



AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DE OVOS DE PERCEVEJOS SOBRE A COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE

CHEMICAL STERILIZATION ASSESSMENT OF STINK BUG EGG SURFACE ON MICROBIOL COMMUNITY

Simone de Souza Prado⁽¹⁾
Antônio Ricardo Panizzi⁽²⁾

Resumo

Os percevejos são insetos sugadores que se alimentam de plantas de diversas culturas de importância econômica no Brasil e no mundo. Estudos recentes mostram que as espécies *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, *Murgantia histrionica*, *Euschistus heros*, *Chlorochroa ligata*, *Chlorochroa sayi*, *Chlorochroa uhleri*, *Plautia stali*, *Thyanta pallidovirens*, *Dichelops melacanthus*, *Edessa mediatubunda*, *Loxa deducta*, *Pellaea stictica*, *Piezodorus guildinii* e *Thyanta perditor* apresentam um simbiote dominante associado aos cecos gástricos. Neste sistema, as fêmeas transmitem os simbioses verticalmente para sua prole espalhando-os sobre os ovos logo após a oviposição. Quando as ninfas de primeiro instar eclodem, elas sugam a superfície dos ovos e adquirem os simbioses. Os percevejos podem ter sua biologia prejudicada pela falta desses simbioses durante seu desenvolvimento. Neste trabalho avaliou-se a esterilização química superficial dos ovos das espécies *E. heros*, *D. melacanthus*, *N. viridula*, *P. stictica* e *P. guildinii* na comunidade microbiana presente por meio da utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram que os ovos esterilizados quimicamente (hipoclorito de sódio) tiveram os microrganismos (simbioses) e as estruturas das esculturações dos córions eliminados. Esta informação é de extrema importância tanto para o aprimoramento das técnicas de criação dos insetos em laboratório quanto na adoção de novas estratégias de controle a serem utilizadas no manejo integrado dessas pragas.

Palavras-chave: Bactéria. Manejo Integrado de Pragas. Simbioses. Praga de Soja.

Abstract

Stink bugs are plant sucking insects that feed on economic important crops in Brazil and around the world. Recently, it was shown that the stink bugs Nezara viridula, Acrosternum hilare, Murgantia histrionica, Euschistus heros, Chlorochroa ligata, Chlorochroa sayi, Chlorochroa uhleri, Plautia stali, Thyanta pallidovirens, Dichelops melacanthus, Edessa

¹(Doutor em Entomologia pela University of Hawaii at Manoa. Pesquisador Embrapa Meio Ambiente. Endereço eletrônico: simone.prado@embrapa.br.

²(Doutor em Entomologia pela University of Florida. Pesquisador Embrapa Trigo. Endereço eletrônico: antonio.panizzi@embrapa.br.



meditabunda, *Loxa deducta*, *Pellaea stictica*, *Piezodorus guildinii*, and *Thyanta perditor* carried one major bacterium associated in their midgut. In this system, females of stink bug vertically transmit the symbionts by smearing them on the surface of the egg masses. When first instars nymphs hatch, they probe the egg surface and orally acquire the symbionts. Stink bugs can have their development negatively impacted by the lack of these symbionts. Herne, using scanning electron microscopy (SEM), we evaluate the chemical surface egg sterilization of *Euschistus heros*, *Dichelops melacanthus*, *Nezara viridula*, *Pellaea stictica* and *Piezodorus guildinii* on microbial community. Our results show that chemical (sodium hypochloride) sterilized eggs removed the microbial community (symbionts) and the chorion sculpture structures. This information is of utmost importance for the improvement of insects rearing techniques under laboratory conditions and in an adoption of new control strategies to be used in the integrated management of these pests.

Keywords: Bacteria. Integrated Pest Management. Symbionts. Soybean pest.

1 Introdução

Pentatomidae é uma das maiores famílias de percevejos dentro da subordem Heteroptera (Ordem Hemiptera), com mais de 4.000 espécies descritas dividida em 8 subfamílias (PANIZZI *et al.*, 2000). O sucesso dos percevejos como pragas de plantas de importância econômica é bem conhecido devido ao seu comportamento extremamente polífago. Diversos grupos de insetos que vivem em dietas com baixos teores de nutrientes, como é o caso dos percevejos, dependem de simbioses obrigatórios que proporcionam nutrientes adicionais imprescindíveis a sua sobrevivência (DOUGLAS, 1996). Buchner (1965) relatou pela primeira vez que percevejos se encontram associados com bactérias localizadas principalmente no intestino médio ou cecos gástricos. Recentemente, foi mostrado que as espécies *Nezara viridula* (L.), *Acrosternum hilare* (Say), *Murgantia histrionica* (Hahn), *Euschistus heros* (Fabricius), *Chlorochroa ligata* (Say), *Chlorochroa sayi* (Stal), *Chlorochroa uhleri* (Stal), *Plautia stali* Scott, *Thyanta pallidovirens* (Stal), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Edessa meditabunda* (F.), *Loxa deducta* Walker, *Pellaea stictica* (Dallas, 1851), *Piezodorus guildinii* (Westwood) e *Thyanta perditor* (F.) apresentam um simbiote dominante nos cecos gástricos e a filogenia desses simbioses mostrou que eles não formam um grupo monofilético, sugerindo que os simbioses foram adquiridos múltiplas vezes com o passar do tempo (PRADO AND ALMEIDA 2009a; PRADO AND ZUCCHI, 2012). Buchner (1965) também sugeriu que a transmissão dos simbioses de fêmeas para ninfas se daria verticalmente de maneira oral, ou seja, ninfas de primeiro instar logo após o nascimento sugam e adquirem os simbioses espalhados pelas fêmeas na superfície da massa



de ovos (PRADO *et al.*, 2006, PRADO AND ALMEIDA, 2009b, PRADO *et al.*, 2009, PRADO *et al.*, 2010, PRADO AND ZUCCHI, 2012).

Deste modo, este trabalho tem por objetivo avaliar a esterilização química superficial dos ovos das espécies *E. heros*, *D. melacanthus*, *N. viridula*, *P. stictica* e *P. guildinii* na comunidade microbiana presente e nas esculturações dos córions por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2 Material e Métodos

Adultos das espécies *E. heros*, *D. melacanthus*, *N. viridula*, *P. stictica* e *P. guildinii* foram coletados no campo experimental da Embrapa Soja, em Londrina/PR e levados ao Laboratório de Bioecologia de Percevejos para a criação dos insetos e aquisição de ovos. Os adultos foram acondicionados em caixas plásticas transparentes de criação (25 x 20 x 20 cm), com fundo forrado com papel filtro e tampas teladas. Os insetos foram mantidos em câmara de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ U.R. e fotoperíodo de 14 h antes dos ovos serem usados nos experimentos. Os percevejos foram alimentados com vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae).

Uma massa de ovos de cada espécie de percevejo foi esterilizada superficialmente em álcool (95,5%) por 5 min e, em seguida, foram mergulhados em uma solução de hipoclorito de sódio (90%) por 5 min de 1 a 2 dias antes das ninfas eclodirem. No Laboratório de Microscopia Eletrônica da UEL-Londrina/PR, as massas de ovos foram fixados por 12 h em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,2). Logo após, os ovos foram lavados três vezes com tampão fosfato, por um período total de 45 min para a remoção dos fixadores. Tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato foi usado para fazer a pós-fixação das amostras durante 1 h. Logo após desidratação em série crescente de concentração de etanol, os ovos foram colados em stubs por meio de fita adesiva dupla face de carbono, revestidas com ouro em metalizador (BAL-TEC® SCD050, Balzers, Liechtenstein) e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI® Quanta 200, Eindhoven, Holanda). O mesmo método foi utilizado para os ovos controle, os quais não foram esterilizados.

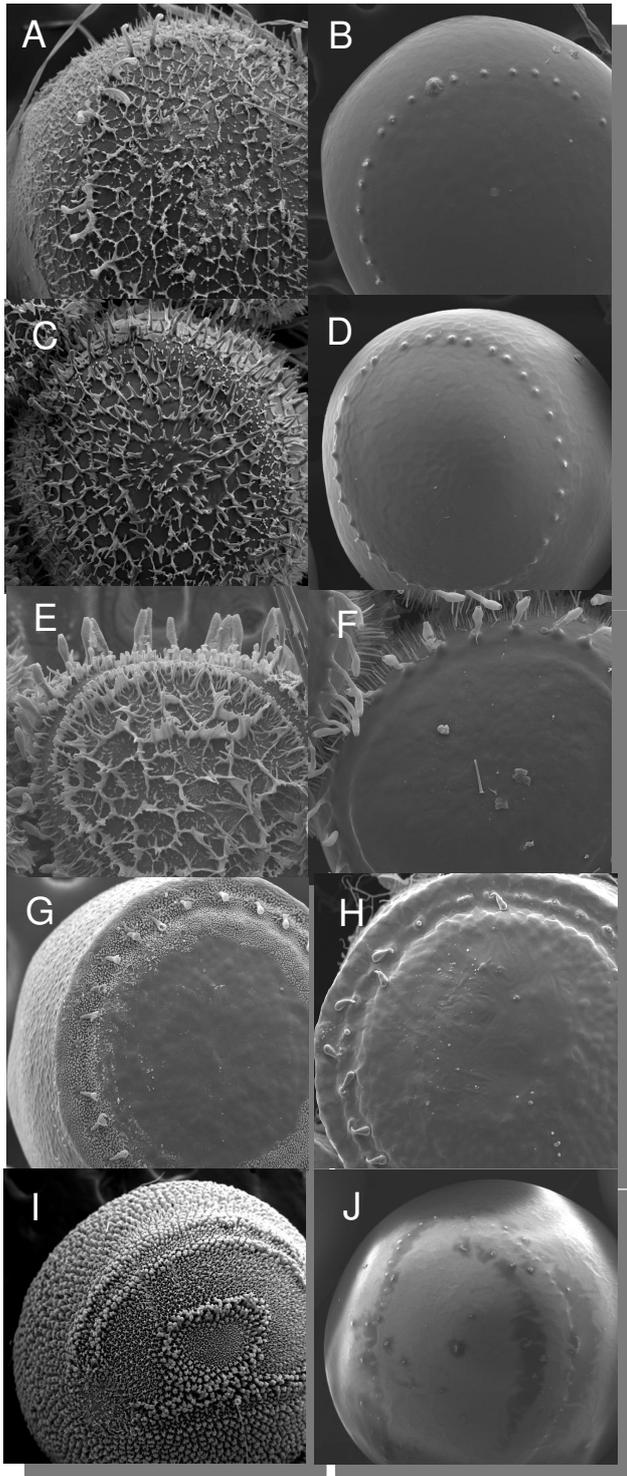


3 Resultados e Discussão

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada na identificação de caracteres morfológicos para o reconhecimento de diversas espécies de insetos incluindo aspectos morfológicos dos ovos de percevejos (MATESCO *et al.*, 2007; 2009; 2014). No presente trabalho, a técnica de MEV foi utilizada para mostrar o impacto da esterilização na superfície dos ovos de percevejos e na comunidade microbiana encontrada ao seu redor. Todos os ovos dos percevejos apresentaram o formato de barril, com exceção dos ovos de *P. stictica* que são esféricos (Fig. 1).

Os ovos de *E. heros*, *D. melacanthus* e *P. guildinii* do controle (Fig. 1A, 1C e 1E respectivamente) em comparação com os ovos esterilizados (Fig. 1B, 1D e 1F respectivamente) apresentaram um padrão de esculpturação do cório reticulado espinhoso com numerosos processos aero-micropilares ao redor do ovo, sendo a ponta dos processos aero-micropilares de forma clavada. No caso de *P. guildinii*, os ovos apresentaram a superfície do cório com menos espinhos e os processos aero-micropilares mais compridos quando comparado com os demais. Os ovos de *N. viridula* do controle (Fig. 1G) em comparação com os ovos esterilizados (Fig. 1H) não apresentaram nenhum padrão de esculpturação reticulado sendo a superfície do ovo lisa e sem os adornos observados nos demais ovos. Já os ovos de *P. stictica* do controle (Fig. 1I) em comparação com os ovos esterilizados (Fig. 1J), apresentaram o mesmo padrão de esculpturação do cório encontrado ao redor do ovo todo e não somente na superfície como nos demais ovos. Os processos aero-micropilares dos ovos de *P. stictica* foram numerosos também, no entanto, não são tão compridos quanto aos demais localizados na região do opérculo, ou seja, parte utilizada para a saída do inseto.

Figura 1 – Visualização externa dos ovos de *Euschistus heros* (A), *Dichelops melacanthus* (C), *Nezara viridula* (E), *Pellaea stictica* (G) e *Piezodorus guildinii* (I) do controle e após a esterilização superficial dos ovos (B, D, F, H e J) pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).



O detalhamento da comunidade bacteriana na superfície dos ovos do controle de *E. heros*, *D. melacanthus* e *P. stictica* pode ser observado nas Fig. 2, 3 e 4. Na fig. 2A é possível observar inúmeros microrganismos entre os espinhos na superfície do cório dos ovos de *E. heros*. Na fig. 2B é possível observar também 2 aero-micropilares clavadas e na fig. 2C várias bactérias em forma de cocos. Nas figs. 3A, 3B e 3C é possível observar bactérias em forma de bastonetes entre os espinhos presente no cório do ovo de *D. melacanthus*. Nas figs. 4A, B e C pode-se observar as inúmeras aero-micropilares repletas de bactérias ao redor e no topo dos ovos. Em resumo, a maior parte dos microrganismos encontrados na superfície dos ovos dos percevejos observados neste estudo apresentam a forma de bastonete como os simbiontes observados em *A. hilare* através da técnica de fluorescência de hibridização in situ ou FISH realizada por PRADO *et al.*, (2010). Adicionalmente, pode ser observado também microrganismos na forma de cocos, talvez um actinomiceto, encontrado também nos cecos gástricos dos percevejos (ZUCCHI *et al.*, 2012).

Figura 2 – Detalhe de colônias de microrganismos na superfície dos ovos de *Euschistus heros* (A, B, C).

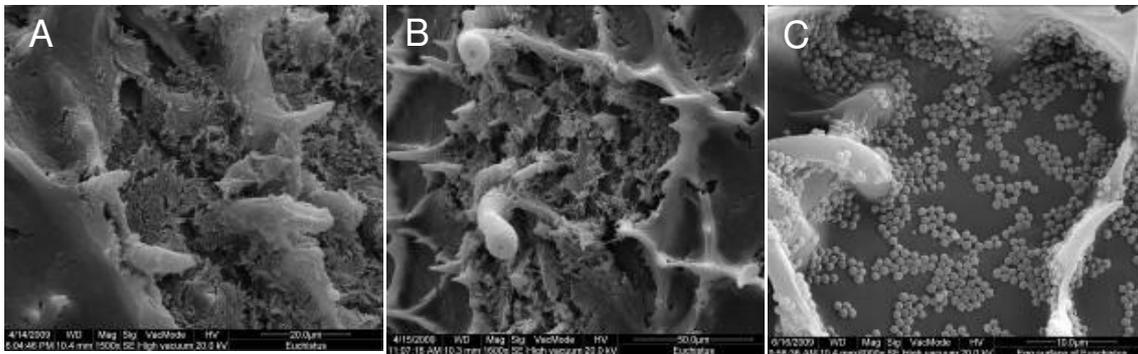


Figura 3 – Detalhe de colônias de microrganismos na superfície dos ovos de *Dichelops melacanthus* (A, B, C).

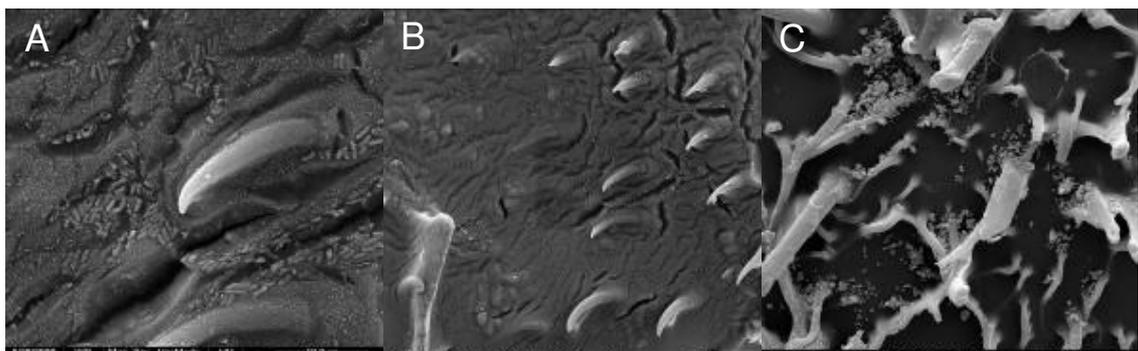
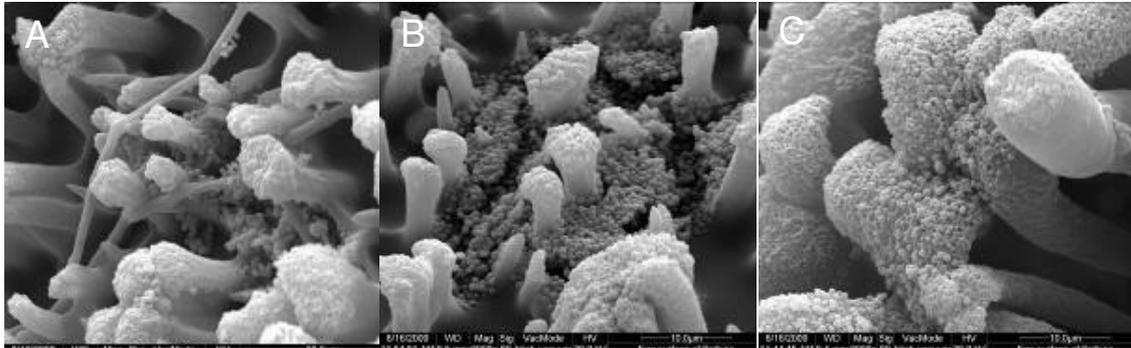


Figura 4 – Detalhe de colônias de microrganismos na superfície dos ovos de *Pellaea stictica* (A, B, C).



As informações apresentadas confirmam a presença de comunidades de microrganismos existente na superfície dos ovos de percevejos. Esses microrganismos, (possíveis simbiossiontes), podem influenciar a sobrevivência das ninfas por se encontrarem localizados na superfície de ovos por onde os percevejos permanecem após a emergência durante o primeiro instar. Estudos recentes demonstraram que ninfas de primeiro instar do pentatomídeo *E. meditabunda* logo após a emergência visitam cerca de 8 córions/ovos e permanecem sobre cada um por cerca de 3 minutos, permanecendo por cerca de 25 minutos sobre os córions/ovos antes de se posicionarem ao redor dos mesmos (CALIZOTTI AND PANIZZI 2014); nesse período possivelmente ingerem simbiossiontes.

4 Conclusões

A esterilização química de ovos de percevejo influencia negativamente na estruturação do cório dos ovos e na comunidade microbiana presente.

5 Agradecimentos/ Apoio financeiro

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pós-doutorado ao primeiro autor e a Embrapa Soja pela oportunidade de desenvolver o projeto. A Dra. Celia G. T. J. Andrade e ao técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de



Londrina (UEL/PR) e ao técnico Jovenil Silva da Embrapa Soja pelo apoio técnico. Aos pós-graduandos Flavia Clolet e Rogerio Depieri pelas discussões sobre o trabalho e constante ajuda no laboratório.

Referências

- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. Interscience Publishers, New York. 1965.
- CALIZOTTI, G. S.; PANIZZI, A. R. 2014. Behavior of first instar nymphs of *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) on the egg mass. *Florida Entomologist* 97: 277-280.
- DOUGLAS, A. E. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. **J. Insect Physiol.** v. 42, p. 247-255, 1996.
- MATESCO, V. C.; BIANCHI, F. M.; FURSTENAU, B. B. R. J.; DA SILVA, P. P.; CAMPOS, J. A.; GRAZIA, J. External egg structure of the Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera) and the search for characters with phylogenetic importance. **Zootaxa.** v. 3768, p. 351-385. 2014.
- MATESCO, V. C.; FURSTENAU, B. B. R. J.; BERNARDES, J. L. C; SCHWERTNER, C. F.; GRAZIA, J. Morphological features of the eggs of Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). **Zootaxa.** v. 1984, p. 1 – 30. 2009.
- MATESCO, V. C.; SCHWERTNER, C. F.; GRAZIA J. Descrição dos estágios imaturos e biologia de *Chinavia pengue* (Rolston) (Hemiptera, Pentatomidae). **Rev. Brasil. Entomol.** v. 51, p. 416 - 435. 2007.
- PANIZZI, A. R.; MCPHERSON, J. E., JAMES, D. G., JAVAHERY, M.; MCPHERSON, R.M. Economic importance of stink bug (Pentatomidae). In SCHAEFER, C. W.; PANIZZI A.R. [eds.], *Heteroptera of economic importance*, CRC, Boca Raton, Florida. 2000.
- PRADO, S. S.; ALMEIDA, R. P. P. Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. **Curr. Microbiol.** v.58, p. 64-69. 2009a.
- PRADO, S. S.; ALMEIDA, R. P. P. Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. **Entomol. Experim. Appl.** v. 132, p. 21-29. 2009b.
- PRADO, S. S.; GOLDEN, M.; FOLLETT, P. A.; DAUGHERTY, M. P.; ALMEIDA. R.P.P. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environ. Entomol.** v. 38, p. 103-109. 2009.



*I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA,
AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA)*

09 a 12 de maio de 2016 - Centro de Convenções da UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, SP



PRADO, S. S.; HUNG, K.; DAUGHERTY, M. P.; ALMEIDA, R. P. P. Indirect effects of temperature on stink bug fitness via maintenance of gut-associated symbionts. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 76, p. 1261 - 1266. 2010.

PRADO, S. S.; RUBINOFF, D.; ALMEIDA, R. P. P. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 99, p. 577-585. 2006.

PRADO, S. S.; ZUCCHI, T. D. Host-symbiont interactions for potentially managing heteropteran pests. **Psyche** v. 10, p. 20 - 30. 2012.

ZUCCHI, T. D.; PRADO, S. S.; CONSOLI, F. L. The gastric caeca of pentatomids as a house for actinomycetes. **BMC Microbiol.** v. 12, p. 1 - 7. 2012.