de *E. heros*. Foram utilizados os genótipos BRS 284 (controle), BRS 391 e BRS 1001IPRO. Foram observados a duração do instar, viabilidade dos insetos por instar e período ninfa-adulto. Também foram avaliados o peso dos insetos adultos após a emergência, a longevidade, tanto total como somente das fêmeas, a razão sexual e a oviposição. Também foi realizado um teste de preferência alimentar, com e sem chance de escolha, onde as bainhas de perfuração nas vagens foram contadas após coloração com Fucsina ácida. Nenhum dos parâmetros biológicos observados apresentou diferença significativa em relação à testemunha. Os resultados de preferência alimentar indicam que pode haver não preferência ou repelência do percevejo *E. heros* ao genótipo BRS 391 e preferência ao genótipo BRS 1001IPRO. Conclui-se, portanto, que os genótipos de soja testados não alteram o ciclo biológico do percevejo-marrom, *Euschistus heros*, e que há preferência ao genótipo BRS 1001IPRO e não preferência ao BRS 391.

Termos para indexação: percevejo-marrom, *Bacillus thuringiensis*, flavonoides.

4.2 ABSTRACT

The soybean crop suffers with pest insects attack, from their germination to its harvest. In the reproductive phase, the stink bugs are responsible for the main damages, being the brown stink bug, *Euschistus heros*, the main one. The application of insecticides is the most used way to control this insect, but it is expensive and ineffective, due to *E. heros* resistance to insecticides over time. Thus, alternative methods have been used, and the search for resistant cultivars to these insects has been increasing. In this process, the objective of this study was to evaluate the effects of different soybean genotypes on the biology of *E. heros*. Were used the genotypes BRS 284 (control), BRS 391 and BRS 1001IPRO. Were observed the duration of the instar, viability of the insects per instar and nymph-adult period. The weight of adult insects after emergence, longevity, both total and only females, sex ratio and oviposition were also evaluated. A food preference test was also performed, with and without a choice, where the drilling sheaths in the pods were counted after staining with acidic Fuchsin. None of the biological parameters observed presented a significant difference in relation to the control. The food preference results indicate that there may be no preference or repellency of the *E. heros* stink bug to the BRS 391 genotype and preference to the BRS 1001IPRO genotype. It is concluded that the soybean genotypes tested do not alter the biological cycle of the brown stink bug, *Euschistus heros*, and that there is preference to the genotype BRS 1001IPRO and no preference to the BRS 391.

Index terms: brown stink bug, *Bacillus thuringiensis*, flavonoids.

4.3 INTRODUÇÃO

A soja, *Glicine max* (L.) Merrill, é uma das principais culturas de oleaginosas do mundo (LIU, 2006), sendo considerado o principal produto do agronegócio brasileiro (SILVA et al., 2010). De acordo com a CONAB, na safra 2016/2017 a produção de soja no Brasil alcançou a marca de 114 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Desde a sua germinação até a colheita, a cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos praga. Na fase reprodutiva, os percevejos são responsáveis pelos principais prejuízos, ocasionando severos danos diretos e indiretos à cultura (PANIZZI, 2013). As espécies desta família, *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) formam o complexo de percevejos da soja predominante no Brasil (GUEDES et al., 2012). Os danos dos percevejos têm se tornado cada vez mais graves devido a ocorrência do seu aumento populacional, monitoramento ineficiente e aplicações indiscriminadas de agrotóxicos, o que resulta em um desequilíbrio ambiental e na presença de populações mais resistentes (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Dentre estas espécies de percevejos, o percevejo-marrom *E. heros* é considerado a praga de maior importância nas principais regiões produtoras do Brasil (PANIZZI; VIVAN, 1997; SOSA-GÓMEZ et al., 2009). Esta praga ocorre de novembro até abril, com três gerações (CORRÊA-FERREIRA et al., 2009; SOUZA, 2013) e se alimenta preferencialmente das vagens, sendo responsável pela redução do peso e qualidade das sementes (CORRÊA-FERREIRA; AZEVEDO, 2002; DEPIERI; PANIZZI, 2011; SILVA et al., 2012).

O método de controle do percevejo-marrom mais utilizado nas lavouras brasileiras é o controle químico, porém a aplicação de inseticidas é cara e nem sempre eficaz, sendo que desde 1990 vem sendo registrado a ineficiência no controle do percevejo, sendo sugerida a resistência do *E. heros* à inseticidas (SOSA-GÓMEZ; CORSO; MORALES, 2001; PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Dada a necessidade de aplicações seguidas de inseticidas para controle do inseto-praga

para evitar perdas na produção, a importância em se obter cultivares de soja com resistência a insetos tem sido destacada (LOURENÇÃO et al., 2010).

A resistência das plantas envolve características que as tornam menos suscetíveis ao ataque do herbívoro, dependendo das condições em que são manifestadas, essas defesas podem atuar de forma direta, formando barreiras morfológicas, ou de forma indireta, formando barreiras químicas, ou seja, a produção de metabolitos secundários, tais como alcaloides, terpenóides, esteroides e flavonoides (KOGAN, 1986; ARIMURA et al., 2005; CHEN, 2008), sendo que esses compostos desempenham importante papel na determinação da quantidade de alimento que o inseto vai ingerir (BECK, 1965; FRAENKEL, 1969; SRIVASTAVA et al., 1999).

A redução da preferência por um hospedeiro e do tempo de desenvolvimento dos insetos, devido aos mecanismos de defesas da planta podem afetar o crescimento da população desta praga. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a biologia de *E. heros*, alimentados com diferentes genótipos de soja.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Genótipos de soja utilizados

Foram utilizados três genótipos de soja: BRS 284 (genótipo testemunha), BRS 391 (genótipo resistente à percevejos e que contém os isoflavonoides genistina e genisteína) e o BRS 1001IPRO (genótipo *Bt*).

4.4.2 Aspectos biológicos de *E. heros* alimentado com diferentes genótipos de soja

O trabalho foi conduzido na Embrapa Soja, Londrina-PR, utilizando-se câmara climatizada tipo B.O.D. com temperatura de 26°C (± 2 °C), umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$) e fotofase de 14 h.

Foram utilizados insetos de criação provenientes da Embrapa Soja. Após eclosão, os percevejos foram individualizados em placas de Petri (8 cm de diâmetro) forradas com papel filtro e algodão umedecido. Quando atingiram o segundo instar, esses insetos foram alimentados com vagens dos diferentes genótipos de soja, sendo que cada genótipo foi considerado um tratamento, constituído por 70 insetos, ou seja, repetições, em delineamento inteiramente casualizado. O alimento era renovado a cada dois dias. Foram observados diariamente os seguintes parâmetros: duração do instar, viabilidade dos insetos por instar e período ninfa (segundo instar) -adulto. Quando atingiram a fase adulta, estes foram sexados e pareados em casais. Outros parâmetros avaliados foram o peso dos insetos adultos após a emergência, a longevidade, tanto total como somente das fêmeas e a razão sexual (expressa pela fórmula $rs = n^{\circ} \text{ de fêmeas} / (n^{\circ} \text{ de fêmeas} + n^{\circ} \text{ de machos})$). Os ovos, oriundos dos casais, eram coletados diariamente, para avaliação de oviposição.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, com $p < 0,05$.

4.4.3 Preferência alimentar de *E. heros* a diferentes genótipos de soja

Foi realizado um ensaio de preferência alimentar com os três genótipos de soja, com e sem chance de escolha para os insetos.

Foram utilizadas fêmeas adultas, individualizadas, sendo 18 insetos para o ensaio com chance e 15 insetos para o ensaio sem chance de escolha, sendo que cada inseto correspondeu a uma repetição, em delineamento inteiramente casualizado.

Os insetos foram colocados em placas de Petri (14 cm de diâmetro) forradas com papel filtro e contendo algodão umedecido no centro. Essas placas demarcadas em três áreas, onde cada parte continha uma vagem. Para o ensaio com chance de escolha, cada uma dessas três vagens correspondia a um dos genótipos (Figura 1). Para o ensaio sem chance de escolha, as vagens eram do mesmo genótipo.

Os insetos foram alimentados por quatro dias, sem troca das vagens. Após este período, as vagens foram coletadas e submetidas à coloração com Fucsina ácida, para contagem das bainhas de perfuração, tanto do lado de fora da vagem, como nos grãos.

Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste Friedman, com $p < 0,05$.

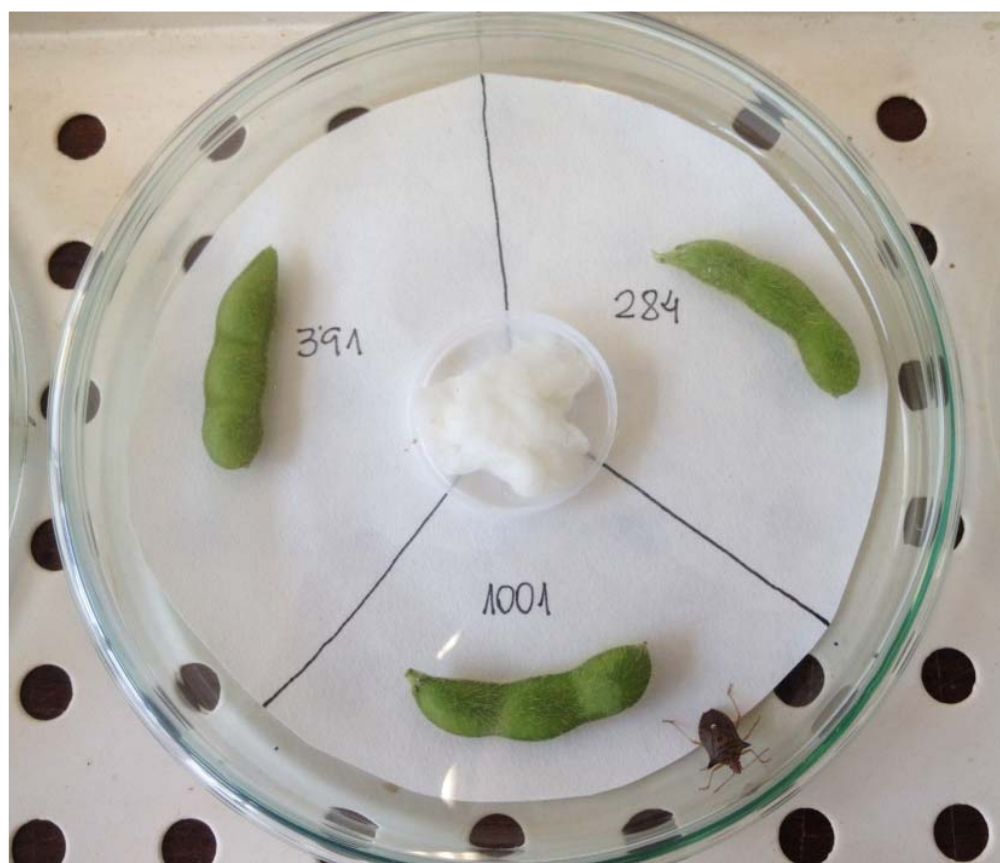


Figura 5. Representação de uma repetição do ensaio de preferência alimentar, com chance de escolha, de *Euschistus heros* a diferentes genótipos de soja.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Aspectos biológicos de *E. heros* alimentado com diferentes genótipos de soja

Tanto os parâmetros avaliados estatisticamente para ninfas (Tabela 4) como os para adultos (Tabela 5) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. A razão sexual, que indica a proporção de fêmeas em relação ao número de machos em uma população, foi maior nos dois tratamentos, em relação à testemunha (Tabela 5), sendo maior na BRS 1001IPRO, seguido da BRS 391.

Os resultados de duração dos instares, peso de adultos e número de ovos (oviposição) são inferiores aos observados por OLIVEIRA (2014). Esta diferença pode estar ligada à alimentação, pois o autor utilizou, em todos os seus tratamentos (soja, amendoim, girassol, ervilha e gergelim), vagens frescas de feijão. Assim, a diversidade da dieta oferecida aos insetos influencia nos seus parâmetros biológicos, proporcionando melhor nutrição, conseqüentemente o peso e a longevidade dos insetos são maiores. Panizzi, Bueno e Silva (2012) citam que os adultos deste percevejo vivem, em média, 116 dias, em condições de campo, muito acima do que foi observado no presente trabalho (30,97 dias para a testemunha), em laboratório.

Tabela 4. Duração e viabilidade de ninfas de *Euschistus heros* alimentadas com diferentes genótipos de soja. Londrina, 2016.

Tratamento	N2		N3		N4		N5		N2-Adulto
	D (dias)	V (%)	D (dias)	V (%)	D (dias)	V (%)	D (dias)	V (%)	D (dias)
BRS 284	3,49 (± 1,80) a	77,61	3,90 (± 1,21) a	84,62	4,61 (± 1,10) a	88,64	7,13 (± 1,38) a	97,44	20,16 (± 3,86) a
BRS 391	3,64 (± 2,15) a	59,32	4,11 (± 0,90) a	94,29	4,39 (± 1,12) a	93,94	7,36 (± 1,23) a	100	20,74 (± 3,44) a
BRS 1001IPRO	3,64 (± 1,86) a	63,08	4,31 (± 1,56) a	90,24	4,51 (± 0,96) a	94,30	7,11 (± 1,09) a	97,22	20,43 (± 3,08) a
CV (%)	53,85		30,82		23,54		17,28		17,08

Médias (± erro padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV (%) – Coeficiente de variação. D (dias) – Duração, em dias, de cada instar. V (%) – Viabilidade dos insetos, para cada instar. N2 – Ninfas de segundo instar. N3 – Ninfas de terceiro instar. N4 – Ninfas de quarto instar. N5 – Ninfas de quinto instar. N2-Adulto – Duração do início do segundo instar à fase adulta.

Tabela 5. Aspectos biológicos de adultos de *Euschistus heros* alimentados com diferentes genótipos de soja. Londrina, 2016.

Tratamento	Razão Sexual	Peso (mg)	Oviposição	Longevidade (dias)	
				Total	Fêmeas
BRS 284	0,34	67,85 (± 9,89) a	132,31 (± 152,35) a	30,97 (± 18,25) a	26,61 (± 19,90) a
BRS 391	0,48	66,63 (± 9,22) a	56,93 (± 78,35) a	24,77 (± 17,17) a	23,73 (± 19,23) a
BRS 1001IPRO	0,51	67,82 (± 7,78) a	61,83 (± 94,12) a	25,03 (± 15,22) a	22,10 (± 22,10) a
CV (%)		13,38	84,32	34,49	40,87

Médias (± erro padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV (%) – Coeficiente de variação. Razão Sexual – rs = n° de fêmeas/(n° de fêmeas + n° de machos). Oviposição – Soma do número diário de ovos por fêmea.

4.5.2 Preferência alimentar de *E. heros* a diferentes genótipos de soja

Quando os insetos foram colocados com chance de escolha, o genótipo BRS 1001IPRO foi o mais atrativo aos percevejos, sendo significativamente mais perfurado em relação aos outros dois tratamentos, fora e dentro das vagens. Os tratamentos BRS 284 e BRS 391 não diferiram entre si estatisticamente (Tabela 6).

Quando os insetos foram colocados sem chance de escolha, o genótipo BRS 391 foi o que apresentou a menor média de perfurações, sendo estatisticamente diferente da BRS 284 para o lado de fora, e dos dois tratamentos do lado de dentro. Os tratamentos BRS 284 e BRS 1001IPRO não diferiram entre si estatisticamente (Tabela 6). Estes resultados indicam que pode haver não preferência ou repelência do percevejo *E. heros* ao genótipo BRS 391 e preferência ao genótipo BRS 1001IPRO.

Tabela 6. Preferência alimentar de *E. heros* a diferentes genótipos de soja.

Tratamento	Número de Bainhas de Perfuração			
	Com Chance de Escolha		Sem Chance de Escolha	
	Fora	Dentro	Fora	Dentro
BRS 284	3,22 a	1,11 a	12,80 b	2,80 b
BRS 391	2,61 a	0,44 a	4,80 a	1,06 a
BRS 1001IPRO	10,22 b	2,83 b	6,46 ab	2,66 b

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0.05$).

Sismeiro (2015), estudando as populações de insetos-praga e predadores na cultura da soja em sucessão com milho, observou que havia maior população de *E. heros* em todos os tratamentos contendo soja com o genótipo Bt, em relação aos outros tratamentos, corroborando com o resultado de preferência alimentar. Correia-Ferreira et al. (2016), avaliando a tolerância do genótipo BRS 391 à ataques de percevejos, observaram menor nível populacional destes insetos em

relação ao controle. Os autores ainda observaram que houve um menor índice de sementes picadas e inviabilizadas pelos percevejos, do genótipo BRS 391, em duas áreas testadas, em relação ao controle.

4.6 CONCLUSÃO

Os genótipos BRS 391 e BRS 1001IPRO não alteram o ciclo biológico do percevejo-marrom, *Euschistus heros*.

Pode haver não preferência ou repelência do percevejo *E. heros* ao genótipo BRS 391 e há preferência ao genótipo BRS 1001IPRO.

REFERÊNCIAS

- ARIMURA, G. I.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defenses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1734, p. 91-111, 2005.
- BECK, D. Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology*, v. 10, p. 207-232, 1965.
- CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**. v. 15, p. 101-114, 2008.
- CIVIDANES, F. J.; PARRA, J. R. P. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos da soja. II. *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 12, p. 1841-1846, 1994.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_10_11_27_12_boletim_graos_agosto_2017.pdf >. Acessado em 08 de janeiro de 2018.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 2002.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; LIMA, D.; ARIAS, C. A. A. TOLERÂNCIA DA SOJA BRS 391 AOS DANOS DE PERCEVEJOS SUGADORES DE GRÃOS. **Resumos expandidos da XXXV Reunião de Pesquisa de Soja**. 2016.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; KRZYZANOWSKI, F. C.; MINAMI, C. A. **Percevejos e a qualidade da semente de soja – série sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 16. (Circular Técnica, 67).

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 46. (Circular Técnica, 24).

DEPIERI, R.; 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.

FRAENKEL, G. Evaluation of four thoughts on secondary plant substances. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 12, p. 473-486, 1969.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GRAZIA, J.; DEL VECCHIO, M. C.; BALESTIERI, F. M. P.; RAMIRO, Z. A. Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja (*Glycine max* (L.) Merrill): I – *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 9, p. 39-51, 1980.

GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; STÜRMER, G. R.; MELO, A. A.; BIGOLIN, M.; PERINI, C. R.; SARI, B. G. Percevejos da soja: novos cenários, novo manejo. **Revista Plantio Direto**, v. 12, n. 1, p. 24-30, 2012.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Journal Research**. Iowa State v.60, p. 501-527, 1986.

LIU, Z. T.; BI, Y. L. Yield rise and potential of Heilongjiang soybean production in the perspective of science and technology progress. **Soybean Bull**, v. 80, p. 1-3, 2006.

LOURENÇÃO, A. L.; RECO, P. C.; BRAGA, N. R.; VALLE, G. E.; PINHEIRO, J. B. Produtividade de genótipos de soja sob infestação da Lagarta-da-Soja e de Percevejos. **Neotropical Entomology**, v.39, n. 2, p. 275-281, 2010.

OLIVEIRA, D. G. P. Parâmetros biológicos de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados em dietas naturais e sua relação com a infecção causada por fungos entomopatogênicos. 2014, 101p. **Tese**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

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

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja manejo integrado de insetos e outros artrópodes-pragas**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. cap. 5, p. 335-420.

PANIZZI, A. R.; VIVAN, L. M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in overwintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 82, n. 2, p. 213-217, 1997.

SILVA, C. E.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M.A.; LEITE, R.S.; OLIVEIRA, G. B. A.; MOREIRA, A. A.; SANTOS, H. M. C.; MÔNACO, A. P. A. Avaliação de ácidos graxos da soja: grão inteiro, casca, cotilédones e hipocótilo. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 5., Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2010. 31-34. (Embrapa Soja. Documentos, 323). 2010.

SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R.A.; PANIZZI, A. R. Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa mediatubunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 386-390, 2012.

SISMEIRO, M. N. S. Artrópodes predadores e insetos-praga em sistemas de sucessão soja-milho com plantas geneticamente modificadas. 2015. 68p. **Tese**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p. 317-320, 2001.

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.

SOUZA, L. A.; BARBOSA, J.C.; GRIGOLLI, J. F. J.; FRAGA, D. F.; MALDONADO Jr, W.; BUSOLI, A. C. Spatial distribution of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 412-418, 2013.

SRIVASTAVA, R.; SHUKLS, Y. N.; KUMAR, S. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v. 21, p 59-76, 1999.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os genótipos testados causam alterações morfológicas e histoquímicas no epitélio do intestino médio de *Euschistus heros*, inferindo assim que o uso destes genótipos pode resultar em melhoria para o controle desta praga, uma vez que ambos podem estar associados com a quebra de resistência do inseto aos inseticidas.

Os genótipos testados não alteram o ciclo biológico do percevejo-marrom, *Euschistus heros*, porém há não preferência ou repelência do inseto ao genótipo BRS 391 e preferência ao genótipo BRS 1001IPRO.