



**IMPACTO DO DIÓXIDO DE CARBONO EM SIMBIOTES DO PERCEVEJO DA SOJA,
*Euschistus heros***

Antonio Carlos Sita **Costa**¹; Joáz Dorneles **Júnior**²; Elen Ribeiro dos **Santos**³; Simone de Souza **Prado**⁴

Nº 18413

RESUMO – A soja tem grande destaque por sua importância econômica, sendo o Brasil o segundo maior produtor e o principal exportador do grão. Para alta produção é necessário adotar o controle de pragas da cultura, controlando principalmente o percevejo-marrom *Euschistus heros*. Com o aumento da liberação de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico alterações como o aumento de temperatura global estão ocorrendo. Sabe-se que o CO₂ estimula a produção de fotoassimiladores nas plantas e conseqüentemente afeta a população de insetos de importância agrícola. Na ausência de O₂ ou em situação de aumento de CO₂, a cadeia respiratória do inseto fica bloqueada ou parcialmente bloqueada e a glicose é quebrada por fermentação. Ocorre, então, a produção de álcool e ácido lático, tóxicos para células. Esses compostos podem afetar o desenvolvimento, reprodutividade e longevidade dos insetos. Adicionalmente, esses compostos podem afetar as interações entre insetos e simbiotes e portanto, podem influenciar no controle de pragas. Desse modo, avaliou-se o comportamento dos simbiotes presentes nos cecos gástricos de *E. heros* criados em dois tratamentos, sendo um tratamento (controle) com 400±100 ppm (partes por milhão) de CO₂ e um tratamento com 900±100 ppm de CO₂, ou seja, com adição extra de CO₂. Em ambos tratamentos foi observada uma baixa infectividade natural dos insetos com o simbiote e a proporção de insetos positivos foi maior no ambiente com adição extra de CO₂.

Palavras-chaves: Extração de DNA, pragas da soja, gás carbônico, endossimbiote, maria-fedida.

¹ Bolsista Embrapa: Antonio Carlos Sita Costa, Graduação em Engenharia Química, ESAMC, Campinas-SP; antoniositac@hotmail.com

² Colaborador: Joáz Dorneles Júnior, Bolsista CAPS, Doutorando em Proteção de Plantas, Unesp, Botucatu-SP.

³ Colaborador: Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Técnica da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁴ Orientadora: Simone de Souza Prado, Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; simone.prado@embrapa.br



ABSTRACT – Soybean has great significance for its economic importance, being Brazil the second largest producer and the main exporter of the grain. For high production it is necessary to adopt pest control of the crop, by controlling mainly the brown stink bug *Euschistus heros*. With increasing release of carbon dioxide (CO₂) atmospheric changes as global temperature increases, are occurring. It is known that CO₂ stimulates the production of photo-assimilators in plants and consequently affects the population of insects of agricultural importance. In the absence of O₂ or in a situation of CO₂ increases, the respiratory chain of the insect is blocked or partially blocked and the glucose is broken by fermentation. Then, there is the production of alcohol and lactic acid, toxic to cells. These compounds can affect the development, reproductivity, and longevity of insects. In addition, these compounds may affect interactions between insects and symbionts and therefore may influence pest control. Thus, this study evaluated the behavior of the symbionts present in the gastric caeca of *E. heros* grown in two treatments, being a treatment (control) with 400 ± 100 ppm (parts per million) of CO₂ and a treatment with 900 ± 100 ppm of CO₂, ie with extra addition of CO₂. In both treatments a low natural infectivity of the insects with the symbiont was observed and the proportion of positive insects was higher in the environment with extra CO₂. The knowledge of the behavior of the bug and its symbionts is very important for pest management in a global warming scenario.

Keywords: DNA Extraction, pest of soybean, carbonic gas, endosymbiont, stink bug.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o complexo de insetos causadores de danos à soja é composto principalmente por lepidópteros desfolhadores e percevejos sugadores de seiva (PANIZZI et al., 2013). Mesmo com a notória alteração climática no globo terrestre, poucos são os trabalhos que relacionam o aumento populacional de insetos-pragas às alterações nas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) em países de clima tropical (DADÈR et al., 2016).

O CO₂ tem rápido aumento de concentração na atmosfera, devido a atividades tais como desmatamentos, queima de combustíveis fósseis, entre outras liberações de substâncias químicas (IPCC, 2014). Os impactos podem ser observados em todos os continentes (aumento da temperatura global, contaminação do ar atmosférico, etc.), nos oceanos (acidificação da água do



mar devido à reação química com o CO₂) e colocam em risco a estabilidade econômica global, principalmente no que se refere ao futuro das atividades agrícolas (EITZINGER et al., 2010; GORNALL et al., 2010).

A soja [*Glycine max* (L) Merril] recebe destaque em estudos de influência de CO₂, por ser a mais cultivada no mundo, mas pouco se sabe ainda sobre o assunto. Na agricultura, a soja assume importância mundial pela produção de grãos/sementes, com alta produtividade. Com objetivo de manter a alta produtividade da soja, é necessário que agricultores adotem meios de controle de pragas, sendo que as principais são lepidópteros e percevejos da família Pentatomidae (PANIZZI; OLIVEIRA, 1998).

O percevejo da família Pentatomidae *Euschistus heros* é atraído por plantas com alto teor nutritivo, as quais proporcionam melhor desenvolvimento e capacidade reprodutiva aos insetos (PANIZZI, 1991). Assim, com o aumento da concentração de CO₂ atmosférico, as plantas poderão ter um incremento na produção de carboidratos e outros compostos, podendo tornar-se ou não mais atrativas aos percevejos. Tal evento na natureza poderá potencializar o ataque de pragas no campo. Zavala et al. (2013) discutem que plantas submetidas a um ambiente enriquecido com CO₂ tendem a apresentar uma maior variabilidade de nutrientes disponíveis aos endosimbiontes, justificando assim o maior sucesso de colonização e desenvolvimento de insetos sugadores.

Associações entre insetos e microrganismos são importantes biologicamente para as plantas hospedeiras e podem influenciar na evolução de ambos. Relações entre insetos e microrganismos são largamente encontradas na natureza e podem ser obrigatórias para o hospedeiro, para o simbiote, para ambos ou para nenhum. Prado et al. (2006) relataram que *Nezara viridula* apresenta bactérias endosimbióticas associadas aos cecos gástricos. Posteriormente, foi mostrado que os percevejos *E. heros*, *Acrosternum hilare* (Say, 1832), *Murgantia histrionica* (Hahn, 1834), *Chlorochroa ligata* (Say, 1832), *Chlorochroa sayi* (Stål, 1872), *Chlorochroa uhleri* (Stal, 1872), *Plautia stali* (Scott, 1874), *Thyanta pallidovirens* (Stal, 1862), *Pellaea stictica* (Dallas, 1851), *Loxa deducta* (Walker, 1867), *Thyanta perditor* ((Fabricius, 1794), *Piezodorus guildinii*, *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), e *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794) também apresentam um simbiote dominante nos cecos gástricos (PRADO; ALMEIDA, 2009a; PRADO; ZUCCHI, 2012). A árvore filogenética dos simbiotes associados aos cecos gástricos dos percevejos não formam um grupo monofilético, sugerindo evolutivamente inúmeras introduções de tempos em tempos (PRADO et al., 2006; PRADO; ALMEIDA, 2009a). Buchner (1965) sugeriu que a transmissão dos simbiotes de fêmeas para ninfas se daria verticalmente, mas diferente de outros insetos, oralmente. Prado et al. (2006) confirmaram e demonstraram que



ninfas de primeiro instar de *N. viridula* nascem aposimbióticas (sem simbiotes) e, logo em seguida, através do comportamento de agregação sobre os ovos, sugam e adquirem os simbiotes espalhados pelas fêmeas na superfície do corium dos ovos (PRADO et al., 2006; PRADO; ALMEIDA, 2009b; PRADO et al., 2009). Embora não relatado em detalhes, esse modo único de transmissão, onde o simbiote fica exposto por um certo período de tempo fora do hospedeiro, é extremamente interessante pois pode ser afetado por fatores ambientais como aumento de temperatura e no caso pelo CO₂, variáveis que podem influenciar a interação coevolucionária entre insetos e microrganismos e no comportamento da praga no campo. Desse modo, esse estudo avaliou o comportamento dos simbiotes presentes nos cecos gástricos de *E. heros*, sob o efeito de duas concentrações diferentes de CO₂ a fim de conhecer a conduta das pragas e dos microrganismos no campo em um cenário de aquecimento global.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna/SP.

2.1. Ambientes utilizados

As condições gerais utilizadas nos dois tratamentos (condição ambiente e com adição extra de CO₂) foram de 25±3 °C de temperatura, 70±10 % de umidade relativa e 14 horas de fotoperíodo. O tratamento com adição extra de CO₂ (T1) foi conduzido em câmara do tipo B.O.D. (340 L de volume) com concentração de CO₂ de 900±100 ppm (partes por milhão). Já o tratamento sem adição extra de CO₂ (T2) foi conduzido em câmara do tipo Fitotron® (1200 L) com concentração de 400±100 ppm.

2.2. Ovos e período ninfal de *Euschistus heros*

A quantidade de ovos utilizados no estudo foi de 800 unidades, sendo 400 por tratamento, separados em 20 repetições, contendo 20 ovos cada repetição e devolvidas para as respectivas câmaras (B.O.D. e Fitotron®). Cada repetição foi composta por uma caixa plástica do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) com aberturas nas tampas de 4 cm², vedadas com tecido do tipo “voil” para trocas gasosas. Além disso as gaiolas foram forradas com papel filtro. Os ovos foram



disponibilizados pela empresa BUG Agentes Biológicos de Piracicaba – SP, Brasil. Uma vagem/gerbox foi disponibilizada para assim que as ninfas atingissem o 2º instar pudessem se alimentar. Após a eclosão, as ninfas foram avaliadas quanto a diversos parâmetros biológicos e a mortalidade em cada ínstar e também a somatória ao final, totalizando os cinco estágios ninfais. As repetições contendo 20 ovos cada (20 repetições), foram avaliadas diariamente após a eclosão das ninfas. A alimentação das ninfas foi composta de uma vagem verde de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e 5 amendoins cru (*Arachis hypogaea* L.). As vagens e amendoins foram substituídos a cada 6 ~ 7 dias, quando esses perdiam visualmente características nutritivas (vagens murchas/secas e/ou amareladas) ou quando apresentavam fungos. De cada repetição, um macho e uma fêmea foram retirados e colocados em álcool 90% para futura análise de extração de DNA.

2.3. Extração de DNA e PCR

Um total de 40 insetos de cada tratamento (T1, T2) foi selecionado para realizar a extração de DNA seguindo o protocolo de Rogers e Bendich (1988). Neste protocolo, os percevejos foram macerados, utilizando-se as soluções de tampão de extração, CTAB 10% (*Cetyl trimethylammonium bromide*) e proteinase K (10mg/ml) para cada amostra, na sequência foram levadas ao banho seco c/ agitação por 60 minutos. Após esse tempo, foram realizadas lavagens das amostras com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), levado a centrifuga a 14000 rpm por 15 minutos a 15° C. Após a centrifugação, o sobrenadante (400ul) foi retirado e transferido para eppendorfs novos e, em seguida, lavados com isopropanol gelado 100% (400ul) e 45% de acetato de amônio (10M) (180µl). As amostras foram armazenadas overnight a -4°C. Na segunda etapa da extração o sobrenadante foi descartado, lavando o pellet com etanol 70% (300µl), após isso as amostras secaram, foi acrescentado 30µl de TE, ou seja, de solução de Tris-HCl (1M, pH: 8,0) / 20 mL de EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic* 0,5 M, pH: 8,0), e após 30 min à 37°C, as amostras foram armazenadas no freezer a -4°C. Após a extração de DNA, 2µl de cada amostra foram alíquotadas, adicionados 0,5µl de cada um dos pares de “primers” 16SB1 (universal) e SPEh1 (específico) para detecção do simbionte primário do percevejo, também 6,25µl do Master Mix (Taq DNA Polymerase Master Mix RED da Ampliqon) para a reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Para a amplificação do DNA, as amostras foram colocadas no Termociclador Veriti, por 2h30min, conforme testes realizados anteriormente para o conjunto de “primers” desenvolvido para a detecção do simbionte presente nos cecos gástricos do percevejo *E. heros* como em Prado et al. (2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Figura 1, o simbiote primário de *Euschistus heros* foi detectado em 37,5% dos insetos que foram criados a partir dos ovos colocados no T1. Já nos insetos advindos de ovos colocados no T2, o simbiote foi detectado em somente 15% dos insetos. Já os dados de infectividade natural dos insetos pelo simbiote foi baixo (<40%) em ambos tratamentos, sendo semelhante aos dados apresentado para o percevejo *Murgantia histrionica* e diferindo dos dados apresentados pelo percevejo *Acrosternum hilare* como observado anteriormente em Prado et al. (2010). No entanto, pode-se observar que os insetos criados em ambiente com adição de CO₂ apresentaram mais que o dobro de insetos positivos para o simbiote mostrando uma tendência de encontrarmos um número maior de insetos infectados com os simbioses em um cenário de aumento do aquecimento global.

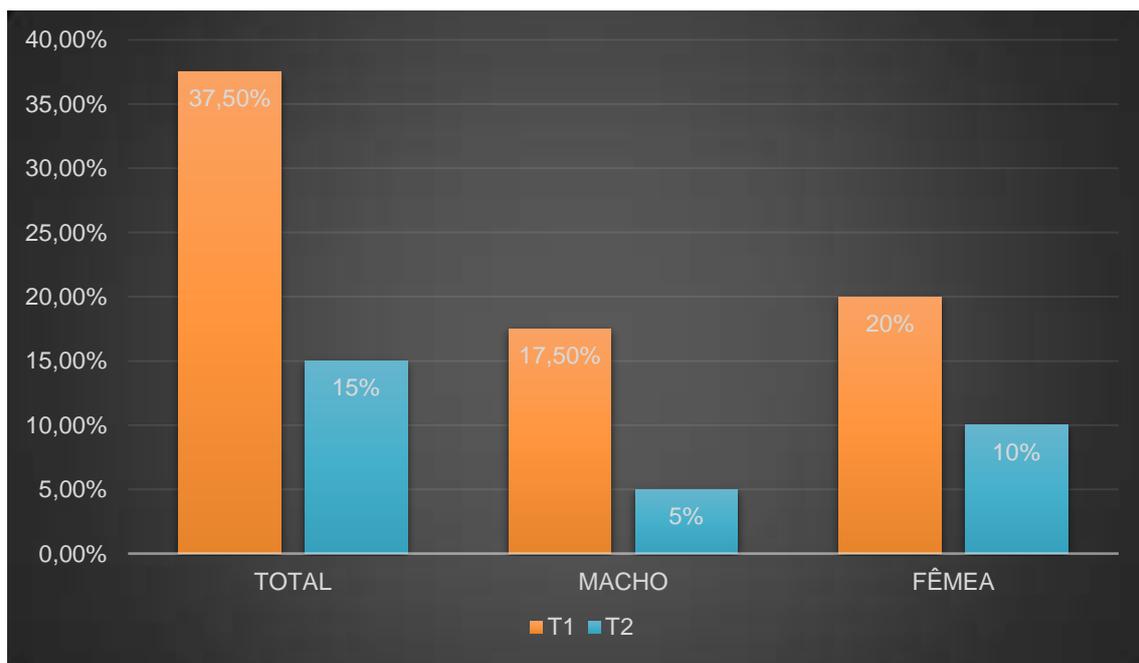


Figura 1. Porcentagem total de machos e fêmeas do percevejo *Euschistus heros* positivos para o simbiote presente nos cecos gástricos de insetos criados a partir de ovos colocados em ambiente com adição extra de CO₂ 900±100 ppm (T1) em comparação com insetos criados a partir de ovos colocados em condições ambientais semelhantes a encontrada na natureza de 400±100 ppm (T2 - sem adição extra de CO₂).



4. CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos que a porcentagem de detecção de simbiote presente nos cecos gástricos do percevejo foi maior nos insetos criados em ambiente com adição extra de CO₂ em comparação com os insetos criados em condições ambientais. Ambientes com teor maior de CO₂ tendem a favorecer e aumentar a infectividade natural dos insetos pelos simbioses influenciando diretamente no desenvolvimento dos insetos, já que a maioria dos simbioses são obrigatórios para seu desenvolvimento. No entanto, é necessário analisar um maior número de insetos por mais de uma geração, para obter resultados mais consistentes da influência do CO₂ no desenvolvimento do simbiote do percevejo *E. heros*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Embrapa pela bolsa concedida e aos técnicos do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.

6. REFERÊNCIAS

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. New York: Wiley Interscience, 1965. 909 p.

DÁDER, B.; FERERES, A.; MORENO, A.; TREBICKI, P. **Elevated CO₂ impacts bell pepper growth with consequences to *Myzus persicae* life history, feeding behavior and virus transmission ability**. Scientific Reports, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep19120>>. Acessado em 18 de Abril de 2018.

EITZINGER, J.; ORLANDINI, S.; STEFANSKI, R.; NAYLOR, R. E. L. Climate change: introductory editorial. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 148, p. 499-500, 2010.

GORNALL, J.; BETTS, R.; BURKE, E.; CLARK, R.; CAMP, J.; WILLET, K.; WILTSHIRE, A. GORNALL. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Philosophical transaction of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. 365, n. 1554, p. 2973-2989, 2010.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate change 2014. Disponível em: <www.ipcc.ch>. Acessado em 19 de Abril de 2018.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Londrina: Embrapa, p. 335-421. 2013.

PANIZZI, A.R.; OLIVEIRA, E.D.M. Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (pigeonpea) and soybean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 88, p. 169-175, 1998.



PANIZZI, A. R. Ecologia nutricional de insetos sugadores de sementes. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole/CNPq, 1991.

PRADO S. S.; GOLDEN M.; FOLLET, P.A.; DAUGHERTY M.P.; ALMEIDA, R.P.P. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 38, p. 103-109. 2009.

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

PRADO, S. S.; ALMEIDA, R. P. P. Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. **Current Microbiology**, 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* (Hemiptera: Pentatomidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 132, p. 21–29. 2009b.

PRADO, S. S.; HUNG, K. Y.; M. P. DAUGHERTY, M. P.; ALMEIDA, R. P. P. Indirect Effects of Temperature on Stink Bug Fitness, via Maintenance of Gut-Associated Symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1261–1266. 2010.

PRADO, S. S.; RUBINOFF, D.; ALMEIDA, R. P. P. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, p. 577-585. 2006.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S.B., SCHILPEROORT, R.A., VERMA, D.P.S. (Ed.). **Plant-molecular-biology-manual**. Dordrecht: Springer, 1989. p. 73-83.

ZAVALA, J. A.; NABITY, P. D.; DELUCIA, E. H. An emerging understanding of mechanisms governing insect herbivory under elevated CO₂. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 79-97, 2013.