Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Simbiontes associados ao intestino médio e aparelho reprodutivo de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae)

Wanessa Scopel

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Wanessa Scopel
Engenheira Agrônoma

Simbiontes associados ao intestino médio e aparelho reprodutivo de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Scopel, Wanessa

Simbiontes associados ao intestino médio e aparelho reprodutivo de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) / Wanessa Scopel. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

90 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Microbiota 2. Simbiose 3. Caracterização molecular 4. Interação inseto-simbionte I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de força, por permitir a realização desta grande conquista.

À minha família pelo incentivo, compreensão e amor incondicional. Obrigada por entenderem minha ausência em momentos importantes.

Ao Dr. Fernando Luis Cônsoli, pela orientação, confiança e ensinamentos, os quais foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, meu eterno agradecimento.

À Marcele Coelho, técnica de nível superior do Laboratório de Interações em Insetos da Esalq/USP, pela companhia, disposição e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Dr. Crébio José Ávila, pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, por me receber em seu laboratório e disponibilizar as áreas para coletas de percevejos.

Aos Doutores Samuel Roggia e Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira, pesquisadores da Embrapa Soja, pela atenção e disponibilidade durante as coletas de insetos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Esalq/USP, pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Interações em Insetos, agradeço pela enriquecedora e divertida convivência diária, pela troca de informações profissionais, pelos momentos de descontração, pelas risadas e pelo apoio. Tenho muita sorte em trabalhar e conviver com vocês!

Aos colegas e amigos do curso do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Esalq/USP pelo companheirismo, descontração e convívio agradável.

Muitas pessoas contribuíram para concretizar este trabalho. Agradeço, em especial, àquelas que me enviaram amostras de percevejos.

À Doutora Carolina Reigada, Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP, pelo auxílio com as análises estatísticas e esclarecimentos, sempre realizados de forma muito atenciosa.

Às secretárias do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP, Marta Colletti e Andrea Sintoni, por sempre estarem dispostas a ajudar.

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

A todos aqueles que não tenham sido aqui citados, mas que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 8
1. INTRODUÇÃO 11
REFERÊNCIAS 13
2. SIMBIONTES CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS AO APARELHO REPRODUTIVO E TRATO DIGESTIVO DE *EUSCHISTUS HEROS* 15
Resumo 15
Abstract 15
2.1. Introdução 16
2.2. Material e métodos 18
2.2.1. Criação de *Euschistus heros* 18
2.2.2. Cultivo e isolamento de simbiontes associados a *Euschistus heros* 18
2.2.3. Extração do DNA genômico e caracterização molecular dos simbiontes 19
2.2.4. Identificação putativa e análise filogenética 21
2.3. Resultados 21
2.1. Discussão 26
2.2. Conclusão 30
REFERÊNCIAS 30
3. ANÁLISE METAGENÔMICA DA DIVERSIDADE DE SIMBIONTES ASSOCIADOS AO INTESTINO MÉDIO DE *EUSCHISTUS HEROS* 37
Resumo 37
Abstract 37
3.1. Introdução 38
3.2. Material e métodos 40
3.2.1. Coleta dos insetos e extração de DNA genômico 40
3.2.1.1. Coleta de embrião 40
3.2.1.2. Coleta do intestino médio de ninfas e adultos 41
3.2.2. Amplificação e sequenciamento metagenômico 41
3.2.3. Análise de dados 42
3.2.4. Análise filogenética 44

3.3. Resultados....44
3.4. Discussão....54
3.5. Conclusão....56
REFERÊNCIAS....56
4. SIMBIONTES ASSOCIADOS AO TRATO REPRODUTIVO E A APTIDÃO REPRODUTIVA DE *EUSCHISTUS HEROS*....61
Resumo....61
Abstract....61
4.1. Introdução....62
4.2. Material e métodos....64
4.2.1. Criação estoque de *Euschistus heros*....64
4.2.2. Simbiontes associados à vesícula seminal e a reprodução de *Euschistus heros*....65
4.2.3. Análise estatística....66
4.3. Resultados....66
4.4. Discussão....68
4.5. Conclusão....70
REFERÊNCIAS....70
5. SIMBIONTES E O DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DE *EUSCHISTUS HEROS*....73
Resumo....73
Abstract....73
5.1. Introdução....74
5.2. Material e métodos....75
5.2.1. Criação estoque de *Euschistus heros*....75
5.2.2. Efeito do tratamento conjugado pela alimentação de adultos com antibióticos e esterilização superficial dos ovos no desenvolvimento e reprodução de *Euschistus heros*....76
5.2.3. Análise estatística....77
5.3. Resultados....77
5.4. Discussão....80
5.5. Conclusão....82
REFERÊNCIAS....82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS....85
ANEXOS....87

RESUMO

Simbiontes associados ao intestino médio e aparelho reprodutivo de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae)

Bactérias simbiontes foram fundamentais no processo evolutivo de eucariotos. Em insetos, essa associação permitiu a exploração de novos nichos ecológicos pela íntima associação estabelecida com bactérias que fornecem nutrientes essenciais a hospedeiros cuja dieta apresenta limitação em sua composição nutritiva, assim como proteção em condições de estresse à fatores bióticos e abióticos. Um grande número de associações facultativas, aquelas em que o simbionte não é essencial para a sobrevivência do hospedeiro, mas pode impactar na aptidão biológica, tem sido descobertas. Pentatomídeos estão comumente associados a bactérias extracelulares facultativas presentes nas invaginações da região final do intestino médio (V4), sendo alvos de investigação para a determinação da diversidade de simbiontes e, principalmente, sua função na interação com o inseto hospedeiro. Porém, na ausência destes simbiontes, o desenvolvimento e a aptidão reprodutiva do hospedeiro podem ser prejudicados. Adicionalmente, bactérias livres associadas a insetos podem se associar a outros tecidos, como as estruturas reprodutivas, e causar efeitos nocivos ao hospedeiro. A intensidade dos efeitos induzidos por essa microbiota depende de vários fatores, como a sua diversidade, a idade e o tecido do hospedeiro. Nesta tese utilizamos como modelo de estudo o percevejo *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), uma importante praga de diversas culturas agrícolas, para investigar: i) a diversidade de simbiontes cultiváveis associada às estruturas reprodutivas (ovários, espermateca e vesícula seminal) e digestivas (criptas da região final do intestino médio); ii) a diversidade de simbiontes não-cultiváveis associados ao embrião e ventrículos do intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos; iii) o efeito de tratamentos com antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) na eliminação de bactérias associadas à vesícula seminal e espermateca e; iv) aquelas associadas à região V4 do intestino médio, na aptidão reprodutiva de *E. heros*. A região V4 do intestino médio, ovários, espermateca e vesícula seminal apresentaram *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*) e *Firmicutes* (*Enterococcaceae* e *Staphylococcaceae*) como simbiontes cultiváveis, sendo a região V4 do intestino médio a mais diversa entre as estruturas avaliadas. Entre os filotipos isolados, foram encontrados filotipos comuns a todas as estruturas analisadas (LII-WS-Eh24a), mas também aqueles associados exclusivamente ao trato reprodutivo (LII-WS-Eh94b, LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh97b) e aparelho digestivo (LII-WS-Eh90b e LII-WS-Eh19a). Quanto aos simbionte não-cultiváveis, a análise de metagenômica indicou o embrião de *E. heros* como sendo o mais diverso, seguido pelas regiões V1 e V2 do intestino médio de ninfas e adultos. A região V4 foi a menos diversa, sendo habitada praticamente por uma *Enterobacteriaceae* próxima a *Erwinia amylovvora* e de transmissão transovariana, sendo este o primeiro relato em percevejos. A espermateca e a vesícula seminal são naturalmente infectadas por simbiontes e a eliminação dessas bactérias após tratamento com antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B)

não resultou em alterações na capacidade reprodutiva de fêmeas. O tratamento de adultos com a solução de antibiótico-antimicótico e a esterilização superficial dos ovos não interferiu no desenvolvimento de *E. heros*, ocorrendo, porém, redução da fertilidade e aumento na mortalidade de ninfas quando os parentais foram alimentados com antibióticos.

Palavras-chave: Microbiota; Simbiose; Caracterização molecular; Interação inseto-simbionte

ABSTRACT

Symbionts associated with the midgut and reproductive tract of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae)

Bacterial symbionts are fundamental in the evolutionary process of eukaryotes. In insects this association allowed the exploitation of new ecological niches, because the bacteria provide essential nutrients for those whose diet is nutritionally limited. Bacterial symbionts also provide protection against biotic and abiotic factors, allowing insects to exploit a range of food types. In recent years, a large number of facultative associations have been discovered. In such associations, symbionts are not essential for host survival, but may have a significant impact on insect host fitness. Pentatomids are commonly associated with facultative extracellular bacteria present in the invaginations of the posterior region of the midgut (V4) and have been targeted in studies for the determination of the diversity and function of these symbionts. However, associations with symbionts can impose adaptive costs to the host; therefore, in the absence of these symbionts, the development and reproduction of the host may be impaired. In addition, facultative symbionts can be potentially pathogenic bacteria, and can infect the host's reproductive system. The intensity of the effects induced by this microbiota depends of several factors, such as its diversity, age and host tissue infected. In here, we used *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), an important agricultural pest of several crops, as a model to investigate: i) the diversity of culturable symbionts of *E. heros* (ovaries, spermatheca and seminal vesicle) and digestive tract (crypts of the posterior region of the midgut); ii) the diversity of non-culturable symbionts associated with the embryo and midgut ventricles of fifth instar nymphs and adults; iii) the effect of antibiotic-antimycotic treatments (10,000 units/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin sulphate and 25 mg/mL amphotericin B) in the elimination of bacteria associated with the seminal vesicle and spermathecae and; iv) those associated with the V4 region of the midgut in the reproductive fitness of *E. heros*. Our data show that the diversity of culturable symbionts associated with the V4 region of the midgut, ovaries, spermatheca and seminal vesicle is represented by *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*) and *Firmicutes* (*Enterococcaceae* and *Staphylococcaceae*). The V4 region of the midgut was the most diverse among the evaluated structures. In addition, common culturable phylotypes were found to all structures analyzed (LII-WS-Eh24a), but also those associated exclusively with the reproductive tract (LII-WS-Eh94b, LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh97b) and digestive tract (LII-WS-Eh90b e LII-WS-Eh19a). Metagenomic analysis indicated the embryo of *E. heros* carried the most diverse non-culturable microbiota, followed by the V1 and V2 region of the midgut. The V4 region was mostly inhabited by an *Enterobacteriaceae* near *Erwinia amylovvora* and transovarian transmission, being this the first report in stinkbugs. Symbionts associated with the spermatheca and the seminal vesicle naturally infect *E. heros* and do not affect the reproductive capacity of females. Treatment of adults with the antibiotic-antimycotic solution (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) and surface sterilization of the eggs did not interfere with

the development of *E. heros*, but the progenie of couples treated with antibiotics presented reduced fertility and increased nymphal mortality.

Keywords: Microbiota; Symbiosis; Molecular characterization; Insect-symbiont interaction

1. INTRODUÇÃO

Bactérias simbiontes, endocitobiontes ou endossimbiontes de vida livre, contribuem de forma significativa na adaptação de insetos às mais diversas fontes de alimentos e habitats, visto que os simbiontes estão envolvidos no fornecimento de nutrientes essenciais aos hospedeiros (vitaminas e aminoácidos), os quais não estão disponíveis em concentrações adequadas ao inseto na fonte de alimento explorada (Klepzig *et al.* 2009; Moran & Dunbar 2006).

Os endossimbiontes podem ser divididos em primários ou obrigatórios e secundários ou facultativos. Os simbiontes obrigatórios normalmente se localizam em células especializadas isoladas, denominadas bacteriócitos, ou agrupadas, formando um órgão específico, o bacterioma, localizado na hemocele do inseto. Esses simbiontes são transmitidos via transovariana e estão envolvidos em associações de mutualismo altamente especializadas, necessárias a ambos os parceiros (Moran & Dunbar 2006). Os facultativos, por sua vez, são tipicamente de vida livre, presentes na hemolinfa, no lúmen intestinal ou associados à diferentes tipos celulares, sendo de ocorrência irregular nas populações do hospedeiro (Afkhami & Rudgers 2008; Fukatsu *et al.* 2000; Sudakaran *et al.* 2017). Porém, muitos simbiontes secundários acabam influenciando aspectos essenciais da aptidão do hospedeiro, como a tolerância a altas temperaturas (Montllor *et al.* 2002), a preferência pela planta hospedeira (Leonardo & Muiru 2003; Tsuchida *et al.* 2004), o catabolismo de pesticidas (Cheng *et al.* 2017; Kikuchi *et al.* 2012; Pan *et al.* 2013) e o aumento da resistência de hospedeiros a parasitoides (Oliver *et al.* 2003; Oliver *et al.* 2005) e fungos (Scarborough *et al.* 2005). Outros simbiontes facultativos, como *Wolbachia*, *Spiroplasma* e *Cardinium*, são conhecidos por manipular a reprodução do hospedeiro (Anbutsu & Fukatsu 2003; Werren *et al.* 2008; Zchori-Fein & Perlman 2004). Embora a maioria dos endocitobiontes facultativos sejam transmitidos verticalmente, não há congruência na filogenia de endocitobiontes e seus hospedeiros, sugerindo múltiplas origens e frequentes transmissões horizontais (Hosokawa *et al.* 2016a; Hosokawa *et al.* 2016b; Kikuchi 2009; Moran & Dunbar 2006). Ainda, os endossimbiontes secundários transmitidos via materna podem sofrer redução em sua densidade ao longo de gerações sucessivas do hospedeiro (Afkhami & Rudgers 2008; Fukatsu *et al.* 2000).

Informações sobre os mecanismos de transmissão e aquisição de endossimbiontes de vida livre, como os associados à hemolinfa e ao lúmen intestinal, são escassas. Porém, há relatos da transmissão de simbiontes associados ao trato digestivo via alimentação da

superfície coriônica contaminada (Boucias *et al.* 2012; Fukatsu & Hosokawa 2002; Kaiwa *et al.* 2014), coprofagia materna (Beard *et al.* 2002) e trofolaxia proctodeal (Currie *et al.* 2006; Hongoh 2010; Koch & Schmid-Hempel 2011; Marsh *et al.* 2014; Powell *et al.* 2014). A aquisição também pode ocorrer diretamente do ambiente, a cada nova geração (Caspi-Fluger *et al.* 2012; Kikuchi *et al.* 2007).

Os percevejos, representantes da Ordem Hemiptera, consistem de mais de 40.000 espécies no mundo. São agrupados em sete infraordens, sendo relatados simbiontes em duas delas, Cimicomorpha e Pentatomomorpha. Os percevejos dessas infraordens demonstram adaptações a diversos habitats e estratégias de vida, como a dos predadores, hematófagos e fitófagos. Além disso, apresentam o intestino médio dividido em quatro segmentos, sendo o último deles (V4) caracterizado por apresentar invaginações (cecos ou criptas), considerado um importante local de interação com bactérias (Kikuchi *et al.* 2008; Schaefer & Panizzi 2000; Weirauch & Schuh 2011).

Embora a maior parte das funções biológicas da microbiota intestinal permaneça obscura em percevejos, foi demonstrada que a eliminação de simbiontes das criptas resultou em crescimento retardado e maior mortalidade ninfal em algumas espécies de hospedeiros (Fukatsu & Hosokawa 2002; Hosokawa *et al.* 2016a; Hosokawa *et al.* 2006; Kikuchi *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 2009; Prado *et al.* 2006; Tada *et al.* 2011), bem como na redução de peso de adultos (Hirose *et al*. 2006).

Diante deste contexto, evidencia-se a importância de se conhecer a diversidade, localização e possível função dos simbiontes em insetos, visando entender as implicações dessas interações na biologia e fisiologia do hospedeiro. Assim, esse projeto teve por finalidade abordar a relação de simbiose facultativa em *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), importante praga agrícola de diversas culturas (soja, algodão, girassol, milho). Para tanto, buscou-se estudar a diversidade da microbiota cultivável associada às estruturas reprodutivas (ovários, espermateca e vesícula seminal) e digestivas (criptas da região final do intestino médio); ii) a diversidade de simbiontes não-cultiváveis associados ao embrião e ventrículos do intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos; iii) o efeito de tratamentos com antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) na eliminação de bactérias associadas à vesícula seminal e espermateca e; iv) aquelas associadas à região V4 do intestino médio, na aptidão reprodutiva de *E. heros* e, assim, fornecer bases para o aprimoramento e/ou desenvolvimento de técnicas alternativas de controle de pragas.

Referências

Afkhami ME, Rudgers JA (2008) Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist* **172**, 405-416.

Anbutsu H, Fukatsu T (2003) Population dynamics of male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1428-1434.

Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV (2002) Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology* **47**, 123-141.

Boucias DG, Garcia-Maruniak A, Cherry R, *et al.* (2012) Detection and characterization of bacterial symbionts in the Heteropteran, *Blissus insularis*. *FEMS Microbiology Ecology* **82**, 629-641.

Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, *et al.* (2012) Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **279**, 1791-1796.

Cheng D, Guo Z, Riegler M, *et al.* (2017) Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome* **5**, 13.

Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* **311**, 81-83.

Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 389-396.

Fukatsu T, Nikoh N, Kawai R, Koga R (2000) The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2748-2758.

Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ, Aldrich JR (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 91-95.

Hongoh Y (2010) Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 1145-1151.

Hosokawa T, Matsuura Y, Kikuchi Y, Fukatsu T (2016b) Recurrent evolution of gut symbiotic bacteria in pentatomid stinkbugs. *Zoological Letters* **2**, 24.

Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, *et al.* (2016a) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nature Microbiology* **1**, 15011.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol* **4**, 1841-1851.

Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2014) Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Current Biology* **24**, 2465-2470.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, *et al.* (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8618-8622.

Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments* **24**, 195-204.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *Bmc Biology* **7**, 2.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2008) Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. *Microbial Ecology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers 39-63.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2007) Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4308-4316.

Klepzig KD, Adams A, Handelsman J, Raffa K (2009) Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology* **38**, 67-77.

Koch H, Schmid-Hempel P (2011) Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19288-19292.

Leonardo TE, Muiru GT (2003) Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, S209-S212.

Marsh SE, Poulsen M, Pinto-Tomás A, Currie CR (2014) Interaction between workers during a short time window is required for bacterial symbiont transmission in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *PloS One* **9**, 1-9.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-195.

Moran NA, Dunbar HE (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12803-12806.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12795-12800.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1803-1807.

Pan HP, Chu D, Liu BM, *et al.* (2013) Relative amount of symbionts in insect hosts changes with host-plant adaptation and insecticide resistance. *Environmental Entomology* **42**, 74-78.

Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA (2014) Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 7378-7387.

Prado SS, Rubinoff D, Almeida RP (2006) Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 577-585.

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray H (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**, 1781-1781.

Schaefer CW, Panizzi AR (2000) *Heteroptera of economic importance.* CRC press. Boca Raton, Florida. 852 p.

Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M (2017) Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology* **25**, 375-390.

Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, *et al.* (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* **46**, 483.

Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**, 1989-1989.

Weirauch C, Schuh RT (2011) Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. *Annual Review of Entomology* **56**, 487-510.

Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 741-751.

Zchori-Fein E, Perlman SJ (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* **13**, 2009-2016.

2. SIMBIONTES CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS AO APARELHO REPRODUTIVO E TRATO DIGESTIVO DE *Euschistus heros*

Resumo

Os simbiontes (bactérias) são amplamente difundidos em eucariotos e podem influenciar a fisiologia, ecologia e evolução do hospedeiro. A maioria dos insetos abrigam bactérias na hemocele, em células especializadas e no lúmen intestinal. Os percevejos, assim como muitos artrópodes, são conhecidos por abrigar bactérias simbiontes facultativas que ocorrem extracelularmente. Apesar de não estabelecerem associação obrigatória, essas bactérias geralmente influenciam a aptidão do hospedeiro. Desta forma, este trabalho teve por objetivo identificar os simbiontes facultativos cultiváveis associados aos ovários, à espermateca, vesícula seminal e região posterior do intestino médio (V4) de machos e fêmeas de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). Para tanto, foram utilizados diferentes meios de cultura para a inoculação das estruturas selecionadas e isolamento de bactérias. As colônias selecionadas (morfotipos) foram multiplicadas em meio líquido, sujeitas à extração de DNA genômico, amplificação do gene 16S do rRNA e análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição. Os amplicons do gene 16S do rRNA de morfotipos com padrões de restrição distintos foram purificados e sequenciados. Baseando-se em análises de sequências do 16S rDNA obtido, verificou-se a diversidade de bactérias cultiváveis associadas principalmente à região V4 do intestino médio de *E. heros*. Análises comparativas das sequências obtidas com aquelas depositadas nos bancos de dados do EzTaxon-e e a utilização de uma matriz de distâncias pareadas agruparam os filotipos em dois filos: *Proteobacteria* e *Firmicutes*, sendo o primeiro representado por uma única família (*Enterobacteriaceae*) de *γ-Proteobacteria*, enquanto o segundo por duas famílias (*Enterococcaceae* e *Staphylococcaceae*) de *Bacilli*. Foram identificados filotipos de ocorrência exclusiva em ovários (LII-WS-Eh97b), espermateca (LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh94b) e região V4 do intestino médio, tanto de machos (LII-WS-Eh90b) quanto de fêmeas (LII-WS-Eh19a), exceto na vesícula seminal.

Palavras-chave: Diversidade; Meio de cultura; Bactéria facultativa; Árvore filogenética

Abstract

Symbionts (bacteria) are widely distributed in eukaryotes, potentially influencing the physiology, ecology and evolution of the host. Most insects harbor bacteria in their hemocele, specialized cells and into the gut lumen. Stinkbugs, like many arthropods, are known to harbor extracellular facultative symbiotic bacteria. Although these bacteria do not establish obligate associations, they usually influence their host fitness. The objective of this work was to identify the culturable facultative symbionts associated with the ovaries, spermatheca, seminal vesicle and posterior region of the midgut (V4) of males and females of

Euschistus heros (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). Several culture media were used for the inoculation of the selected structures and isolation of bacteria. The selected colonies (morphotypes) were cultured in liquid medium, subjected to genomic DNA extraction, 16S rRNA gene amplification and restriction fragment size polymorphism (RFLP) analysis. Morphotypes with distinct RFLP patterns were purified and sequenced, and sequences obtained were used for putative identification and phylogenitical analysis. Comparative analyses of the sequences obtained with those available in the EzTaxon-e database and the use of a matrix of paired distances grouped the phylotypes in two Phyla: *Proteobacteria* and *Firmicutes*, the first being represented by a single family (*Enterobacteriaceae*) of *γ-Proteobacteria*, while the second with two families (*Enterococcaceae* and *Staphylococcaceae*) of *Bacilli*. Some of the phylotypes identified were exclusively associated with single structures, such as ovaries (LII-WS-Eh97b), spermatheca (LII-WS-Eh88b and LII-WS-Eh94b) and the V4 region of the midgut of male (LII-WS-Eh90b) and female (LII-WS-Eh19a), except in the seminal vesicle.

Keywords: Diversity; Culture medium; Facultative bacteria; Phylogenetic tree

2.1. Introdução

A simbiose entre insetos e microrganismos é comum, e relações de mutualismo proporcionaram grande capacidade adaptativa aos insetos quanto ao uso de fontes nutricionais restritas ou de difícil digestão (Douglas 2009). Mesmo as associações a organismos que estabelecem relações secundárias acabam por atribuir novas características fenotípicas ao hospedeiro, permitindo, assim, a exploração de novos nichos ecológicos inacessíveis anteriormente, desempenhando constantemente um papel importante na adaptação e evolução dos artrópodes (Klepzig *et al.* 2009; Moran & Dunbar 2006; Sudakaran *et al.* 2017)

Hemípteros das infraordens Cimicomorpha e Pentatomomorpha possuem associações de simbiose com bactérias, as quais são predominantemente encontradas nas criptas ou cecos gástricos da região posterior do intestino médio (Kikuchi *et al.* 2008). Quando esses simbiontes são eliminados, o hospedeiro apresenta crescimento lento e alta mortalidade ninfal (Hosokawa *et al.* 2016; Kikuchi *et al.* 2009; Tada *et al.* 2011; Taylor *et al.* 2014), bem como a redução de peso de adultos (Hirose *et al.* 2006), sinalizando a importância dos mesmos na aptidão biológica do inseto.

Em populações naturais de percevejos da família Alydidae, bactérias do gênero *Burkholderia* (*β-Proteobacteria*) predominam na comunidade associada às criptas do V4, sendo associados a 95-100% das populações naturais estudadas (Kikuchi *et al.* 2005). Esse

simbionte também ocorre predominantemente em Coreidae, Berytidae, Blissidae, Cymidae, Pachygronthidae e Rhyparochromidae (Henry 2009; Kikuchi *et al.* 2011; Kikuchi *et al.* 2005).

Outras famílias de heterópteros, inclusive Pentatomidae, apresentam algumas linhagens distintas de *γ-Proteobacteria* como simbionte predominante no lúmen intestinal (Fukatsu & Hosokawa 2002; Hosokawa *et al.* 2010a; Hosokawa *et al.* 2006; Kaiwa *et al.* 2011; Kikuchi *et al.* 2009; Prado & Almeida 2009). Há também relatos da existência de rica comunidade de *Actinobacteria* no intestino de percevejos, havendo, inclusive, a sugestão de que a mesma venha a desempenhar papel protetor contra a ocorrência de patógenos devido a conhecida atividade das actinobactérias na produção de substâncias com função antibiótica (Salem *et al.* 2013; Zucchi *et al.* 2012).

Mas a microbiota de insetos também pode ser composta por patógenos normalmente transmitidos por eles e que, em alguns casos, ganham o potencial de transmissão sexual (Mann *et al.* 2011). Além disso, bactérias associadas ao trato digestivo podem ganhar acesso aos órgãos reprodutivos de insetos, sendo comprovada a ocorrência de várias associações patogênicas que são transmitidas sexualmente em insetos (Knell & Webberley 2004; Miest & Bloch-Qazi 2008). Assim, as estruturas reprodutivas de insetos também são potenciais abrigos de simbiontes que poderiam estabelecer relações de comensalismo ou de patogenicidade com seus insetos hospedeiros. No caso de percevejos, há relatos da existência de infecções associadas aos órgãos reprodutivos, mas sem qualquer identificação específica ou caracterização de seu efeito, limitando a melhor compreensão dessas associações na bioecologia desses insetos (Bright & Bulgheresi 2010; Woodward 1949). Esses estudos relataram a presença de bactérias em ovários e vesícula seminal de percevejos (Bright & Bulgheresi 2010; Woodward 1949); entretanto, além da falta de identificação, ainda há a necessidade de estudos direcionados à diversidade de bactérias existentes para que se possa elucidar as possíveis relações com o hospedeiro.

O percevejo *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) se destaca como praga de diversas culturas de importância econômica, tais como soja, algodão, girassol e milho. Tanto adultos quanto ninfas se alimentam pela sucção de hastes, ramos, vagens e grãos, ocasionando danos diretos e indiretos às plantas, limitando sua produção (Soria *et al.* 2016). Assim como outros insetos da ordem Hemiptera, presume-se que *E. heros* também compartilhe associações com endossimbiontes de vida livre. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar os simbiontes cultiváveis associados às estruturas reprodutivas de fêmeas (espermateca e ovários) e machos (vesícula seminal) e da região final do intestino médio (V4) de adultos de *E. heros*.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Criação de *Euschistus heros*

A colônia de *E. heros* foi estabelecida a partir da coleta de adultos em cultivo de soja no munícipio de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil (22º16'42"S, 54º49'10"O). Os percevejos foram trazidos ao laboratório e separados por sexo para a individualização de casais (n= 50), mantidos em caixas plásticas (21 x 18 x 18 cm). Os insetos foram alimentados com dieta natural composta de vagens de feijão, sementes de amendoim e girassol, sendo ainda oferecida água em algodão umedecido. O alimento e a água foram substituídos a cada dois dias. Um pedaço de tecido (18 x 5 cm) foi pendurado na tampa da caixa para servir de substrato para oviposição. As posturas foram coletadas semanalmente e colocadas em caixas plásticas (6 x 12 x 12 cm) contendo algodão umedecido para evitar a dessecação dos ovos. Imaturos foram alimentados com a mesma dieta dos adultos e transferidos para caixas plásticas maiores (21 x 18 x 18 cm), assim que atingiram o quinto ínstar. A criação foi mantida em condições controladas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h).

2.2.2. Cultivo e isolamento de simbiontes associados a *Euschistus heros*

Percevejos de último ínstar provenientes da criação em laboratório foram mantidos em gaiola até a emergência de adultos. Adultos virgens entre 1 e 5 dias de idade foram esterilizados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em 70% etanol (v/v), na qual os insetos foram imersos durante 2 min, sendo posteriormente lavados em água deionizada estéril. Os percevejos foram dissecados em condições assépticas em solução salina estéril de NaCl a 0,85% para a obtenção da região V4 do intestino de machos e fêmeas, espermateca e ovário de fêmeas e vesícula seminal de machos. A estrutura dissecada foi lavada (3×) em solução salina estéril antes de ser transferida individualmente para tubos contendo 100 µL de solução salina estéril de NaCl a 0,85%. As estruturas foram maceradas com auxílio de pistilo para a liberação do seu conteúdo e agitadas em vórtex para a homogeneização da amostra. Posteriormente, diluições seriadas (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) foram utilizadas para o plaqueamento e cultivo de bactérias em condições aeróbicas. Após a diluição, cada amostra foi agitada em vórtex e alíquotas de 50 µL foram plaqueadas em placas de Petri contendo os meios de cultura: Luria Bertani (LB) (Acumedia®), Nutriente

Agar (NA) (Acumedia®), MacConkey Agar (Acumedia®), TSA (Acumedia®), 20% TSA, Czapek Dox Agar (Fluka Analytical®), Nutriente Agar Alcalino (Atlas 2010), Amido Alcalino (Atlas 2010), ISP4 (Shirling & Gottlieb 1966), SM3 (Tan *et al.* 2006) e o meio para *Acetobacter diazotrophicus* Agar (Atlas 2010). As placas foram incubadas a 28°C por pelo menos 16 horas ou até o surgimento de colônias bacterianas.

As colônias obtidas foram categorizadas em função de suas características morfológicas (cor, tamanho, textura, brilho, formato e regularidade dos limites da colônia), sendo coletados três representantes de cada tipo morfológico em cada meio de cultivo para cada tecido amostrado. Após o isolamento de cada morfotipo, os isolados foram cultivados em meio líquido caldo triptona de soja (TSB) (HiMedia®) a 28°C, de 16 a 24 h, sob agitação constante (120 rpm), ou em meio líquido adequado ao seu cultivo. Após o crescimento, alíquotas das células cultivadas foram preservadas em 30% glicerol e depositadas na Coleção de Simbiontes de Insetos do Laboratório de Interações em Insetos, mantida a -20 e -80ºC.

2.2.3. Extração do DNA genômico e caracterização molecular dos simbiontes

A outra parte da alíquota das células bacterianas (1 mL) foi sedimentada via centrifugação (3.500 *g* x 5 min x 10ºC), sendo o sedimento obtido utilizado para a extração de DNA genômico pela adição de 400 µL do tampão de extração TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA, pH 8; 400 mM NaCl), 40 µL de 20% SDS e 8 µL de proteinase-K (20 mg/mL) às células sedimentadas. O material foi incubado a 55ºC por 1 h. Após este período, 300 µL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (5M NaCl) foram adicionados, a amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 s, centrifugada a 14.000 *g* (30 min a 25ºC) e o sobrenadante coletado. Um volume de isopropanol gelado foi adicionado ao sobrenadante e a amostra incubada a -20ºC *overnight* para a precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada (14.000 *g* x 30 min x 4ºC), o sobrenadante descartado, o sedimento de DNA lavado em banhos sucessivos de 100% (1×) e 70% (2×) etanol e centrifugado a 14.000 *g* por 5 min a 4ºC (Sunnucks & Hales 1996). Ao término das lavagens, o DNA sedimentado foi mantido à temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol, sendo, em seguida, ressuspenso em 20 µL de água deionizada estéril e armazenado a -20ºC até sua utilização. A integridade do DNA extraído foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a 0,8% (w/v), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 7,2) a 5 V/cm, e posterior visualização em transiluminador.

As amostras de DNA obtidas foram utilizadas para a amplificação do gene 16S do rRNA, empregando os iniciadores universais 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), posições 8 – 27 de *Escherichia coli*, e 1491R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), posições 1509 – 1491 de *E. coli* (Rivas *et al.* 2001). A reação de amplificação foi composta de tampão de reação (1×), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 mM de dNTP, 0,32 µM de cada iniciador, 0,5 U de Taq polimerase e 20 ng/µL de DNA genômico, em termociclador programado a 95ºC por 4 min (1 ciclo); 35 ciclos a 95ºC por 1 min, 55ºC por 1 min e 72ºC por 2 min; e extensão final a 72ºC por 10 min (1 ciclo). Os amplicons foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1%, nas mesmas condições de eletroforese descritas anteriormente.

As reações que produziram fragmento único de tamanho esperado (≈1.500 pb) foram submetidas à análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando as enzimas de restrição *Rsa*I, *Hinf*I, *Dde*I e *Eco*RI. Alíquotas de 3 µL de cada amplicon foram adicionadas ao tampão de reação específico para cada enzima (5,5 µL de água, 1 µL de tampão da enzima e 2 U da enzima), seguindo as instruções do fabricante. As reações foram colocadas em banho-maria a 37°C *overnight* e o padrão de restrição obtido foi visualizado em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O tamanho dos fragmentos de restrição foi estimado com auxílio do programa GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.), utilizando-se como padrão o marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

Amplicons de três isolados para cada padrão de digestão obtido foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao tratamento enzimático com 2 U de exonuclease e 1 U de fosfatase alcalina (ExoSap, Promega), adicionadas a 8 µL da reação de PCR. As amostras foram mantidas a 37°C por 30 min e posteriormente submetidas a 80°C por 15 min para a inativação das enzimas. Em seguida, os amplicons foram enviados para sequenciamento unidirecional junto ao Centro de Biotecnologia Agrícola – CEBTEC/USP, utilizando-se um dos iniciadores originalmente utilizado na reação de amplificação. Os sequenciamentos obtidos (cerca de 650 nt) foram visualizados e editados no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza). Apenas um dos amplicons de cada um dos padrões enzimáticos foi posteriormente submetido ao sequenciamento bidirecional, exceto para aqueles em que dissimilaridades foram observadas no primeiro sequenciamento, para posterior identificação putativa e análise do posicionamento filogenético dos mesmos. Após sequenciamento completo do amplicon do 16S rDNA obtido, as sequências foram submetidas ao alinhamento par-a-par no programa MEGA v6.06 (Tamura *et al.* 2013), e sequências que apresentavam até

2% de dissimilaridade foram agrupadas, sendo selecionada apenas uma das sequências como representante de cada grupo.

2.2.4. Identificação putativa e análise filogenética

Os eletroferogramas obtidos com o sequenciamento das diferentes amostras foram editados manualmente utilizando o programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza) e as sequências senso e antissenso montadas com auxílio da ferramenta BLAST. As sequências completas (≈1.500 pb) foram utilizadas na busca por sequências-tipo similares junto ao banco de dados do EzTaxon-e (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) (Kim *et al.* 2012) e, em seguida, alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa MEGA v6.06 (Tamura *et al.* 2013), utilizando como parâmetros de penalidade de *gap* = 15 e de extensão de *gap* = 9. Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se o método calculado pelo algoritmo de *Neighbor-Joining*, com o modelo de distância Kimura-2 parâmetros, com 1.000 iterações.

2.3. Resultados

A análise morfológica dos isolados obtidos em 11 meios de cultivo levou à seleção de 275 morfotipos associados a *E. heros*, sendo a região V4 do intestino médio de fêmeas e machos aquelas que resultaram no maior número de morfotipos (Figura 2.1 a). Porém, a análise de RFLP e o sequenciamento parcial do fragmento do gene de 16S do rRNA levou à identificação de 117 unidades taxonômicas operacionais (UTOs) (Tabela 2.1 b). O sequenciamento completo do amplicon do 16S do rDNA obtido para as 117 UTOs resultou na identificação de 12 filotipos, sendo sete deles associados à região V4 do intestino médio de fêmeas e de machos, cinco à espermateca, três aos ovários e dois à vesícula seminal.

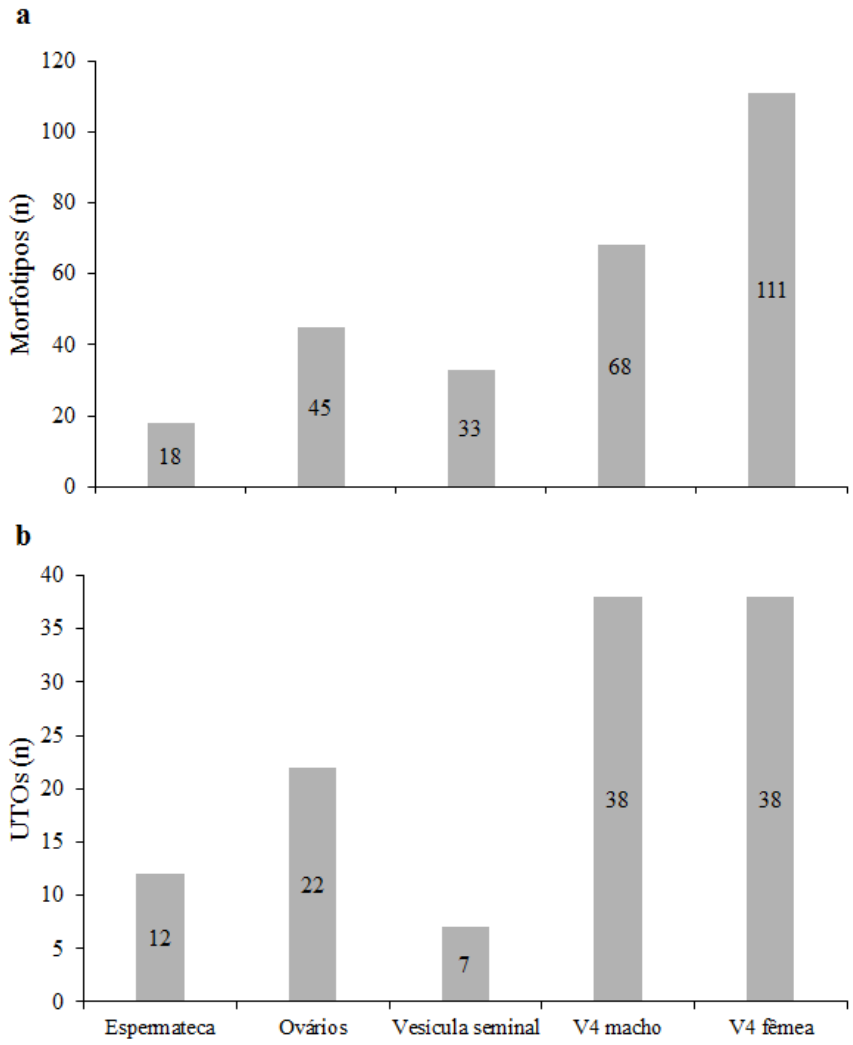

Figura 2.1. Número de morfotipos (a) e unidades taxonômicas operacionais (UTOs) (b) de simbiontes cultiváveis associados aos tecidos digestivos e reprodutivos de *Euschistus heros*.

Tabela 2.1. Identificação putativa de simbiontes cultiváveis isolados de estruturas digestivas e reprodutivas de *Euschistus heros* após análise heurística de similaridade das sequências do gene 16S rDNA (≈1.500 pb) àquelas depositadas no banco de dados do EzTaxon-e.

Isolado	im	vs	if	ov	es*	Correspondente mais próximo	Nº acesso	Similaridade (%)	Classe	Filo
LII-WS-Eh12a						*Yokenella regensburgei*	JMPS01000045	99,64		
LII-WS-Eh24a						*Yokenella regensburgei*	JMPS01000045	99,64		
LII-WS-Eh87b						*Yokenella regensburgei*	JMPS01000045	99,63		
LII-WS-Eh90b						*Yokenella regensburgei*	JMPS01000045	93,00		
LII-WS-Eh94b						*Yokenella regensburgei*	JMPS01000045	97,97		
LII-WS-Eh19a						*Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*	AB061685	99,86		
LII-WS-Eh36a						*Serratia marcescens* subsp. *marcescens*	JMPQ01000005	99,35		
LII-WS-Eh76a						*Enterococcus faecalis*	ASDA01000001	99,36		
LII-WS-Eh17a						*Enterococcus faecalis*	ASDA01000001	99,72		
LII-WS-Eh88b						*Enterococcus gilvus*	AJDQ01000009	97,85		
LII-WS-Eh91c						*Staphylococcus sciuri*	AJ421446	99,57		
LII-WS-Eh97b						*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*	AP008934	96,97		

*Tecido: (im) intestino macho; (vs) vesícula seminal; (if) intestino fêmea; (ov) ovários; (es) espermateca.

A análise das sequências permitiram a identificação de filotipos representantes de *Firmicutes* (5) e *Proteobacteria* (7). *Firmicutes* foi representado por duas famílias, *Enterococcaceae* e *Staphylococcaceae*, ambas pertencentes a Classe *Bacilli*. Em *Proteobacteria*, a Classe *γ-Proteobacteria* foi a única encontrada, sendo representada exclusivamente por *Enterobacteriaceae* (Tabela 2.1). Três dos sete filotipos de *Enterobacteriaceae* apresentaram similaridade superior a 99,3% a *Yokenella regensburgei* e dois a *Serratia marcescens*. Por outro lado, dois outros filotipos apresentaram similaridade reduzida ao representante mais próximo do banco de dados, com cerca de 97,9% (LII-WS-Eh94b) e 93,0% (LII-WS-Eh90b) de similaridade, indicando a existência de duas unidades taxonômicas ainda desconhecidas (Tabela 2.1). Três dos cinco filotipos de *Firmicutes* apresentaram similaridade superior a 99,3% em relação às sequências-tipo mais próximas, deixando pouca dúvida em relação à sua identificação putativa, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus sciuri* (Tabela 2.1). Porém, dois deles, LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh97b, apresentam dissimilaridade que garantem seu posicionamento como novas entidades taxonômicas (Tabela 2.1, Figura 2.2).

A maioria dos filotipos obtidos foram associados exclusivamente a um ou poucos tecidos, sendo o filotipo LII-WS-Eh24a o único a ocorrer em todos os tecidos analisados de machos e fêmeas de *E. heros*. Por outro lado, os filotipos LII-WS-Eh90b e LII-WS-Eh19a ocorreram exclusivamente associados à região V4 do intestino de machos e de fêmeas, respectivamente, sendo os filotipos LII-WS-Eh12a e LII-WS-Eh36a comuns apenas ao V4, independentemente do sexo do indivíduo (Tabela 2.1). Os filotipos LII-WS-Eh94b, LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh97b foram associados exclusivamente às estruturas reprodutivas de fêmeas de *E. heros*, sendo os dois primeiros associados unicamente à espermateca e o último ao ovário (Tabela 2.1). Mas o ovário e a espermateca também foram associados a simbiontes que ocorreram simultaneamente na região V4 do intestino de *E. heros*, como os filotipos LII-WS-Eh17a (ovário) e LII-WS-Eh87b (espermateca). A vesícula seminal de machos também foi associada a um filotipo comum à região V4 do intestino de machos de *E. heros* (LII-WS-Eh91c) (Tabela 2.1).

A árvore filogenética construída com os filotipos selecionados e as sequências de linhagens-tipo mais próximas permitiu verificar que a maior parte dos isolados resultaram em ramos isolados das linhagens-tipo mais próximas, formando clados distintos e com alto valor de suporte de bootstrap (Figura 2.2). Entre as *Enterobacteriaceae*, todos os filotipos que apresentaram *Y. regensburgei* como representante mais próximo resultaram em um mesmo clado com essa bactéria, mas todos em subclados e ramos distintos com valores significativos

de bootstrap, indicando o posicionamento sistemático dessas diferentes unidades taxonômicas. O mesmo ocorreu para os filotipos próximos a *Serratia* (Figura 2.2). Entre *Enterobacteriaceae*, as mais divergentes foram LII-WS-Eh90b e LII-WS-Eh94b, seguidas por LII-WS-Eh12a, as quais foram associadas exclusivamente ao intestino de machos, espermateca e região final do intestino médio (região V4), respectivamente, tendo como relativo mais próximo bactérias do gênero *Yokenella* (Figura 2.2).

O filotipo LII-WS-Eh88b pertencente a *Enterococcaceae*, também de ocorrência exclusiva na espermateca de *E. heros*, resultou em subclado junto a *Enterococcus raffinosus*, mas a divergência do 16S do rDNA e o comprimento do ramo indicam se tratar de entidade taxonômica distinta de seu relativo mais próximo (Figura 2.2). A *Enterococcaceae* LII-WS-Eh17a, mesmo compartilhando 99,7% de similaridade do fragmento do 16S do rDNA analisado com seu relativo mais próximo, resultou em clado mais externo ao posicionamento de *Enterococcus faecalis*, que se colocou em subclado conjuntamente com o filotipo LII-WS-Eh76a, com alto valor de bootstrap (Figura 2.2). A análise filogenética também indicou que o filotipo LII-WS-Eh97b pertencente a *Staphylococcaceae* se sustenta como entidade taxonômica distinta de seu relativo mais próximo, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, assim como indicado pelo comprimento do ramo ao qual está associado (Figura 2.2).

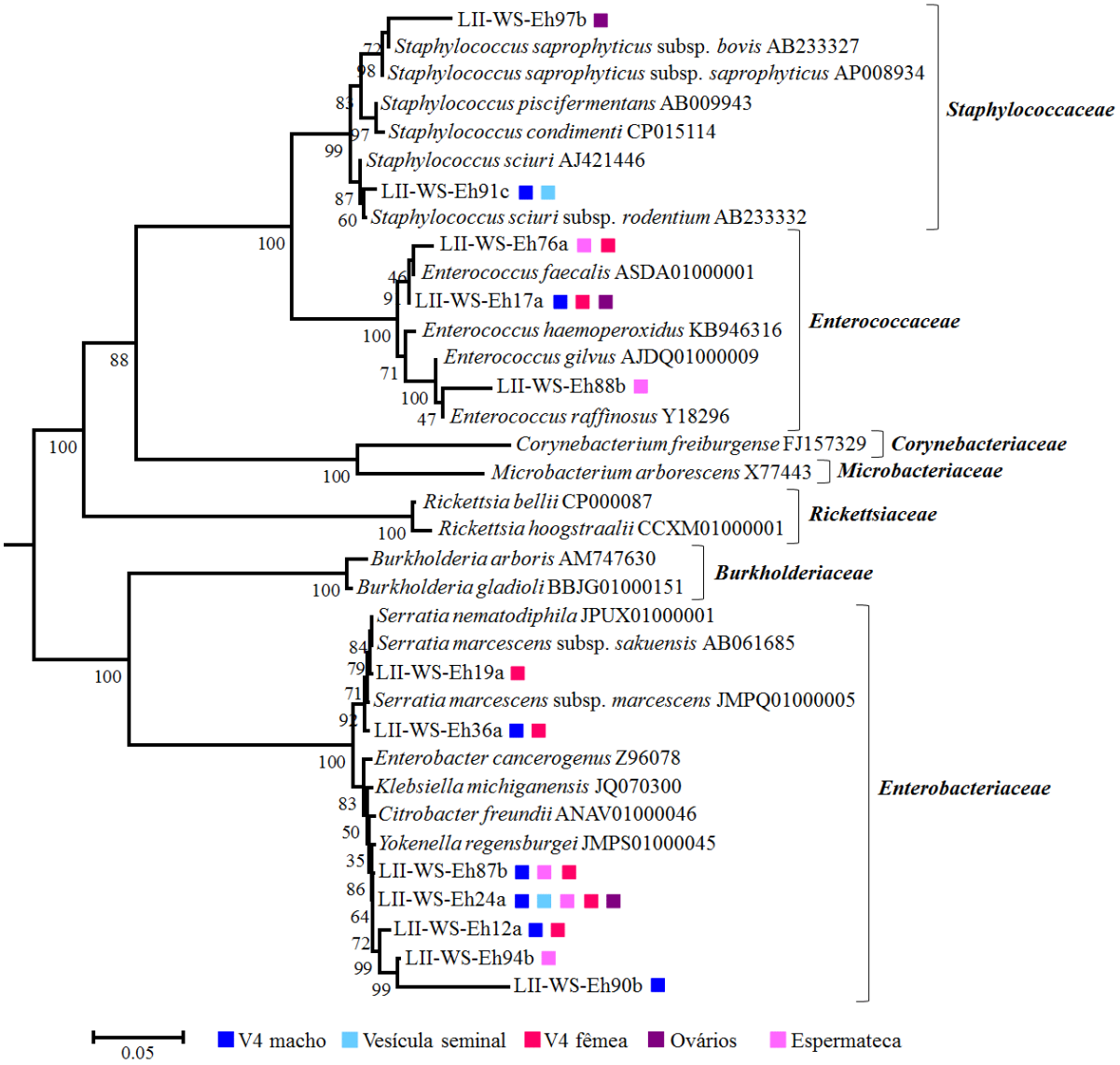

Figura 2.2. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene 16S rDNA (≈1.500 pb) obtidas da região V4 do intestino médio de machos e fêmeas, espermateca e ovários de fêmeas e vesícula seminal de machos de *Euschistus heros*. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de bootstrap. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo.

2.1. Discussão

O uso de meios de cultivo para o isolamento de endossimbiontes associados à região V4 do intestino, ao ovário, espermateca e vesícula seminal de adultos de *E. heros* resultou na identificação de 12 filotipos, quatro deles se posicionando como entidades taxonômicas novas na análise filogenética realizada. Embora tenha-se utilizado 11 meios de cultura visando atender às exigências nutricionais de diferentes grupos de bactérias, há exigências específicas em relação ao meio de cultivo, sejam elas relacionadas à nutrientes específicos, condições de

pH, temperatura de incubação ou níveis de oxigênio, que impedem o cultivo bem sucedido da maioria dos microrganismos (Olivier-Espejel *et al.* 2011; Stewart 2012). Mesmo reconhecendo que os métodos de cultivo, como forma de estudo da diversidade microbiana associada a determinado ambiente subestima a diversidade real, é somente através do isolamento de bactérias que se pode caracterizar propriedades fisiológicas e o potencial de patogenicidade desses simbiontes (Vartoukian *et al.* 2010).

Percevejos, em geral, possuem relações de mutualismo com diversas bactérias simbiontes (Kikuchi *et al.* 2008). A região V4 do intestino médio de *E. heros* apresentou a maior diversidade de filotipos cultiváveis obtidos, com espécies representando os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Essas associações são comuns para indivíduos da infraordem Pentatomomorpha, nos quais endossimbiontes se localizam no lúmen das criptas, a parte final do intestino médio (Kikuchi *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 2009; Kuechler *et al.* 2012).

Grande parte dos filotipos obtidos pertence a diferentes linhagens de *γ-Proteobacteria*, assim como ocorre em espécies de percevejos das famílias Acanthosomatidae, Cydnidae, Parastrachiidae, Plataspidae, Scutelleridae e Urostylididae, entre outros pentatomídeos (Bansal *et al.* 2014; Bistolas *et al.* 2014; Hosokawa *et al.* 2012; Hosokawa *et al.* 2006; Kaiwa *et al.* 2014; Prado & Almeida 2009).

Os endossimbiontes também podem ser importantes mediadores de interações indiretas que auxiliam no uso de plantas como fonte de alimento, seja ajudando na detoxificação de compostos secundários ou proporcionando nutrientes carentes nessa fonte de alimento, como acontece com o percevejo *Megacopta punctatissima* (Hemiptera: Plataspidae) e seu simbionte intestinal *Ishikawaella* (*γ-Proteobacteria*) (Brown *et al.* 2014). A ocorrência exclusiva de simbiontes no intestino sugere a existência de mecanismo de transmissão desse simbionte entre gerações do hospedeiro que venham a garantir a fixação dessa associação ao hospedeiro. A transmissão vertical está entre os processos mais importantes para a manutenção de associações hospedeiro-simbionte, seja ela decorrente da deposição do simbionte externamente junto aos ovos para aquisição direta pelos imaturos recém-eclodidos (Fukatsu & Hosokawa 2002; Hosokawa *et al.* 2005; Hosokawa *et al.* 2008; Kaiwa *et al.* 2014) ou transferência aos tecidos reprodutivos e células germinativas do hospedeiro (Fukatsu & Nikoh 2000; Hosokawa *et al.* 2010b; Miura *et al.* 2003).

Yokenella regensburgei, o filotipo mais abundante obtido neste estudo, já foi identificado como patógeno humano oportunista, mas, de importância clínica pouco clara, sendo a única espécie do gênero *Yokenella* dentro da família *Enterobacteriaceae* (Lo *et al.* 2011; Stock *et al.* 2004). Em insetos, isolados de *Y. regensburgei* foram relatados pela

primeira vez em amostras de intestino de *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera, Pyrrhocoridae) (Kosako *et al.* 1984), mostrando que a ocorrência em percevejos é de longa data.

Em *E. heros* foram encontrados dois filotipos associados ao intestino e que são relacionados ao gênero *Serratia*. Bactérias deste gênero, quando associadas aos insetos podem se comportar como patógenos ou como simbiontes (Petersen & Tisa 2013). Em pulgões *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae), o simbionte facultativo *S. symbiotica* é transmitido verticalmente e fornece defesa contra o estresse térmico ambiental (Montllor *et al.* 2002). O afídeo *Cinara cedri* Min. (Homoptera: Lachnidae) é infectado por *S. symbiotica* que está na transição para se tornar um simbionte primário (Lamelas *et al.* 2011). Mais recentemente, verificou-se *S. marcescens* modulando o perfil dos terpenoides, importante mecanismo de defesa contra herbívoros, da planta hospedeira, permitindo a herbivoria de *Chrysolina herbacea* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Pizzolante *et al.* 2017). Em alguns casos, estirpes de *Serratia* podem ser altamente virulentas, por exemplo, matando larvas de dípteros em 2-3 dias com sintomas semelhantes a uma infecção por vírus (Lysyk *et al.* 2002), e reduzindo a longevidade dos adultos (Patil *et al.* 2011). Esse potencial inseticida apresentado por *Serratia* também foi encontrado em lepidópteros, como a traça (Jeong *et al.* 2010; Kim *et al.* 2009; Patil *et al.* 2012). Bactérias do gênero *Serratia* apresentam elevada atividade enzimática de quitinases e proteases, o que tem sido associado à toxicidade e supressão do sistema imune do inseto (Kim *et al.* 2009). Estudos com foco na infecção intestinal em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), identificaram proteases de *S. marcescens* atacando células do epitélio do intestino, destruindo proteínas relacionadas à imunidade, mas não com efeito citotóxico contra os hemócitos (Nehme *et al.* 2007; Tao *et al.* 2006). As quitinases de *Serratia marcescens* são patogênicas ao ácaro parasita de abelhas (Tu *et al.* 2010).

Enterococcus e *Staphylococcus* são consideradas bactérias generalistas, estando presentes em outros pentatomídeos, como *Nezara viridula* (Hirose *et al*. 2006), além de lepidópteros (Tang *et al.* 2012; Vilanova *et al.* 2016; Visôtto *et al.* 2009), isópteros (Tholen *et al.* 1997) e dípteros (Geiger *et al.* 2009). *E. casseliflavus* foi recentemente isolada de S*podoptera litura*, praga altamente polífaga (Thakur *et al.* 2015), e de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), espécie especialista que se alimenta de solanáceas tóxicas (Brinkmann *et al.* 2008). Em particular, *E. casseliflavus* quando associada a larvas de *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) forma um biofilme para cristalizar terpenos tóxicos, como carotenos, encontrados na planta da qual se alimenta, enquanto as larvas que não desenvolveram o biofilme apresentaram elevada mortalidade (Shao *et al.* 2011). Isolados

de *E. mundtii* produzem antimicrobianos, podendo contribuir na defesa do insetos hospedeiro (Chen *et al.* 2016; van Frankenhuyzen *et al.* 2010). Assim, a microbiota intestinal característica encontrada em *E. heros* pode proporcionar vários benefícios, desde a suplementação de nutrientes até a defesa do hospedeiro.

Existem muitos estudos que mostram o isolamento de espécies de *Staphylococcus* associadas ao trato digestivo de diferentes espécies de insetos, como os afídeos (Ali & Demirba 2012), lepidópteros (Ince *et al.* 2008; Osborn *et al.* 2002; Yu *et al.* 2008), coleópteros (Demirci *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2004) e dípteros (Kuzina *et al.* 2001). Entretanto, embora seja considerado um patógeno humano comum, não há evidência de que sejam patógenos de insetos (Butler *et al.* 2010; Demirci *et al.* 2013; Harada *et al.* 1996).

Simbiontes facultativos podem assumir interações patogênicas com seus hospedeiros, como aqueles que induzem doenças sexualmente transmissíveis. Estas são comuns em insetos, sendo que a maioria tem efeitos negativos sobre o hospedeiro, ocasionando a redução da fecundidade e da fertilidade, além do aumento na mortalidade. Estima-se que a prevalência de DSTs nas populações hospedeiras seja superior a 90% (Knell & Webberley 2004). Neste estudo, *E. heros* apresentou baixa diversidade de simbiontes cultiváveis associados aos tecidos reprodutivos, sendo poucos de ocorrência exclusiva. Ainda, um simbionte em particular tem se destacado como potencial patógeno do aparelho reprodutor de *E. heros*, o LII-WS-Eh24a. Embora a literatura sobre esse tema ainda seja incipiente e sejam necessários estudos mais detalhados sobre essa bactéria, é possível que ao defecar, as bactérias presentes no trato digestivo de *E. heros* possam entrar em contato com a genitália dos insetos e assim, ganhar acesso aos tecidos reprodutivos, visto que aparelho digestivo e reprodutivo estão morfologicamente muito próximos.

Algumas espécies de percevejos apresentam associações com *β-Proteobacteria*, formando clados específicos com bactérias do gênero *Burkholderia*, um importante simbionte localizado nas criptas do intestino médio, o qual foi demonstrado auxiliar na degradação de inseticidas (Kikuchi *et al.* 2012). Embora *Burkholderia* seja adquirida horizontalmente a partir do ambiente a cada geração, esse gênero não foi constatado neste estudo. Esse fato pode ser atribuído a capacidade dos insetos em selecionar espécies ou linhagens de simbiontes internamente, como acontece com o percevejo *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae), que possui uma região de constrição no intestino para selecionar os endossimbiontes a ele associados (Ohbayashi *et al.* 2015). Esse órgão pode desempenhar um importante papel no estabelecimento de microrganismos simbiontes e pode estar associado ao baixo número de filotipos obtidos para essa região.

Neste estudo não foram identificadas actinobactérias em nenhum dos tecidos amostrados. Actinobactérias são conhecidas por habitar o trato digestivo de vários insetos, incluindo diversas espécies de Pentatomidae, os quais apresentam grande diversidade de actinobactérias no lúmen intestinal (Zucchi *et al.* 2012). O papel desses simbiontes geralmente está associado à produção de enzimas para auxiliar na digestão de alimentos do hospedeiro (Arango 2016; Bignell 2016), síntese de nutrientes (Salem *et al.* 2013) e produção de metabólitos bioativos que podem atuar na proteção do hospedeiro contra bactérias patogênicas (Kaltenpoth 2009; Zhang *et al.* 2016).

2.2. Conclusão

A região V4 do intestino médio de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) é a mais diversa em endossimbiontes cultiváveis entre as estruturas avaliadas;

Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*) e *Firmicutes* (*Enterococcaceae* e *Staphylococcaceae*) foram os únicos representantes cultiváveis associados à região V4 do intestino médio, ovário, espermateca e vesícula seminal de *E. heros*;

Foram encontrados filotipos exclusivamente associados aos ovários (LII-WS-Eh97b), espermateca (LII-WS-Eh88b e LII-WS-Eh94b) e região V4 do intestino de machos (LII-WS-Eh90b) e de fêmeas (LII-WS-Eh19a), exceto na vesícula seminal.

Referências

Ali S, Demirba Z (2012) A novel cry2Ab gene from the indigenous isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 133-140.

Arango RA (2016) Evaluating the role of gut-associated *Actinobacteria* in wood-feeding subterranean termites (Rhinotermitidae: *Reticulitermes* spp.). The University of Wisconsin-Madison. Thesis. 124 p.

Atlas RM (2010) *Handbook of microbiological media*. CRC press.

Bansal R, Michel AP, Sabree ZL (2014) The crypt-dwelling primary bacterial symbiont of the polyphagous pentatomid pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* **43**, 617-625.

Bignell DE (2016) The role of symbionts in the evolution of termites and their rise to ecological dominance in the tropics. In: *The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts* **2**, 121-172. Springer.

Bistolas KS, Sakamoto RI, Fernandes JA, Goffredi SK (2014) Symbiont polyphyly, co-evolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. *Frontiers in Microbiology* **5**, 349.

Bright M, Bulgheresi S (2010) A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 218-230.

Brinkmann N, Martens R, Tebbe CC (2008) Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 7189-7196.

Brown A, Huynh LY, Bolender CM, Nelson KG, McCutcheon JP (2014) Population genomics of a symbiont in the early stages of a pest invasion. *Molecular Ecology* **23**, 1516-1530.

Butler JF, Garcia-Maruniak A, Meek F, Maruniak JE (2010) Wild Florida house flies (*Musca domestica*) as carriers of pathogenic bacteria. *Florida Entomologist* **93**, 218-223.

Chen B, Teh B-S, Sun C, *et al.* (2016) Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports* **6**, 1-14.

Demirci M, Sevim E, Demir İ, Sevim A (2013) Culturable bacterial microbiota of *Plagiodera versicolora* (L.)(Coleoptera: Chrysomelidae) and virulence of the isolated strains. *Folia Microbiologica* **58**, 201-210.

Douglas AE (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* **23**, 38-47.

Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental* Microbiology 68, 389-396.

Fukatsu T, Nikoh N (2000) Endosymbiotic Microbiota of the Bamboo PseudococcidAntonina crawii (Insecta, Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 643-650.

Geiger A, Fardeau M-L, Grebaut P, *et al.* (2009) First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1364-1370.

Harada H, Oyaizu H, Ishikawa H (1996) A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora. *The Journal of General and Applied Microbiology* **42**, 17-26.

Henry TJ (2009) Biodiversity of Heteroptera. Insect Biodiversity, Science and Society 1, 223-263.

Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ, Aldrich JR (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 91-95.

Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, *et al.* (2016) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nature Microbiology* **1**, 15011.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Fukatsu T (2012) Polyphyly of gut symbionts in stinkbugs of the family Cydnidae. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4758-4761.

Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng X-Y, Fukatsu T (2010b) Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 769-774.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, *et al.* (2010a) Phylogenetic position and peculiar genetic traits of a midgut bacterial symbiont of the stinkbug *Parastrachia japonensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 4130-4135.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Shimada M, Fukatsu T (2008) Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biology Letters* **4**, 45-48.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol* **4**, 1841-1851.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T (2005) The making of symbiont capsule in the plataspid stinkbug *Megacopta punctatissima*. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 471-477.

Ince IA, Katı H, Yilmaz H, Demir I, Demirbağ Z (2008) Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 3005-3015.

Jeong HU, Mun HY, Oh HK, *et al.* (2010) Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia* sp. EML-SE1 against *Diamondback moth*. *The Journal of Microbiology* **48**, 541-545.

Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2014) Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Current Biology* **24**, 2465-2470.

Kaiwa N, Hosokawa T, Kikuchi Y, *et al.* (2011) Bacterial symbionts of the giant jewel stinkbug *Eucorysses grandis* (Hemiptera: Scutelleridae). *Zoological Science* **28**, 169-174.

Kaltenpoth M (2009) *Actinobacteria* as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology* **17**, 529-535.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, *et al.* (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8618-8622.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2011) An ancient but promiscuous host–symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Journal* **5**, 446-460.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *Bmc Biology* **7**, 2.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2008) Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. *Microbial Ecology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers 39-63.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2007) Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4308-4316.

Kikuchi Y, Meng X-Y, Fukatsu T (2005) Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocorisa chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4035-4043.

Kim O-S, Cho Y-J, Lee K, *et al.* (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 716-721.

Kim Y, Kim K, Seo J, *et al.* (2009) Identification of an entomopathogenic bacterium, *Serratia* sp. ANU101, and its hemolytic activity. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 314-322.

Klepzig KD, Adams A, Handelsman J, Raffa K (2009) Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology* **38**, 67-77.

Knell RJ, Webberley KM (2004) Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews* **79**, 557-581.

Kosako Y, Sakazaki R, Yoshizaki E (1984) *Yokenella regensburgei* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family *Enterobacteriaceae*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **37**, 117-124.

Kuechler SM, Renz P, Dettner K, Kehl S (2012) Diversity of symbiotic organs and bacterial endosymbionts of lygaeoid bugs of the families Blissidae and Lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeoidea). *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 2648-2659.

Kuzina LV, Peloquin JJ, Vacek DC, Miller TA (2001) Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology* **42**, 290-294.

Lamelas A, Gosalbes MJ, Manzano-Marín A, *et al.* (2011) *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet* **7**, 1-11.

Lo Y-C, Chuang Y-W, Lin Y-H (2011) *Yokenella regensburgei* in an immunocompromised host: a case report and review of the literature. *Infection* **39**, 485.

Lysyk T, Kalischuk-Tymensen L, Selinger L (2002) Comparsion of selected growth media for culturing *Serratia marcescens*, *Aeromonas* sp., and *Pseudomonas aeruginosa* as pathogens of adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* **39**, 89-98.

Mann RS, Pelz-Stelinski K, Hermann SL, Tiwari S, Stelinski LL (2011) Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS One* **6**, 1-8.

Miest TS, Bloch-Qazi MC (2008) Sick of mating: sexual transmission of a pathogenic bacterium in *Drosophila melanogaster*. *Fly* **2**, 215-219.

Miura T, Braendle C, Shingleton A, *et al.* (2003) A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid Acyrthosiphon pisum (Hemiptera: Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **295**, 59-81.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-195.

Moran NA, Dunbar HE (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12803-12806.

Nehme NT, Liégeois S, Kele B, *et al.* (2007) A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* **3**, 1694-1709.

Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, *et al.* (2015) Insect's intestinal organ for symbiont sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E5179-E5188.

Olivier-Espejel S, Sabree ZL, Noge K, Becerra JX (2011) Gut microbiota in nymph and adults of the giant mesquite bug (*Thasus neocalifornicus*) (Heteroptera: Coreidae) is dominated by *Burkholderia* acquired de novo every generation. *Environmental Entomology* **40**, 1102-1110.

Osborn F, Berlioz L, Vitelli-Flores J, *et al.* (2002) Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of invertebrate pathology* **80**, 7-12.

Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB (2012) Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research* **110**, 1841-1847.

Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB (2011) Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research* **109**, 1179-1187.

Petersen LM, Tisa LS (2013) Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian Journal of Microbiology* **59**, 627-640.

Pizzolante G, Cordero C, Tredici SM, *et al.* (2017) Cultivable gut bacteria provide a pathway for adaptation of *Chrysolina herbacea* to *Mentha aquatica* volatiles. *BMC Plant Biology* **17**, 30.

Prado SS, Almeida RP (2009) Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. *Current Microbiology* **58**, 64-69.

Rivas R, Velázquez E, Valverde A, Mateos PF, Martínez-Molina E (2001) A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* **22**, 1086-1089.

Salem H, Kreutzer E, Sudakaran S, Kaltenpoth M (2013) *Actinobacteria* as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental Microbiology* **15**, 1956-1968.

Shao Y, Spiteller D, Tang X, *et al.* (2011) Crystallization of α-and β-carotene in the foregut of *Spodoptera* larvae feeding on a toxic food plant. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 273-281.

Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **16**, 313-340.

Soria M, Degrande P, Panizzi A, Toews M (2016) Economic injury level of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) on cotton plants. *Neotropical Entomology* **46**, 1-12.

Stewart EJ (2012) Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology* **194**, 4151-4160.

Stock I, Sherwood KJ, Wiedemann B (2004) Antimicrobial susceptibility patterns, β-lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **48**, 5-15.

Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M (2017) Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology* **25**, 375-390.

Sunnucks P, Hales DF (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution* **13**, 510-524.

Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, *et al.* (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* **46**, 483.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.

Tan GYA, Ward AC, Goodfellow M (2006) Exploration of Amycolatopsis diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 557-569.

Tang X, Freitak D, Vogel H, *et al.* (2012) Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PloS one* **7**, 1-9.

Tao K, Long Z, Liu K, Tao Y, Liu S (2006) Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. *Current Microbiology* **52**, 45-49.

Taylor CM, Coffey PL, DeLay BD, Dively GP (2014) The importance of gut symbionts in the development of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål). *PLoS One* **9**, 1-9.

Thakur A, Dhammi P, Saini HS, Kaur S (2015) Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* **127**, 38-46.

Tholen A, Schink B, Brune A (1997) The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* **24**, 137-149.

Tu S, Qiu X, Cao L, *et al.* (2010) Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* **104**, 75-82.

van Frankenhuyzen K, Liu Y, Tonon A (2010) Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 124-131.

Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG (2010) Strategies for culture of ‘unculturable’bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **309**, 1-7.

Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M (2016) The Generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1-8.

Visôtto L, Oliveira M, Ribon A, Mares-Guia T, Guedes R (2009) Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental entomology* **38**, 1078-1085.

Yu H, Wang Z, Liu L, *et al.* (2008) Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current microbiology* **56**, 391-396.

Zhang X, Gao Z, Zhang M, *et al.* (2016) Analysis of endophytic actinobacteria species diversity in the stem of *Gynura cusimbua* by 16S rRNA gene clone library. *Microbiology* **85**, 379-385.

Zhang W, He Z, Deng X, Yin Y (2004) Variety and distribution of intestinal flora of *Apriona germari* larvae. *Journal Southwest Agricutural University (Natural Science Edition)* **26**, 169-172.

Zucchi TD, Prado SS, Cônsoli FL (2012) The gastric caeca of pentatomids as a house for actinomycetes. *BMC Microbiology* **12**, 101-108.

Woodward T (1949) The internal male reproductive organs in the genus *Nabis latreille* (Nabidae: Hemiptera-Heteroptera). *Physiological Entomology* **24**, 111-118.

3. ANÁLISE METAGENÔMICA DA DIVERSIDADE DE SIMBIONTES ASSOCIADOS AO INTESTINO MÉDIO DE *Euschistus heros*

Resumo

Percevejos abrigam bactérias simbiontes extracelulares em seu intestino médio, particularmente nas criptas da região posterior do intestino médio (região V4). Relatos da literatura indicam que esses simbiontes pertencem a Classe *γ-Proteobacteria* das *Enterobacteriaceae* e estão associados a diversas famílias de Hemiptera-Heteroptera, inclusive Pentatomidae. Entretanto, a diversidade e abundância da microbiota associada a outras regiões do intestino médio são desconhecidas, assim como alterações na microbiota intestinal da fase imatura e adulta ou a associação precoce de bactérias intestinais ainda na fase embrionária. Análises comparativas da microbiota associada a embriões e tecidos da fase imatura e adulta poderiam auxiliar no esclarecimento quanto à prevalência e o modo de transmissão dessas bactérias. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar a diversidade da microbiota intestinal associada a embriões, ninfas de último ínstar e adultos de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidade), via análises de metagenômica. A microbiota de *E. heros* foi analisada após amplificação da região V4 do gene do 16S do RNA ribossomal utilizando iniciadores específicos e sequenciamento de nova geração em plataforma Illumina MiSeq. O sequenciamento rendeu 4.712.587 leituras, com aproximadamente 253 pb, que produziu 833 UTOs distribuídas em 17 filos, 28 classes, 54 ordens, 94 famílias e 163 gêneros. O embrião apresentou a microbiota mais diversa, enquanto as regiões V1 e V2 foram as mais diversas entre as porções do intestino médio de ninfas e adultos de *E. heros* analisadas. A microbiota da região V4 do intestino médio foi dominada por uma UTO não-cultivável e desconhecida de *Enterobacteriaceae*. Essa mesma UTO também foi identificada associada ao embrião desse percevejo, indicando a sua provável transmissão transovariana. Amplificações subsequentes com iniciadores específicos para essa bactéria visando à extensão do fragmento do 16S do rDNA, permitiu caracterizar essa UTO como sendo próxima a *Erwinia amylovvora*.

Palavras-chave: Microbiota; Bioinformática; Abundância relativa; Similaridade

Abstract

Stinkbugs harbor extracellular bacterial symbionts in the crypts of the posterior end of their midgut. Reports in the literature indicate that these symbionts belong to *Enterobacteriaceae* (*γ-Proteobacteria*), and are associated with several families of Hemiptera-Heteroptera, including Pentatomidae. However, the diversity and abundance of the microbiota associated with other regions of the midgut of pentatomids are unknown, as well as composition of the microbiota at different stages of development. Thus, we aimed to determine the microbiota diversity with the embryo, last instar nymphs and adults of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). We performed comparative analyses of the

microbiota associated with embryos and different regions of the midgut (V1, V2, V3 and V4) of fifth instars and adults to obtain information on the prevalence of specific bacteria to different stages of development and different regions of the gut, and to get insights into mode of transmission of the bacteria associated with the gut. The microbiota of *E. heros* was analyzed after amplification of the V4 region of the 16S ribossomal RNA gene using specific primers and next-generation sequencing on the Illumina MiSeq platform. Illumina sequencing generated 4,712,587 readings, with approximately 253 bp, that produced 833 OTUs distributed in 17 phyla, 28 classes, 54 orders, 94 families and 163 genera. The embryo presented the most diverse microbiota. The V1 and V2 regions were the most diverse regions in the midgut of nymphs and adults of *E. heros*. The V4 region was dominated inhabited by an OTU belonging to an unindefied *Enterobacteriaceae*, which was also associated with the embryo of this insect, indicating its probable transovarian transmission. Additional amplification of the 16S rDNA from this OTU allowed the nearly full characterization of the 16S and putative identification of this OTU as a *Erwinia amylovvora*-like bacterium.

Keywords: Microbiota; Bioinformatics; Relative abundance; Similarity

3.1. Introdução

Insetos que dependem de fontes alimentares nutricionalmente limitadas, como a seiva de plantas, sangue de vertebrados e material lenhoso, por exemplo, possuem associações obrigatórias com microrganismos simbiontes benéficos alojados no lúmen do intestino médio, na hemocele ou em células denominadas bacteriócitos. Bacteriócitos podem estar organizados em um conjunto celular, formando um órgão específico, o bacterioma (Buchner 1965; Kikuchi 2009). Na ausência dessas bactérias, os insetos hospedeiros são incapazes de crescer, sobreviver ou de se reproduzir normalmente, pois os simbiontes são responsáveis pela suplementação nutricional do hospedeiro (Baumann 2005).

Geralmente, simbiontes obrigatórios não conseguem se multiplicar fora do hospedeiro em decorrência da adaptação ao seu ambiente interno, formando uma entidade biológica inseparável, constituindo um sistema íntimo e obrigatório de simbiose (Buchner 1965; Kikuchi 2009). Entretanto, bactérias simbiontes altamente especializadas são geralmente derivadas de bactérias de vida livre menos especializadas, facultativamente associadas a seus hospedeiros, e essa especialização é resultado de um longo processo de co-evolução com o hospedeiro, sendo a origem e os mecanismos implícitos às associações obrigatórias hospedeiro-simbionte importantes para estudos de ecologia e evolução (Hosokawa *et al.* 2006; Rio *et al.* 2004).

Entre as diferentes ordens de insetos, os hemípteros desenvolveram associações diferenciadas com bactérias simbiontes, tendo em vista que a maior parte destes insetos se alimentam de dietas com baixo valor nutricional. Percevejos fitófagos abrigam bactérias no lúmen da porção posterior do intestino médio (V4). Esta região é diferenciada morfologicamente das demais, apresentando inúmeras criptas que são colonizadas por bactérias de vida livre (Kikuchi *et al.* 2008, 2011). Estas bactérias são transmitidas verticalmente para a prole pela contaminação da superfície do ovo (Hosokawa *et al.* 2012a) e por coprofagia, particularmente pela deposição de cápsulas fecais junto às posturas (Fukatsu & Hosokawa 2002). Quando os simbiontes associados à essa região são eliminados, os percevejos apresentam crescimento retardado, mortalidade ninfal elevada e anormalidades morfológicas, indicando a importância biológica dessas bactérias (Bistolas *et al.* 2014; Hosokawa *et al.* 2013; Hosokawa *et al.* 2016; Kaiwa *et al.* 2014; Kikuchi *et al.* 2007; Taylor *et al.* 2014).

Estudos filogenéticos mostram a predominância de *γ-Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*) na superfamília de percevejos Pentatomoidea, *Actinobacteria* em Pyrrhocoroidea, e *Burkholderia*, uma *β-Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*), em Coreoidea e Lygaeoidea (Kaltenpoth *et al.* 2009; Kikuchi 2009; Kikuchi *et al.* 2011). No entanto, os padrões co-evolutivos das relações hospedeiro-simbionte são diferentes. Em Plataspidae, Acanthosomatidae e Urostylididae, a filogenia dos simbiontes reflete a filogenia do hospedeiro e o genoma dos simbiontes associados a esses percevejos são drasticamente reduzidos para menos de 1 Mb, indicando co-especiação estável e evolução genômica degenerativa baseada na transmissão vertical do simbionte durante o processo evolutivo (Hosokawa *et al.* 2006; Kaiwa *et al.* 2014; Kikuchi *et al.* 2009). Em Pentatomidae e Cydnidae, a filogenia dos simbiontes não segue a filogenia do hospedeiro, e o genoma dos simbiontes não apresenta redução de tamanho, sugerindo associações hospedeiro-simbiontes recentes devido a aquisições do ambiente, transferências horizontais ou substituições dos simbiontes (Bistolas *et al.* 2014; Hosokawa *et al.* 2013; Hosokawa *et al.* 2016).

Estudos recentes revelaram que todas as bactérias associadas à região V4 de pentatomídeos são da família *Enterobacteriaceae* (*γ-Proteobacteria*), sugerindo múltiplas origens evolutivas, sendo que alguns desses simbiontes não são cultiváveis. Em alguns casos, várias bactérias simbiontes obrigatórias podem coexistir em um mesmo hospedeiro e diferentes espécies de percevejos podem compartilhar as mesmas espécies de simbiontes. Algumas bactérias ambientais podem estabelecer infecção estável e relação de mutualismo com percevejos (Hosokawa *et al.* 2016).

O percevejo neotropical, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae), é uma das pragas mais abundantes na cultura da soja no Brasil (Sosa-Gómez & Silva 2010). O hábito polífago confere um grande potencial para o aumento e persistência de populações, permitindo o seu desenvolvimento em algodão, girassol e milho (Panizzi *et al.* 2000; Smaniotto & Panizzi 2015). Nos últimos anos, a associação percevejos-bactérias simbiontes tem sido preconizada como sendo uma estratégia em potencial para o controle de pragas (Douglas 2015; Kikuchi 2009; Su *et al.* 2013). Entretanto, para que essa estratégia seja explorada de forma eficiente, é importante conhecer a diversidade e compreender a estruturação da microbiota ao longo do desenvolvimento do hospedeiro. Tendo em vista que essas informações ainda permanecem obscuras em *E. heros*, este trabalho teve por objetivo determinar a diversidade da microbiota associada a diferentes regiões do intestino médio de ninfas e adultos de *E. heros*, assim como de seus embriões.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Coleta dos insetos e extração de DNA genômico

Todos os insetos utilizados nesse experimento foram oriundos da população estoque criada e mantida em condições de laboratório, assim como descrito no capítulo 2.

3.2.1.1. Coleta de embrião

Ovos de *E. heros* provenientes de criação mantida em laboratório foram coletados logo após a postura, colocados em placas de Petri e armazenados em condições controladas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h), até a visualização do embrião formado (5 dias). Os ovos foram então esterilizados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em 70% etanol (v/v) (1× - 2 min) e lavados em água deionizada estéril, em condições assépticas. Em seguida, o opérculo do ovo foi removido em solução salina estéril de NaCl a 0,85%, sendo o embrião retirado e armazenado em tubos contendo 100 µL de etanol absoluto. Foram utilizadas 3 repetições biológicas contendo 10 embriões cada.

3.2.1.2. Coleta do intestino médio de ninfas e adultos

Ninfas de quinto ínstar e adultos de *E. heros* com 10 e 20 dias de idade foram dissecados em solução salina estéril de NaCl a 0,85% para obtenção dos diferentes ventrículos do intestino médio, em condições assépticas (Figura 3.1). Cada estrutura dissecada foi lavada em solução salina estéril (3×), transferida para tubos contendo 100 µL de etanol absoluto e armazenada individualmente. Os acessórios para dissecação (pinças e tesouras) eram flambados a cada tecido coletado, para evitar a contaminação. Foram utilizadas três repetições biológicas, sendo cada repetição composta por estruturas provenientes de 10 indivíduos (5 machos e 5 fêmeas).

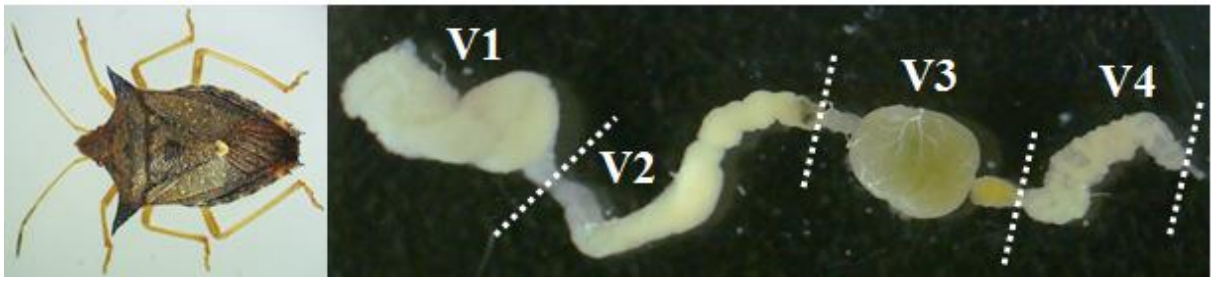

Figura 3.1. Ilustração dos diferentes ventrículos do intestino de *Euschistus heros* amostrados para extração de DNA genômico e determinação da microbiota associada.

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de DNA genômico (gDNA) utilizando-se o produto comercial AxyPrep Bacterial Genomic DNA Kit (Axygen), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade, qualidade e pureza do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (w/v), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 7,2) a 5 V/cm, e posterior visualização em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador, bem como pela obtenção da razão das leituras de absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotometria.

3.2.2. Amplificação e sequenciamento metagenômico

As amostras de DNA obtidas foram submetidas à amplificação do fragmento da região V4 do gene do 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) em reações de PCR com os iniciadores específicos 16SV4F (5’ AGT CAG TCA GCC GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT 3’) e 16SV4R (5’ TAT GGT AAT TGT GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3’). As

reações foram programadas a 98ºC por 2 min (1 ciclo), seguida de 30 ciclos a 98ºC por 45 s, 56ºC por 1 min e 72ºC por 90 s, com extensão final (1 ciclo) a 72ºC por 10 min. Cada reação foi feita em volume final de 50 µL, contendo 100-150 ng de gDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$, tampão de reação (1×), 0,2 mM de dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,5 U de Taq polimerase.

Os produtos de amplificação (≈400 pb) foram separados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 7,2) a 5 V/cm e visualizado em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador. Os produtos de PCR foram extraídos do gel de agarose e purificados com o produto comercial SV Gel and PCR Clean-Up System (Wizard), seguindo as recomendações do fabricante. Com o auxílio de um espectrofotômetro, determinou-se a qualidade e quantidade do produto de amplificação purificado.

A partir do produto de PCR purificado da primeira reação, as amostras foram submetidas a nova amplificação utilizando o produto comercial NEXTflex 16S V4 Amplicon SEQ (Bioo Scientific). Cada reação foi feita em volume final de 50 µL, contendo 50 ng de amplicons da região V4 do 16S rDNA produzidos anteriormente, NEXTflex™ DNA PCR Master Mix na concentração recomendada, um iniciador antissenso (NEXTflex™ 16SV4R - 0,2 µM) específico para cada amostra e o mesmo iniciador senso para todas as amostras (NEXTflex™ 16SV4F - 0,2 µM) (5'AAT GAT ACG GCG ACC GAG ATC TAC ACT GTA ATT GTG TGC CAG CMG CCG CGG TAA 3'). As reações foram programadas a 98ºC por 2 min (1 ciclo), seguido de 30 ciclos a 98ºC por 45 s, 56ºC por 1 min e 72ºC por 90 s, com extensão final (1 ciclo) a 72ºC por 10 min. Os amplicons obtidos (≈400 pb) foram purificados utilizando Agencourt AMPure® XP Magnetic Beads (Beckman Coulter) e enviados para sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq, junto ao Laboratório de Biologia Animal, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho (ESALQ/USP, Piracicaba/SP).

3.2.3. Análise de dados

A análise das sequências obtidas foi realizada com o programa QIIME v1.8.0, seguindo os parâmetros padrão (Caporaso *et al.* 2010b). Primeiramente, as leituras senso e antissenso de cada amostra foram alinhadas e unidas, formando sequências consenso. Estas foram filtradas em relação à qualidade (Phred >= Q20**)**, tamanho de leitura (mínimo/máximo = 200/1000 nucleotídeos) e número de bases ambíguas (= 0). Sequências brutas que não atingiram os limiares de qualidade especificados foram omitidas da análise, bem como

leituras observadas menos de 50 vezes. Aquelas aprovadas foram submetidas à demultiplexação, produzindo informações sobre o número de sequências detectadas para cada amostra.

Após a filtragem, as sequências demultiplexadas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com um limite de similaridade de 97%, utilizando o algoritmo UCLUST (Edgar 2010), sendo a sequência mais abundante escolhida como representativa de cada grupo de UTO. As sequências representativas de cada UTO foram alinhadas contra as sequências disponíveis no banco de dados do GreenGenes 16S rRNA v13_8 (McDonald *et al.* 2012; Werner *et al.* 2012) pelo método PyNAST (Caporaso *et al.* 2010a). A classificação taxonômica das bactérias foi realizada de acordo com o táxon mais próximo, dependendo dos valores de similaridade seguindo os critérios: > 97% de similaridade para o nível de espécie, entre 95 e 97% ao nível de gênero, entre 90 e 95% ao nível de família, entre 85 e 90% ao nível de ordem, entre 80 e 85% ao nível de classe e entre 77 e 80% ao nível de filo (Ledezma-Villanueva *et al.* 2016).

Em seguida, foram gerados os índices de α-diversidade, sendo estimados os valores de cobertura amostral, os parâmetros de riqueza (Chao1) e diversidade de espécies (Shannon), e construídas curvas de rarefação. O índice Chao1 usa o número de UTOs formadas a partir de uma ou duas sequências para estimar as "espécies" ausentes (Chao 1984). O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever que a "espécie" pertencerá a um indivíduo escolhido ao acaso em uma amostra com "S" espécies e "N" indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa (Fu *et al.* 2011; Möhlenhoff *et al.* 2001). A riqueza e a diversidade de espécies dependem do esforço amostral despendido, uma vez que o número de espécies aumenta proporcionalmente com o número de indivíduos amostrados. As curvas de rarefação permitem avaliar o aumento no número de UTOs inéditas em cada amostra. Quando a curva estabiliza, nenhuma UTO nova é adicionada e a riqueza total é obtida. Assim, novas amostragens não são necessárias (Yu *et al.* 2012).

Para avaliar a riqueza e diversidade de bactérias entre as amostras (β-diversidade), foi necessário gerar uma matriz de distâncias pelo algoritmo de Bray-Curtis e transformar os dados para log (x+1). Essa matriz foi a base para a análise de ordenação do tipo Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), utilizada para indicar o agrupamento das amostras em função dos respectivos graus de similaridade.

As comparações dos perfis da microbiota entre as categorias de idade e as regiões do intestino médio e o embrião de *E. heros* foram realizadas com o emprego da Análise de

Similaridade (ANOSIM). É um procedimento não-paramétrico que compara as similaridades entre dois ou mais grupos de unidades amostrais por meio de correlações, gerando uma estatística *R* que varia de -1 a +1. Valores de $R > 0,75$ indicam que os grupos estão claramente separados. Para $0,5 < R < 0,75$ os grupos estão separados, porém apresentam sobreposições; $0,25 < R < 0,5$ apresenta grupos parcialmente separados; e $R < 0,25$ significa que não existe separação entre os grupos. Por meio de permutações aleatórias dos grupos foi calculado um teste de significância dos valores estimados de *R'*. Dessa forma, o valor de *p* é calculado como o número de vezes que *R'* for maior ou igual a *R*. Se $p < 0,05$, o valor é significativo (Clarke & Gorley 2006). Análises multivariadas para a comparação entre a abundância relativa de UTOs presentes em V4 em relação às demais regiões do intestino médio e embrião de *E. heros* foram realizadas com o auxílio dos programas STAMP v2.1.3 (Parks *et al.* 2014) e PAST v2.17c (Hammer *et al.* 2001).

3.2.4. Análise filogenética

As sequências completas (≈1.500 pb) foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa MEGA v6.06 (Tamura *et al.* 2013), utilizando como parâmetros de penalidade de *gap* = 15 e de extensão de *gap* = 9. Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se o método calculado pelo algoritmo de *Neighbor-Joining*, com o modelo de distância Kimura-2 parâmetros, com 1.000 iterações.

3.3. Resultados

O sequenciamento da microbiota associada ao embrião e às diferentes regiões do intestino médio de ninfas e adultos de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) gerou um conjunto total de 10.649.825 leituras. Após a aplicação do filtro de qualidade e da remoção de leituras observadas menos de 50 vezes, esse número foi reduzido para 4.712.587 leituras, com aproximadamente 253 pb.

A classificação das sequências contra aquelas disponíveis no banco de dados do GreenGenes, ao nível de 97% de similaridade, produziu 833 UTOs distribuídas em 17 filos, 28 classes, 54 ordens, 94 famílias e 163 gêneros.

As curvas de rarefação mostraram a estabilização da diversidade com a amostragem de 12.245 leituras, indicando que o esforço amostral foi suficiente para estimar a diversidade dentro de cada amostra (Figura 3.2).

Para uma melhor apresentação dos dados, foram considerados aqui apenas os táxons que representam 3% ou mais da microbiota associada ao embrião e diferentes partes do intestino médio de ninfas e adultos de *E. heros*, em pelo menos uma das amostras (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Porcentagem de táxons em amostras de embrião e em diferentes regiões do intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos de *Euschistus heros*, com representatividade igual ou superior a 3% em pelo menos uma das amostras.

						V1[1]			V2			V3			V4		
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**	**E[2]**	**N5**	**A10**	**A20**	**N5**	**A10**	**A20**	**N5**	**A10**	**A20**	**N5**	**A10**	**A20**
Actinobacteria	*Rubrobacteria*	*Rubrobacterales*	*Rubrobacteraceae*	*Rubrobacter*	16.6	5.7	0.0	1.9	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Actinobacteria	*Actinomycetales*	*Corynebacteriaceae*	*Corynebacterium*	4.2	1.2	1.3	0.0	1.8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Brevibacteriaceae	*Brevibacterium*	0.0	1.6	0.0	0.0	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Firmicutes	*Bacilli*	*Bacillales*	UTO-ID4312974	-----	7.4	11.2	31.7	0.7	26.5	15.1	1.4	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Staphylococcaceae	*Staphylococcus*	1.1	1.3	3.3	0.0	2.4	3.2	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Lactobacillales	*Enterococcaceae*	*Enterococcus*	0.0	0.0	7.7	2.2	0.0	18.3	4.8	13.3	22.9	13.1	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	*α-Proteobacteria*	*Sphingomonadales*	*Sphingomonadaceae*	*Sphingobium*	3.4	1.2	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Rickettsiales	UTO-ID3225199	-----	0.0	11.4	3.3	6.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	β-Proteobacteria	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*	UTO-ID822112	1.4	0.3	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Rhodocyclales	*Rhodocyclaceae*	*Zoogloea*	2.8	0.9	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	γ-Proteobacteria	*Enterobacteriales*	*Enterobacteriaceae*	UTO-ID1010113	15.7	14.4	27.5	32.1	13.3	9.0	12.4	7.6	14.6	21.0	82.5	98.6	98.6
				UTO-ID4384058	9.1	9.0	16.3	45.7	19.8	46.0	51.7	59.7	56.4	49.2	6.8	1.1	1.1
				Serratia	5.7	26.7	0.6	2.2	17.3	1.9	27.7	12.1	3.2	15.1	0.0	0.0	0.0
				Erwinia	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	10.4	0.0	0.0
		Pseudomonadales	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	9.4	3.6	0.0	1.7	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	3.2	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[1] Partes do intestino médio: ventrículo 1 a quatro (V1 a V4).
[2] Diferentes idades: embrião (E), ninfa de quinto ínstar (N5) e adultos com 10 (A10) e 20 (A20) dias.

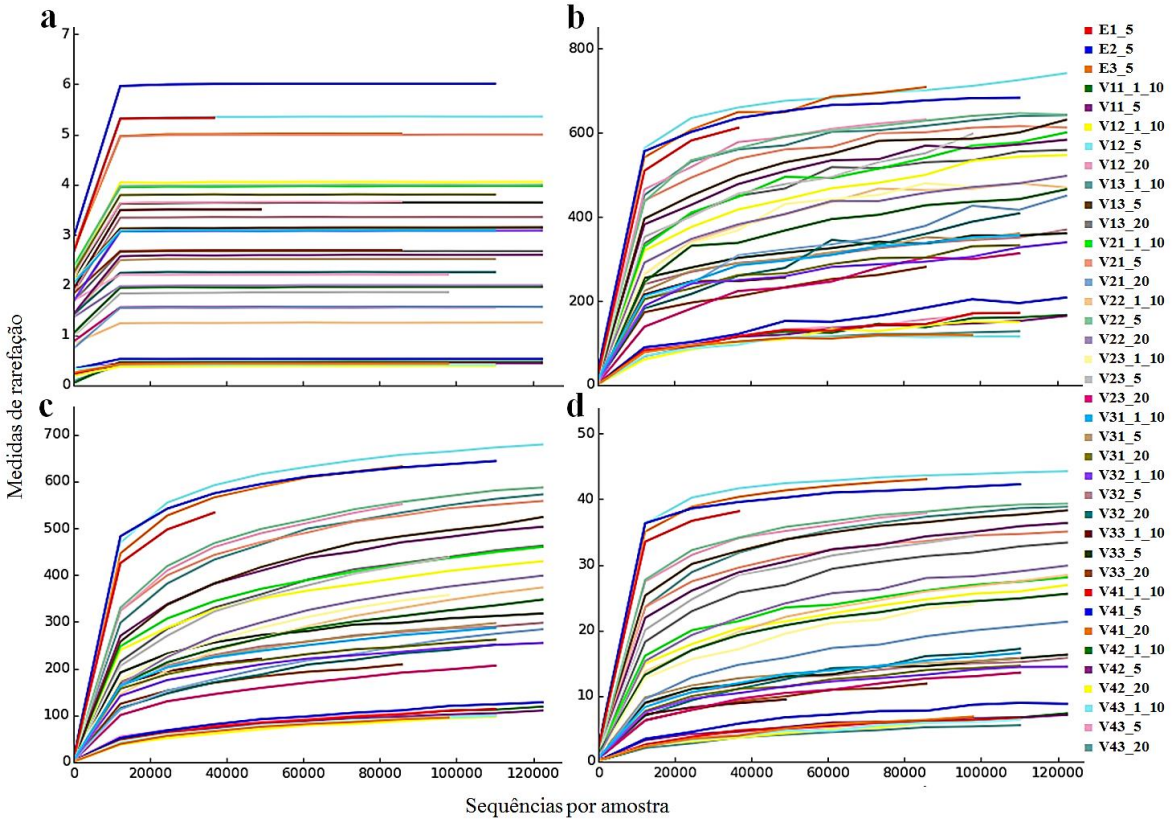

Figura 3.2. Curvas de rarefação para os índices de diversidade alfa de amostras de embrião e dos ventrículos do intestino médio de ninfas e adultos (V1 a V4) de *Euschistus heros*. (a) Shannon, (b) Chao I, (c) UTOs observadas e (d) diversidade filogenética.

A análise das sequências obtidas permitiu a determinação dos principais arranjos filogenéticos com base na matriz de UTOs. Em geral, *Proteobacteria* (79,3%) foi o filo predominante da microbiota, seguido por *Firmicutes* (16,3%) e *Actinobacteria* (3,5%). Entretanto, quando observado mais detalhadamente, verifica-se que *Proteobacteria* corresponde a 50,7% dos simbiontes associados ao embrião, 76,5% daqueles associados às ninfas de quinto ínstar, 69,6% dos associados aos adultos com 10 dias e 91,6% das bactérias associadas aos adultos com 20 dias de idade. O segundo filo mais abundante no embrião foi *Actinobacteria* (20,8%) seguido por *Firmicutes* (8,4%), enquanto para ninfas e adultos com 10 e 20 dias, o segundo filo mais abundante foi *Firmicutes*, com 14,4, 25,6 e 5,5%, respectivamente. *Actinobacteria* correspondeu a 4,5% da microbiota de ninfas e 0,5% das bactérias de adultos com 10 e 20 dias (Tabela 3.1, Figura 3.3).

Considerando as diferentes partes do intestino de ninfas e adultos, foi observada maior abundância de *Actinobacteria* nas regiões V1 e V2 de ninfas (>8,5%), reduzindo drasticamente em adultos (<2,0%). Não há registros deste filo para as regiões V3 e V4 de adultos. Seguindo este padrão, *Firmicutes* predominou de V1 a V3 em adultos com 10 dias,

seguido pelas ninfas, com redução em adultos com 20 dias. Não foi registrada ocorrência de *Firmicutes* no V4 (Tabela 3.1, Figura 3.3).

Curiosamente, houve maior abundância de *Proteobacteria* em adultos com 20 dias, seguido pelas ninfas e adultos com 10 dias, nas regiões V1 a V3, sendo a ocorrência praticamente exclusiva em V4, onde 99,7% da comunidade era representada por esse grupo de bactéria (Tabela 3.1, Figura 3.3).

Actinobacteria foi representada por *Rubrobacteraceae* (*Rubrobacter*), *Corynebacteriaceae* (*Corynebacterium*) e *Brevibacteriaceae* (*Brevibacterium*), enquanto *Firmicutes* por *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus*) e uma família ainda não identificada, mas com alta representatividade, principalmente em embriões e V1 e V2 de ninfas e adultos com até 10 dias. Além da maior abundância, *Proteobacteria* apresentou a maior diversidade, com representantes nas três classes: *α-Proteobacteria* - *Sphingomonadaceae* (*Sphingobium*); *β-Proteobacteria* - *Rhodocyclaceae* (*Zoogloea*) e gêneros indeterminados da família *Comamonadaceae*; *γ-Proteobacteria* foi representada por *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*) e, principalmente, por *Enterobacteriaceae* (*Serratia*, *Erwinia* e outros não-identificados).

A família *Enterobacteriaceae* apresenta peculiaridades, em especial por possuir um gênero ainda desconhecido que ocorre no embrião (≈16%), sendo predominante na região V4 do intestino médio de ninfas (≈82%) e adultos (>98%) de *E. heros*. Em contrapartida, apresenta um segundo gênero também não-identificado e de elevada abundância, que prevalece nas regiões V2 e V3 de ninfas e adultos (≈45-60%) (Figura 3.3).

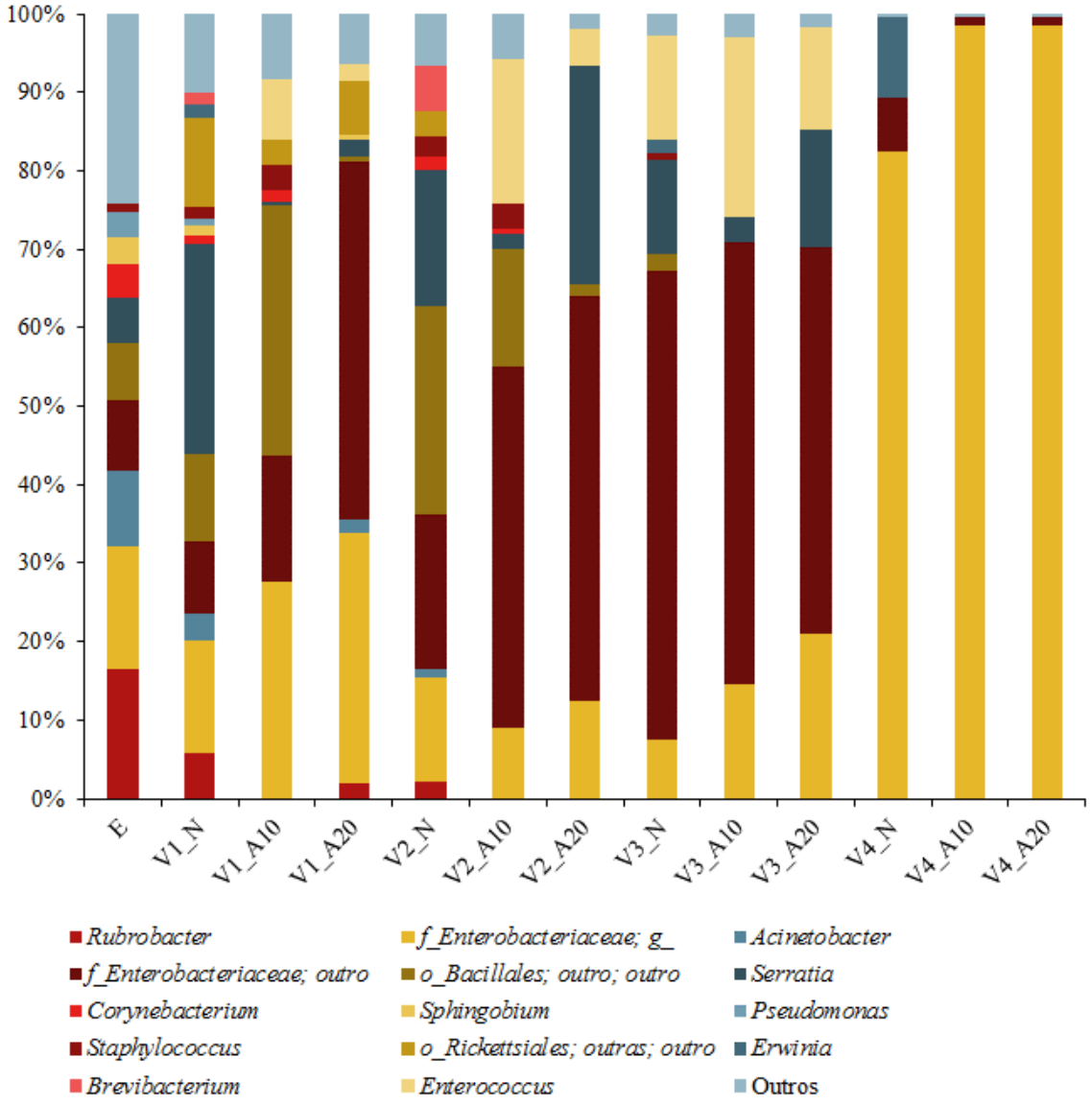

Figura 3.3. Abundância relativa dos gêneros mais abundantes de bactérias simbiontes, obtidas a partir dos dados da matriz de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), para as diferentes idades e partes do intestino de *Euschistus heros*: embrião (E) e ventrículos do intestino médio de ninfas de quinto ínstar (V1 a V4_N5) e adultos com 10 (V1 a V4_A10) e 20 dias após a emergência (V1 a V4_A20).

A análise de similaridade (ANOSIM) das UTOs e de sua abundância relativa demonstrou ocorrer a separação entre os grupos; porém, com sobreposição parcial dos dados de comunidade (R = 0,616, $p \leq 0{,}0001$), não sendo significativa entre amostras (Anexo A). A microbiota associada a cada órgão estudado formou grupo definido, mas com níveis distintos de compartilhamento da microbiota entre as diferentes estruturas de *E. heros* estudadas (Figura 3.4). O perfil da microbiota associada ao embrião foi o mais diverso entre as amostras. Entretanto, há um grande número de táxons compartilhados com as regiões iniciais do intestino médio, V1 e V2, particularmente de ninfas, ocorrendo redução drástica no

compartilhamento de membros da comunidade com regiões mais distais do intestino médio, como as regiões V3 e V4, principalmente de adultos (Figura 3.4, Anexo B).

A região V3 de ninfas e adultos parece ser uma área de transição, onde há similaridade alta com a microbiota presente na região V2 devido à forte sobreposição dos grupos, e separação para aquela localizada no embrião e na região V4. O perfil da microbiota entre as regiões V3 mostra o compartilhamento praticamente total da microbiota entre ninfas e adultos. Já a região V4 apresenta diversidade extremamente baixa. Esse fato é evidente quando comparada ao perfil da microbiota associada ao embrião e aquele presente nas demais partes do intestino médio (Figura 3.4, Anexo B).

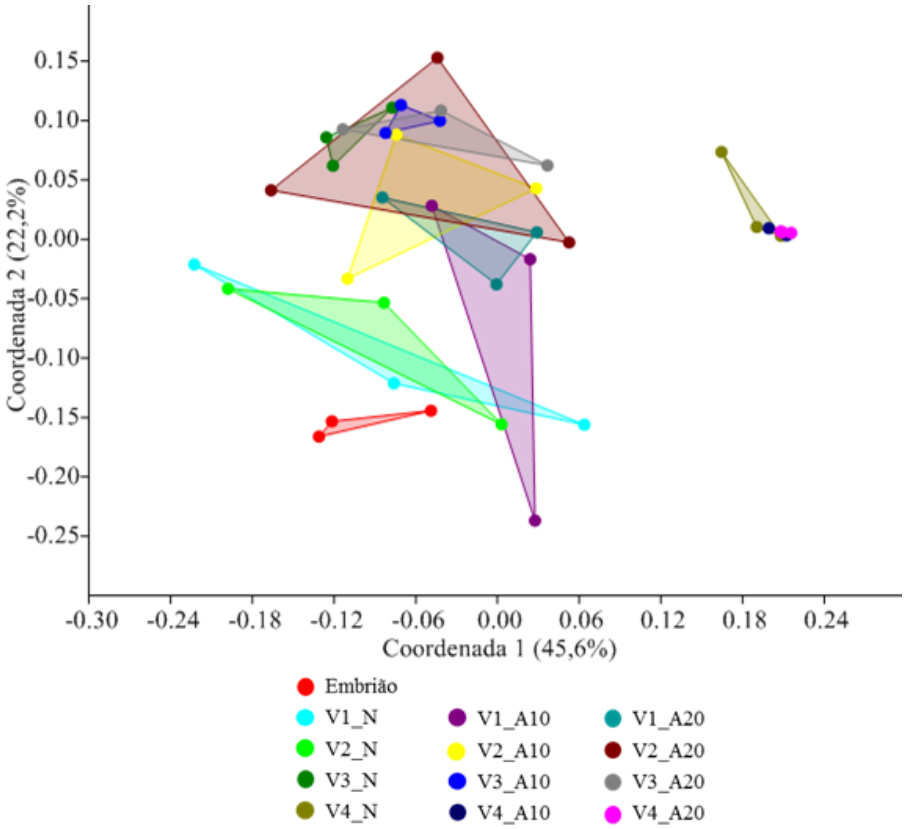

Figura 3.4. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da microbiota associada ao embrião e regiões V1 a V4 do intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

A ANOSIM realizada para verificar o perfil dos grupos formados pela microbiota associada ao embrião, ninfas e adultos, sem levar em consideração as diferentes partes do intestino médio, indicou alta similaridade, dada a sobreposição das comunidades dos diferentes grupos (R = 0,1006, $p \leq 0{,}0314$), mas com diferença significativa para a microbiota

do embrião quando comparada com a de adultos com 10 e 20 dias, respectivamente $p \leq 0{,}018$ e $p \leq 0{,}0046$ (Figura 3.5, Anexo C).

A microbiota presente no embrião é muito similar àquela associada às ninfas de quinto ínstar, apresentando menor sobreposição e diversidade dos grupos em relação aos adultos com 10 e 20 dias (Figura 3.5, Anexo D).

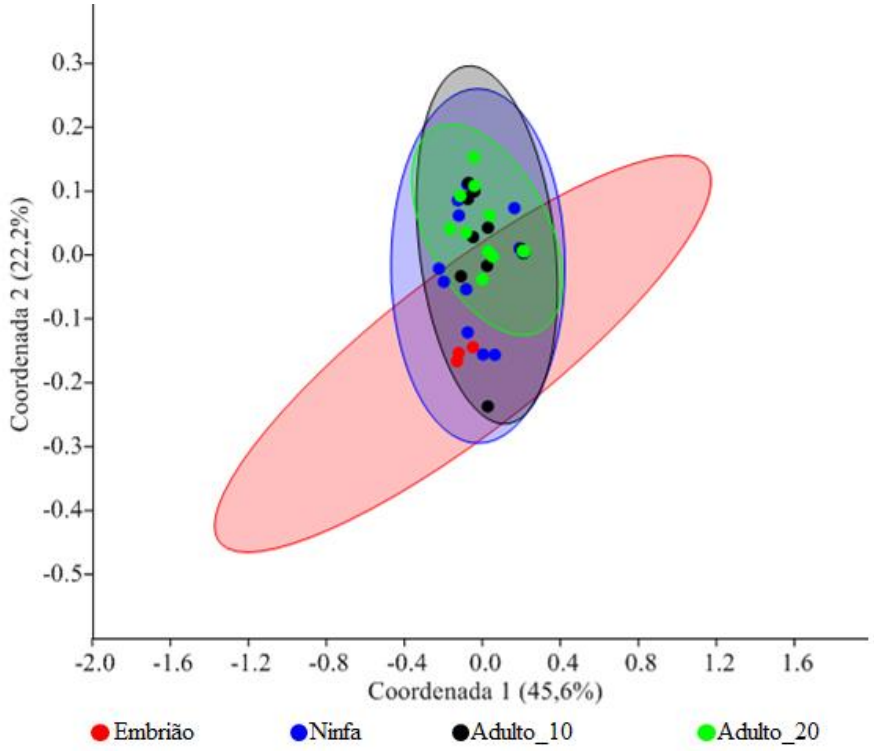

Figura 3.5. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da microbiota associada ao embrião, ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias.

Quando realizada a ANOSIM para comparar o perfil da microbiota associada ao embrião e às diferentes partes do intestino médio de ninfas e adultos de *E. heros*, foi verificada a separação dos grupos; porém, compartilhando semelhanças pela existência de sobreposições significativas das microbiotas ($R = 0{,}6454$, $p \leq 0{,}0001$) (Anexo E).

De forma geral, a microbiota associada ao embrião apresentou alta similaridade com aquela da região V1 do intestino médio, que se sobrepõe fortemente com o grupo do V2. Este, por fim, é similar ao da região V3. A região V4 apresenta um grupo plenamente separado do embrião e das demais partes do intestino (Figura 3.6, Anexo F).

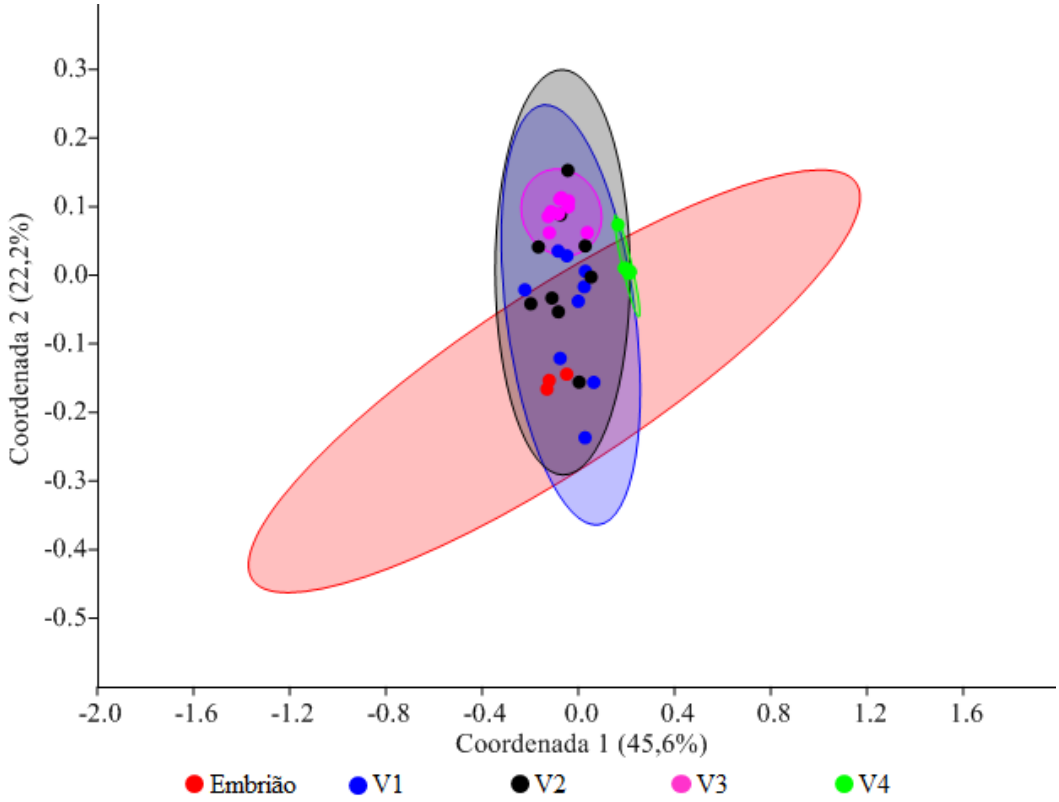

Figura 3.6. Escalonamento multidimensional mão-métrico (NMDS) da microbiota associada ao embrião e diferentes partes do intestino médio de *Euschistus heros*.

Análises dos membros da microbiota da região V4 àqueles do embrião e das demais regiões do intestino médio de *E. heros* revelaram a predominância de uma UTO fortemente associada a essa região, a qual representou mais de 90% da microbiota do V4, diferindo significativamente das demais regiões (Figura 3.7).

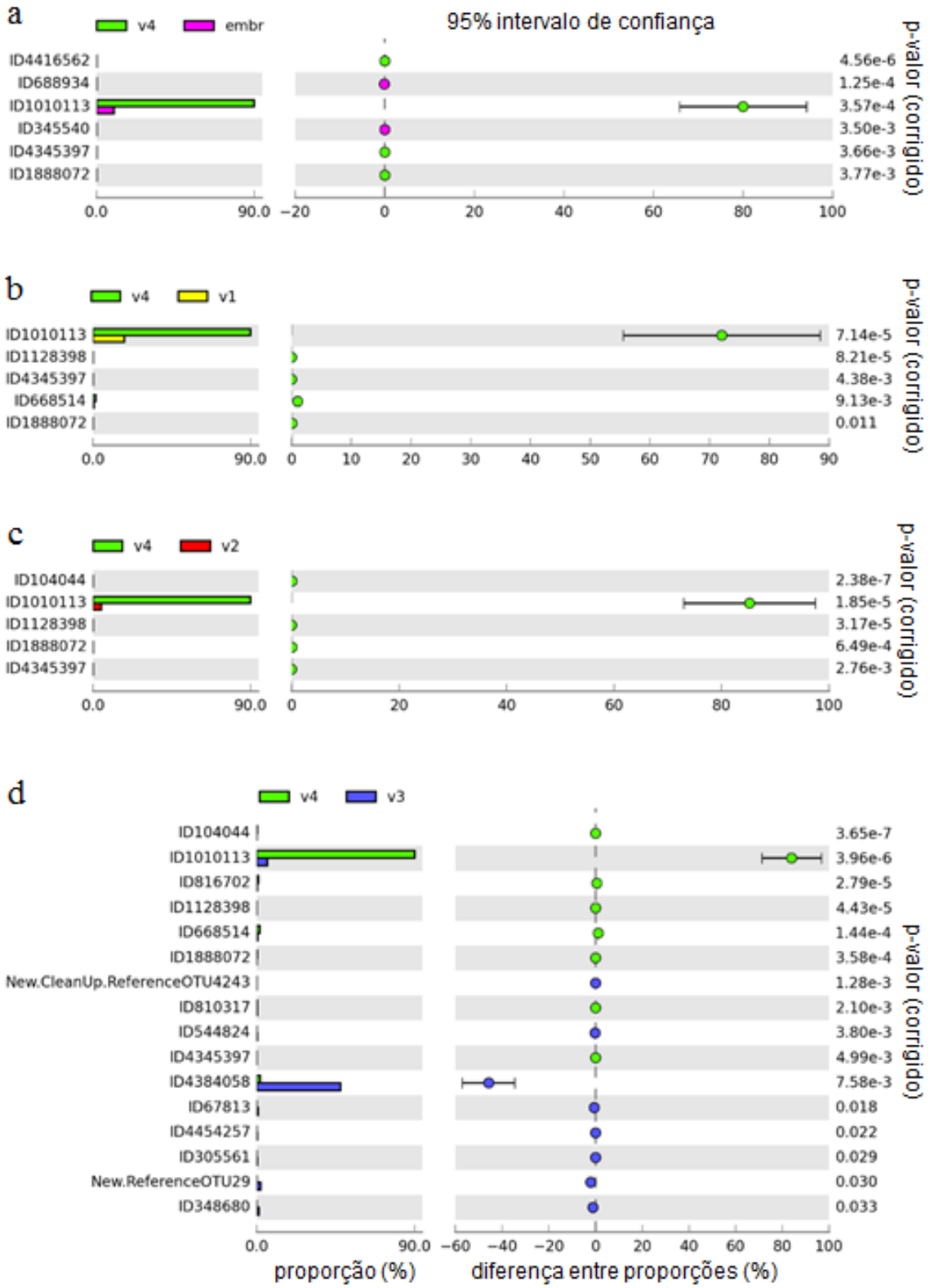

Figura 3.7. Diferença na proporção relativa de bactérias associadas à região V4 do intestino médio de *Euschistus heros* e aquelas comuns ao embrião (a), V1 (b), V2 (c) e V3 (d). Valor de *p* corrigido pelo método de Bonferroni.

Análises da região do 16S do gene do rRNA dessa UTO após a extensão do fragmento originalmente produzido indicaram que essa bactéria apresentou 98,88% de similaridade ao representante mais próximo, *Pantoea septica*. A UTO-ID1010113 resultou em clado conjuntamente com *P. septica* e *Erwinia amylovvora*, se colocando em subclado mais interno com *E. amylovvora*; porém, sem sustentação de bootstrap (Figura 3.8).

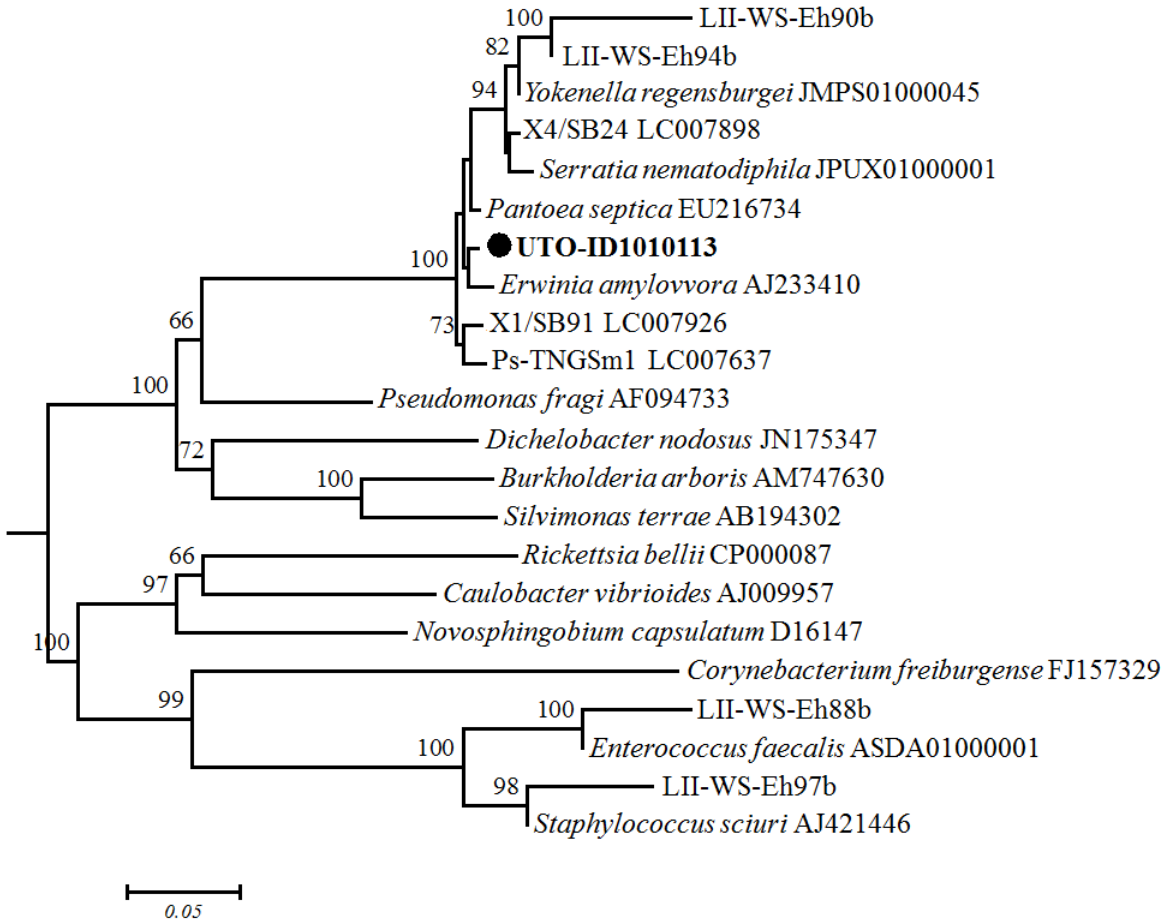

Figura 3.8. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene 16S rRNA (≈ 1.500 pb) obtidas de embrião e da região V4 do intestino médio de ninfas e adultos de *Euschistus heros*. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de bootstrap. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo.

3.4. Discussão

Os simbiontes mais importantes em percevejos são bactérias extracelulares que vivem no lúmen das criptas do intestino médio, na região V4. Geralmente estes simbiontes pertencem a *β*- e *γ-Proteobacteria* e estão presentes em diferentes famílias de percevejos, tais como Pentatomidae (Kikuchi *et al.* 2011, b; Kikuchi *et al.* 2012; Prado *et al.* 2006; Tada *et al.*

2011), Plataspidae (Fukatsu & Hosokawa 2002), Cydnidae (Hosokawa *et al.* 2012b), Acanthosomatidae (Kikuchi *et al.* 2009) e Scutelleridae (Kaiwa *et al.* 2010).

Neste estudo, verificamos que *E. heros* apresenta uma *γ-Proteobacteria* próxima a *Erwinia amylovvovora*, a qual se mostrou como a bactéria mais representativa na microbiota do V4 do intestino médio desse percevejo, sendo também encontrada no embrião. O posicionamento da UTO-ID1010113 entre os gêneros *Pantoea* e *Erwinia* com baixos valores de bootstrap pode ser explicado pela origem monofilética desses dois gêneros (Walterson & Stavrinides 2015).

A elevada abundância de UTO-ID1010113 na região V4 do intestino médio indica o potencial de contribuição dessa bactéria na ecologia/fisiologia de *E. heros*, assim como demonstrado para outras espécies de pentatomídeos, nas quais a eliminação de simbiontes do gênero *Pantoea* resultou em aumento da mortalidade e do período de desenvolvimento de imaturos, além de levar à redução da fecundidade (Bistolas *et al.* 2014; Duron & Noël 2016; Hosokawa *et al.* 2016; Prado & Almeida 2009b) e do peso corporal de adultos recém emergidos (Hirose *et al.* 2006).

A presença da UTO-ID1010113 no embrião, antes da exposição do inseto ao ambiente, e sua predominância na região V4 do intestino médio de *E. heros* indica que essa bactéria seja transmitida verticalmente, por via transovariana, diferentemente do que ocorre na maioria dos percevejos. A maioria das espécies fitófagas de Pentatomoidea e Pyrrhocoroidea estão associadas a simbiontes intestinais em *γ-Proteobacteria* e *Actinobacteria*, respectivamente, e são transmitidos verticalmente para a prole (Hosokawa *et al.* 2016; Hosokawa *et al.* 2012b; Itoh *et al.* 2014; Kaiwa *et al.* 2011; Kaltenpoth *et al.* 2009; Kikuchi 2009; Prado & Almeida 2009a; Tada *et al.* 2011). Diferentes mecanismos têm sido relatados para a transmissão vertical em percevejos. Em Pentatomidae, Scuttelleridae, Acanthosomatidae e Pyrrhocoridae, a fêmea contamina superficialmente os ovos e as ninfas adquirem os simbiontes ao testarem a superfície do córion (Calizotti & Panizzi 2014; Kaltenpoth *et al.* 2009; Kikuchi *et al.* 2012; Tada *et al.* 2011). Em Cydnidae e Parastrachiidae, as ninfas adquirem os simbiontes alimentando-se dos excrementos da fêmea (Hosokawa *et al.* 2012a). Em Plataspidae, as fêmeas fornecem uma cápsula contendo simbiontes e as ninfas são infectadas com simbiontes ao sugar a cápsula (Fukatsu & Hosokawa 2002). A transmissão transovariana de componentes da microbiota intestinal não é desconhecida, ocorrendo em outras associações inseto-simbionte, como em *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) e *Pantoea agglomerans.* Nesse caso, a bactéria

forma um biofilme no intestino do inseto, migrando posteriormente para os ovários, onde formará biofilme junto às extremidade dos ovos (Lauzon *et al.* 2009).

Actinobacteria associada a insetos atuam reconhecidamente na defesa de seus hospedeiros. Isso ocorre em função de suas habilidades ecológicas e fisiológicas, incluindo a capacidade de utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio e a produção de ampla gama de metabólitos secundários com propriedades antibióticas (Kaltenpoth 2009; Salem *et al.* 2013). *Actinobacteria* também foi identificada associada a *E. heros*, mas apenas ao embrião e regiões V1 e V2, apesar de várias outras espécies de Pentatomidae carregarem actinobactérias na região V4 do intestino médio (Zucchi *et al.* 2012).

Outro aspecto importante a ser mencionado diz respeito às bactérias patogênicas. Embora os estudos nesse campo ainda sejam incipientes, já se tem relatos da ocorrência de alguns gêneros e espécies capazes de causar doenças em insetos, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que destrói o corpo gorduroso de *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae) (Dorn 1976; Dorn 1977) e de *Enterococcus faecalis*, que degrada peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), os quais atuam na defesa do hospedeiro (Park *et al.* 2007). Em *E. heros*, foi identificada uma pequena abundância de *Pseudomonas* presentes exclusivamente no embrião, e de *Enterococcus* predominando as regiões V1 a V3 de adultos com 10 e 20 dias, necessitando de mais estudos para verificar a função desses simbiontes nessas amostras.

3.5. Conclusão

O embrião de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) tem a maior diversidade de simbiontes.

As regiões V1 e V2 são as mais diversas entre as partes do intestino médio de ninfas e adultos de *E. heros*.

O V4 do intestino médio é inteiramente habitado por uma *Enterobacteriaceae* próxima a *Erwinia amylovvora*, cuja transmissão é transovariana

Referências

Baumann P (2005) Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**, 155-189.

Bistolas KS, Sakamoto RI, Fernandes JA, Goffredi SK (2014) Symbiont polyphyly, co-evolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. *Frontiers in Microbiology* **5**, 349.

Buchner P (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York: John Wiley.

Calizotti GS, Panizzi AR (2014) Behavior of first instar nymphs of Edessa meditabunda (F.)(Hemiptera: Pentatomidae) on the egg mass. *Florida Entomologist* **97**, 277-280.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**, 335-336.

Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, *et al.* (2010a) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* **26**, 266-267.

Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265-270.

Clarke KR, Gorley RN (2006) *PRIMER V6: User Manual-Tutorial* Plymouth Marine Laboratory.

Dorn A (1976) Pseudomonas aeruginosa cause epidemic disease in the milkweed bug, Oncopeltus fasciatus dallas (Insecta, Heteroptera). *Cellular and Molecular Life Sciences* **32**, 599-601.

Dorn A (1977) Studies on the fat body of oncopeltus fasciatus invaded by pseudomonas aeruginosa1. *Journal of Invertebrate Pathology* **29**, 347-353.

Douglas AE (2015) Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology* **60**, 17-34.

Duron O, Noël V (2016) A wide diversity of *Pantoea* lineages are engaged in mutualistic symbiosis and cospeciation processes with stinkbugs. *Environmental Microbiology Reports* **8**, 715-727.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460-2461.

Fu Y, Shao L, Tong L, Liu H (2011) Ethylene removal efficiency and bacterial community diversity of a natural zeolite biofilter. *Bioresource Technology* **102**, 576-584.

Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 389-396.

Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*.

Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ, Aldrich JR (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 91-95.

Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, *et al.* (2016) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nature Microbiology* **1**, 15011.

Hosokawa T, Hironaka M, Inadomi K, *et al.* (2013) Diverse strategies for vertical symbiont transmission among subsocial stinkbugs. *PLoS One* **8**, 1-8.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Fukatsu T (2012b) Polyphyly of gut symbionts in stinkbugs of the family Cydnidae. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4758-4761.

Hosokawa T, Hironaka M, Mukai H, *et al.* (2012a) Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal Behaviour* **83**, 293-300.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol* **4**, 1841-1851.

Itoh H, Aita M, Nagayama A, *et al.* (2014) Evidence of environmental and vertical transmission of *Burkholderia* symbionts in the oriental chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 5974-5983.

Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2014) Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Current Biology* **24**, 2465-2470.

Kaiwa N, Hosokawa T, Kikuchi Y, *et al.* (2011) Bacterial symbionts of the giant jewel stinkbug *Eucorysses grandis* (Hemiptera: Scutelleridae). *Zoological Science* **28**, 169-174.

Kaiwa N, Hosokawa T, Kikuchi Y, *et al.* (2010) Primary gut symbiont and secondary, *Sodalis*-allied symbiont of the scutellerid stinkbug *Cantao ocellatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3486-3494.

Kaltenpoth M (2009) *Actinobacteria* as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology* **17**, 529-535.

Kaltenpoth M, Winter SA, Kleinhammer A (2009) Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. *FEMS Microbiology Ecology* **69**, 373-383.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, Fukatsu T (2012) Gut symbiotic bacteria in the cabbage bugs *Eurydema rugosa* and *Eurydema dominulus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* **47**, 1-8.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2011) An ancient but promiscuous host–symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Journal* **5**, 446-460.

Yu H, Wang Z, Liu L, *et al.* (2008) Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current microbiology* **56**, 391-396.

Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments* **24**, 195-204.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *Bmc Biology* **7**, 2.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2008) Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. *Microbial Ecology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers 39-63.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2007) Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4308-4316.

Lauzon C, McCombs S, Potter S, Peabody N (2009) Establishment and vertical passage of Enterobacter (Pantoea) agglomerans and Klebsiella pneumoniae through all life stages of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* **102**, 85-95.

Ledezma-Villanueva A, Adame-Rodríguez JM, O'Connor-Sánchez IA, Villarreal-Chiu JF, Aréchiga-Carvajal ET (2016) Biodegradation kinetic rates of diesel-contaminated sandy soil samples by two different microbial consortia. *Annals of Microbiology* **66**, 197-206.

McDonald D, Price MN, Goodrich J, *et al.* (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of Bacteria and Archaea. *The ISME Journal* **6**, 610-618.

Möhlenhoff P, Müller L, Gorbushina AA, Petersen K (2001) Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Jicrobiology Letters* **195**, 169-173.

Panizzi AR, McPherson J, James DG, Javahery M, McPherson RM (2000) Stink bugs (Pentatomidae). *Heteroptera of Economic Importance*, 421-474.

Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH (2007) Extracellular gelatinase of Enterococcus faecalis destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and immunity* **75**, 1861-1869.

Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG (2014) STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**, 3123-3124.

Prado SS, Almeida RP (2009b) Role of symbiotic gut bacteria in the development of Acrosternum hilare and Murgantia histrionica. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**, 21-29.

Prado SS, Almeida RP (2009a) Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. *Current Microbiology* **58**, 64-69.

Prado SS, Rubinoff D, Almeida RP (2006) Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 577-585.

Rio RV, Hu Y, Aksoy S (2004) Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology* **12**, 325-336.

Salem H, Kreutzer E, Sudakaran S, Kaltenpoth M (2013) *Actinobacteria* as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental Microbiology* **15**, 1956-1968.

Smaniotto LF, Panizzi AR (2015) Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. *Florida Entomologist* **98**, 7-17.

Sosa-Gómez DR, Silva JJd (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **45**, 767-769.

Su Q, Zhou X, Zhang Y (2013) Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative & integrative biology* **6**, 1-7.

Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, *et al.* (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* **46**, 483.

Taylor CM, Coffey PL, DeLay BD, Dively GP (2014) The importance of gut symbionts in the development of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål). *PLoS One* **9**, 1-9.

Walterson AM, Stavrinides J (2015) Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS microbiology reviews* **39**, 968-984.

Werner JJ, Koren O, Hugenholtz P, *et al.* (2012) Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. *The ISME Journal* **6**, 94-103.

Yu DW, Ji Y, Emerson BC, *et al.* (2012) Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 613-623.

Zucchi TD, Prado SS, Cônsoli FL (2012) The gastric caeca of pentatomids as a house for actinomycetes. *BMC Microbiology* **12**, 101-108.

4. SIMBIONTES ASSOCIADOS AO TRATO REPRODUTIVO E A APTIDÃO REPRODUTIVA DE *Euschistus heros*

Resumo

Simbiontes facultativos podem assumir interações patogênicas com seus hospedeiros, como bactérias oportunistas que induzem doenças sexualmente transmissíveis. O efeito dessas associações pode refletir nos parâmetros reprodutivos do inseto hospedeiro, com possível redução da fecundidade e fertilidade, podendo levar o inseto à morte. São poucos os relatos na literatura que abordam a presença de bactérias livres associadas aos órgãos reprodutivos em insetos, sendo inexistentes abordagens para a investigação do efeito direto dessas bactérias na aptidão reprodutiva e longevidade de adultos infectados via transmissão sexual. Este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência e intensidade de infecção das estruturas reprodutivas de machos (vesícula seminal) e fêmeas (espermateca) virgens por bactérias cultiváveis e o efeito dessas infecções na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), utilizando-se de indivíduos tratados ou não com antibiótico. Para isso, machos e fêmeas recém-emergidos receberam solução de antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) durante 10 dias (pré-cópula), antes de ser permitida sua reprodução, seguindo os tratamentos: i) fêmeas e machos tratados com antibiótico (FtMt); ii) fêmeas tratadas com antibiótico e machos não-tratados (FtMnt); iii) fêmeas e machos não-tratados (FntMnt); iv) fêmeas não-tratadas e machos tratados com antibiótico (FntMt). Machos foram removidos e dissecados logo após o término da cópula para plaqueamento dos fluídos da vesícula seminal a fim de se verificar a ocorrência e intensidade de infecção dessa estrutura reprodutiva. O experimento foi mantido em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas). Os simbiontes associados à espermateca e à vesícula seminal infectam naturalmente a machos e fêmeas virgens recém-emergidas de *E. heros*. O tratamento de adultos com antibióticos reduziu o número de insetos infectados, assim como a infecção naqueles que mantiveram associação com as bactérias. Apesar disso, os experimentos realizados não permitiram a identificação de qualquer efeito negativo de bactérias associadas à vesícula seminal na capacidade reprodutiva de fêmeas de *E. heros*.

Palavras-chave: Simbionte oportunista; Custo adaptativo; Parâmetros biológicos; Aptidão do hospedeiro

Abstract

Facultative symbionts can establish pathogenic interactions with their hosts, as opportunistic bacteria that induce sexually transmitted diseases. Pathogenic associations directly interfere on the reproductive parameters of the insect host, leading to a reduction in female fecundity and fertility, or even death. There are few reports in the literature addressing the presence of free bacteria

associated with the reproductive organs in insects, and there are no attempts to investigate the direct effects of these bacteria on the reproductive fitness and longevity of adults infected through sexual transmission. There are few reports in the literature that addressed the presence of symbionts within or on reproductive organs in insects, and none of them investigated the direct effects of opportunistic, sexually transmitted bacteria on reproduction. The objective of this work was to verify the occurrence and intensity of infection of the reproductive structures of virgin male (seminal vesicle) and female (spermatheca) by culturable bacteria, and the effect of these infections on the reproductive fitness of females of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). We investigated the occurrence and intensity of infection in virgin and mated males and females treated or not with antibiotics (10,000 units/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin sulphate and 25 mg/mL amphotericin B). We also assessed the effects of these symbionts on the reproductive capacity of *E. heros* females. Newly emerged males and females were fed antibiotic-antimycotic solution for 10 days (pre-mating), before being allowed to reproduce, using the following the treatments: i) females and males treated with antibiotics (FtMt); ii) females treated with antibiotics and untreated males (FtMnt); iii) untreated females and males (FntMnt); iv) untreated females and males treated with antibiotics (FntMt). Males were removed and dissected shortly after mating for the assessment of the infection status of their seminal vesicle in plating assays. The experiment was kept under controlled conditions (25±1°C; 60±10% RH; 14h photophase). Symbionts associated with the spermatheca and the seminal vesicle are naturally associated with newly emerged virgin males and females of *E. heros*. Antibiotic treatments cured almost all males and females, and drastically reduced infection in those that remained infected. Nevertheless, we did not detect changes in female reproductive fitness treated or not, or when mating with treated or untreated males of *E. heros*.

Keywords: Opportunistic symbiont; Adaptative cost; Biological parameters; Host fitness

4.1. Introdução

Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) são comuns em insetos, sendo que a maioria tem efeitos negativos sobre o hospedeiro, como a redução da fertilidade e do número de ovos depositados, além do aumento na mortalidade. Estima-se que a prevalência de DSTs em insetos seja superior a 90% (Knell & Webberley 2004).

As DSTs podem deixar o hospedeiro estéril e alterar suas características fenológicas. DSTs são normalmente associadas a organismos unicelulares, mas há também exemplos de organismos multicelulares que são transmitidos via sexo e afetam a aptidão biológica do hospedeiro. Isto é observado, por exemplo, nas infecções de *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) pelo ácaro *Coccipolipus hippodamiae* (McDaniel & Moril)

(Acari: Podapolipidae), o qual reduz a viabilidade do ovo para menos de 20% quando a fêmea está infectada há mais de dez dias (Hurst *et al.* 1995; Pastok *et al.* 2015). As reduções na fertilidade do hospedeiro associadas à infecção podem ser uma adaptação por parte dos microrganismos patogênicos para desviar recursos que pode usar para reproduzir sem diminuir as habilidades do hospedeiro para atrair parceiros ou reduzir a longevidade, aumentando assim a probabilidade de transmissão. Ainda, as reduções na fertilidade podem ser uma resposta do hospedeiro à infecção, pois os recursos que seriam usados na reprodução são investidos em defesas contra bactérias patogênicas (Hurd 2001).

Simbiontes mutualistas são frequentemente associados à nutrição de insetos. A relação de mutualismo é resultado de processo co-evolutivo de longa duração, o qual exige a transmissão vertical do simbionte, que será, geralmente, intracelular. Porém, há também simbiontes facultativos, dos quais a sobrevivência e reprodução do inseto hospedeiro são independentes, mas que podem influenciar vários aspectos da bioecologia de seus hospedeiros (Klepzig *et al.* 2009; Moran & Dunbar 2006; Ohbayashi *et al.* 2015; White *et al.* 2013).

Muitos simbiontes secundários interferem em inúmeros mecanismos fisiológicos do hospedeiro, refletindo no aumento da aptidão do hospedeiro, incluindo a resistência a altas temperaturas (Montllor *et al.* 2002), o catabolismo de inseticidas (Kikuchi *et al.* 2012a) e a proteção contra patógenos (Scarborough *et al.* 2005) e parasitoides (Oliver *et al.* 2005; Oliver *et al.* 2003). Em percevejos, há modificações na região final do intestino médio, ao longo das criptas, que abrigam bactérias que podem ter níveis distintos de associação com seus hospedeiros, sendo que a sua eliminação pode influenciar negativamente a biologia do hospedeiro (Hayashi *et al.* 2015).

Entretanto, simbiontes facultativos também podem assumir interações patogênicas com seus hospedeiros, como aqueles que induzem doenças sexualmente transmissíveis. Bactérias oportunistas facilmente infectam insetos durante a cópula via abertura genital ou pela realização de cópulas traumáticas (Reinhardt *et al.* 2015; Reinhardt *et al.* 2005), podendo reduzir a aptidão reprodutiva e sobrevivência das fêmeas (Kelly 2011). Simbiontes que infectam o aparelho reprodutor podem levar à redução da viabilidade dos espermatozoides e, consequentemente, da fecundidade e fertilidade, pois fêmeas investem recursos na imunidade e na remoção de espermatozoides danificados (Adamo 1999; Otti *et al.* 2013). Além disso, podem ocorrer modificações nos órgãos reprodutivos, como o alongamento do duto espermático, levando ao isolamento reprodutivo (Marshall 2007).

Embora muitas bactérias associadas a insetos sejam conhecidas por serem transmitidas verticalmente da mãe para a prole, a transmissão sexual de bactérias entre casais

raramente foi relatada em insetos (Knell & Webberley 2004). No caso de *Wolbachia* spp., foi registrada a sua ocorrência nos testículos e ovários de insetos, mas esses simbiontes são transmitidos majoritariamente pelo citoplasma do ovo e não durante o acasalamento (Hoffmann & Turelli 1997). Dessa mesma forma ocorre a transmissão das bactérias *Candidatus* Hamiltonella defensa e *Candidatus* Regiella insecticola no pulgão *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) (Moran & Dunbar 2006) e de bactérias pertencentes ao gênero *Asaia* em mosquitos *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) *(Damiani et al.* 2008). Já a bactéria *Candidatus* Liberibacter asiaticus, transmitida sexualmente por machos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) infectados para as fêmeas durante o acasalamento (Mann *et al.* 2011), trata-se de um patógeno de plantas e não de bactérias livres associados diretamente aos tecidos reprodutivos do inseto.

Bactérias patogênicas possuem potencial para serem utilizadas como agentes de controle de pragas. As DSTs seriam agentes promissores para o controle de pragas a longo prazo, uma vez que possuem o potencial de influenciar a dinâmica da população hospedeira (Zelazny *et al.* 1990). Existem poucos relatos sobre a presença de bactérias livres associadas aos órgãos reprodutivos de insetos (Mann *et al.* 2011; Miest & Bloch-Qazi 2008; Otti *et al.* 2013; Reinhardt *et al.* 2015), sendo inexistentes abordagens sobre o efeito direto de bactérias oportunistas transmitidas sexualmente na aptidão reprodutiva de insetos. Desta forma, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da cópula com machos tratados ou não com antibióticos na reprodução e longevidade de fêmeas de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae).

4.2. Material e métodos

4.2.1. Criação estoque de *Euschistus heros*

A criação estoque de *E. heros* foi estabelecida em laboratório a partir de coleta de adultos na cultura da soja no munícipio de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil (22º16’42”S, 54º49’10”O). Os casais coletados foram individualizados (n= 50) em caixas plásticas (21 x 18 x 18 cm) e alimentados com dieta natural composta de vagens de feijão, sementes de amendoim e girassol. A água foi oferecida em algodão umedecido, o qual era substituído a cada dois dias, assim como o alimento. Como substrato para oviposição, foi utilizado um pedaço de tecido (18 x 5 cm) pendurado na tampa da caixa, sendo as posturas coletadas semanalmente. As posturas eram colocadas em caixa plástica (6 x 12 x 12 cm)

contendo algodão umedecido para evitar a dessecação dos ovos. As ninfas foram alimentadas com a mesma dieta dos adultos e transferidas para caixas maiores (supracitadas), assim que atingiam o quinto ínstar. A criação foi mantida em condições controladas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h).

4.2.2. Simbiontes associados à vesícula seminal e a reprodução de *Euschistus heros*

Machos e fêmeas recém-emergidos, alimentados com vagens de feijão e sementes de amendoim e girassol, receberam 2% da solução comercial de antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) (Gibco - Life Technologies) adicionada à água durante o período de pré-cópula (10 dias). Posteriormente, casais foram individualizados em placas de Petri (90 x 15 mm) de acordo com o tratamento: i) fêmeas e machos tratados com antibiótico (FtMt); ii) fêmeas tratadas com antibiótico e machos não-tratados (FtMnt); iii) fêmeas e machos não-tratados (FntMnt); iv) fêmeas não-tratadas e machos tratados com antibiótico (FntMt).

Os machos de *E. heros* foram removidos e dissecados logo após a cópula para a coleta dos fluídos da vesícula seminal e plaqueamento em meio de cultivo TSA, a fim de verificar o status da infecção e a densidade de bactérias associadas à vesícula seminal. A ocorrência de simbiontes associados à espermateca e vesícula seminal também foi avaliada em fêmeas e machos virgens tratados com antibiótico e não-tratados. As placas permaneceram por 48 h a 28°C para o crescimento de bactérias e, posteriormente, realizada a contagem das unidades formadores de colônia (UFCs).

O efeito dos simbiontes na reprodução foi avaliado comparando-se a capacidade reprodutiva de indivíduos não-tratados àqueles tratados com antibióticos, avaliando-se os parâmetros biológicos de fecundidade (ovos/fêmea), fertilidade (%) e longevidade (dias) de fêmeas. Os dados de fecundidade e de fertilidade foram obtidos ao longo de 30 dias de avaliação. Cada tratamento consistiu de 45 repetições, sendo cada casal considerado uma repetição. O experimento foi mantido em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

4.2.3. Análise estatística

A fecundidade e a viabilidade dos ovos foram analisados por modelos lineares generalizados (MLG), assumindo a distribuição de Poisson e binomial dos dados, respectivamente, com correção para superdispersão. Os dados de longevidade foram comparados pelo teste de log-rank, com os valores de *p* corrigidos pelo método de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no programa *R* (v.3.3.2) (Team 2014).

4.3. Resultados

Simbiontes associados à espermateca e vesícula seminal ocorrem naturalmente em *E. heros*, possivelmente pela sua aquisição por outros mecanismos, e não unicamente pela cópula. Machos e fêmeas virgens apresentaram bactérias associadas à vesícula seminal e espermateca, respectivamente, de 3 a 6 vezes mais do que os indivíduos virgens tratados com solução de antibiótico. Apenas 10 a 20% dos indivíduos tratados permaneceram infectados após o tratamento com antibióticos. Os indivíduos que permaneceram infectados após a alimentação com antibiótico, apresentaram redução de duas vezes na quantidade de unidades formadoras de colônia (UFCs) associadas à vesícula seminal e espermateca (Figura 4.1).

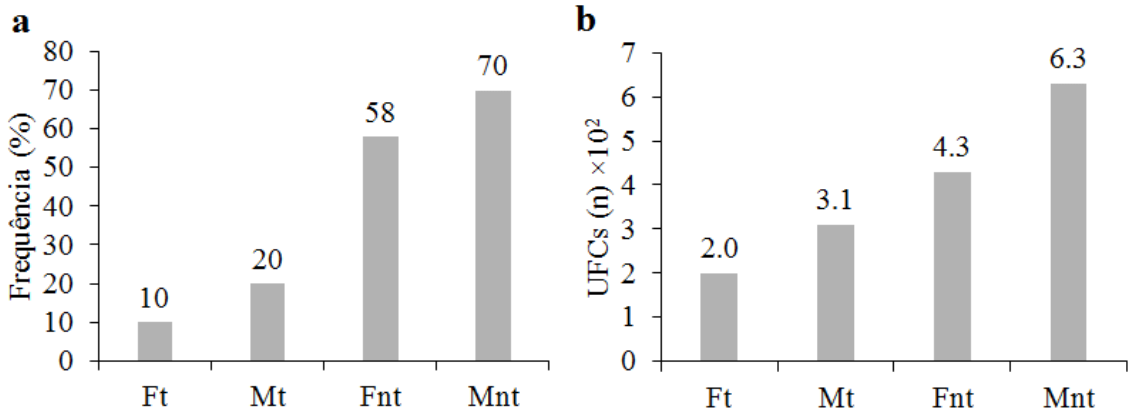

Figura 4.1. Frequência (a) e número de unidades formadoras de colônia (b) associadas à vesícula seminal e espermateca de *Euschistus heros* virgens (Mt/Ft = machos/fêmeas tratados com antibiótico; Mnt/Fnt = machos/fêmeas não-tratados).

A proporção de machos tratados com vesícula seminal infectada após a cópula manteve-se praticamente a mesma daquela obtida para machos virgens tratados, em cópulas realizadas com fêmeas tratadas com antibióticos. No entanto, cópulas com fêmeas não-tratadas, que apresentam 58% de infecção natural da espermateca, levaram à duplicação da

proporção de machos tratados que apresentaram infecção da vesícula seminal após a cópula (Figura 4.2). O número de UFCs em machos após a cópula se manteve praticamente inalterado quando comparado ao respectivo controle, tratado ou não-tratado, independentemente da condição de tratamento da fêmea (Figura 4.2).

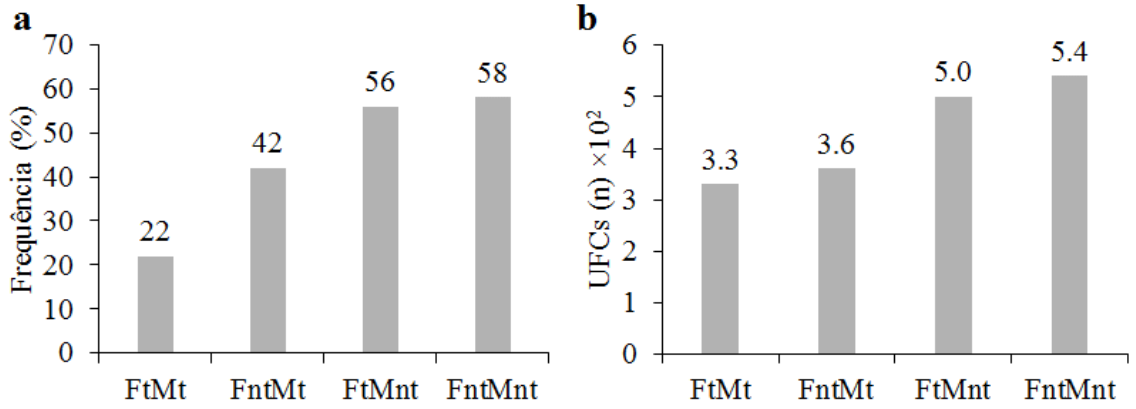

Figura 4.2. Frequência (a) e número de unidades formadoras de colônia (b) associadas à vesícula seminal de *Euschistus heros* pós-cópula (FtMt = fêmeas e machos tratados com antibiótico; FtMnt = fêmeas tratadas e machos não-tratados; FntMnt = fêmeas e machos não-tratados; FntMt = fêmeas não-tratadas e machos tratados).

Os simbiontes associados à vesícula seminal não interferem na capacidade reprodutiva das fêmeas de *E. heros*. A fecundidade, a fertilidade e a longevidade das fêmeas que copularam com machos tratados e não-tratados com a solução de antibióticos foram semelhantes (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1. Fecundidade (número de ovos/fêmea) e fertilidade (%) (x ± EP) de fêmeas de *Euschistus heros* submetidas ou não ao tratamento com antibióticos e acasaladas com machos submetidos ou não ao tratamento com antibióticos. FtMt = fêmeas e machos tratados com antibiótico; FtMnt = fêmeas tratadas e machos não-tratados; FntMnt = fêmeas e machos não-tratados; FntMt = fêmeas não-tratadas e machos tratados (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Tratamento	Fecundidade (n. ovos/fêmea)[1]	Fertilidade (%)[1]
FtMt	94,1 ± 9,2	37,5 ± 6,8
FntMt	80,0 ± 7,8	38,6 ± 6,9
FtMnt	98,6 ± 7,7	34,4 ± 7,0
FntMnt	94,3 ± 7,1	34,5 ± 5,7
F	$F_{3,176} = 1,12$	$F_{3,164} = 1,02$
p	0,34	0,38

[1] Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4.2. Longevidade (dias) (x ± EP) de fêmeas de *Euschistus heros* submetidas ou não ao tratamento com antibióticos e acasaladas com machos submetidos ou não ao tratamento com antibióticos. FtMt = fêmeas e machos tratados com antibiótico; FtMnt = fêmeas tratadas e machos não-tratados; FntMnt = fêmeas e machos não-tratados; FntMt = fêmeas não-tratadas e machos tratados (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Tratamento	Longevidade (dias)[1]
FtMt	61,8 ± 5,0
FntMt	53,8 ± 4,2
FtMnt	67,7 ± 4,6
FntMnt	62,4 ± 3,8
gl (n)	3 (45)
χ^2	6
p	0,11

[1] Teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.4. Discussão

A diversidade de simbiontes associados à vesícula seminal é extremamente baixa, visto que estudos conduzidos anteriormente revelaram a presença de apenas dois filotipos neste tecido. A solução de antibiótico-antimicótico utilizada para eliminar essas bactérias mostrou-se bem eficiente, eliminando quase a totalidade do número de infecções de bactérias associadas à vesícula seminal. Verifica-se uma ampla ocorrência dos simbiontes, tendo em vista que não são exclusivos desta estrutura e ocorrem também na região V4 do intestino médio de machos e fêmeas, espermateca e ovários (capítulo 2). Esse fato pode contribuir para a infecção da genitália de *E. heros* a partir da contaminação da mesma durante a defecação, uma vez que o trato digestivo é morfologicamente muito próximo ao aparelho reprodutivo. Situação semelhante ocorre na espermateca.

A ocorrência de bactérias associadas à espermateca e vesícula seminal em insetos virgens e sem receber tratamento com antibiótico é um indicativo que essas bactérias ocorrem naturalmente em *E. heros*, sendo transmitidas para o aparelho reprodutivo por outros mecanismos além da cópula (Knell & Webberley 2004), incluindo a possibilidade de infecção pela aquisição de bactérias presentes no intestino, ou ainda, durante o desenvolvimento ninfal.

A reprodução de fêmeas tratadas ou não-tratadas, quando copuladas com machos tratados ou não com antibióticos, não resultou em qualquer efeito na aptidão reprodutiva de fêmeas, indicando que a existência de infecção na espermateca ou na vesícula seminal não afeta os parâmetros reprodutivos avaliados, sugerindo que essa associação de simbiose não seja essencial ao hospedeiro e nem patogênica, uma vez que a transmissão de DSTs influenciaria negativamente nos parâmetros biológicos reprodutivos. A transmissão da

bactéria entomopatogênica *Serratia marcescens* a partir de machos infectados para as fêmeas durante o acasalamento em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), resulta na infecção e mortalidade de fêmeas (Miest & Bloch-Qazi 2008).

Além disso, não há dados sobre a prevalência de bactérias patogênicas associadas às estruturas reprodutivas em populações de insetos. Se a densidade desses microrganismos for baixa, o custo para mantê-las também será. A redução na fertilidade do hospedeiro associada à infecção pode ser uma adaptação por parte dos microrganismos patogênicos para desviar recursos para sua multiplicação sem que haja efeito nocivo aos atributos biológicos do hospedeiro, aumentando assim a probabilidade de sua transmissão. Ainda, reduções na fertilidade podem ser uma resposta do hospedeiro à infecção, pois os recursos que seriam usados na reprodução são investidos em defesas contra bactérias patogênicas (Hurd 2001; Knell & Webberley 2004).

Neste estudo há indícios de que fêmeas infectadas possam contaminar machos durante a cópula, mas não foi avaliado a transmissão bacteriana de machos infectados para as fêmeas. Em algumas espécies de inseto, esse fato pode ser atribuído à produção de proteínas com propriedades antimicrobianas, assim como ocorre em *Drosophila melanogaster*, a andropina (Lung *et al.* 2001). Esta molécula é formada nos testículos e passada para fêmeas durante o acasalamento para evitar a degradação do esperma (Knell & Webberley 2004; Lung *et al.* 2001). De forma semelhante, machos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) possuem moléculas antimicrobianas eficientes no fluído seminal, que são capazes de matar os esporos do fungo *Nosema apis* e, assim, reduzir o risco de transmissão da doença durante o acasalamento (Peng *et al.* 2016). No entanto, a andropina não foi encontrada no fluído seminal do percevejo *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae), mas identificou-se a produção de lisozimas bacteriolíticas para a proteção do espermatozoide (Otti *et al.* 2009). Tendo em vista a ocorrência natural de simbiontes associados à espermateca e vesícula seminal de *E. heros*, é possível que neste pentatomídeo não ocorra a produção de compostos com atividade antimicrobiana ou ainda, que as bactérias que infectam a vesícula seminal são resistentes aos compostos com atividade microbiana produzidos pelo inseto. Além disso, a presença desses compostos podem garantir a manutenção de níveis de infecção que não levam à produção de quadros patológicos.

A associação de bactérias com o aparelho reprodutivo de percevejos precisa ser melhor investigada. Tendo em vista de que são endossimbiontes facilmente cultivados, a manipulação desses microrganismos poderia ser uma alternativa promissora para o controle de pragas. Para tanto, há necessidade de entender a distribuição de endossimbiontes

facultativos na natureza e de estudar a dinâmica de transmissão dos mesmos, considerando quais os custos adaptativos envolvidos nessa associação e na interação com outros endosimbiontes.

4.5. Conclusão

Simbiontes associados à espermateca e à vesícula seminal ocorrem naturalmente em populações de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) e a sua eliminação não afeta a capacidade reprodutiva e a longevidade de fêmeas.

Referências

Adamo SA (1999) Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* **57**, 117-124.

Damiani C, Ricci I, Crotti E, *et al.* (2008) Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Current Biology* **18**, R1087-R1088.

Hayashi T, Hosokawa T, Meng X-Y, Koga R, Fukatsu T (2015) Female-specific specialization of a posterior end region of the midgut symbiotic organ in *Plautia splendens* and allied stinkbugs. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 2603-2611.

Hoffmann AA, Turelli M (1997) Cytoplasmic incompatibility in insects.

Hurd H (2001) Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends in Parasitology* **17**, 363-368.

Hurst GD, Sharpe RG, Broomfield AH, *et al.* (1995) Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. *Ecological Entomology* **20**, 230-236.

Kelly CD (2011) Reproductive and physiological costs of repeated immune challenges in female *Wellington tree weta* (Orthoptera: Anostostomatidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **104**, 38-46.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, *et al.* (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8618-8622.

Klepzig KD, Adams A, Handelsman J, Raffa K (2009) Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology* **38**, 67-77.

Knell RJ, Webberley KM (2004) Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews* **79**, 557-581.

Lung O, Kuo L, Wolfner M (2001) *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *Journal of Insect Physiology* **47**, 617-622.

Marshall JL (2007) Rapid evolution of spermathecal duct length in the *Allonemobius socius* complex of crickets: species, population and *Wolbachia* effects. *PLoS One* **2**, 1-7.

Mann RS, Pelz-Stelinski K, Hermann SL, Tiwari S, Stelinski LL (2011) Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS One* **6**, 1-8.

Miest TS, Bloch-Qazi MC (2008) Sick of mating: sexual transmission of a pathogenic bacterium in *Drosophila melanogaster*. *Fly* **2**, 215-219.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-195.

Moran NA, Dunbar HE (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12803-12806.

Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, *et al.* (2015) Insect's intestinal organ for symbiont sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E5179-E5188.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12795-12800.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1803-1807.

Otti O, McTighe AP, Reinhardt K (2013) In vitro antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Functional Ecology* **27**, 219-226.

Otti O, Naylor RA, Siva-Jothy MT, Reinhardt K (2009) Bacteriolytic activity in the ejaculate of an insect. *The American Naturalist* **174**, 292-295.

Pastok D, Hoare MJ, Ryder JJ, *et al.* (2015) The role of host phenology in determining the incidence of an insect sexually transmitted infection. *Oikos* **125**, 636-643.

Peng Y, Grassl J, Millar AH, Baer B (2016) Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. In: *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **283**, 1-9.

Reinhardt K, Anthes N, Lange R (2015) Copulatory wounding and traumatic insemination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, 1-26.

Reinhardt K, Naylor RA, Siva-Jothy MT (2005) Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect. *Ecological Entomology* **30**, 607-611.

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray H (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**, 1781-1781.

Team RC (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

Zelazny B, Lolong A, Crawford A (1990) Introduction and field comparison of baculovirus strains against *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarahaeidae) in the Maldives. *Environmental Entomology* **19**, 1115-1121.

White JA, Giorgini M, Strand MR, Pennacchio F (2013) Arthropod endosymbiosis and evolution. In: *Arthropod Biology and Evolution* **1**, 441-477. Springer.

5. SIMBIONTES E O DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DE *Euschistus heros*

Resumo

Diversas bactérias simbiontes estão associadas ao trato digestivo de percevejos fitófagos de forma mutualista. Esse tipo de associação gera custos adaptativos para ambos os organismos envolvidos, inseto hospedeiro e bactéria simbionte, a fim de garantir sua sobrevivência, uma vez que a eliminação dos simbiontes resulta em efeitos negativos na aptidão do inseto hospedeiro, como crescimento retardado, mortalidade elevada, anomalias morfológicas e redução da prole. O percevejo *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), uma praga que ataca diversas culturas, possui invaginações na região final do intestino médio, onde estão localizados os simbiontes. No entanto, ainda não foram esclarecidos quais os custos adaptativos envolvidos nessa associação. Assim, este estudo teve por objetivo verificar a função de bactérias simbiontes no desenvolvimento e reprodução de *E. heros*. Para isso, machos e fêmeas recém-emergidos receberam solução de antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) durante 10 dias (pré-cópula), antes de ser permitida sua reprodução, seguindo os tratamentos: i) fêmeas e machos tratados com antibiótico (FtMt); ii) fêmeas tratadas com antibiótico e machos não-tratados (FtMnt); iii) fêmeas e machos não-tratados (FntMnt); iv) fêmeas não-tratadas e machos tratados com antibiótico (FntMt). Uma parte dos ovos obtidos para cada tratamento foi submetida a esterilização superficial com hipoclorito de sódio, e a outra parte recebeu tratamento superficial apenas com água. Os adultos recém-emergidos foram utilizados para a montagem de novos casais para a avaliação dos aspectos reprodutivos. Durante o desenvolvimento desses percevejos, avaliou-se a duração e sobrevivência do período ninfal, a fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos, levando em consideração o tratamento dos pais (FtMt, FtMnt, FntMnt e FntMt) e o procedimento de esterilização dos ovos (água ou hipoclorito). A esterilização da superfície do ovo não interferiu no desenvolvimento ninfal de *E. heros*. O tratamento dos casais com antibiótico resultou na redução da fertilidade e no aumento da mortalidade de ninfas.

Palavras-chave: Custo adaptativo; Transmissão vertical; Criptas; Reprodução

Abstract

Several symbiotic bacteria are associated with the digestive tract of phytophagous stinkbugs in a mutualistic way. This kind of association generates adaptive costs for both organisms involved, host insect and symbiotic bacteria, in order to guarantee their survival, since the elimination of symbionts results in negative effects on the host insect's ability, such as delayed growth, high mortality, morphological anomalies and offspring reduction. The stinkbug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), a pest that attacks various crops, has invaginations in the final region of the midgut, where symbionts are located.

However, the adaptive costs involved in this association have not yet been clarified. Thus, this study aimed to verify the role of symbiotic bacteria in the development and reproduction of *E. heros*. Newly emerged males and females were treated with an antibiotic-antimycotic solution (10,000 units/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin sulphate and 25 mg/mL amphotericin B) for 10 days (pre-copula), before being allowed to reproduce, according to the treatments: i) females and males treated with antibiotic (FtMt); ii) female treated with antibiotic and untreated males (FtMnt); iii) untreated females and males (FntMnt); iv) untreated and male treated with antibiotic (FntMt). A part of the eggs obtained from each treatment was subjected to surface sterilization with sodium hypochlorite, and the other part received surface treatment with only water, and their immature development was followed. Newly emerged adults were used for the evaluation of their reproductive traits. The following parameters were assessed: duration and survival of the nymphal period, fecundity, fertility and longevity of adults, taking into account their parents' treatment (FtMt, FtMnt, FntMnt and FntMt) and egg sterilization procedure (water or hypochlorite). Sterilization of the egg surface did not interfere with ninfal development of *E. heros*. Lower fertility and increased mortality of nymphs were observed for couples in which males and females were treated with antibiotics.

Keywords: Adaptative cost; Vertical transmission; Crypts; Reproduction

5.1. Introdução

Parte do sucesso na diversidade dos insetos se deve às associações de simbiose que estabeleceram com microrganismos em sua história evolutiva (Douglas 2009). Através dessas associações, os insetos conseguiram desenvolver novas funções metabólicas e ocupar novos nichos ecológicos, uma vez que insetos passaram a ter supridas as suas deficiências pela complementação proporcionada pelas vias metabólicas das bactérias (Hosokawa *et al.* 2016a).

Percevejos fitófagos das infraordens Cimicomorpha e Pentatomomorpha possuem invaginações na porção posterior do intestino médio, região essa denominada de quarto ventrículo (V4), adaptada a abrigar microbiota abundante (Kikuchi *et al.* 2008; Salem *et al.* 2015). As bactérias que habitam o V4 podem ser transmitidas para a prole por dois mecanismos, horizontal e vertical. No primeiro, as bactérias são adquiridas do ambiente a cada nova geração, enquanto no segundo, os simbiontes são liberados sobre a superfície coriônica dos ovos ou contidos em pellets fecais depositados junto às posturas, os quais são explorados pela prole para estabelecer a transmissão vertical do simbionte (Hosokawa *et al.* 2016b; Kikuchi *et al.* 2008).

A eliminação de simbiontes associados ao aparelho digestivo do percevejo hospedeiro produziu diversos efeitos negativos na aptidão do inseto, como crescimento retardado, mortalidade elevada, anomalias morfológicas e redução da prole, indicando a importância biológica desta simbiose (Hosokawa *et al.* 2013; Hosokawa *et al.* 2016a; Kaiwa *et al.* 2011; Kaiwa *et al.* 2014; Karamipour *et al.* 2016; Prado & Almeida 2009a; Tada *et al.* 2011).

A importância das bactérias simbiontes para os percevejos hospedeiros é diferente entre os táxons. Em Pentatomoidea, a função desses simbiontes intestinais tem sido associada à suplementação de aminoácidos, como foi demonstrado para Urostylididae, Pentatomidae e Plataspidae (Kaiwa *et al.* 2014; Kenyon *et al.* 2015; Nikoh *et al.* 2011). Em Parastrachiidae, os simbiontes auxiliam na ciclagem do nitrogênio reciclando o ácido úrico armazenado para sustentar o metabolismo durante longos períodos de diapausa (Kashima *et al.* 2006). Em Alydidae (Coreoidea), *Burkholderia*, os simbiontes associados ao V4 desses percevejos, interferem na resposta imunológica do hospedeiro (Kim *et al.* 2015) e auxiliam na degradação do inseticida fenitrotion (Kikuchi *et al.* 2012); mas sua função primária permanece desconhecida. Já os percevejos da família Pyrrhocoridae estão associados a duas espécies obrigatórias de actinobactérias, *Coriobacterium glomerans* e *Gordonibacter* sp., as quais suplementam a nutrição de seus hospedeiros fornecendo vitaminas do complexo B (Kaltenpoth *et al.* 2009; Salem *et al.* 2014; Salem *et al.* 2013; Sudakaran *et al.* 2012).

Considerando a alta prevalência de simbiontes na região V4 do intestino médio de pentatomídeos e que o efeito aos hospedeiros ainda geram questionamentos, este estudo teve por objetivo verificar a função dessas bactérias no desenvolvimento e reprodução de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae).

5.2. Material e métodos

5.2.1. Criação estoque de *Euschistus heros*

A colônia estoque de *E. heros* foi iniciada com a coleta de adultos em lavoura de soja no munícipio de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil (22º16’42”S, 54º49’10”O). Os adultos obtidos foram utilizados para a formação de casais (n = 50) isolados em caixas plásticas (21 x 18 x 18 cm) para alimentação e reprodução. Os adultos foram alimentados com vagens de feijão, sementes de amendoim e girassol, sendo oferecida água em algodão umedecido. No interior das caixas foi adicionado um pedaço de tecido (18 x 5 cm) pendurado na tampa da

caixa para servir de substrato de postura. Os ovos eram coletados semanalmente e colocados em caixas plásticas (6 x 12 x 12 cm) contendo algodão umedecido para evitar a sua dessecação, e os imaturos obtidos alimentados de forma análoga aos adultos coletados no campo. As ninfas foram mantidas nesses recipientes até atingirem o quinto ínstar, quando foram transferidas para o mesmo recipiente utilizado para a manutenção dos adultos. Os insetos foram mantidos em condições controladas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h), sendo o alimento e a água substituídos a cada dois dias.

5.2.2. Efeito do tratamento conjugado pela alimentação de adultos com antibióticos e esterilização superficial dos ovos no desenvolvimento e reprodução de *Euschistus heros*

Logo após a emergência, machos e fêmeas de *E. heros* alimentados com vagens de feijão e sementes de amendoim e girassol, receberam 2% de solução comercial antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina G, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 mg/mL anfotericina B) (Gibco - Life Technologies) adicionada à água durante o período de pré-cópula (10 dias). Para os insetos controle foi oferecida apenas água. Após o período de acesso ao antibiótico, os adultos foram utilizados para a formação de casais individualizados em placas de Petri (90 x 15 mm), seguindo os seguintes tratamentos: i) fêmeas e machos tratados com antibiótico (FtMt); ii) fêmeas tratadas com antibiótico e machos não-tratados (FtMnt); iii) fêmeas e machos não-tratados (FntMnt); iv) fêmeas não-tratadas e machos tratados com antibiótico (FntMt). Os adultos foram alimentados e mantidos em condições controladas, assim como descrito anteriormente, avaliando-se a fecundidade, fertilidadae e longevidade dos adultos submetidos a esses diferentes tratamentos.

Os ovos obtidos foram coletados e subdivididos em dois grupos para cada um dos tratamentos realizados (FtMt, FtMnt, FntMnt e FntMt). Uma parte dos ovos foi submetida a esterilização superficial com 2% de solução comercial de hipoclorito de sódio por 2 minutos, enquanto a outra parte recebeu tratamento superficial apenas com água. Posteriormente, os ovos foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo papel absorvente no fundo, onde permaneceram até a eclosão das ninfas. As ninfas assim obtidas foram alimentadas como descrito anteriormente e mantidas nas mesmas condições de criação já descritas, até a emergência de adultos. Adultos recém-emergidos foram individualizados por sexo e utilizados para a montagem de novos casais para a avaliação de atributos reprodutivos dos adultos.

Foram avaliadas a duração e mortalidade do período ninfal, a fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos, levando em consideração o tratamento realizado nos parentais (FtMt, FtMnt, FntMnt e FntMt) e o procedimento de esterilização ou não dos ovos (água ou hipoclorito). Dados de fecundidade e de fertilidade foram obtidos durante 10 dias de avaliação. Para a mortalidade de ninfas, foram considerados 200 indivíduos por tratamento.

5.2.3. Análise estatística

Dados de fecundidade (número de ovos/fêmea) e viabilidade de ovos (fertilidade) foram analisados pelo uso de modelos lineares generalizados (MLG), assumindo, respectivamente, distribuição de Poisson e binomial, com correção para superdispersão. A mortalidade de ninfas foi analisada pelo uso de modelos lineares generalizados (MLG), assumindo distribuição binomial. Os dados de longevidade foram comparados pelo teste log-rank, com os valores de *p* corrigidos pelo método de Bonferroni. A duração do período ninfal também foi analisada utilizando-se de modelos lineares generalizados (MLG), assumindo distribuição de Poisson e utilizando-se da correção dos dados para superdispersão, sendo os valores médios comparados pelo teste log-rank, com os valores de *p* corrigidos pelo método de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no programa *R* (v.3.3.2) (Team 2014).

5.3. Resultados

A longevidade de adultos de *E. heros* tratados ou não com antibióticos durante o período de pré-cópula não foi afetada, independentemente do tratamento ao qual o parceiro foi submetido (χ^2 = 1,0972; *gl* = 3; *p* = 0,778) e sexo (χ^2 = 1,1725; *gl* = 1; *p* = 0,279). Fêmeas e machos sobreviveram, respectivamente, por 42 dias e 45 dias (Tabela 5.1)

Tabela 5.1. Longevidade de adultos (dias) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Longevidade (dias)[1]	
	Macho	Fêmea
FtMt	43,2 ± 2,9	42,9 ± 2,9
FntMt	46,1 ± 3,0	37,1 ± 2,9
FtMnt	43,8 ± 2,6	46,2 ± 3,2
FntMnt	46,6 ± 2,8	40,0 ± 2,7

[1] Teste de Tukey (*p* > 0,05).

Também não houve efeito do tratamento com antibiótico ($F_{3,302}$ = 0,2011; p = 0,8956) ou da esterilização superficial dos ovos ($F_{3,300}$ = 0,755; p = 0,3856) na fecundidade das fêmeas, que apresentaram fecundidade média de 40 ovos/fêmea (Tabela 5.2). A fertilidade das fêmeas não foi influenciada pela esterilização superficial dos ovos ($F_{3,177}$ = -28,031; p = 0,1224), mas foi influenciada pelo tratamento com antibióticos ($F_{3,179}$ = 5,4596; p < 0,0013) (Tabela 5.3).

Tabela 5.2. Fecundidade (número de ovos/fêmea) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Fecundidade (n. ovos/fêmea)[1]	
	Água	Hipoclorito
FtMt	39,8 ± 4,2	42,4 ± 4,4
FntMt	38,3 ± 5,5	41,5 ± 5,5
FtMnt	40,0 ± 3,6	39,5 ± 3,4
FntMnt	37,8 ± 3,6	41,5 ± 3,6

[1] Teste de Tukey (p > 0,05).

Tabela 5.3. Fertilidade (%) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Fertilidade (%)[1]
FtMt	39,9 ± 4,9 ab
FntMt	50,7 ± 6,1 a
FtMnt	34,0 ± 4,5 b
FntMnt	43,1 ± 5,7 a

[1] Teste de Tukey (p > 0,05).

A duração do período ninfal não foi afetada pela esterilização superficial dos ovos (χ^2 = 0,0752; gl = 1; p = 0,784) ou pelo tratamento com antibióticos (χ^2 = 2,6348; gl = 3; p = 0,451), sendo, em média de 19 dias (Tabela 5.4). Porém, a mortalidade ninfal sofreu influência da interação dos fatores testados, alimentação com antibióticos e esterilização superficial dos ovos (χ^2 = 14,726; gl = 3; p < 0,05) (Tabela 5.5).

Tabela 5.4. Duração do período ninfal (dias) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Duração do período ninfal (dias) [1]	
	Água	Hipoclorito
FtMt	15,6 ± 0,6	18,6 ± 0,6
FntMt	20,0 ± 0,5	18,7 ± 0,5
FtMnt	19,4 ± 0,5	17,6 ± 0,6
FntMnt	20,5 ± 0,4	18,8 ± 0,5

[1] Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 5.5. Mortalidade de ninfas (%) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais/Esterilização dos ovos	Mortalidade de ninfas (%)[1]
FtMt * Água	66,6 ± 3,4 a
FtMnt * Água	39,0 ± 3,5 c
FntMt * Água	34,5 ± 3,4 c
FntMnt * Água	30,0 ± 3,2 c
FtMt * Hipoclorito	55,5 ± 3,5 ab
FtMnt * Hipoclorito	51,0 ± 3,5 b
FntMt * Hipoclorito	44,0 ± 3,5 c
FntMnt * Hipoclorito	41,5 ± 3,5 c

[1] Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O tratamento com antibióticos ($\chi^2 = 1,257$; $gl = 1$; $p = 0,262$) e a esterilização superficial dos ovos ($\chi^2 = 2,075$; $gl = 3$; $p = 0,557$) não tiveram efeito significativo na longevidade dos adultos da geração filial, mas, no geral, fêmeas (43 dias) foram mais longevas que machos (36 dias) ($\chi^2 = 12,26$; $gl = 1$; $p < 0,001$) (Tabela 5.6). A fecundidade desses adultos também não sofreu efeito da alimentação dos parentais com antibióticos ($F_{3,315} = 0,105$; $p = 0,9571$) ou da esterilização superficial dos ovos ($F_{3,313} = 0,4341$; $p = 0,5105$) (Tabela 5.7). No entanto, a fertilidade das fêmeas oriundas de pais alimentados com antibióticos e ovos esterilizados superficialmente foi influenciada pela interação dos fatores estudados ($F_{3,312} = 2,892$; $p < 0,05$) (Tabela 5.8).

Tabela 5.6. Longevidade (dias) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados cujos e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

	Longevidade (dias) [1]			
	Água		Hipoclorito	
Tratamento	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
FtMt	40,4 ± 2,8	41,5 ± 2,9	34,0 ± 3,0	35,0 ± 2,5
FntMt	35,1 ± 2,5	50,7 ± 7,6	37,4 ± 2,6	40,6 ± 2,5
FtMnt	38,8 ± 3,0	47,5 ± 2,3	36,4 ± 2,5	45,0 ± 2,1
FntMnt	33,7 ± 2,6	40,9 ± 2,5	35,5 ± 2,7	46,3 ± 2,5

[1] Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 5.7. Fecundidade (número de ovos/fêmea) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados cujos e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Fecundidade (n. ovos/fêmea)[1]	
	Água	Hipoclorito
FtMt	79,6 ± 5,2	77,8 ± 4,9
FntMt	75,6 ± 3,6	80,1 ± 4,0
FtMnt	78,9 ± 3,7	80,8 ± 3,7
FntMnt	76,4 ± 4,2	79,4 ± 4,3

[1] Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 5.8. Fertilidade (%) (x±EP) de *Euschistus heros* tratados com antibiótico e não-tratados cujos e ovos esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas).

Casais	Fertilidade (%)[1]
FtMt * Água	74,3 ± 3,1 c
FtMnt * Água	75,9 ± 3,2 b
FntMt * Água	73,1 ± 2,8 cd
FntMnt * Água	68,3 ± 3,5 e
FtMt * Hipoclorito	75,5 ± 2,6 bc
FtMnt * Hipoclorito	75,3 ± 2,7 bc
FntMt * Hipoclorito	70,6 ± 3,4 d
FntMnt * Hipoclorito	82,4 ± 1,8 a

[1] Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4. Discussão

A esterilização da superfície do ovo para verificar a função dos simbiontes geralmente resulta em menor fecundidade e longevidade do inseto hospedeiro em comparação aos insetos que não recebem o tratamento, indicando um papel essencial dessas bactérias no hospedeiro (Hosokawa *et al.* 2016a; Kaiwa *et al.* 2011). Muitas vezes, a esterilização da

superfície coriônica, não elimina totalmente os simbiontes, mas contribui para reduzir drasticamente a densidade de bactérias quando comparado com os ovos sem tratamento (controle) (Karamipour *et al.* 2016). Neste estudo, a esterilização dos ovos com solução 2% hipoclorito de sódio durante 2 min não interferiu diretamente nos parâmetros biológicos avaliados.

O tratamento com antibiótico e a sua interação com a esterilização dos ovos mostraram-se importantes para a fertilidade e sobrevivência das ninfas de *E. heros*. Isso pode ser decorrente da eliminação das bactérias intestinais, assim como demonstrado em outros insetos, tais como Pentatomidae (Bansal *et al.* 2014; Bistolas *et al.* 2014; Hirose *et al.* 2006; Hosokawa *et al.* 2016a; Prado & Almeida 2009b; Tada *et al.* 2011), Scutelleridae (Kafil *et al.* 2013; Kaiwa *et al.* 2010, 2011), Cydnidae (Hosokawa *et al.* 2013), Plataspidae (Fukatsu & Hosokawa 2002; Hosokawa *et al.* 2006; Tada *et al.* 2011), Acanthosomatidae (Kikuchi *et al.* 2009), Parastrachiidae (Hosokawa *et al.* 2012) e Urostylididae (Kaiwa *et al.* 2014).

Os simbiontes associados ao trato digestivo de *E. heros* podem ser transmitidos verticalmente para a prole por outros mecanismos que não a contaminação da superfície coriônica, mas sim via transovariana, por exemplo. Isso fica bem exemplificado pela elevada mortalidade de ninfas nos tratamentos em que o casal é tratado com antibiótico, independentemente da esterilização dos ovos. Bactérias simbiontes transmitidas via transovariana geralmente estão associadas à nutrição do hospedeiro, fornecendo-lhes aminoácidos essenciais, vitaminas e outros nutrientes deficientes na dieta. Assim, os simbiontes de *E. heros* também poderiam desempenhar um papel nutricional. Porém, tanto na manutenção da criação estoque quanto durante a condução do experimento, *E. heros* foi alimentado com vagens de feijão e sementes de amendoim e girassol, que são alimentos ricos em proteínas e, por isso, o fornecimento de aminoácidos pelo simbionte pode ter sido irrelevante. No campo, ninfas e adultos de *E. heros* são encontrados sugando hastes e sementes (quando presentes) de plantas bem menos nutritivas do que a dieta oferecida em laboratório. Com base no fato de que a seiva da planta é geralmente desprovida de aminoácidos essenciais e algumas vitaminas (Douglas 2009), o simbionte do intestino médio provavelmente compensa a deficiência nutricional da dieta, como *Candidatus* Tachikawaea gelatinosa faz para os percevejos hospedeiros da família Urostylididae (Kaiwa *et al.* 2014). Além disso, considerando que uma variedade de papéis biológicos diferentes dos nutricionais são atribuídos a bactérias simbiontes facultativas de diversos insetos (Oliver *et al.* 2010), e que muitos percevejos abrigam no intestino não apenas os simbiontes obrigatórios, mas também facultativos como *Wolbachia*, *Sodalis*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Lariskella* e outros

(Hosokawa *et al.* 2015; Kikuchi & Fukatsu 2003; Matsuura *et al.* 2014; Matsuura *et al.* 2012), a possibilidade de funções não nutricionais da microbiota intestinal também deve ser considerada.

Uma perspectiva interessante deste estudo é o fato de que os aspectos reprodutivos dos adultos parecem suportar os efeitos dos tratamento realizados ainda na geração parental. O fato dos adultos não terem sido tratados novamente com antibiótico e nem os seus ovos terem sido esterilizados, sendo avaliados apenas os efeitos residuais, mostra evidências ainda mais significativas da transmissão transovariana de algumas bactérias; no entanto, alguns grupos de simbiontes intestinais podem ser substituídos por outras bactérias presentes no ambiente, a exemplo do que ocorre com *Pantoea* em *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae) (Duron & Noël 2016; Hosokawa *et al.* 2016a).

5.5. Conclusão

A esterilização da superfície do ovo com hipoclorito de sódio não interfere no desenvolvimento ninfal de *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae).

O tratamento dos casais com antibiótico reduz a fertilidade e aumenta a mortalidade de ninfas.

Referências

Bansal R, Michel AP, Sabree ZL (2014) The crypt-dwelling primary bacterial symbiont of the polyphagous pentatomid pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* **43**, 617-625.

Bistolas KS, Sakamoto RI, Fernandes JA, Goffredi SK (2014) Symbiont polyphyly, co-evolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. *Frontiers in Microbiology* **5**, 349.

Douglas AE (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* **23**, 38-47.

Duron O, Noël V (2016) A wide diversity of *Pantoea* lineages are engaged in mutualistic symbiosis and cospeciation processes with stinkbugs. *Environmental Microbiology Reports* **8**, 715-727.

Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 389-396.

Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ, Aldrich JR (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* **99**, 91-95.

Hosokawa T, Matsuura Y, Kikuchi Y, Fukatsu T (2016b) Recurrent evolution of gut symbiotic bacteria in pentatomid stinkbugs. *Zoological Letters* **2**, 24.

Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, *et al.* (2016a) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nature Microbiology* **1**, 15011.

Hosokawa T, Kaiwa N, Matsuura Y, Kikuchi Y, Fukatsu T (2015) Infection prevalence of *Sodalis* symbionts among stinkbugs. *Zoological Letters* **1**, 5.

Hosokawa T, Hironaka M, Inadomi K, *et al.* (2013) Diverse strategies for vertical symbiont transmission among subsocial stinkbugs. *PLoS One* **8**, 1-8.

Hosokawa T, Hironaka M, Mukai H, *et al.* (2012) Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal Behaviour* **83**, 293-300.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol* **4**, 1841-1851.

Kafil M, Bandani AR, Kaltenpoth M, Goldansaz SH, Alavi SM (2013) Role of symbiotic bacteria in the growth and development of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Journal of Insect Science* **13**, 1-12.

Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2014) Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Current Biology* **24**, 2465-2470.

Kaiwa N, Hosokawa T, Kikuchi Y, *et al.* (2011) Bacterial symbionts of the giant jewel stinkbug *Eucorysses grandis* (Hemiptera: Scutelleridae). *Zoological Science* **28**, 169-174.

Kaiwa N, Hosokawa T, Kikuchi Y, *et al.* (2010) Primary gut symbiont and secondary, *Sodalis*-allied symbiont of the scutellerid stinkbug *Cantao ocellatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3486-3494.

Kaltenpoth M, Winter SA, Kleinhammer A (2009) Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. *FEMS Microbiology Ecology* **69**, 373-383.

Karamipour N, Mehrabadi M, Fathipour Y (2016) *Gammaproteobacteria* as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Scientific Reports* **6**, 1-12.

Kashima T, Nakamura T, Tojo S (2006) Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. *Journal of Insect Physiology* **52**, 816-825.

Kenyon LJ, Meulia T, Sabree ZL (2015) Habitat visualization and genomic analysis of "*Candidatus* Pantoea carbekii," the primary symbiont of the brown marmorated stink bug. *Genome Biology and Evolution* **7**, 620-635.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, *et al.* (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8618-8622.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *Bmc Biology* **7**, 2.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T (2008) Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. *Microbial Ecology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers 39-63.

Kikuchi Y, Fukatsu T (2003) Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6082-6090.

Kim JK, Lee JB, Huh YR, *et al.* (2015) *Burkholderia* gut symbionts enhance the innate immunity of host *Riptortus pedestris*. *Developmental & Comparative Immunology* **53**, 265-269.

Matsuura Y, Hosokawa T, Serracin M, *et al.* (2014) Bacterial symbionts of a devastating coffee plant pest, the stinkbug *Antestiopsis thunbergii* (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 3769-3775.

Matsuura Y, Kikuchi Y, Meng XY, Koga R, Fukatsu T (2012) Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4149-4156.

Nikoh N, Hosokawa T, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T (2011) Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. *Genome Biology and Evolution* **3**, 702-714.

Prado SS, Almeida RP (2009b) Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**, 21-29.

Prado SS, Almeida RP (2009a) Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. *Current Microbiology* **58**, 64-69.

Salem H, Florez L, Gerardo N, Kaltenpoth M (2015) An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **282**, 20142957.

Salem H, Bauer E, Strauss AS, *et al.* (2014) Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **281**, 1-10.

Salem H, Kreutzer E, Sudakaran S, Kaltenpoth M (2013) *Actinobacteria* as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental Microbiology* **15**, 1956-1968.

Sudakaran S, Salem H, Kost C, Kaltenpoth M (2012) Geographical and ecological stability of the symbiotic midgut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology* **21**, 6134-6151.

Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology* **55**, 247-266.

Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, *et al.* (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* **46**, 483.

Team RC (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Euschistus heros apresenta microbiota diversifica associada ao intestino e às estruturas reprodutivas. No caso da região V4 do intestino, ficou claro que as bactérias mais abundantes nessa região, assim como determinado em estudo de metagenômica, não são cultiváveis nos meios de cultivo testados nesse trabalho. Estudos de metagenômica também reveleram que as diferentes regiões do trato digestivo apresentam comunidade característica, apesar do compartilhamento de membros dessa comunidade. Análises da microbiota associada a embriões de *E. heros* também revelaram que os simbiontes associados às regiões V3 e V4 estão associados ao embrião, demonstrando que essas bactérias são transmitidas transovarianamente ao invés de serem adquiridas pela alimentação da superfície do córion, assim como relatado para muitos pentatomídeos. A aquisição desses simbiontes via transmissão transovariana foi comprovada via ensaios biológicos em que a superfície dos ovos foi tratada com solução de hipoclorito. Estudos comparativos da capacidade reprodutiva de adultos oriundos de posturas tratadas superficialmente ou não com hipoclorito, em que as ninfas foram tratadas ou não com antibióticos, reveleram que o tratamento com antibióticos de machos e/ou fêmeas afetou a fertilidade de fêmeas em relação ao controle.

Análises adicionais para se avaliar o efeito da microbiota associada à vesícula seminal de machos na fecundidade e fertilidade de fêmeas reveleram a ocorrência natural de bactérias infectando as estruturas reprodutivas de machos e fêmeas. No entanto, a eliminação das bactérias infectantes da vesícula seminal não resultaram em qualquer efeito na fecundidade e fertilidade de fêmeas acasaladas com esses machos ou com machos infectados.

A contribuição dos microrganismos, particularmente da microbiota intestinal, para a função dos insetos é altamente relevante a partir de várias perspectivas, ligando-se à medicina, ecologia e agricultura. Algumas espécies de insetos fornecem modelos laboratoriais úteis para trabalhos experimentais com comunidades microbianas e suas interações para melhor compreender a ecologia e fisiologia dessas interações. Como bactérias endossimbiontes de insetos apresentam potencial para se tornar alvo para o controle de pragas, várias estudos buscam elucidar os mecanismos dessas associações de simbiose.

Os resultados aqui apresentados elucidaram não somente a diversidade de simbiontes em estruturas reprodutivas e digestivas de *E. heros*, mas também foi relatada, pela primeira vez em percevejos, a ocorrência de transmissão transovariana. Tendo em vista os efeitos desse simbionte na fertilidade de *E. heros*, há possibilidades para o desenvolvimento de novas

estratégias sustentáveis para o manejo desse inseto explorando as interações hospedeiro-simbiontes.

Anexos

Anexo A. Valor de *p* (corrigido pelo método Bonferroni) entre as amostras, resultante da análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião[1]	V1_N	V2_N	V3_N	V4_N	V1_A10	V2_A10	V3_A10	V4_A10	V1_A20	V2_A20	V3_A20	V4_A20
Embrião	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1_N	0,2982	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V2_N	0,0976	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3_N	0,0996	0,1033	0,0982	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V4_N	0,0998	0,1023	0,0994	0,0935	0	-	-	-	-	-	-	-	-
V1_A10	0,0986	0,1969	0,4905	0,098	0,1014	0	-	-	-	-	-	-	-
V2_A10	0,0963	0,1003	0,3018	0,2995	0,0919	1	0	-	-	-	-	-	-
V3_A10	0,1023	0,0975	0,0989	0,0984	0,1011	0,1014	0,0985	0	-	-	-	-	-
V4_A10	0,1019	0,1007	0,1005	0,1005	0,2974	0,1082	0,0986	0,0969	0	-	-	-	-
V1_A20	0,1023	0,3975	0,4028	0,2078	0,0974	0,2992	0,2024	0,1018	0,0983	0	-	-	-
V2_A20	0,1023	0,3035	0,2931	0,4092	0,0942	0,1044	1	0,2037	0,0937	0,4057	0	-	-
V3_A20	0,1033	0,1046	0,097	0,2011	0,1016	0,1043	0,5077	0,5027	0,1015	0,2037	0,8023	0	-
V4_A20	0,0974	0,0962	0,0989	0,1028	0,5049	0,099	0,0973	0,1001	0,5047	0,0962	0,0957	0,1009	0

[1] Partes do intestino médio: ventrículo 1 a quatro (V1 a V4) e diferentes idades: embrião, ninfa de quinto ínstar (N) e adultos com 10 (A10) e 20 (A20) dias.

Anexo B. Valor de R resultante da análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião[1]	V1_N	V2_N	V3_N	V4_N	V1_A10	V2_A10	V3_A10	V4_A10	V1_A20	V2_A20	V3_A20	V4_A20
Embrião	0[2]		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1_N	0.1481	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V2_N	0.5185	-0,4074	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3_N	1	0,5926	0,5556	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V4_N	1	0,8519	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
V1_A10	0.963	0,2593	0,1481	0,4815	0,9259	0	-	-	-	-	-	-	-
V2_A10	1	0,6296	0,2963	0,1481	0,963	-0,3333	0	-	-	-	-	-	-
V3_A10	1	0,7407	0,6667	0,5926	1	0,5556	0,2963	0	-	-	-	-	-
V4_A10	1	0,8889	1	1	0,07407	0,8889	0,963	1	0	-	-	-	-
V1_A20	0.8519	0,1481	0,1111	0,5556	1	0,1481	0,3333	0,7407	1	0	-	-	-
V2_A20	0.7407	0,3333	0,1111	0,03704	0,7037	0,2222	-0,1852	0,2222	0,7407	0,1111	0	-	-
V3_A20	1	0,7037	0,6667	0,2222	1	0,4815	0	0,07407	1	0,4074	-0,2222	0	-
V4_A20	1	0,8889	1	1	0,1111	0,8889	1	1	-0,037	1	0,7037	1	0

[1] Partes do intestino médio: ventrículo 1 a quatro (V1 a V4) e diferentes idades: embrião, ninfa de quinto ínstar (N) e adultos com 10 (A10) e 20 (A20) dias.

[2] Valores: $R > 0,75$ – grupos bem separados; $0,5 < R < 0,75$ – grupos separados com sobreposições; $0,25 < R < 0,5$ – grupos parcialmente separados; $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos.

Anexo C. Valor de *p* (corrigido pelo método Bonferroni) resultante da análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião	Ninfa	Adulto_10dias	Adulto_20dias
Embrião	0	-	-	-
Ninfa	0,4283	0	-	-
Adulto_10dias	0,018*	0,173	0	-
Adulto_20dias	0,0046**	0,2125	0,2789	0

* Valores significativos $p < 0,05$.
** Valores significativos $p < 0,01$.

Anexo D. Valor de R resultante da Análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião	Ninfa	Adulto_10dias	Adulto_20dias
Embrião	0	-	-	-
Ninfa	0,00483	0	-	-
Adulto_10dias	0,4122	0,05093	0	-
Adulto_20dias	0,5467	0,03546	0,01599	0

Valores: $R > 0,75$ – grupos bem separados; $0,5 < R < 0,75$ – grupos separados com sobreposições; $0,25 < R < 0,5$ – grupos parcialmente separados; $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos.

Anexo E. Valor de *p* (corrigido pelo método de Bonferroni) entre as amostras, resultante da análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião	V1	V2	V3	V4
Embrião	0	-	-	-	-
V1	0,1482	0	-	-	-
V2	0,0043*	0,5188	0	-	-
V3	0,0048*	0,0004*	0,0064*	0	-
V4	0,0048*	0,0001*	0,0003*	0,0001*	0

** Valores significativos $p < 0,01$.

Anexo F. Valor de R resultante da análise de similaridade (ANOSIM) da microbiota de *Euschistus heros* associada ao embrião e regiões V1 a V4 de intestino médio de ninfas de quinto ínstar e adultos com 10 e 20 dias após a emergência.

	Embrião	V1	V2	V3	V4
Embrião	0	-	-	-	-
V1	0,2023	0	-	-	-
V2	0,4796	-0,0175	0	-	-
V3	1	0,4575	0,2219	0	-
V4	1	0,8011	0,8591	1	0

Valores: $R > 0,75$ – grupos bem separados; $0,5 < R < 0,75$ – grupos separados com sobreposições; $0,25 < R < 0,5$ – grupos parcialmente separados; $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos.