

EDSON HIROSE

ESTUDO DE SIMBIONTES ASSOCIADOS A *Nezara viridula* (L.)

(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de “Doutor em Ciências” no  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração Entomologia,  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Antônio Ricardo Panizzi

Curitiba

Fevereiro 2005

**“ESTUDO DE SIMBIONTES ASSOCIADOS A *Nezara viridula* (L.)  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) “**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em Ciências” no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Antônio Ricardo Panizzi (Orientador)  
Embrapa/Soja Londrina/PR

Dr. Alexandre José Cattelan  
Embrapa/Soja Londrina/PR

Prof. Dr. Fernando Luis Cõnsoli  
ESALQ/USP

Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida  
UFPR

Profa. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari  
UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2005.

Aos meus Pais, Yukiteru e  
Tiroko, e ao meu irmão Marcos.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus orientadores e amigos Dr. Antônio Ricardo Panizzi e Dr. Alexandre José Cattelan, por me mostrarem os caminhos da coragem e da dedicação.

Ao programa de pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, e todo o seu corpo docente pela oportunidade oferecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Soja) e seus funcionários, especialmente a Fábio, Ivanilda, Jairo, Joacir e Rosimeire.

A Jovenil José da Silva, Técnico do Laboratório de Bioecologia de Percevejos, que tenho orgulho de chamar meu amigo.

Aos amigos: Adriana, Andréia (Déia), Clarice, Cláudia, Giorla, Jorge, Lúcia, Marliton, Rogier, Simone, Viviane, Wilsimar, Zhang pelos bons momentos que compartilhamos, e pela amizade incondicional oferecida.

Aos Drs. Jeffrey R. Aldrich, Phyllis Martin, Steve Rehner e Mai Lin Webb (USDA-ARS – Beltsville – MD), e a Profa. Halha O. Saridakis (UEL - Londrina - PR), por me receberem em seus laboratórios e compartilharem os conhecimentos.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja, Drs. Daniel R. Sosa-Gómez, Flávio Moscardi e Beatriz Corrêa-Ferreira.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
CAPÍTULO 1	
Introdução geral .....	1
1.1 . Introdução .....	1
1.2 . Objetivos .....	6
1.3 . Literatura citada .....	7
CAPÍTULO 2	
Esterilização das posturas de <i>Nezara viridula</i> (L.) e sua influência na viabilidade dos ovos, sobrevivência e desenvolvimento ninfal .....	13
2.1 . Introdução .....	13
2.2 . Material e métodos .....	14
2.3 . Resultados e discussão .....	18
2.4 . Literatura citada .....	26

## CAPÍTULO 3

Efeito de grupo sobre a performance das ninfas de <i>Nezara viridula</i> (L.) associado à perturbação da colônia .....	30
3.1 . Introdução .....	30
3.2 . Material e métodos.....	31
3.3 . Resultados e discussão .....	33
3.4 . Literatura citada .....	45

## CAPÍTULO 4

Efeito de antibióticos sobre o desenvolvimento de ninfas de <i>Nezara viridula</i> (L.).....	48
4.1 . Introdução .....	48
4.2 . Material e métodos.....	49
4.3 . Resultados e discussão .....	51
4.4 . Literatura citada .....	59

## CAPÍTULO 5

Efeito do gradiente de umidade sobre ninfas de primeiro ínstar de <i>Nezara viridula</i> (L.) ...	63
5.1 . Introdução .....	63
5.2 . Material e métodos.....	64
5.3 . Resultados e discussão .....	68
5.4 . Literatura citada .....	74

## CAPÍTULO 6

Sistema digestório de <i>Nezara viridula</i> (L.).....	76
--	----

6.1 . Introdução .....	76
6.2 . Material e Métodos .....	77
6.3 . Resultados e discussão .....	80
6.4 . Literatura citada .....	86

## CAPÍTULO 7

Bactérias do trato digestório do <i>Nezara viridula</i> (L.) caracterizadas por sequenciamento da região do DNA ribossomal 16S .....	90
7.1 . Introdução .....	90
7.2 . Material e métodos.....	91
7.3 . Resultados e discussão .....	98
7.4 . Literatura citada .....	105

## CAPÍTULO 8

Ação tóxica de <i>Chromobacterium suttsuga</i> sobre adultos de <i>Nezara viridula</i> (L.).....	110
8.1 . Introdução .....	110
8.2 . Material e métodos.....	111
8.3 . Resultados e discussão .....	114
8.4 . Literatura citada .....	116

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
---------------------------	-----

## RESUMO

As ninfas de 1<sup>o</sup> instar de *Nezara viridula* (L.) apresentam agregação marcante sobre as posturas, levantando a possibilidade de aquisição de simbioses depositados na superfície dos ovos por contaminação. Assim foram realizados estudos referentes à esterilização da superfície de ovos, efeito de isolamento de ovos e perturbação das ninfas agregadas sobre a postura, efeito de antibióticos no desenvolvimento ninfal, e detecção de bactérias presentes no trato digestório do inseto. A esterilização da superfície dos ovos, através de radiação ultravioleta (UV-C) não foi completa e a emergência de ninfas foi reduzida em 50% após 10 minutos de exposição à radiação UV-C. Hipoclorito de sódio (1 e 2,5%) impediu o desenvolvimento do embrião e a sobrevivência das ninfas de 1<sup>o</sup> instar. Formaldeído a 8% foi eficiente para eliminar as bactérias culturáveis da superfície dos ovos, e não houve diferenças significativas no tempo de desenvolvimento total das ninfas e peso no primeiro dia de vida adulta em comparação aos insetos testemunha. O efeito de grupo sobre a performance das ninfas de *N. viridula* no 1<sup>o</sup> instar indicou a mortalidade de 23,3% para ninfas mantidas individualizadas e 13,3% para ninfas mantidas em grupo. As ninfas que se desenvolveram de ovos isolados tiveram o tempo de desenvolvimento retardado em relação às ninfas mantidas em grupo no 1<sup>o</sup> instar. A mortalidade total das ninfas de *N. viridula* foi, respectivamente, 43,3% e 23,3% para as ninfas removidas do córion, e para as ninfas testemunha, mas não houve diferenças no tempo de desenvolvimento e no peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta. Os antibióticos afetaram o desenvolvimento de ninfas de *N. viridula* de forma positiva (estreptomicina), acelerando o desenvolvimento ninfal e originando adultos mais pesados; e de forma negativa (tetraciclina), atrasando o desenvolvimento ninfal e originando adultos com peso menor, quando comparados à testemunha (sem antibióticos). A emergência das

ninfas foi variável de acordo com a umidade relativa (UR), sendo de 83,9% (100% UR); 89,5% (84% UR); 76,0% (76% UR); 58,9% (55% UR); 38,5% (33% UR) e 19,1% (0% UR); apenas ninfas mantidas em 100% UR atingiram o 2<sup>o</sup> instar, enquanto a 0% UR, todas as ninfas morreram poucas horas após a emergência, sem permanecer sobre a postura. Ninfas expostas a gradientes de UR deslocaram-se da superfície dos ovos e buscaram as áreas com UR mais alta 30 h após a eclosão, permanecendo na margem do papel saturado com água, mas evitando ficar diretamente em contato com a água, até a troca de instar. Verificou-se redução significativa no valor do pH da região do ventrículo 1 (V1) (6,6) e V2 (6,1), para o V3 (5,2). Foram identificadas três bactérias através do seqüenciamento de um segmento rDNA 16S: *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* em V1, V2 e V3, e uma bactéria identificada como próxima a *Pantoea* sp. na região V4; e *Serratia marcescens*, bactéria culturável mais freqüentemente encontrada em adultos provenientes do campo.

**PALAVRAS CHAVES:** Heteroptera, bactéria, trato digestório, comportamento.

## ABSTRACT

First instars of *Nezara viridula* (L.) present a strong aggregation on egg masses, raising the possibility of simbiotic acquisition from the egg surface. Studies were conducted regarding eggs' surface sterilization, effect of egg isolation and removal of nymphs from egg masses on the survivorship and development of 1<sup>st</sup> instars, effect of antibiotics in the nymphal development, and bacteria detection in the digestive tract of adults. Sterilization of egg surface with ultraviolet radiation (UV-C) reduced the emergence of nymphs by 50% after 10 minutes of exposition. Sodium hypochlorite (1 – 2.5%) prevented the embryonic development and the 1<sup>st</sup> instar survivorship. Formaldehyde 8% eliminated culturable bacteria from egg surface, but resulted in no significant differences in total development time and weight in the 1<sup>st</sup> day of adult life compared to control nymphs. During the 1<sup>st</sup> instar, mortality of individualized nymphs was 23.3%, while for nymphs kept in group mortality was 13.3%. First instars that grew from isolated eggs showed delayed development compared to nymphs kept in group. Total nymphal mortality of *N. viridula* was, respectively, 43.3% and 23.3% for nymphs removed from the corion, and nymphs that remained on the corion (control), but there were no differences in developmental time and in weight of adult in the 1<sup>st</sup> day. Antibiotics (streptomycin) reduced nymphal development time and originated heavier adults compared to the control, while tetracyclin had a reverse effect. Humidity affected the development of the embryos and 1<sup>st</sup> instars behavior. Nymphal emergency was variable with different relative humidity (RH) being 83.9% (100% RH); 89.5% (84% RH); 76.0% (76% RH); 58.9% (55% RH); 38.5% (33% RH), and 19.1% (0% RH). Nymphs kept in 100% RH reached the 2<sup>nd</sup> instar, nymphs in 0% RH died few hours after the emergency without staying on the corion. Nymphs moved from corion to areas with higher RH, 30 h after emergence,

staying on the edge of water-saturated paper, but avoiding direct contact with the water, until the molt. The pH of the digestive system was variable: Ventriculus 1 (V1) (6.6), V2 (6.1), and V3 (5.2). Three bacteria were identified using rDNA 16S segment sequencing: from V1 to V3, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis*; from V4, a bacterium close to *Pantoea* sp.; and from the entire digestive system, *Serratia marcescens*, which was frequently found in insects field collected.

KEYWORDS: Heteroptera, bacteria, gut, behavior.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média $\pm$ EP) de ninfas de <i>Nezara viridula</i> oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , $60\pm 10\%$ UR, fotoperíodo 14h L:10h E) (número de ninfas entre parênteses).....	24
--	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média $\pm$ EP) de ninfas de <i>Nezara viridula</i> oriundas de ovos isolados ou mantidos em grupos, alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , $60\pm 10\%$ UR, fotoperíodo 14h L:10h E) (número de ninfas entre parênteses). .....	35
Tabela 3.2. Tempo de desenvolvimento (média $\pm$ EP) de ninfas de <i>Nezara viridula</i> removidas de seu córion no 1 <sup>o</sup> ínstar (removidas) e não removidas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , $60\pm 10\%$ UR, fotoperíodo 14h L:10h E) (número de ninfas entre parênteses). .....	43

### CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média $\pm$ EP) de ninfas de <i>Nezara viridula</i> tratadas com antibióticos, tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , $60\pm 10\%$ UR, fotoperíodo 14h L:10h E) (número de ninfas entre parênteses).....	54
--	----

## CAPÍTULO 5

Tabela 5.1. Umidade relativa (aproximada) à temperatura de 25°C, obtida com água destilada, soluções saturadas de sais e sílica gel. ....	65
---	----

## CAPÍTULO 6

Tabela 6.1. Comprimento (C) e largura (L) (mm) (média ± EP) em diferentes regiões do sistema digestório de <i>Nezara viridula</i> .....	80
Tabela 6.2. Valores de pH (média ± EP) em diferentes regiões do sistema digestório de <i>Nezara viridula</i> . ....	85

## CAPÍTULO 7

Tabela 7.1 Número de acesso ao depósito das seqüências de rDNA 16S no Genbank das bactérias encontradas no trato digestório de <i>Nezara viridula</i> . ....	100
Tabela 7.2. Tempo de desenvolvimento (dias) (média ± EP) de ninfas de <i>Nezara viridula</i> tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L), alimentadas com vagens verdes de feijão e mantidas em sala climatizada (25±1°C, 50±10% UR, fotoperíodo 16 h L:8h E) (número de ninfas entre parênteses). ....	102

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Ninfas de *Nezara viridula* recém-emergidas agregadas sobre a postura.....2

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Emergência (%) de ninfas de *Nezara viridula* em relação ao tempo de exposição (min.) das posturas à radiação ultravioleta (UV-C) (n=2). ..... 19

Figura 2.2. Número de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) em meio de cultura Agar Tripsina Caseína de Soja, diluído 10 vezes (0,1 x TSA), em cinco ovos de *Nezara viridula*, submetidos à radiação UV-C; leitura após 48hs de incubação (n=2)...20

Figura 2.3. Mortalidade (%) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD (25±1°C, 60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....23

Figura 2.4. Peso (média ± EP) no 1º dia de vida adulta de *Nezara viridula* oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), e as ninfas alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD (25±1°C, 60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). .....25

## CAPÍTULO 3

- Figura 3.1. Mortalidade (%) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos isolados ou mantidos em grupos, alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....34
- Figura 3.2. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* cujos ovos foram isolados ou mantidos agrupados e as ninfas alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L:10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ). .....37
- Figura 3.3. Variação de peso (média  $\pm$  EP) de adultos de *Nezara viridula* oriundos de ovos isolados ou mantidos em grupos e cujas ninfas foram alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L:10h E). ...38
- Figura 3.4. Sobrevivência e longevidade (média  $\pm$  EP) de adultos de *Nezara viridula* oriundos de ovos isolados ou mantidos em grupo e cujas ninfas foram alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....40
- Figura 3.5. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* removidas do córion no 1<sup>o</sup> instar (removidas) e ninfas que permaneceram sobre o córion (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....42
- Figura 3.6. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* cujas ninfas foram removidas de seu córion no 1<sup>o</sup> instar (removidas) e não removidas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,

60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). .....44

## CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com os antibióticos tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....52

Figura 4.2. Peso (média ± EP) no 1º dia de vida adulta de *Nezara viridula* tratados na fase ninfal com antibióticos tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). .....56

Figura 4.3. Sobrevivência e longevidade (média ± EP) de adultos de *Nezara viridula*, machos e fêmeas tratados com antibióticos (tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L) e não tratados (testemunha), alimentados com vagens verdes de soja e mantidos em câmaras BOD ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60±10% UR, fotoperíodo 14h L:10h E). .....58

## CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Frasco de vidro com solução saturada de sais (esquerda) e suporte plástico com uma postura de *Nezara viridula* dentro do frasco (direita). .....65

- Figura 5.2. Arena elaborada para verificar o deslocamento das ninfas de *Nezara viridula* de 1º instar para área com umidade. A = cório dos ovos abandonado; B = ninfas 1º instar agregadas junto ao papel saturado com água; C = tira de papel filtro saturado com água; e D = reservatório de água destilada.....67
- Figura 5.3. Esquema do sistema de monitoramento do deslocamento das ninfas *Nezara viridula* em relação à umidade.....67
- Figura 5.4. Emergência (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* cujas posturas foram submetidas a diferentes umidades relativas obtidas com solução saturada de sais e sílica gel à 25°C (n=5).....69

## CAPÍTULO 6

- Figura 6.1. Fêmea de *Nezara viridula* preparada para a retirada do sistema digestório (posição dorsal). A = ventrículo 3; e B = ventrículo 4 (região dos cecos gástricos).....78
- Figura 6.2. Parte do sistema digestório de *Nezara viridula* (ventriculo = V), V1 – parte anterior, V4 – parte posterior do sistema digestório. ....81
- Figura 6.3. Ventrículo 1 (V1) de *Nezara viridula* conectado ao ventriculo 2 (V2 – estrutura tubular) indicado pela seta. ....82
- Figura 6.4. Detalhes do intestino médio de *Nezara viridula*. Ventrículo = V, V4 = região dos cecos gástricos. ....83
- Figura 6.5. Detalhes da região dos cecos gástricos (V4) de *Nezara viridula*, formado por quatro cordões de cecos e traquéias (túbulos de coloração prateada). A = parte proximal; B = parte mediana, setas indicando um dos cordões de cecos; e C = parte distal, seta indicando final dos cecos e início do reto. ....84

## CAPÍTULO 7

Figura 7.1. Gel de agarose (0,8%) com o produto da reação de PCR de bactérias culturáveis obtidas de ninfas e adultos de *Nezara viridula* com *primers* específicos para a região 16S DNA ribossomal. Banda A = bactéria isolada da superfície de ninfas de 1º instar; B = bactéria isolada do estômago de ninfa de 4º instar; C = bactéria isolada do estômago de uma fêmea; e D = bactéria isolada do estômago de um macho. ....98

Figura 7.2. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L), e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verde de feijão e mantidas em sala climatizada (25±1°C, 50±10% UR, fotoperíodo 16h L:8h E). .... 101

Figura 7.3. Peso (média ± EP) no 1º dia de vida adulta de *Nezara viridula* oriundas de ninfas tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L) e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de feijão e mantidas em sala climatizada (25±1°C, 50±10% UR, fotoperíodo 16 h L: 8h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). .... 103

## CAPÍTULO 8

Figura 8.1. Mortalidade de adultos de *Nezara viridula* submetidos a diferentes suspensões de *Chromobacterium suttsga* cepa PRAA4-1. Suspensão = colônias coletadas em placas de meio em 15 mL de água destilada e esterilizada; Sobrenadante = suspensão centrifugada a 15000 rpm/30 minutos; Autoclavado = suspensão autoclavada a 121°C/10 minutos; e Filtrado = suspensão filtrada em filtro Millipore 0,45 µm. .... 115

## CAPÍTULO 1

### Introdução geral

#### 1.1. Introdução

Os pentatomídeos fitófagos apresentam grande importância entre os insetos pragas que atacam a cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], sendo os percevejos sugadores de sementes, *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), os mais importantes (Panizzi & Slansky 1985). Na soja, o ataque provoca atraso na maturação, retenção foliar e desenvolvimento anormal de folículos e vagens (Daugherty *et al.* 1964, Boethel *et al.* 2000).

O percevejo verde *N. viridula* é um inseto de grande capacidade de dispersão (Panizzi & Slansky 1985), amplamente distribuído através das regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando danos a diversas espécies de plantas de importância econômica além da soja, tais como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maid. & Bet.) e pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] (Todd 1989, Bundy & McPherson 2000, Panizzi *et al.* 2000, Greene *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001). No Brasil, sua ocorrência tem sido observada principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e sua importância e distribuição têm aumentado devido à expansão da cultura da soja e algodão (Vivan 2004, Cruz 2004).

*N. viridula* coloca seus ovos em massas hexagonais de 30-130 ovos, na face inferior das folhas ou nas partes mais abrigadas das plantas; os ovos são amarelos e tornam-se rosados

com o desenvolvimento do embrião. Após a eclosão, as ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar permanecem aglomeradas sobre a postura, aparentemente sem se alimentar (Todd 1989) (Fig. 1.1). O fenômeno de agregação em *N. viridula*, assim como em outros pentatomídeos é comum durante a fase inicial de seu desenvolvimento. A agregação apresentada por *N. viridula* é marcante no 1<sup>o</sup> ínstar; do 2<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> ínstar a agregação torna-se mais difusa e, a partir deste ínstar, as ninfas dispersam (Panizzi *et al.* 1980).

Dois efeitos têm sido atribuídos à agregação ninfal de *N. viridula*: desenvolvimento mais rápido, e redução na mortalidade em ninfas agregadas (Lockwood & Story 1986).



Figura 1.1. Ninfas de *Nezara viridula* recém-emergidas agregadas sobre a postura.

Várias teorias têm sido propostas para justificar esse comportamento nos insetos, incluindo questões de reprodução, alimentação, defesa, higr e termo regulação. Em pentatomídeos é possível ainda que microrganismos simbiotes sejam depositados na superfície dos ovos pelas fêmeas durante a oviposição e, ao eclodirem, as ninfas ingiram ou absorvam esses possíveis simbiotes (Abe *et al.* 1995, Chapman 1998). Esses microrganismos permitiriam um desenvolvimento melhor do inseto.

Durante quatro bilhões de anos a evolução biológica tem originado milhões de espécies, e uma forma de promover a biodiversidade é através da combinação de diferentes espécies, que incluem relações de predador-presa, parasitismo e simbiose (Margulis 1970). Simbiose pode ser definida como uma relação íntima entre microrganismo e inseto, onde a aquisição e a manutenção destes microrganismos resulta em estruturas e vias metabólicas novas (Zook 1998). Através da evolução da Classe Insecta as bactérias têm sido uma força constante e dominante no processo (Dillon & Dillon 2004).

Relações simbióticas em diferentes grupos de insetos desenvolveram-se independentemente com diferentes tipos de microrganismos, os quais são divididos em intracelulares ou extracelulares quanto à localização nas células do hospedeiro (Tanaka & Kaya 1993). Deficiências nutricionais, necessidades bioquímicas e requerimento de compatibilidade sexual são algumas das condições que resultam nas relações entre estes organismos (Houk & Griffiths 1980, Bourtzis & O'Neill 1998, Bordenstein *et al.* 2001, Tamas *et al.* 2002, Clark 2003).

Os simbiotes são normalmente intracelulares localizando-se células especializadas, os micetócitos ou bacteriócitos onde, várias vezes, formam um agrupamento de células infectadas chamado de micetoma ou bacterioma. Estes microrganismos são transmitidos verticalmente

via ovo, como é o caso de *Buchnera*, *Wigglesworthia* e *Wolbachia* (Douglas 1989, 1998, Stevens *et al.* 2001, Wernegreen 2002).

Acredita-se que muitos microrganismos estejam envolvidos no processamento de alimento do inseto, através da quebra de moléculas complexas, ou síntese de aminoácidos essenciais, ou na defesa indireta do inseto, protegendo-o de infecções oportunistas. Estes microrganismos simbiotes estariam envolvidos com fontes metabólicas valiosas para alguns insetos que se alimentam de dietas de digestão difícil, como a celulose (Cazemier *et al.* 2003) ou dietas com deficiências nutricionais, como o floema, que é deficiente em lipídeos e aminoácidos essenciais (Adams & Douglas 1997) e o sangue, considerado pobre em várias vitaminas do complexo B (Dadd 1985, Rainey *et al.* 1995).

No caso de simbiotes extracelulares, estes se manteriam nas cavidades do corpo do hospedeiro (Eichler & Schaub 2002). Segundo Bignell (1984) e Cazemier *et al.* (1997), o trato digestório é o habitat primário para os simbiotes extracelulares nos insetos. A microbiota presente no trato digestório representa todos os tipos de relacionamento, do patogênico ao mutualismo obrigatório, sendo um componente importante para o entendimento da biologia dos insetos (Dillon & Dillon 2004).

Muitos heterópteros possuem apêndices no trato digestório chamados “cecos” ou criptas de bactérias. Esses são de várias formas e tamanhos e abrigam sempre grande número de microrganismos (Steinhaus 1967). Forbes (1892) observou que em percevejos das famílias Coreidae e Lygaeidae essas estruturas em forma de cecos podem estar presentes em um gênero e ausentes em outro. Outros hemípteros (p. ex., Pentatomidae, Scutelleridae, Corimelaenidae) invariavelmente possuem essas estruturas para comportar bactérias que poderiam ter relações simbióticas.

Goodchild (1978), estudando *Piezosternum calidum* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), encontrou evidências que apóia a hipótese de que o intestino médio apresenta uma bactéria simbiótica proveniente dos cecos gástricos. Abe *et al.* (1995) confirmaram a presença de um simbiote em *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae) onde a transmissão do simbiote foi inibida pela desinfecção da superfície dos ovos e as ninfas não se tornaram adultos, devido à mortalidade causada por infecções oportunistas de microrganismos como fungos ou bactérias dos gêneros *Serratia* e *Staphylococcus*.

Para verificar se a agregação de ninfas de *N. viridula* recém-emergidas sobre a massa de ovos permite o contato com simbioses essenciais, Lockwood & Story (1986) realizaram estudos onde foram comparados ovos esterilizados com formaldeído e ovos não esterilizados. Em relação à sobrevivência durante o período de desenvolvimento ninfal, a mortalidade dos insetos nos dois tratamentos não diferiu significativamente. Portanto, os autores concluíram que não havia simbioses essenciais depositados sobre a massa dos ovos para colonizar as ninfas. No entanto, Mourão & Panizzi (1998), em estudos preliminares, obtiveram resultados contrastantes aos reportados por Lockwood & Story (1986). Os ovos que foram esterilizados com formol ou radiação ultravioleta originaram ninfas que apresentaram níveis de sobrevivência menores do que as ninfas oriundas de ovos que não sofreram nenhum tratamento. Da mesma forma, houve um aumento no tempo de desenvolvimento e redução no peso para ninfas oriundas de ovos tratados, em comparação às ninfas de ovos sem tratamento.

Devido à carência de informações mais conclusivas sobre esse assunto, foram realizados experimentos para verificar a existência de relações entre bactérias e o percevejo-verde-da-soja, *N. viridula*.

## 1.2. Objetivos

O estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Testar a eficiência de esterilização física e química da superfície dos ovos de *N. viridula* sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de ninfas.
- Testar antibióticos de amplo espectro na sobrevivência e desenvolvimento de ninfas de *N. viridula*.
- Verificar o efeito do comportamento gregário no 1º instar sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de ninfas.
- Determinar o efeito da umidade na emergência e sobrevivência de ninfas de 1º instar de *N. viridula*.
- Descrever mais detalhadamente sistema digestório de *N. viridula*.
- Detectar bactérias no trato digestório do inseto através de técnicas moleculares (amplificação e seqüenciamento do segmento 16S do DNA ribossomal) e através de testes bioquímicos.
- Verificar a ação tóxica de *Chromobacterium suttsuga* sobre adultos de *N. viridula*.

### 1.3. Literatura citada

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39:109-115.

**Adams, D. & A.E. Douglas. 1997.** How symbiotic bacteria influence plant utilization by the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. Oecologia 110: 528-532.

**Bignell, D.E. 1984.** The arthropod gut as an environment for microorganisms. P. 205-228. In Anderson, J.M., A.D.M. Rayner & D.W.H. Walton (eds.). Invertebrate-microbial interactions. Cambridge University Press. New York, NY. 352 p.

**Boethel, D.J., J.S. Russin, A.T. Wier, M.B. Layton, J.S. Mink & M.L. Boyd. 2000.** Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. J. Econ. Entomol. 93: 707-712.

**Bordenstein, S.R., F.P. O'Hara & J.H. Werren. 2001.** *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. Nature 409: 707-710.

**Bourtzis, K. & S. O'Neill. 1998.** *Wolbachia* infections and arthropod reproductions. Biosciences 48: 287-294.

- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Dynamics and seasonal abundance of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in a cotton-soybean ecosystem. *J. Econ. Entomol.* 93: 697-706.
- Cazemier, A.E., J.H.P. Hackstein, H.J.M. Op den Camp, J. Rosenberg & C. van der Drift. 1997.** Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microb. Ecol.* 33: 189-197.
- Cazemier, A.E., J.C. Verdoes, F.A.G. Reubsaet, J.H.P. Hackstein, C. van der Drift & H.J.M.O. den Camp. 2003.** *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. *Anton. Leeuw.* 83: 135-148.
- Chapman, R.F. 1998.** The insects: structure and function 4<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press, New York, NY. 788 p.
- Clark, M.E., Z. Veneti, K. Bourtzis & T.L. Karr. 2003.** *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mech. Develop.* 120: 185-198.
- Cruz, Jr., J.F.A. 2004.** Danos causados por *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) em maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Dissertação de mestrado, ESALQ, Piracicaba, SP. 41 p.

**Dadd, R.H. 1985.** Nutrition: organisms. P. 313-390. In Kerkut G.A. & L.I. Gilbert (eds.). Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 4. Pergamon, Oxford, UK. 743 p.

**Daugherty, D.M., M.H. Neustadt, C.W. Gehrke, L.E. Cavanah, L.F. Williams & D.E. Green. 1964.** An evaluation of damage to soybeans by brown and green sting bugs. J. Econ. Entomol. 57: 719-22.

**Dillon, R.J. & V.M. Dillon. 2004.** The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu. Rev. Entomol. 49: 71-92.

**Douglas, A.E. 1989.** Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. 64: 409-434.

**Douglas, A.E. 1998.** Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annu. Rev. Entomol. 43: 17-37.

**Eichler, S. & G.A. Schaub. 2002.** Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp. Parasit. 100: 17-27.

**Forbes, S.A. 1892.** Bacteria normal to digestive organs of Hemiptera. Bull. Illinois State Lab. Nat. History 4: 1-6.

- Goodchild, A.J.P. 1978.** The nature and origin of the mid-gut contents in a sap-sucking Heteropteran, *Piezosternum calidum* Fab. (Tessaratominae) and the role of symbiotic bacteria in its nutrition. Entomol. Exp. Appl. 23: 177-188.
- Greene, J.K., S.G. Turnipseed, M.J. Sullivan & O.L. May. 2001.** Treatment thresholds for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in cotton. J. Econ. Entomol. 94: 403-409.
- Houk, E.J. & G.W. Griffiths. 1980.** Intracellular symbiotes of the Homoptera. Annu. Rev. Entomol. 25: 161-187.
- Jones, V.P., D.M. Westcott, N.N. Finson & R.K. Nishimoto. 2001.** Relationship between community structure and southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) damage in macadamia nuts. Environ. Entomol. 30: 1028-1035.
- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1986.** Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 15: 739-749.
- Margulis, L. 1970.** Origin of eukaryotic cells. Yale University Press. New Haven, CT. 349 p.
- Mourão, A.P.M. & A.R. Panizzi. 1998.** Influência da esterilização de posturas de *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) na eclosibilidade dos ovos e na sobrevivência das ninfas. P. 63. In Resumos XVIII Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro, RJ.

- Panizzi, A.R., M.H.M. Galileo, H.A.O. Gastal, J.F.F. Toledo & C.H. Wild. 1980.** Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybean. Environ. Entomol. 9: 293-297.
- Panizzi, A.R. & F. Slansky Jr. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. Fla. Entomol. 68: 184-214.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Economic importance of stink bug (Pentatomidae). P. 421-474. In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.
- Rainey, F.A., J. Burghardt, R.M. Kroppenstedt, S. Klatte & E. Stackebrandt. 1995.** Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. Microbiology 141: 523-528.
- Steinhaus, E.A. 1967.** Insect microbiology. Hafner Pub. Com., New York, NY. 763 p.
- Stevens, L., R. Giordano & R.F. Fialho. 2001.** Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. Annu. Rev. Ecol. System. 32: 519-545.

**Tamas, I., L. Klasson, B. Canbäck, A.K. Näslund, A.S. Eriksson, J.J. Wernegreen, J.P.**

**Sandström, N.A. Moran & S.G.E. Andersson. 2002.** 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296: 2376-2379.

**Tanaka, Y. & H.K. Kaya. 1993.** *Insect pathology*. Academic Press, New York, NY. 666 p.

**Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.

**Vivan, L.M. 2004.** Zoneamento, caracterização morfométrica e genética e aspectos biológicos de diferentes tipos fenológicos de *Nezara viridula* (Linnaeus) (Heteroptera: Pentatomidae) ocorrentes no Brasil. Tese Doutorado UFPR, Curitiba, PR. 118p.

**Wernegreen, J.J. 2002.** Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Rev. Gen.* 3: 850-861.

**Zook, D. 1998.** A new symbiosis language. *Symbiosis News* 1: 1-3.

## CAPÍTULO 2

### **Esterilização das posturas de *Nezara viridula* (L.) e sua influência na viabilidade dos ovos, sobrevivência e desenvolvimento ninfal**

#### **2.1. Introdução**

*Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) é um dos percevejos mais estudados devido à sua importância econômica, atacando a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e várias outras culturas, e sua ampla distribuição geográfica (Todd 1989, Panizzi *et al.* 2000). Apesar dos muitos estudos com este inseto-praga, ainda pouco se conhece sobre as suas relações com possíveis simbioses, sendo os dados de literatura sobre este assunto, praticamente inexistentes.

Goodchild (1978) estudando *Piezosternum calidum* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae), e Abe *et al.* (1995), estudando *Plautia stali* Scott (Heteroptera: Pentatomidae), encontraram evidências que apóiam a hipótese da existência de bactérias simbióticas. Essas bactérias estariam presentes no trato digestório desses percevejos sendo adquiridas pelas ninfas através de contaminação superficial no córion.

As contaminações dos ovos com simbioses extracelulares podem ocorrer de duas formas: por ação ativa, quando os simbioses são depositados pela fêmea sobre os ovos após a oviposição; ou passiva, quando os ovos são contaminados durante a oviposição. Independente da forma de contaminação dos ovos, as ninfas adquirem os simbioses logo após a emergência, ingerindo ou tateado o córion (Steinhaus 1967, Douglas 1989).

Desde que a transmissão vertical (entre adultos e ninfas da próxima geração) dos simbiossantes pode ocorrer pela contaminação externa dos ovos, insetos apossimbiossantes, isto é, livre de microrganismos simbiossantes, poderiam ser obtidos pela assepsia externa dos ovos antes da emergência das ninfas (Dadd 1985, Beard *et al.* 1992, Fukatsu & Hosokawa 2002).

Partindo da hipótese de que os simbiossantes estão presentes na superfície dos ovos de *N. viridula*, e provavelmente desempenham papel essencial na sobrevivência e/ou no desenvolvimento do inseto, este estudo objetivou testar técnicas de esterilização da superfície dos ovos através de tratamentos físicos e químicos e verificar seu efeito na viabilidade dos ovos, sobrevivência e desenvolvimento das ninfas.

## **2.2. Material e métodos**

Posturas de *N. viridula* foram coletadas da criação mantida na Embrapa Soja, em Londrina PR, e colocadas em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) esterilizadas e forradas com papel de filtro umedecido. As placas contendo as posturas foram colocadas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) para se verificar a viabilidade dos ovos pelo desenvolvimento do embrião. As posturas selecionadas foram divididas em grupos de 50-60 ovos e submetidas aos tratamentos descritos a seguir.

### **2.2.1. Esterilização física – radiação ultravioleta (UV-C)**

A radiação ultravioleta compreende o espectro eletromagnético entre 100 a 400 nm é amplamente utilizada para desinfecção de superfície, devido a sua eficiência na eliminação de

microrganismos e por não deixar resíduos (Sizer & Balasubramaniam 1999). A radiação que possui maior ação germicida, é denominada UV-C e se encontra na faixa de 220 a 270 nm, devido à capacidade de penetrar nas paredes celulares causando um desarranjo molecular do material genético, impedindo a reprodução do microrganismo. Por esta razão, lâmpadas germicidas trabalham com o comprimento de onda de 254 nm (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas 2004).

Os ovos foram submetidos à radiação ultravioleta (UV-C) com uma lâmpada germicida (UV Germicidal GE – 30W) a 25 cm das amostras, por 5, 10 e 15 minutos com intervalos de um minuto a cada cinco minutos de exposição para que os ovos não fossem danificados pelo aquecimento. Após a exposição à radiação UV-C, duas amostras de cinco ovos por tratamento foram mergulhadas em 500 µL de solução tampão estéril ( $\text{MgSO}_4$  0,1 M pH 7) e agitados em vortex, para suspender os microrganismos da superfície dos ovos. Das suspensões, foram retiradas três alíquotas de 100 µL e espalhadas sobre meio de cultura Agar Tripsina Caseína de Soja diluído 10 vezes (0,1 TSA) com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas inoculadas foram mantidas em incubadoras a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

## **2.2. Esterilização química**

Para a esterilização química da superfície dos ovos, foram usados hipoclorito de sódio (NaOCl) e formaldeído (HCHO). Esses componentes são os mais utilizados para a esterilização da superfície de ovos de insetos (Sikorowski & Goodwin 1985).

### **2.2.2. Hipoclorito de sódio (NaOCl)**

Massas de ovos ( $\approx 50$  ovos) ( $n = 6$ ) foram mergulhadas em soluções de hipoclorito de sódio (1 e 2,5%) por três minutos e a seguir, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Dez amostras de cinco ovos por tratamento foram colocadas em 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão estéril ( $\text{MgSO}_4$  0,1 M pH 7), agitadas em vortex e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram espalhadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura 0,1 TSA, com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas inoculadas foram mantidas em incubadora a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

### **2.2.3. Formaldeído (HCHO)**

Massas de ovos ( $\approx 50$  ovos) ( $n = 6$ ) foram mergulhadas em solução de formaldeído na concentração de 8% por três minutos e lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Dez amostras de cinco ovos por tratamento foram colocadas em 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão estéril ( $\text{MgSO}_4$  0,1 M pH 7), agitadas em vortex e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram espalhadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura 0,1 TSA, com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas inoculadas foram mantidas em incubadora ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **2.2.4. Biologia de ninfas**

As posturas tratadas, e sem tratamento (testemunha) foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizadas e forradas com papel de filtro umedecido e mantidas em

câmara BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E), até que as ninfas atingissem o 2<sup>o</sup> ínstar.

No 1<sup>o</sup> dia do 2<sup>o</sup> ínstar as ninfas de cada tratamento foram individualizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel de filtro, contendo um recipiente (2,8 cm de diâmetro) com algodão embebido em água e uma vagem verde de soja em fase de enchimento de grão (R6). Cada placa constituiu uma unidade experimental distribuída em delineamento completamente casualizado.

As ninfas foram observadas diariamente e, a cada dois dias, o alimento, água e papel de filtro foram trocados. As ninfas foram mantidas em câmara BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E), e observadas diariamente anotando-se a mudança de ínstar e a mortalidade. No 1<sup>o</sup> dia de vida adulta, os insetos foram sexados e pesados individualmente em balança eletrônica.

#### **2.2.5. Análise dos dados**

A porcentagem de mortalidade ninfal foi calculada, e os dados de tempo de duração de cada ínstar, o tempo total de desenvolvimento das ninfas (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> ínstar) e o peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Esterilização física - Radiação ultravioleta (UV-C)

A emergência de ninfas foi afetada proporcionalmente ao tempo de exposição à radiação UV-C, provavelmente devido aos efeitos da radiação sobre o embrião do inseto, ou devido ao calor produzido pela incidência da UV-C sobre a superfície dos ovos (Fig. 2.1). A exposição a cada cinco minutos com a interrupção de um minuto, aparentemente, não foi suficiente para reduzir a mortalidade dos embriões que foi de 50% após 10 minutos de exposição à radiação UV-C. No campo, as posturas são colocadas na face inferior das folhas (Todd 1989). Este comportamento possivelmente auxilia na proteção dos ovos à exposição direta à radiação solar, que poderia comprometer o desenvolvimento dos embriões.

Após 15 minutos de exposição à radiação UV-C, a lavagem dos ovos ainda apresentou, em média, cinco unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) (Fig. 2.2), comprovando a ineficiência do método para esterilizar completamente a superfície do ovo. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao fato dos ovos apresentarem irregularidades. A casca do ovo dos insetos consiste de duas camadas principais, uma externa, o córion, e outra interna, a membrana vitelínica (Hinton 1985). O córion dos ovos da família Pentatomidae possui várias microestruturas e processos (Candan & Suludere 1999, Bundy & McPherson 2000, Wolf *et al.* 2002), sendo possível que esta superfície irregular sirva de abrigo aos microrganismos protegendo-os da radiação UV. O tratamento com UV é mais efetivo em superfícies lisas, uma vez que superfícies irregulares podem impedir que a radiação UV atinja uniformemente toda a área tratada (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas 2004).

O fato da massa de ovos ser tridimensional dificulta que a radiação atinja toda a superfície do ovo de forma homogênea. Em qualquer posição de irradiação há sempre regiões de sombra que protegeriam possíveis microrganismos depositados na superfície do ovo. A radiação UV é mais eficiente em superfícies e em materiais transparentes, como ar e a água, e não é efetivo em áreas de sombra (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas 2004).

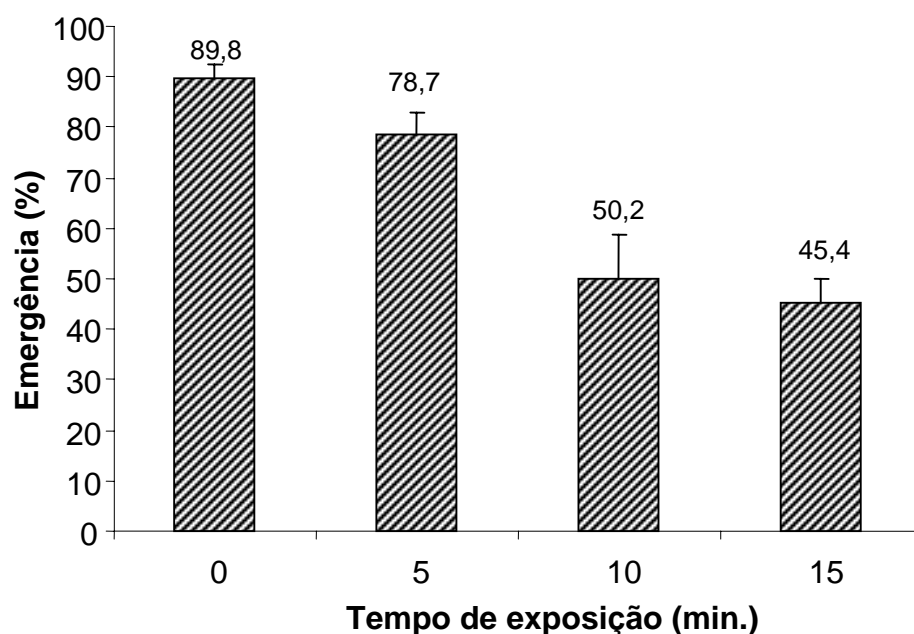


Figura 2.1. Emergência (%) de ninfas de *Nezara viridula* em relação ao tempo de exposição (min.) das posturas à radiação ultravioleta (UV-C) (n=2).

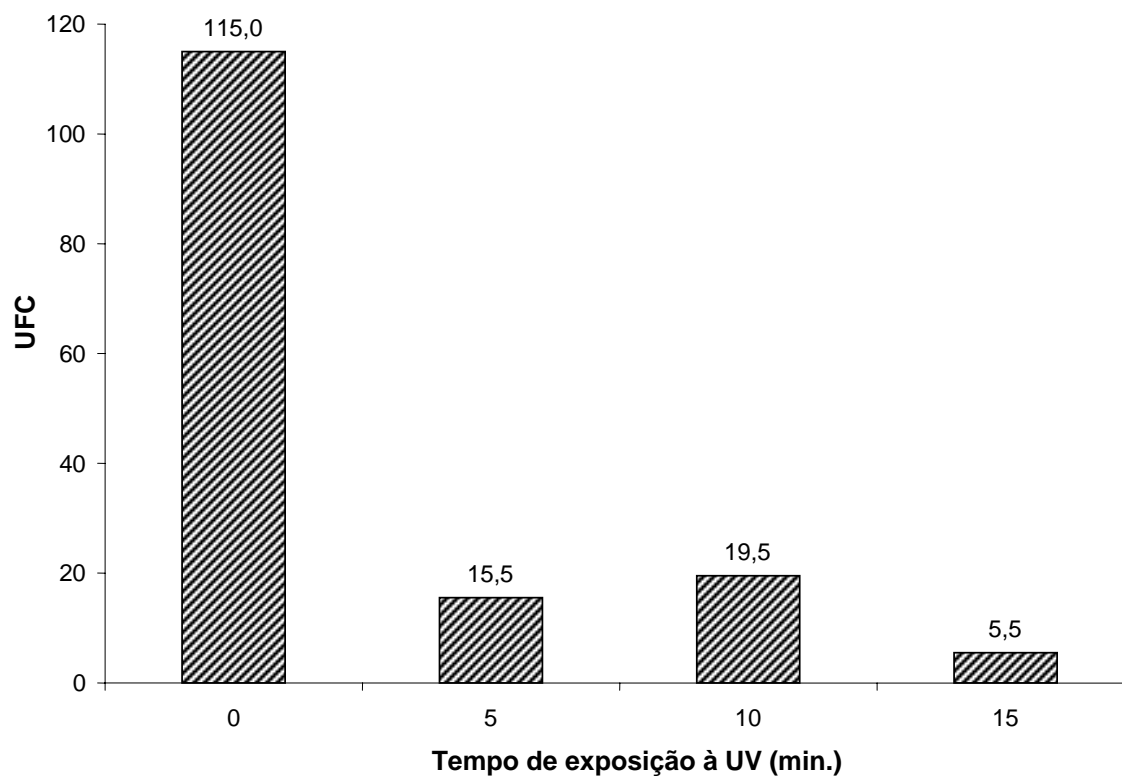


Figura 2.2. Número de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) em meio de cultura Agar Tripsina Caseína de Soja, diluído 10 vezes (0,1 x TSA), em cinco ovos de *Nezara viridula*, submetidos à radiação UV-C; leitura após 48hs de incubação (n=2).

Devido à incapacidade de eliminar todos os microrganismos da superfície dos ovos, e à alta mortalidade de embriões de *N. viridula*, a esterilização através de radiação UV foi descartada, para obtenção de ninfas apossimbióticas.

## **2.3.2. Esterilização química**

### **2.3.2.1. Hipoclorito de sódio**

A suspensão da lavagem dos ovos tratados com hipoclorito de sódio (NaOCl) não apresentou nenhuma unidade formadora de colônia bacteriana (UFC) após 72 horas, demonstrando que a superfície dos ovos ficou livre de microrganismos externos tanto na concentração de 1% como na de 2,5%.

Em todas as posturas tratadas com NaOCl 2,5% não houve emergência de ninfas. Apenas uma das posturas submetida a NaOCl a 1% com 63 ovos apresentou 14 ninfas emergidas, mas nenhuma atingiu o 2<sup>o</sup> ínstar, possivelmente devido ao efeito residual do NaOCl que de algum modo afetou o desenvolvimento do embrião e a sobrevivência das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar. A ação germicida do hipoclorito de sódio é muito eficaz (Sikorowski & Lawrence 1994), mas apresenta como desvantagem sua difícil remoção. Mesmo após várias lavagens, resíduos de NaOCl permanecem na superfície tratada (Abdul-Baki 1974).

Estes resultados sugerem que a utilização de NaOCl para esterilização superficial dos ovos de *N. viridula* nas concentrações utilizadas, apesar da eliminação dos microrganismos culturáveis, não é recomendável devido à mortalidade do embrião.

### 2.3.2.2. Formaldeído

As suspensões das lavagens dos ovos tratados com formaldeído não apresentaram nenhuma unidade formadora de colônia bacteriana (UFC) após 72 horas de incubação, na concentração de 8%. Lockwood & Story (1986) esterilizaram a superfície de ovos de *N. viridula* mergulhando-os em formaldeído a 15% por 20 minutos. Este estudo mostrou que formaldeído a 8% por 3 minutos foi suficiente para eliminar as bactérias culturáveis da superfície dos ovos de *N. viridula*. Formaldeído é um dos mais efetivos antimicrobianos, atuando nas vias metabólicas dos microrganismos impedindo sua reprodução e, quando usado na concentração apropriada, destrói todos os microrganismos presentes na superfície dos ovos (Sikorowski & Lawrence 1994), mas seu manuseio necessita de cuidados especiais por ser carcinogênico (Sun 1981).

A mortalidade total (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> ínstar) das ninfas provenientes de ovos tratados com formaldeído foi de 30%, enquanto no tratamento testemunha foi de 20%. Aparentemente o tratamento com este agente de desinfecção na concentração de 8% afetou a sobrevivência das ninfas (Fig. 2.3). Lockwood & Story (1986) compararam a sobrevivência de ninfas oriundas de ovos de *N. viridula* esterilizados com formaldeído 15% durante 20 minutos e não esterilizados e a mortalidade das ninfas não diferiu significativamente entre os tratamentos, mas ambas foram elevadas (>60%).

O tempo de desenvolvimento em todos os ínstars não diferiu estatisticamente entre as ninfas tratadas com formaldeído e as ninfas testemunhas (Tabela 2.1). O tempo total médio de desenvolvimento variou de 21 a 22 dias. Estes tempos foram similares a de outros estudos de

biologia de ninfas de *N. viridula* conduzidos em condições similares e as ninfas alimentadas com vagens verdes de soja (Panizzi 1997).

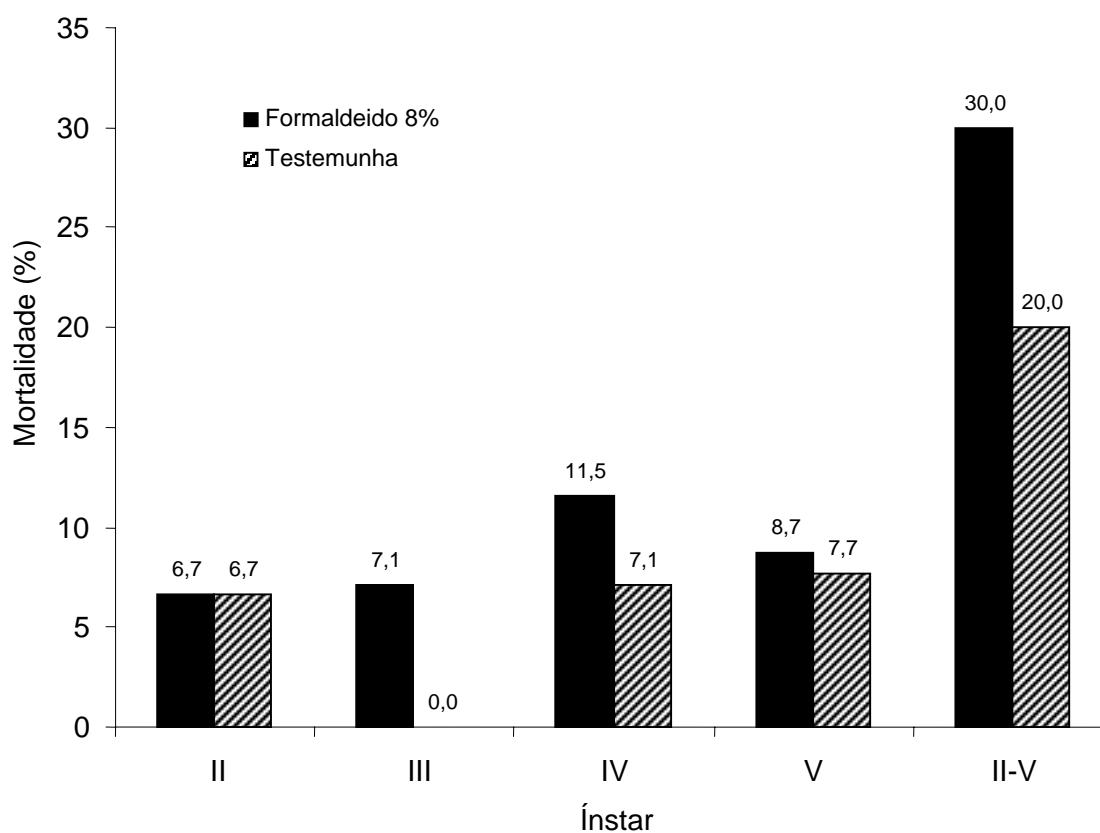


Figura 2.3. Mortalidade (%) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

Tabela 2.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) (número de ninfas entre parênteses).

Tratamentos	Ínstar <sup>1</sup>				Fêmea <sup>1</sup>	Macho <sup>1</sup>
	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>		
Formaldeído 8%	4,8 $\pm$ 0,10 a (28)	4,3 $\pm$ 0,26 a (26)	4,7 $\pm$ 0,26 a (23)	8,2 $\pm$ 0,15 a (21)	21,1 $\pm$ 0,16 a (11)	21,2 $\pm$ 0,20 a (10)
Testemunha	4,9 $\pm$ 0,05 a (28)	3,9 $\pm$ 0,08 a (28)	4,2 $\pm$ 0,12 a (26)	8,6 $\pm$ 0,19 a (24)	22,0 $\pm$ 0,30 a (12)	21,1 $\pm$ 0,23 a (12)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ).

O peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de machos não diferiu estatisticamente entre as ninfas tratadas com formaldeído e as ninfas testemunha (Fig. 2.4). Entre as fêmeas houve diferença estatística no peso no 1<sup>o</sup> dia, as ninfas tratadas com formaldeído foram mais pesadas (185,3 mg) do que as fêmeas originadas das ninfas testemunha (166,9 mg). Talvez isto se deva à mortalidade maior das ninfas tratadas com formaldeído, que pode ter eliminado as ninfas mais debilitadas, sobrevivendo às ninfas saudáveis de peso maior. O peso foi estatisticamente maior para as fêmeas quando comparadas aos machos. Resultado similar foi encontrado em outras biólogias com *N. viridula* (Panizzi & Hirose 1995).

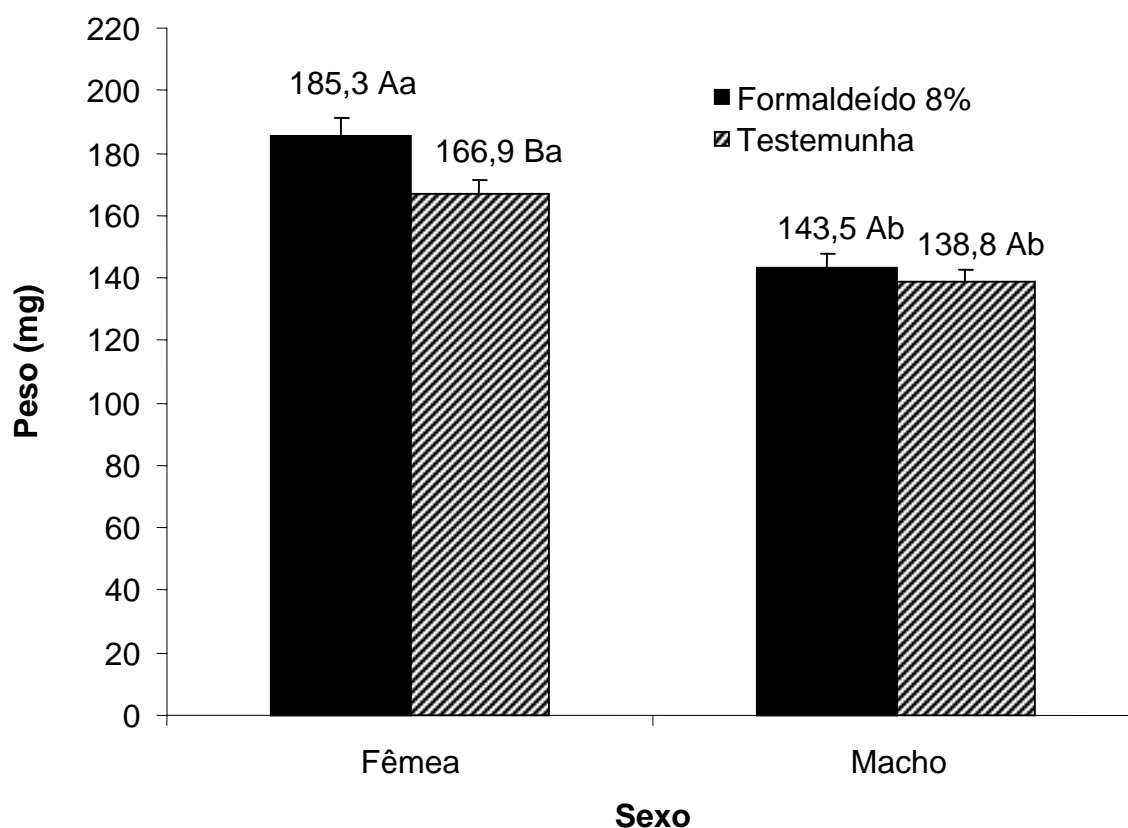


Figura 2.4. Peso (média  $\pm$  EP) no 1º dia de vida adulta de *Nezara viridula* oriundas de ovos tratados com solução de formaldeído (8%) e não tratados (testemunha), e as ninfas alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ).

Das metodologias testadas para esterilizar a superfície do córion de *N. viridula*, a radiação UV não permitiu a eliminação total das bactérias culturáveis e sua incidência afetou o desenvolvimento do embrião, reduzindo a emergência das ninfas após o tratamento. Entre os tratamentos químicos, o hipoclorito de sódio é utilizado frequentemente para a limpeza de

ovos em criações de insetos, mas nas concentrações testadas neste experimento (1 e 2,5%) afetou a emergência das ninfas. Formaldeído 8% se mostrou eficiente na eliminação de bactérias culturáveis e não afetou o desenvolvimento das ninfas, inclusive o peso das fêmeas oriundas de ovos tratados com formaldeído foi maior quanto comparado fêmeas testemunhas. Estes resultados com formaldeído sugerem a não existência de bactérias essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência das ninfas de *N. viridula* depositados na superfície do córion, mas não se pode descartar a possibilidade da existência de bactérias não culturáveis, que poderiam sobreviver a este tratamento de esterilização, e colonizariam as ninfas de *N. viridula*.

#### **2.4. Literatura citada**

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Abdul-Baki, A.A. 1974.** Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfection in <sup>14</sup>C incorporation studies. Plant Physiol. 53: 768-771.

**Beard, C.B.P., W. Mason, S. Aksoy, R.B. Tesh & F.F. Richards. 1992.** Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 195-200.

- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Morphological examination of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to genera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 616-624.
- Candan, S. & Z. Suludere. 1999.** Chorionic structure of *Graphosoma lineatum* (Linneaus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Entomol. Res. Soc.* 1: 1-7.
- Dadd, R.H. 1985.** Nutrition: organisms. P. 313-390. In Kerkut G.A. & L.I. Gilbert (eds.). *Comparative insect physiology, biochemistry & pharmacology*, vol. 4. Pergamon, Oxford. UK. 743 p.
- Douglas, A.E. 1989.** Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol. Rev.* 64: 409-434.
- Fukatsu, T. & T. Hosokawa. 2002.** Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 389-396.
- Guerrero-Beltrán, J.A. & G.V. Barbosa-Cánovas. 2004.** Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Sci. Tech. Int.* 10: 137-147.
- Hinton, H.E. 1985.** *Biology of insect eggs*, vol. 1. Pergamon Press. Oxford. UK. 473 p.

- Goodchild, A.J.P. 1978.** The nature and origin of the mid-gut contents in a sap-sucking Heteropteran, *Piezosternum calidum* Fab. (Tessaratominae) and the role of symbiotic bacteria in its nutrition. *Entomol. Exp. Appl.* 23: 177-188.
- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1986.** Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* 15: 739-749.
- Panizzi, A.R. 1997.** Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 99-122.
- Panizzi, A.R. & E. Hirose. 1995.** Survival, reproduction and starvation resistance of adult southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) reared on sesame or soybean. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 661-665.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Economic importance of stink bug (Pentatomidae). P. 421-474. In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.
- Sikorowski, P.P. & R.H. Goodwin. 1985.** Contaminant control and disease recognition in laboratory colonies. P. 85-105. In Singh P. & R.F. Moore (eds.). *Handbook of insect rearing*, vol. 1. Elsevier Sci., New York, NY, 488 p.

**Sikorowski, P.P. & A.M. Lawrence. 1994.** Microbial contamination and insect rearing. *Am. Entomol.* 42: 240-253.

**Sizer, C.E. & V.M. Balasubramaniam. 1999.** New intervention processes for minimally processed juice. *Food Tech.* 53: 64-67.

**StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6.  
[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

**Steinhaus, E.A. 1967.** *Insect microbiology*. Hafner Publishing Company. New York. NY, 763 p.

**Sun, M. 1981.** Study shows formaldehyde is carcinogenic. *Science* 213: 1232.

**Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.

**Wolf, K.W., W. Reid & D.A. Rider. 2002.** Eggs of the stink bug *Acrosternum (Chinavia) marginatum* (Hemiptera: Pentatomidae): a scanning electron microscopy study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34: 143-149.

## CAPÍTULO 3

### **Efeito de grupo sobre a performance das ninfas de *Nezara viridula* (L.) associado à perturbação da colônia**

#### **3.1. Introdução**

Para muitos insetos o fenômeno de agregação é comum durante a fase inicial de seu desenvolvimento, porém a função deste comportamento é desconhecida para a maioria dos insetos (Matthews & Matthews 1978). Em algumas circunstâncias, os insetos são capazes de alterar as condições do ambiente local pela agregação (Danks 2002). Benton & Crump (1979) observaram que agregados de *Coleomegilla maculata* (De Geer) (Coleoptera: Coccinellidae) são capazes de se aquecer e obter uma temperatura constante em comparação ao ambiente. Wilmer (1980) observou que a perda de água é reduzida em lagartas de *Imbrasia belina* (West.) (Lepidoptera: Saturniidae) que permanecem agregadas.

No percevejo *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) a agregação após a emergência é marcante com ninfas permanecendo em contato íntimo junto às cascas dos ovos, muitas vezes amontoando-se umas sobre as outras, durante todo o 1<sup>o</sup> instar (Kiritani 1964, Panizzi *et al.* 1980). Duas conseqüências foram atribuídas à agregação ninfal de *N. viridula*: ninfas agregadas desenvolvem-se mais rapidamente que ninfas isoladas, e a agregação reduz a mortalidade (Kiritani 1964).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar este comportamento em *N. viridula*, incluindo defesa, hidro e termo regulação e aquisição de simbioses (Lockwood & Story 1986,

Abe *et al.* 1995). Neste estudo, foi examinado o efeito da agregação durante o 1<sup>o</sup> ínstar no desenvolvimento ninfal e sobrevivência/longevidade de adultos de *N. viridula*.

### **3.2. Material e métodos**

Os ovos (posturas) obtidos da criação mantida na Embrapa Soja, em Londrina PR, foram colocados em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) esterilizadas e forradas com papel de filtro umidificado. As placas contendo as posturas foram colocadas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) para verificar a viabilidade dos ovos pelo desenvolvimento do embrião. As posturas selecionadas foram divididas em grupos de 50-60 ovos, e submetidas aos tratamentos descritos a seguir.

#### **3.2.1. Ninfas provenientes de ovos mantidos isolados e em grupos**

Quatro posturas foram separadas em duas partes aproximadamente iguais, na primeira parte, os ovos foram mantidos unidos em massa; na segunda, os ovos foram individualizados com a ajuda de um estilete. Os ovos isolados foram colocados individualmente em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Os ovos agrupados foram mantidos em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro). As placas foram forradas com papel de filtro umidificado e mantidas em BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) até as ninfas atingirem o 2<sup>o</sup> ínstar.

### **3.2.2. Ninfas removidas do córion no 1<sup>o</sup> ínstar**

Quatro posturas foram separadas em duas partes aproximadamente iguais e mantidas em placas forradas com papel de filtro umidificado e mantidas em BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) até a emergência das ninfas, após a emergência um grupo de ninfas foi mantido sobre o córion (testemunha) e o outro grupo foi retirado do córion com o auxílio de um pincel. Cada grupo foi colocado separadamente em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com papel de filtro umidificado, e mantidos em BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) até as ninfas atingirem o 2<sup>o</sup> ínstar.

### **3.2.3. Biologia das ninfas**

No 1<sup>o</sup> dia do 2<sup>o</sup> ínstar, as ninfas foram individualizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo um recipiente plástico (0,3 x 2,8 cm de diâmetro) com algodão umedecido com água e uma vagem verde de soja em fase de enchimento de grão (R6). As ninfas dos quatro tratamentos: ninfas provenientes de ovos isolados, ninfas provenientes de ovos agrupados (testemunha), ninfas removidas do córion e ninfas não removidas (testemunha) foram observadas diariamente, sendo o alimento e a água substituídos a cada dois dias. Os insetos foram sexados e pesados individualmente em balança eletrônica, no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta. Cada placa foi considerada uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

### **3.2.4. Desempenho de adultos proveniente de ninfas removidas do córion no 1º ínstar**

No 1º dia de vida adulta, 10 machos e 10 fêmeas foram colocados em casais em caixas gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), forrada com papel de filtro. Cada gerbox continha um recipiente plástico (0,3 x 2,8 cm de diâmetro) com algodão umedecido com água e uma vagem verde de soja em fase de enchimento de grão (R6); o alimento e a água foram trocados a cada dois dias. Os insetos foram observados diariamente, para se verificar a sobrevivência e a longevidade dos adultos. Cada inseto foi considerado uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

### **3.2.5. Análise dos dados**

Calculou-se a porcentagem de mortalidade ninfal, o tempo de duração de cada ínstar, o tempo total de desenvolvimento das ninfas (2º – 5º ínstar), o peso no 1º dia de vida adulta, a porcentagem de sobrevivência e a longevidade dos adultos. À exceção das porcentagens de mortalidade de ninfas e sobrevivência de adultos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

## **3.3. Resultados e discussão**

### 3.3.1. Desempenho de ninfas provenientes de ovos mantidos em grupo e isolados

A mortalidade total (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> instar) das ninfas cujos ovos foram individualizados foi de 23,3% e a para as ninfas cujos ovos foram mantidos em grupo foi 13,3% (Fig. 3.1). Os períodos mais críticos foram o 2<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ínstars. Normalmente, espera-se mortalidade maior nestes períodos: no 2<sup>o</sup> instar, devido à adaptação das ninfas ao alimento, e no 5<sup>o</sup> devido às necessidades nutricionais para formação do adulto. De forma semelhante Lockwood & Story (1986) observaram que ninfas de 1<sup>o</sup> instar mantidas em grupo tiveram um índice de sobrevivência maior que ninfas isoladas.

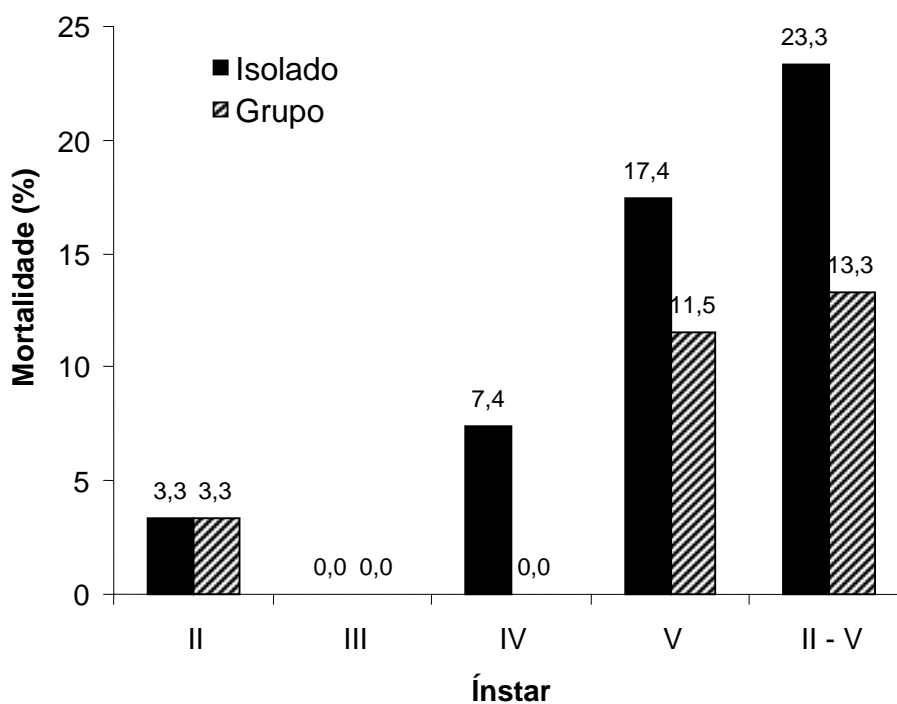


Figura 3.1. Mortalidade (%) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos isolados ou mantidos em grupos, alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD (25±1°C, 60±10% UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

O isolamento dos ovos e ninfas do 1<sup>o</sup> ínstar causou um tempo de desenvolvimento maior no 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ínstaes. As ninfas que se desenvolveram de ovos isolados tiveram o tempo de desenvolvimento maior em relação às ninfas cujos ovos foram mantidos em massa (Tabela 3.1). As ninfas isoladas na fase de ovo originaram fêmeas que levaram mais tempo (25,1 dias) para se desenvolver que fêmeas originadas de ninfas mantidas em grupo na fase de ovo (22,6 dias). Esta diferença não se evidenciou entre os machos, apesar de haver uma tendência do tempo de desenvolvimento total ser maior para machos originados de ovos mantidos isolados. Estes tempos de desenvolvimento ninfal são compatíveis com outras biólogias de *N. viridula* quando alimentadas com vagens verdes de soja (Panizzi & Slansky 1991).

Tabela 3.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* oriundas de ovos isolados ou mantidos em grupos, alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD (25 $\pm$ 1°C, 60 $\pm$ 10% UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) (número de ninfas entre parênteses).

Tratamentos	Ínstar <sup>1</sup>				Fêmea <sup>1</sup>	Macho <sup>1</sup>
	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>		
Isolado	5,0 $\pm$ 0,11 a	4,3 $\pm$ 0,09 a	6,0 $\pm$ 0,36 b	8,9 $\pm$ 0,35 b	25,1 $\pm$ 1,14 b	23,3 $\pm$ 0,83 a
	(29)	(29)	(27)	(23)	(11)	(12)
Grupo	4,9 $\pm$ 0,06 a	4,2 $\pm$ 0,20 a	5,1 $\pm$ 0,08 a	8,2 $\pm$ 0,21 a	22,6 $\pm$ 0,41 a	21,8 $\pm$ 1,37 a
	(29)	(29)	(29)	(26)	(11)	(15)

<sup>1</sup> Médias seguida pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P $\leq$  0,05).

No primeiro dia de vida adulta, fêmeas oriundas de ninfas isoladas no 1º instar pesaram 23% menos (141,0 mg), quando comparadas com fêmeas originárias de ninfas que permaneceram em grupo no 1º instar (164,6 mg) (Fig. 3.2). Em machos não se observaram diferenças significativas entre os pesos no 1º dia de vida adulta. Entre os sexos, as fêmeas cujos ovos foram mantidos agrupados foram significativamente mais pesadas que machos. Normalmente fêmeas de *Nezara viridula* são maiores e mais pesadas que os machos (Panizzi & Hirose 1995).

Vários trabalhos demonstraram que as ninfas de 1º instar não se alimentam (Todd 1989). Isto descarta a possibilidade de ninfas em grupo aproveitarem melhor o alimento. Os resultados obtidos sugerem que a individualização dos ovos afeta o desenvolvimento ninfal de *N. viridula* e que talvez haja necessidade das ninfas permanecerem em grupo para se contaminarem com os simbiossitos, o hábito gregário das ninfas permitiria a contaminação de toda a prole. *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) possui uma bactéria simbiótica, *Rhodococcus rhodnii* que vive extracelularmente no seu trato digestório e é responsável pela síntese de fatores de crescimento. Essa bactéria não é transmitida de forma transovariana. Esses insetos vivem de forma gregária e as ninfas são infectadas por contaminação fecal. Ninfas de *R. prolixus* aposimbiossitos (livre de simbiossitos) podem ser obtidas colocando-se os ovos em frascos estéreis (Beard *et al.* 1992).

As fêmeas oriundas de ovos mantidos agrupados foram mais pesadas durante as duas primeiras semanas, quando comparadas às fêmeas oriundas de ovos isolados, mas após três semanas o peso se igualou. Entre os machos não houve diferenças entre os tratamentos durante as quatro semanas avaliadas (Fig. 3.3). Estes resultados demonstram que a separação dos ovos e a manutenção das ninfas isoladas durante o 1º instar não se mantêm na fase adulta.

Possivelmente, as ninfas que mais fracas acabaram morrendo durante a fase ninfal, ou nos primeiros dias da fase adulta.

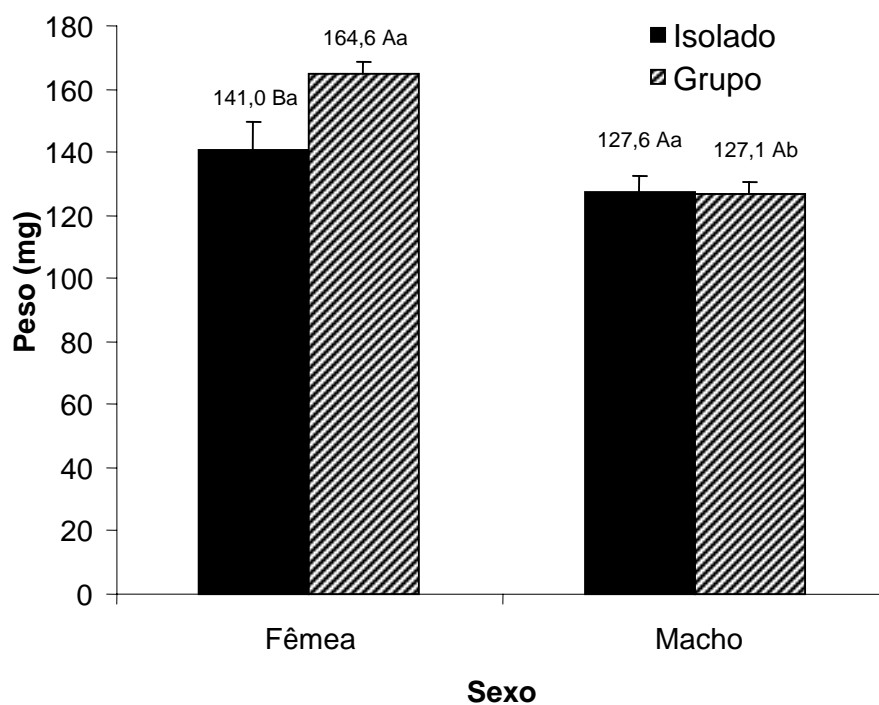


Figura 3.2. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* cujos ovos foram isolados ou mantidos agrupados e as ninfas alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ).

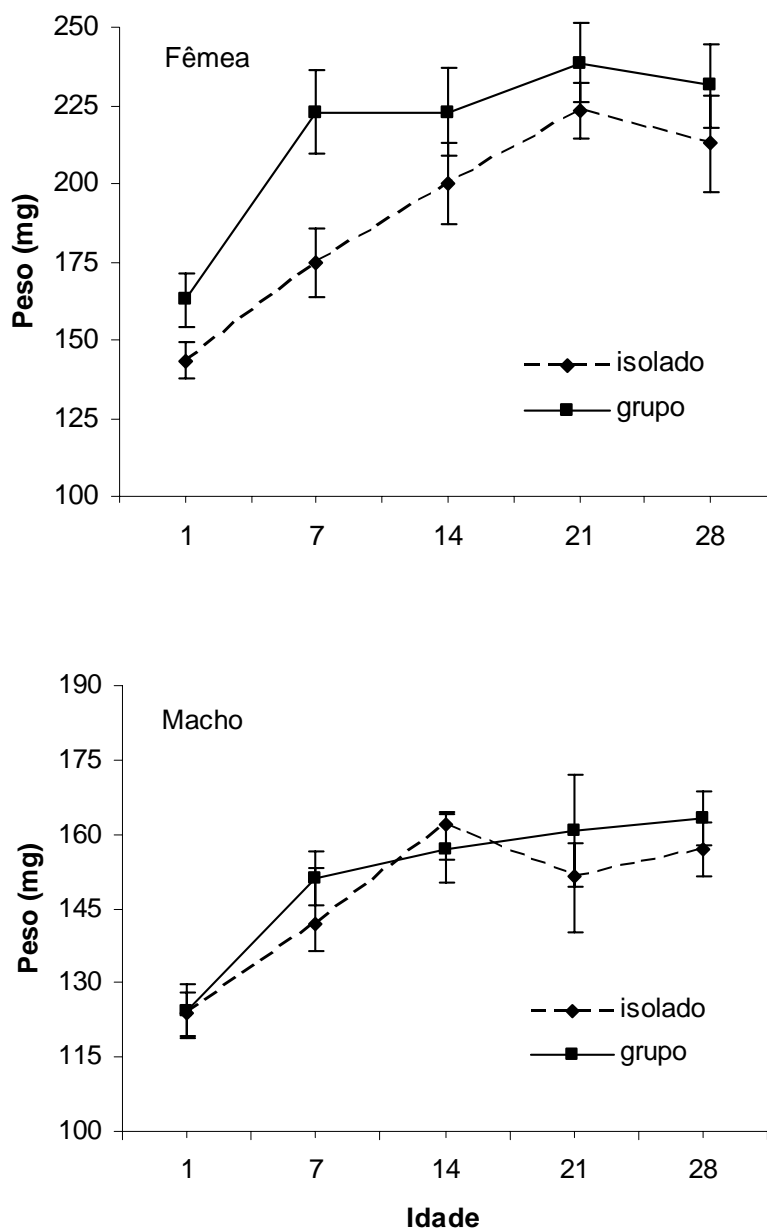


Figura 3.3. Variação de peso (média  $\pm$  EP) de adultos de *Nezara viridula* oriundos de ovos isolados ou mantidos em grupos e cujas ninfas foram alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

A sobrevivência até o 70<sup>o</sup> dia foi similar tanto para os adultos provenientes de ovos isolados, como adultos oriundos de ovos mantidos em grupo. Para as fêmeas, a sobrevivência cai rapidamente após 20 dias. Para os machos, a sobrevivência começa a cair após o 10<sup>o</sup> dia e seguiu de maneira uniforme até o 70<sup>o</sup> dia, quando praticamente todos os machos morreram (Fig. 3.4). A longevidade dos adultos, tanto de machos como de fêmeas, não variou com os tratamentos, sendo em média de 40 dias. Panizzi & Alves (1993) obtiveram longevidade similar (42,2 a 47,9 dias) com adultos de *N. viridula* criados com vagens verdes de soja. Estes resultados sugerem que a separação dos ovos não causa redução na longevidade de adultos de *N. viridula*, que sobreviveram ao estágio ninfal.

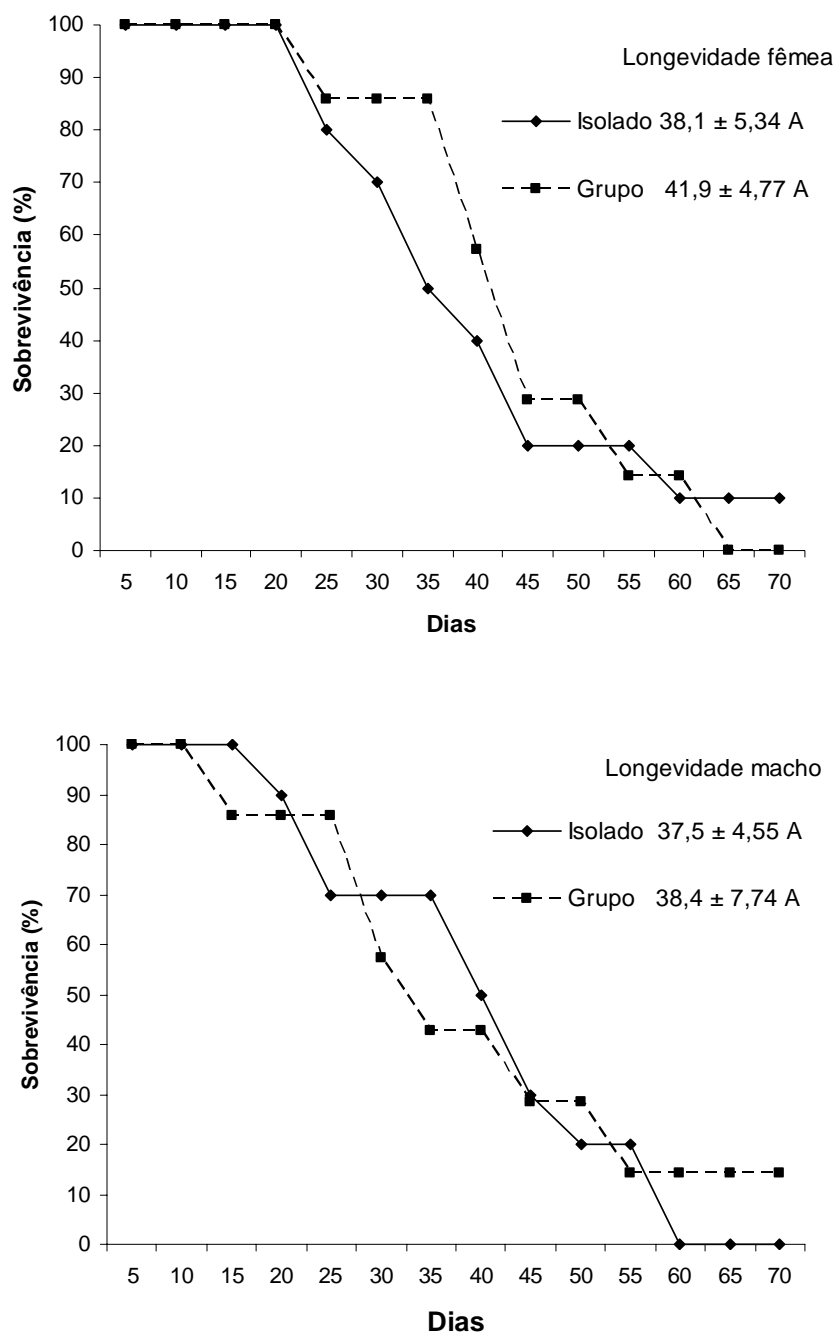


Figura 3.4. Sobrevivência e longevidade (média  $\pm$  EP) de adultos de *Nezara viridula* oriundos de ovos isolados ou mantidos em grupo e cujas ninfas foram alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

### 3.3.2. Desempenho de ninfas removidas do córion no 1<sup>o</sup> ínstar

A mortalidade total das ninfas de *N. viridula* foi, respectivamente, 43,3% e 23,3% para as ninfas removidas do córion e para as ninfas testemunha. A maior mortalidade das ninfas removidas do córion ocorreu no 2<sup>o</sup> ínstar (Fig. 3.5). Mortalidade no 2<sup>o</sup> ínstar é esperada devido à adaptação das ninfas ao alimento, pois ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar não se alimentam (Jones 1985), mas no caso específico desta biologia, a elevada mortalidade no 2<sup>o</sup> ínstar se deve possivelmente ao estresse da remoção das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar do córion. Observou-se que a sobrevivência das ninfas está diretamente relacionada com a capacidade de se reagruparem após a retirada do córion. Ao separar as ninfas recém emergidas elas se dispersaram e quando não se reagrupavam, morriam antes de atingir o 2<sup>o</sup> ínstar. Pode-se levantar duas hipóteses: as ninfas sucumbiram diante o estresse da manipulação, ou a separação impediu que as ninfas entrassem em contato com simbiontes essenciais depositados sobre o córion.

Com relação ao tempo de desenvolvimento, apenas no 3<sup>o</sup> ínstar as ninfas que foram removidas de seu córion apresentaram um tempo de desenvolvimento significativamente maior (5,6 dias) quando comparado com o mesmo período das ninfas testemunhas (4,4 dias). Apesar desta diferença no 3<sup>o</sup> ínstar, os tempos totais de desenvolvimento (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> ínstar) não tiveram diferenças significativas (Tabela 3.2).

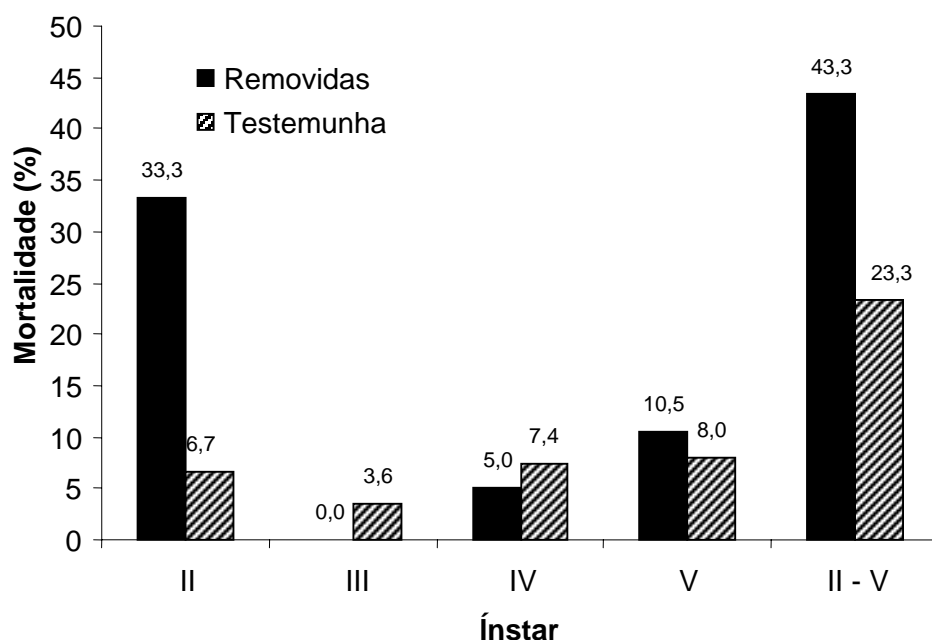


Figura 3.5. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* removidas do córion no 1º instar (removidas) e ninfas que permaneceram sobre o córion (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

Ao se avaliar o desenvolvimento de *N. viridula*, normalmente há uma pressão constante de algum fator abiótico ou biótico (p. ex., temperatura, dieta) durante toda a fase de desenvolvimento ninfal (Kiritani *et al.* 1966, Kester & Smith 1984, Panizzi & Meneguim 1989). Neste estudo, o fator diferenciador foi avaliar o efeito da remoção das ninfas de 1º instar de seu córion, que ocasionou mortalidade nos estágios iniciais (1º e 2º instar). Assim, é possível que as ninfas sobreviventes da separação do córion, por serem mais resistentes ou por terem sido menos afetadas pelo estresse, apresentaram performance de desenvolvimento similar às ninfas testemunha.

Tabela 3.2. Tempo de desenvolvimento (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* removidas de seu córion no 1<sup>o</sup> ínstar (removidas) e não removidas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD (25 $\pm$ 1<sup>o</sup>C, 60 $\pm$ 10% UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) (número de ninfas entre parênteses).

Tratamentos	Ínstar <sup>1</sup>				Fêmea <sup>1</sup>	Macho <sup>1</sup>
	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>		
Removidas	5,8 $\pm$ 0,45 a (20)	5,6 $\pm$ 0,28 a (20)	5,4 $\pm$ 0,25 a (19)	9,4 $\pm$ 0,35 a (17)	24,9 $\pm$ 0,64 a (13)	27,8 $\pm$ 4,09 a (4)
Testemunha	5,7 $\pm$ 0,13 a (28)	4,4 $\pm$ 0,20 b (27)	5,5 $\pm$ 0,08 a (25)	9,3 $\pm$ 0,21 a (23)	23,7 $\pm$ 0,54 a (11)	25,1 $\pm$ 0,92 a (15)

<sup>1</sup> Médias seguida pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P $\leq$  0,05).

O peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre adultos originados de ninfas que foram removidas do córion no 1<sup>o</sup> ínstar e as ninfas sem perturbação (testemunha) (Fig. 3.6). Entre os sexos, as fêmeas foram significativamente mais pesadas que machos, tanto nas ninfas separadas do córion com as ninfas testemunha. Normalmente fêmeas de *Nezara viridula* são maiores e mais pesadas que os machos (Panizzi & Hirose 1995).

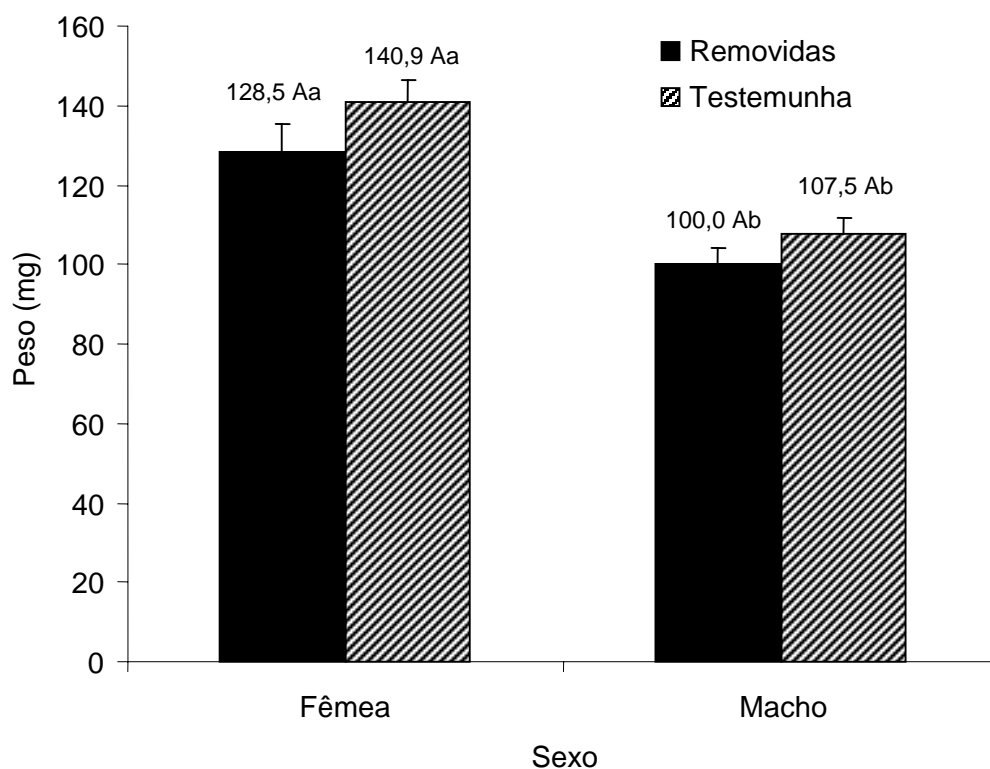


Figura 3.6. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* cujas ninfas foram removidas de seu córion no 1<sup>o</sup> ínstar (removidas) e não removidas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ).

Kiritani (1964) também observou que ninfas agregadas têm menor mortalidade e desenvolvem-se mais rapidamente. Este estudo verificou que condições de estresse no 1<sup>o</sup> ínstar se refletem diretamente nos demais estágios ninfais, causando retardo no desenvolvimento, e reduzindo o peso de adultos. A separação dos ovos antes da emergência das ninfas causou mortalidade menor que a manipulação das ninfas logo após a emergência,

possivelmente devido à fragilidade das ninfas de 1<sup>o</sup> instar que são mais sensíveis à manipulação que os ovos, ou devido à impossibilidade de contaminação com os microrganismos simbiotes, uma vez que o contato com o córion foi impedido.

As diferenças na sobrevivência e desenvolvimento das ninfas separadas de seu córion durante o 1<sup>o</sup> instar e as ninfas testemunhas evidenciaram a necessidade da agregação das ninfas de 1<sup>o</sup> instar de *N. viridula* sobre o córion, talvez devido à necessidade das ninfas se contaminação por simbiotes essenciais, mas não se pode excluir a possibilidade de outros fatores como umidade, e estresse da manipulação, serem responsáveis por estes resultados.

#### **3.4. Literatura citada**

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Beard, C.B.P., W. Mason, S. Aksoy, R.B. Tesh & F.F. Richards. 1992.** Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 195-200.

**Benton, A.H. & A.J. Crump. 1979.** Observations on aggregation and overwintering in the coccinellid beetle *Coleomegilla maculata* (De Geer). J. N.Y. Entomol. Soc. 87: 154-159.

**Danks, H.V. 2002.** Modification of adverse conditions by insects. Oikos 99: 10-24.

**Jones, Jr., W.A. 1985.** *Nezara viridula*. P. 339-344. In Singh, P. & R.F. Moore (eds.). Handbook of insect rearing, vol. 1. Elsevier Sci., New York, NY.488 p.

- Kiritani, K. 1964.** The effect of colony size upon the survival of larvae of the southern green stink bug, *Nezara viridula*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 8: 45-53.
- Kiritani K., N. Hokyo & K. Kimura. 1966.** Factors affecting the winter mortality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* L. Ann. Soc. Entomol. Fr. 2: 199-207.
- Kester K.M. & C.M. Smith. 1984.** Effects of diet on growth, fecundity and duration of tethered flight of *Nezara viridula*. Entomol. Exp. Appl. 35: 75-81.
- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1986.** Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 15: 739-749.
- Matthews, R.W. & J.R. Matthews. 1978.** Insect behavior. Wiley-Interscience publication, New York, NY. 507 p.
- Panizzi, A.R., M.H.M. Galileo, H.A.O. Gastal, J.F.F. Toledo & C.H. Wild. 1980.** Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybean. Environ. Entomol. 9: 293-297.
- Panizzi, A.R. & A.M. Meneguim. 1989.** Performance of nymphal and adult *Nezara viridula* on selected alternate host plants. Entomol. Exp. Appl. 50: 215- 223.

- Panizzi, A.R. & F. Slansky Jr. 1991.** Suitability of selected legumes and the effect of nymphal and adult nutrition in the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* 84: 103-113.
- Panizzi, A.R. & R.M.L. Alves. 1993.** Performance of nymphs and adults of the southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) exposed to soybean pods at different phenological stages of development. *J. Econ. Entomol.* 86: 1088-1093.
- Panizzi, A.R. & E. Hirose. 1995.** Survival, reproduction and starvation resistance of adult southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) reared on sesame or soybean. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 661-665.
- StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.
- Willmer, P.G. 1980.** The effects of a fluctuating environment on the water relations of larval Lepidoptera. *Ecol. Entomol.* 5: 271-292.

## CAPÍTULO 4

### Efeito de antibióticos sobre o desenvolvimento de ninfas de *Nezara viridula* (L.)

#### 4.1. Introdução

O percevejo *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) é um inseto polífago, amplamente distribuído e de grande importância econômica (Panizzi *et al.* 2000). Seus principais hospedeiros são a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e várias outras leguminosas (Todd 1989). Apesar dos muitos estudos realizados com este pentatomídeo, ainda pouco se conhece sobre as suas relações com possíveis simbioss, sendo os dados de literatura sobre este assunto praticamente inexistente.

Bactérias simbióticas em Heteroptera são muitas vezes extracelulares e se encontram no lúmen do trato digestório (Goodchild 1978, Haas & Konig 1987, Eichler & Schaub 2002). Em muitos grupos de Heteroptera a parte final do intestino médio apresenta invaginações, chamadas cecos ou criptas bacterianas (Dolling 1991) que variam em número e arranjo de acordo com os diferentes grupos taxonômicos (Goodchild 1963), e apenas hemípteros como Pentatomidae, Scutelleridae e Corimelaenidae, invariavelmente, possuem estas estruturas para comportar as bactérias (Forbes 1892).

Um dos principais fatores que limita a pesquisa com associações simbióticas é a dificuldade de cultivar a maioria dos microrganismos fora do hospedeiro (Wilkinson 1998). Contudo, a eliminação dos microrganismos do inseto tem se mostrado de valor para avaliar os efeitos desta associação (Dale & Welburn 2001, Vries *et al.* 2001, Yusuf & Turner 2004).

Várias abordagens têm sido adotadas para eliminar os microrganismos, entre elas pode-se citar tratamento com calor, lisozimas e antibióticos, mas nenhum método é utilizado de forma generalizada, devido às particularidades de cada inseto. O tratamento com calor é útil apenas quando o hospedeiro apresenta tolerância térmica maior que o simbiote, sendo esse método utilizado para vários coleópteros, e o uso de lisozimas está em desuso devido a efeitos nos tecidos do hospedeiro (Douglas 1989). O método mais amplamente adotado é a desinfecção do inseto de seus simbioses através de terapia com antibióticos, administrados oralmente, ou por injeção (Wilkinson 1998).

Um antibiótico é definido como uma substância química produzida por microrganismos, ou reproduzida sinteticamente, que exerce efeito inibitório ou letal sobre bactérias. Centenas de antibióticos têm sido descritos, mas poucos são usados como antimicrobianos eficazes (Sikorowski *et al.* 1980). A utilização de antibióticos tem-se provada particularmente útil para elucidação das interações nutricionais entre afídeos e sua bactéria simbiótica *Buchnera* (Adams & Douglas 1997).

Este estudo teve por objetivo verificar o efeito de antibióticos de amplo espectro no desenvolvimento e na sobrevivência de ninfas de *N. viridula* até a fase adulta.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. Desempenho de ninfas**

Posturas de *N. viridula* obtidas da criação mantida na Embrapa Soja, em Londrina PR, foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizadas e forradas com papel de

filtro umidificado com soluções de antibióticos (tetraciclina, 125 mg/L ou estreptomicina, 125 mg/L), os ovos permaneceram em contato com o papel de filtro umidificado. As placas contendo as posturas foram mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) até as ninfas atingirem o 2º ínstar.

No 1º dia do 2º ínstar, 180 ninfas (60 indivíduos/tratamento) foram individualizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo um recipiente plástico (0,3 x 2,8 cm de diâmetro) com algodão umedecido com solução de antibiótico (tratadas) ou umedecido com água (testemunha) e uma vagem verde de soja em fase de enchimento de grão (R6). Cada placa contendo uma ninfa foi considerada uma unidade experimental e distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As ninfas foram observadas diariamente, sendo o alimento e a solução de antibiótico substituídos a cada dois dias. Os insetos foram sexados e pesados em balança eletrônica, no 1º dia de vida adulta.

#### **4.2.2. Desempenho de Adultos**

Adultos (12 fêmeas e 12 machos) de cada tratamento foram colocados individualmente em caixa gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) forrada com papel de filtro. Cada gerbox continha um recipiente plástico (0,3 x 2,8 cm de diâmetro) com algodão umedecido com solução de antibiótico (tratadas) ou com água (testemunha) e uma vagem verde de soja em fase de enchimento de grão (R6), sendo o alimento e a solução de antibióticos ou água trocados a cada dois dias. Os insetos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado e observados diariamente, para se verificar a sobrevivência e longevidade dos adultos.

### 4.2.3. Análise de dados

Calculou-se a porcentagem de mortalidade ninfal, o tempo de duração de cada ínstar, o tempo total de desenvolvimento ninfal (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> ínstar), o peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta, a porcentagem de sobrevivência e a longevidade de adultos. À exceção das porcentagens de mortalidade de ninfas e da sobrevivência de adultos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

### 4.3. Resultados e discussão

A mortalidade das ninfas tratadas com tetraciclina e sem tratamento foi maior no 5<sup>o</sup> ínstar, enquanto as ninfas tratadas com estreptomicina apresentaram maior mortalidade no 2<sup>o</sup> ínstar. Em todos os tratamentos a mortalidade total foi abaixo de 20% (Fig. 4.1). Esta mortalidade é similar à relatada por Panizzi & Slansky (1991) que observaram mortalidade de 22,5% em ninfas de *N. viridula* quando alimentadas com vagens de soja.

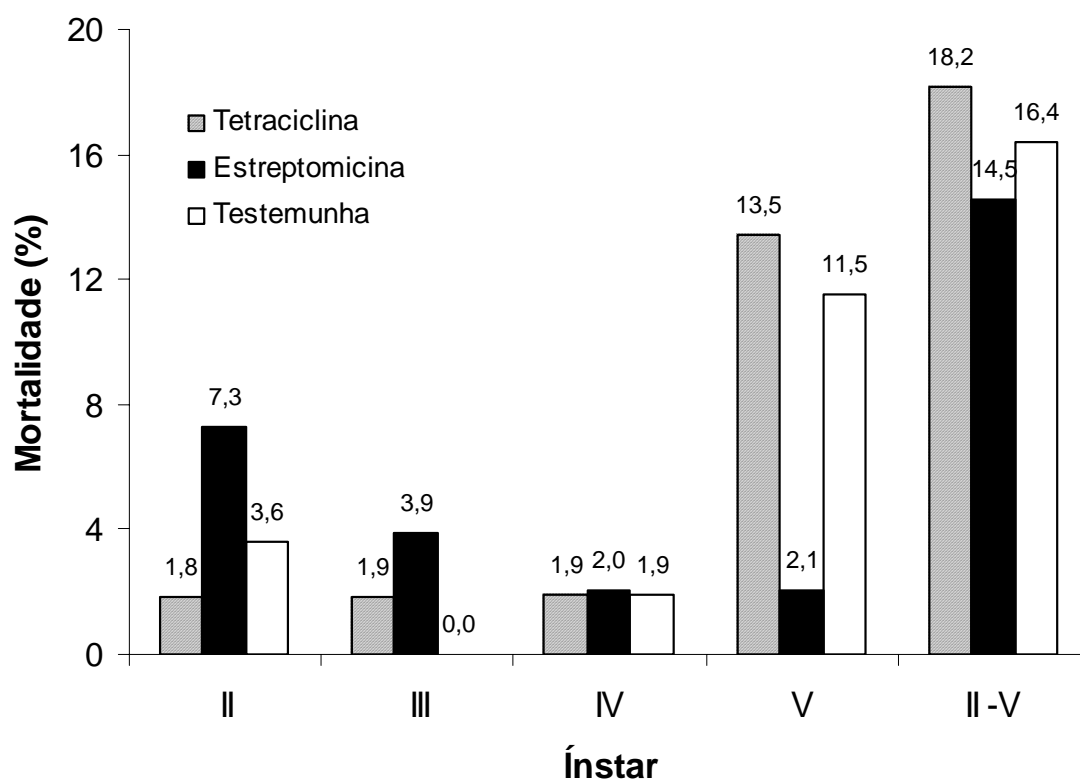


Figura 4.1. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com o antibiótico tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

O tempo de desenvolvimento das ninfas no 2<sup>o</sup> ínstar tratadas com estreptomicina (4,7 dias) foi significativamente menor em relação ao tempo das ninfas tratadas com tetraciclina e às ninfas testemunhas, que tiveram a duração média no 2<sup>o</sup> ínstar de 5,0 dias. No 3<sup>o</sup> ínstar, o tempo de desenvolvimento das ninfas tratadas com estreptomicina foi novamente menor; 3,8 dias contra 4,3 e 4,5 dias para as ninfas tratadas com tetraciclina e as ninfas testemunha, respectivamente (Tabela 4.1). No 4<sup>o</sup> ínstar, as ninfas tratadas com estreptomicina e as ninfas testemunha tiveram o tempo de desenvolvimento similar (4,9 e 5,4 dias respectivamente),

enquanto que as ninfas tratadas com tetraciclina tiveram o tempo de desenvolvimento significativamente maior (6,7 dias). As ninfas tratadas com tetraciclina levaram 12,6 dias para completar o 5<sup>o</sup> instar, aproximadamente cinco dias a mais que das ninfas tratadas com estreptomicina (7,6 dias) e as ninfas testemunha (8,2 dias) levaram para completar o último instar de desenvolvimento. Considerando-se o tempo total de desenvolvimento (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> instar), as ninfas tratadas com estreptomicina apresentaram tempo de desenvolvimento menor (2,0 dias inferior), tanto para as fêmeas quanto para os machos, enquanto que as ninfas tratadas com tetraciclina tiveram um retardo de 5,0 dias no tempo total de desenvolvimento quando comparados com as ninfas testemunhas.

Ninfas aposimbiontes (livre de simbioses) em vários heterópteros exibem retardo no desenvolvimento e aumento de mortalidade ninfal (Chang 1974, Abe *et al.* 1995). As ninfas tratadas com tetraciclina, apesar do atraso no seu desenvolvimento, não tiveram a mortalidade elevada; se a tetraciclina afetou algum simbiote presente nas ninfas de *N. viridula*, esse microrganismo não possui nenhuma atividade essencial à sobrevivência do inseto, ou não houve eliminação completa do simbiote. Segundo Bignell (1984) muitos microrganismos não têm efeitos aparentes no crescimento, sobrevivência e fecundidade dos insetos. Há possibilidade dos microrganismos presentes no inseto terem apenas efeitos indiretos, como, por exemplo, proteger o sistema digestório de infecção com bactérias patogênicas. Em *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) e espécies de *Sitophilus* (Sch.) (Coleoptera: Curculionidae) foi provado ser impossível obter aposimbiose completa com a utilização de antibióticos (Dadd 1985).

Tabela 4.1. Tempo de desenvolvimento (dias) (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com antibióticos, tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras BOD ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) (número de ninfas entre parênteses).

Tratamentos	Ínstar <sup>1</sup>				Fêmea <sup>1</sup>	Macho <sup>1</sup>
	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>		
Tetraciclina	5,0 $\pm$ 0,09 a (54)	4,3 $\pm$ 0,08 a (53)	6,7 $\pm$ 0,21 a (52)	12,6 $\pm$ 0,42 a (45)	29,0 $\pm$ 0,74 a (22)	27,8 $\pm$ 0,67 a (23)
Estreptomicina	4,7 $\pm$ 0,07 b (51)	3,8 $\pm$ 0,12 b (49)	4,9 $\pm$ 0,14 b (48)	7,6 $\pm$ 0,21 b (47)	21,5 $\pm$ 0,50 c (25)	20,3 $\pm$ 0,60 b (22)
Testemunha	5,0 $\pm$ 0,10 a (53)	4,5 $\pm$ 0,15 a (53)	5,4 $\pm$ 0,13 b (52)	8,2 $\pm$ 0,23 b (46)	23,8 $\pm$ 0,65 b (27)	21,8 $\pm$ 0,47 b (19)

<sup>1</sup> Médias seguida pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os pesos no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta (machos e fêmeas) de insetos provenientes de ninfas criadas na presença de tetraciclina foram estatisticamente menores (136,9 e 111,4 mg; para fêmeas e machos, respectivamente), quando comparados ao peso dos adultos originados de ninfas tratadas com estreptomicina (174,2 mg e 147,8 mg) e as ninfas testemunha (165,0 e 140,7 mg), cujos pesos entre tratamentos foram estatisticamente iguais (Fig. 4.2). Entre os sexos, em todos os tratamentos, as fêmeas apresentaram um peso significativamente maior que os machos.

Assim, além do desenvolvimento mais lento, os adultos emergidos das ninfas tratadas com tetraciclina foram menores em peso no 1º dia de vida adulta. Estes resultados sugerem que os antibióticos influenciam no desenvolvimento ninfal de *N. viridula*. Isso levanta duas possibilidades para o efeito da tetraciclina no desenvolvimento ninfal de *N. viridula*: a primeira é a de que, possíveis simbioses seriam eliminados ou reduzidos pela tetraciclina, resultando no atraso do desenvolvimento ninfal. Entre os vários antibióticos disponíveis, as tetraciclinas são comprovadamente os mais eficientes antimicrobianos utilizados na eliminação de simbioses procariontes (Houk & Griffiths 1980). A segunda possibilidade seria a tetraciclina, de modo direto, causar efeitos negativos à biologia de *N. viridula*, devido a efeitos tóxicos do antibiótico sobre a fisiologia do inseto.

A estreptomicina influenciou de forma positiva a biologia de ninfas, com tempo de desenvolvimento ninfal significativamente menor comparado às ninfas testemunhas. É possível que prováveis simbioses não sejam afetados por este antibiótico, ou a utilização deste antibiótico, previna a ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas, sem causar nenhum efeito deletério direto sobre a biologia do inseto.

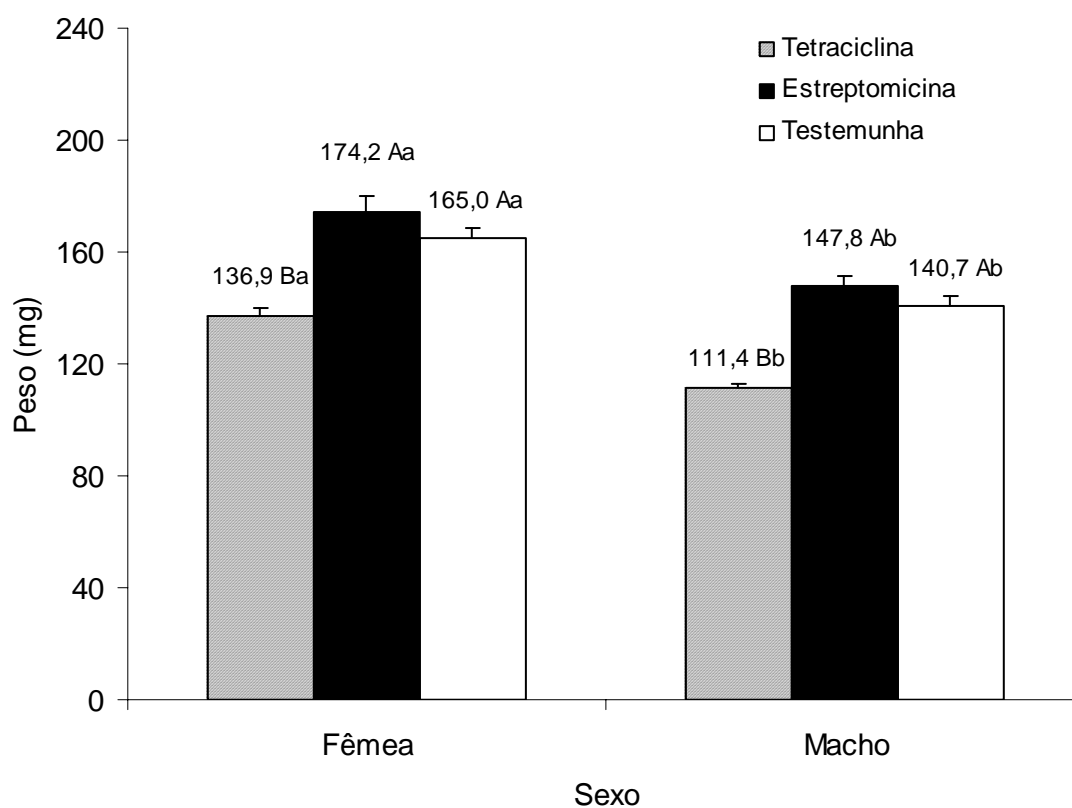


Figura 4.2. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* tratados na fase ninfal com antibióticos tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L e não tratados (testemunha), alimentadas com vagens verdes de soja e mantidas em câmaras climatizadas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ).

A sobrevivência dos adultos foi afetada pelo tratamento com antibióticos (Fig. 4.3). Após 70 dias, mais de 60% das fêmeas tratadas com estreptomicina permaneciam vivas; para as fêmeas tratadas com tetraciclina, a sobrevivência sofreu uma queda após 45 dias e, para as fêmeas testemunhas, após 35 dias. Em machos, os insetos tratados com estreptomicina também apresentaram uma sobrevivência maior, apesar de menos evidente quando comparado com as fêmeas. Machos tratados com tetraciclina e machos testemunhas apresentaram uma curva de sobrevivência similar. A longevidade média de fêmeas tratadas com estreptomicina foi de 68,6 dias, com tetraciclina foi de 46,4 dias e para testemunha foi de 35,9 dias. A mesma tendência foi observada na longevidade de machos, com insetos tratados com antibióticos apresentando uma sobrevivência superior aos machos sem o fornecimento de antibióticos. Panizzi & Alves (1993) obtiveram longevidade de 42,2 a 47,9 dias com adultos de *N. viridula* criados com vagens verdes de soja. Para fêmeas tratadas com estreptomicina, a longevidade foi quase o dobro das fêmeas sem antibiótico, sugerindo que o fornecimento de estreptomicina na fase adulta pode prolongar a longevidade além da expectativa normal de vida adulta de *N. viridula*.

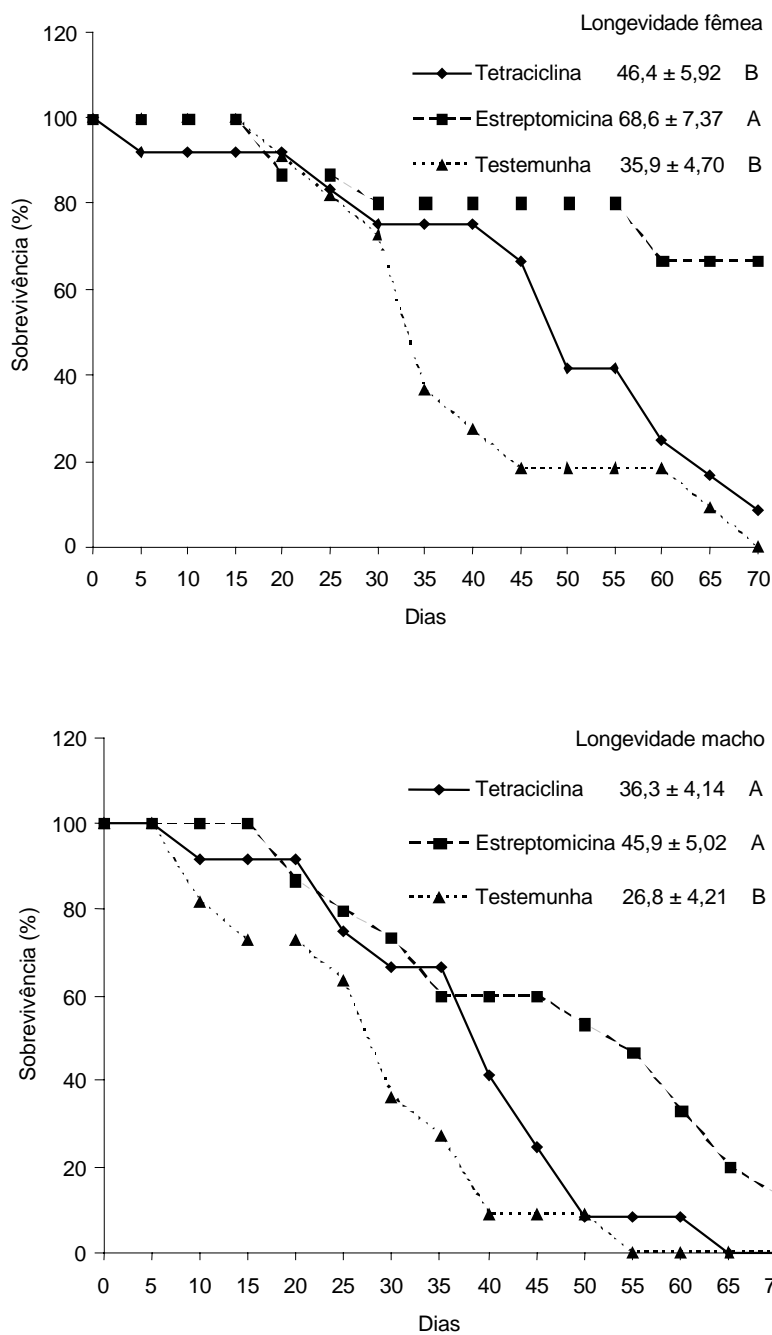


Figura 4.3. Sobrevivência e longevidade (média  $\pm$  EP) de adultos de *Nezara viridula*, machos e fêmeas tratados com antibióticos (tetraciclina - 125 mg/L ou estreptomicina - 125 mg/L) e não tratados (testemunha), alimentados com vagens verdes de soja e mantidos em câmaras BOD ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR, fotoperíodo 14h L: 10h E).

As ninfas de *N. viridula* sofrem grande mortalidade durante seu desenvolvimento (Kiritani 1964). Um desenvolvimento acelerado associado a uma baixa mortalidade pode ser interessante em sistemas de criação de insetos, onde insetos sadios em grande número são necessários. As ninfas tratadas com estreptomicina apresentaram estas vantagens, sem prejuízo ao peso ou defeito morfológico aparente, mas a utilização de antibióticos deve ser restrita a algumas circunstâncias especiais, pois o uso continuado de antibióticos poderia acarretar no surgimento de bactérias resistentes e que se tornariam à população dominante neste ambiente (Sikorowski *et al.* 1980). Assim, a utilização de estreptomicina poderia ser restrita à recepção de insetos de campo, reduzindo a introdução de bactérias potencialmente patogênicas e melhorando a condição geral dos insetos, uma vez que este antibiótico não apresentou nenhum efeito deletério ao desenvolvimento, sobrevivência e longevidade de *N. viridula*.

#### **4.4. Literatura citada**

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Adams, D. & A.E. Douglas. 1997.** How symbiotic bacteria influence plant utilization by the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. Oecologia 110: 528-532.

**Bignell, D.E. 1984.** The arthropod gut as an environment for microorganisms. P. 205-228. In Anderson, J.M., A.D.M. Rayner & D.W.H. Walton (eds.). Invertebrate-microbial interactions. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 352 p.

- Chang, K.P. 1974.** Effects of elevated temperature on the mycetome and symbionts of the bed bug *Cimex lectularis* (Heteroptera). *J. Invert. Pathol.* 23: 333-340.
- Dadd, R.H. 1985.** Nutrition: organisms. P. 313-390. In Kerkut G.A. & L.I. Gilbert (eds.). *Comparative insect physiology, biochemistry & pharmacology*, vol. 4. Pergamon, Oxford, UK. 743 p.
- Dale, C. & S. C. Welburn. 2001.** The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *Inter. J. Parasitol.* 31: 627-630.
- Dolling, W.R. 1991.** *The Hemiptera*. Oxford University Press, Oxford, UK. 274 p.
- Douglas, A.E. 1989.** Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol. Rev.* 64: 409-434.
- Eichler, S. & G.A. Schaub. 2002.** Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasit.* 100: 17-27.
- Forbes, S.A. 1892.** Bacteria normal to digestive organs of Hemiptera. *Bull. Illinois State Lab. Nat. History* 4: 1-6.
- Goodchild, A.J.P. 1963.** Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 141: 851-910.
- Goodchild, A.J.P. 1978.** The nature and origin of the mid-gut contents in a sap-sucking Heteropteran, *Piezosternum calidum* Fab. (Tessaratominae) and the role of symbiotic bacteria in its nutrition. *Ent. Exp. Appl.* 23: 177-188.

- Haas, F. & H. Koenig. 1987.** Characterization of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). FEMS Microbiol. Ecol. 45: 99-106.
- Houk, E.J. & G.W. Griffiths. 1980.** Intracellular symbiotes of the homoptera. Annu. Rev. Entomol. 25: 161-187.
- Kiritani, K. 1964.** The effect of colony size upon the survival of larvae of the southern green stink bug, *Nezara viridula*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 8: 45-53.
- Panizzi, A.R. & F. Slansky Jr. 1991.** Suitability of selected legumes and the effect of nymphal and adult nutrition in the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). J. Econ. Entomol. 84: 103-113.
- Panizzi, A.R. & R.M.L. Alves. 1993.** Performance of nymphs and adults of the southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) exposed to soybean pods at different phenological stages of development. J. Econ. Entomol. 86: 1088-1093.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Economic importance of stink bug (Pentatomidae). P. 421-474. In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.
- Sikorowski, P.P., A.D. Kent, O.H. Lindig, G. Wiygul & J. Roberson. 1980.** Laboratory and insectary studies on the use of antibiotics and antimicrobial agents in mass-rearing of boll weevil. J. Econ. Entomol. 73: 106-110.

**StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6.  
www.statsoft.com.

**Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. Annu. Rev. Entomol. 34: 273-292.

**Vries, E.J., G. Jacobs & J.A.J. Breeuwer. 2001.** Growth and transmission of gut bacteria in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. J. Inverteb. Pathol. 77: 129-137.

**Wilkinson, T.L. 1998.** The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). Comp. Biochem. Physiol. A 119: 871-881.

**Yusuf, M. & B. Turner. 2004.** Characterization of *Wolbachia*-like bacteria isolated from the parthenogenetic stored-product pest psocid *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel) (Psocoptera). J. Stor. Prod. Res. 40: 207-225.

## CAPÍTULO 5

### Efeito do gradiente de umidade sobre ninfas de primeiro ínstar de *Nezara viridula* (L.)

#### 5.1. Introdução

A família Pentatomidae compreende um grande grupo de espécies amplamente distribuídas, sendo *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) uma das mais estudadas devido a sua importância econômica, atacando várias culturas tanto perenes como anuais, incluindo grãos, legumes, frutas e fibras (Todd 1989). Os membros desta família depositam seus ovos em massas, normalmente na superfície da vegetação. Os ovos têm a forma de barril, facilmente reconhecível, e as ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar tendem a permanecerem agregadas em volta da massa de ovos (Yonke 1991).

Lockwood & Story (1986) atribuem à agregação ninfal no 1<sup>o</sup> ínstar o desenvolvimento mais rápido de ninfas e redução na mortalidade. Este comportamento pode ser devido a possível aquisição de simbiontes depositados na superfície dos ovos pelas fêmeas durante a oviposição e, ao eclodirem, as ninfas ingerem ou absorvem esses possíveis simbiontes (Abe *et al.* 1995, Chapman 1998). Outra possível função para este fenômeno de agregação durante o 1<sup>o</sup> ínstar seria evitar o dessecação devido à grande relação superfície e volume que as ninfas apresentam.

Entre os fatores abióticos que afetam a sobrevivência dos ovos de Hemiptera estão a temperatura, calor e umidade (Panizzi 2003). A umidade relativa é um fator ambiental que pode afetar diferentes aspectos da vida do inseto (Willmer 1982) e, para sobreviver, o inseto

deve manter o conteúdo de água dentro de certos limites que são variáveis dependendo do grau de permeabilidade da cutícula (Bursell 1974).

Este estudo foi conduzido para verificar a importância da umidade relativa (UR%) no desenvolvimento do ovo, emergência das ninfas e comportamento das ninfas de 1º instar de *N. viridula*.

## **5.2. Material e métodos**

### **5.2.1. Emergência de ninfas de *N. viridula* em diferentes condições de umidade**

Posturas de um dia de *N. viridula*, com 30 a 40 ovos, obtidas da criação mantida na Embrapa Soja, em Londrina, PR foram fixadas com cola à base de amido em placas de polietileno (1,0 x 1,5 x 0,1 cm) e colocadas em frascos de vidro (300mL) com tampa hermética (Fig. 5.1). Os frascos foram preparados com 50 mL de água destilada, soluções aquosas saturadas de sais, ou 50 g de sílica gel (Tabela 5.1) com um suporte plástico interno para sustentar as posturas de *N. viridula*. A função das diferentes soluções aquosas e da sílica gel foi obter à temperatura de 25°C, umidades relativas (UR%) variando de 0 a 100%. Os seis frascos foram colocados em câmara BOD (25±1°C, 14h L: 10h E), e este processo foi repetido cinco vezes, utilizando 30 posturas. Foram realizadas observações diárias para verificar o desenvolvimento do embrião e a emergência das ninfas.

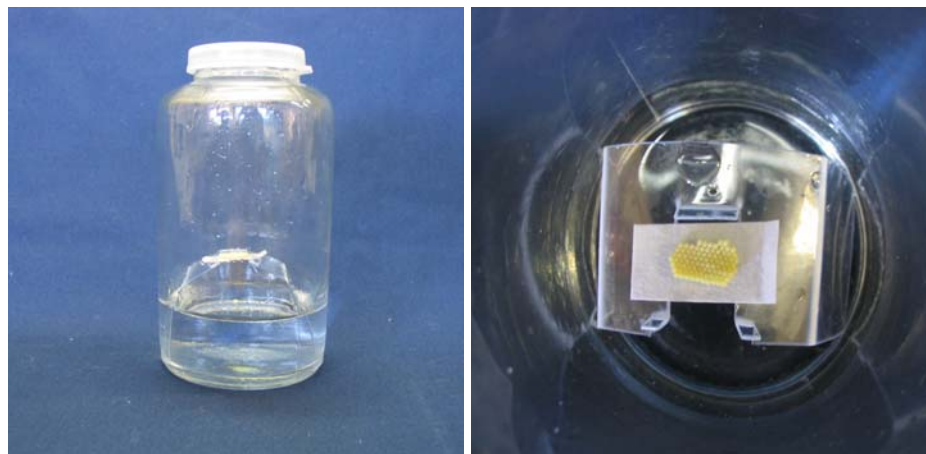


Figura 5.1. Frasco de vidro com solução saturada de sais (esquerda) e suporte plástico com uma postura de *Nezara viridula* dentro do frasco (direita).

Tabela 5.1. Umidade relativa (aproximada) à temperatura de 25°C, obtida com água destilada, soluções saturadas de sais e sílica gel.

<b>Componente</b>	<b>Formula química</b>	<b>UR% aproximada a 25°C</b>
Água destilada	H <sub>2</sub> O	100
Cloreto de potássio	KCl	84
Cloreto de sódio	NaCl	76
Nitrato de magnésio hidratado	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	55
Cloreto de magnésio hidratado	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	33
Sílica gel (1,4mm de diâmetro)	SiO <sub>2</sub>	0

### **5.2.2. Comportamento de ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar de *N. viridula* em relação à umidade**

Posturas contendo 50 a 70 ovos, obtidas da criação mantida na Embrapa Soja, em Londrina PR, foram colocadas em arenas fechadas de plástico transparente (11 x 11 x 7 cm – 847 cm<sup>3</sup>), forradas com papel de filtro (11,0 x 9,7 cm), e uma fita de papel de filtro (1 x 11cm) saturada com água destilada. O papel saturado foi colocado horizontalmente junto a uma das paredes laterais da arena (Fig. 5.2). Para observar o comportamento das ninfas após a emergência, uma câmera digital (Creative NX), ligada a um computador, foi colocada sobre a arena para registrar a cada 5 minutos a posição das ninfas durante 96 h consecutivas (Fig. 5.3), este procedimento foi repetido cinco vezes, em delineamento inteiramente casualizado.

### **5.2.3. Análise dos dados**

As porcentagens de emergência das ninfas, cujas posturas foram submetidas a diferentes umidades relativas, foram calculadas. O tempo (minutos) de permanência das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar sobre a postura, tempo de dispersão das ninfas (período entre o abandono do córion e o reagrupamento) e o tempo de permanência em grupo após reagrupamento foram calculados através da análise das imagens obtidas pela câmera digital. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

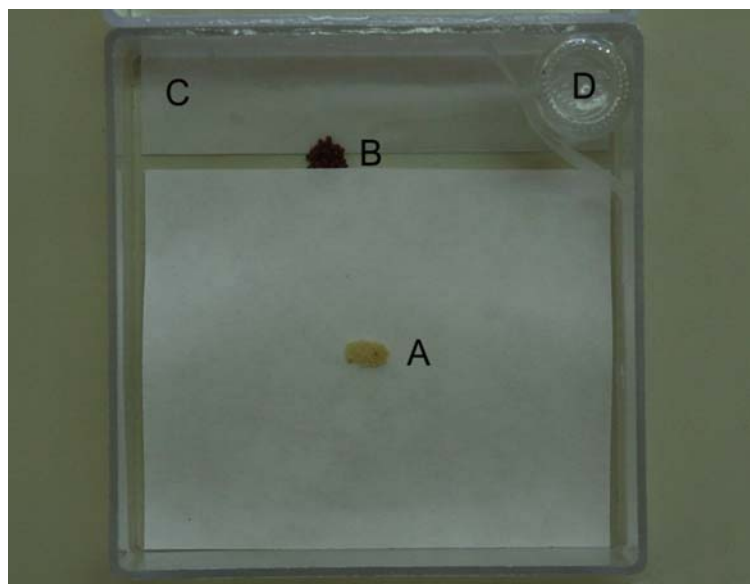


Figura 5.2. Arena elaborada para verificar o deslocamento das ninfas de *Nezara viridula* de 1<sup>o</sup> ínstar para área com umidade. A = córion abandonado; B = ninfas 1<sup>o</sup> ínstar agregadas junto ao papel saturado com água; C = tira de papel filtro saturado com água; e D = reservatório de água destilada.

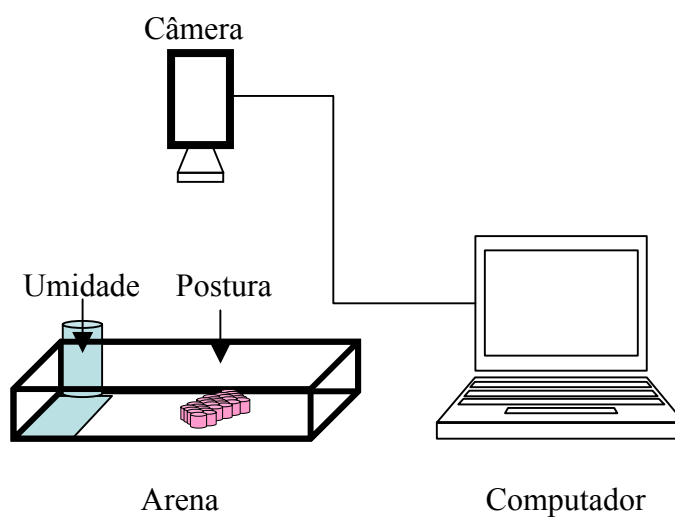


Figura 5.3. Esquema do sistema de monitoramento do deslocamento das ninfas *Nezara viridula* em relação à umidade.

### 5.3. Resultados e discussão

A relação entre a emergência das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar de *N. viridula* e a umidade relativa (UR) à 25°C pode ser observada na Fig. 5.4. A emergência das ninfas apresentou uma correlação direta com a UR, mostrando que quanto maior a UR, maior a emergência de ninfas. Em todas as umidades testadas, apenas as ninfas cujas posturas permaneceram em ambiente com UR 100% passaram para o 2<sup>o</sup> ínstar. Além da alta mortalidade do embrião de posturas submetidas a 0% UR obtida através de sílica gel, as ninfas que iniciaram processo de emergência morreram com parte do corpo dentro de seu respectivo córion. Estes resultados demonstram a importância da umidade no desenvolvimento de embrião e na biologia das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar.

Segundo Panizzi (2003), a falta de umidade ou excesso de calor são responsáveis pela mortalidade dos embriões de pentatomídeos em condições de laboratório. Para muitos insetos, a UR é importante no estágio embrionário: quanto maior a umidade atmosférica mais favorável é o ambiente para o desenvolvimento do embrião (Bursell 1974). No campo, as posturas de *N. viridula* são depositadas na face inferior das folhas (Todd 1989). Esse comportamento pode contribuir para que as posturas tenham uma condição micro-climática com elevada umidade, devido à condensação da água na face inferior da folha além de proteger os ovos da radiação solar, que poderia melhorar as condições para a emergência das ninfas e a sobrevivência do 1<sup>o</sup> ínstar de *N. viridula*. Guarneri *et al.* (2002), testando a emergência de ninfas de *Triatoma brasiliensis* Neiva (Heteroptera: Reduviidae), especulam que a baixa umidade relativa poderia afetar o desenvolvimento do embrião e impedir a saída das ninfas dos ovos por perda de lubrificação ou insuficiente maciez cuticular das ninfas.

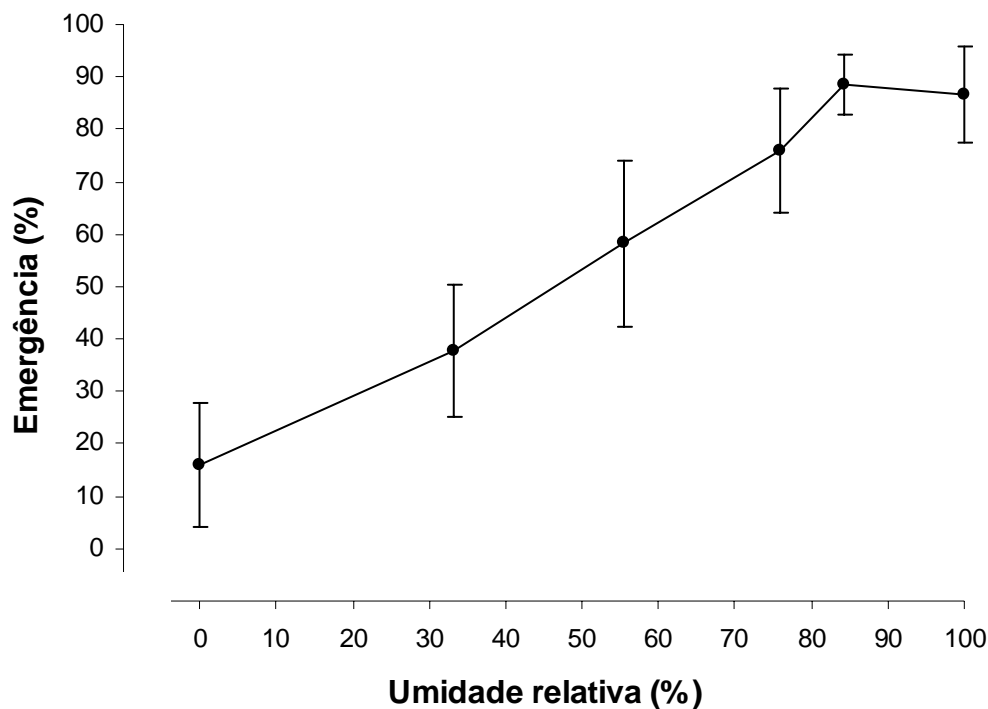


Figura 5.4. Emergência (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* cujas posturas foram submetidas a diferentes umidades relativas obtidas com solução saturada de sais e sílica gel à 25°C (n=5).

As ninfas de *N. viridula* ao emergirem possuem coloração laranja que sofre um escurecimento devido a esclerotização da cutícula. Todas as ninfas adquiriram uma cor marrom em  $57,0 \pm 4,42$  minutos após a emergência (Fig. 1.1). As ninfas ficam mais susceptíveis à perda de água para o ambiente logo após a emergência e a cada troca de ínstar, devido à permeabilidade da cutícula. O conteúdo de água dos insetos normalmente varia em torno de 60 a 80% do peso do corpo, dependendo do habitat, e a fase de desenvolvimento em que se encontram. Os insetos podem perder água por evaporação, através da superfície do

corpo, sendo a cera presente na cutícula a principal barreira para a perda de água, e a taxa de evaporação da cutícula está diretamente relacionada com a temperatura e a umidade do ar adjacente (Chapman 1998).

Outro fator que torna a umidade no ambiente importante para a sobrevivência é a dimensão dos insetos; a superfície corporal através do qual a água pode ser perdida por evaporação é grande em relação à quantidade de água que os insetos têm à disposição (Bursell 1974). Em ninfas, este problema é mais grave, pois a relação superfície/volume é muito maior do que em insetos adultos.

Lockwood & Story (1985) demonstraram que em 75% das massas de ovos de *N. viridula* submetidos à temperatura de 25°C e ao fotoperíodo de 14h L: 10h D, as ninfas emergiram no período de 3:00 a 9:00 h com o amanhecer às 6:00 h, relacionando a emergência das ninfas a um determinado período do dia. Isto levanta a possibilidade das ninfas ajustarem a emergência, para o período do dia com maior umidade relativa, o que conseqüentemente, garantiria a sobrevivência maior das ninfas de 1º instar.

As ninfas emergidas das posturas colocadas nas arenas com gradiente de umidade (Fig. 5.2) permaneceram sobre a postura por  $21,7 \pm 0,67$  horas. Após este período, elas abandonaram o córion e voltaram a se reagrupar, repetindo este processo em média  $6,8 \pm 0,67$  vezes, até abandonarem definitivamente o córion, o que ocorreu após  $31,2 \pm 1,36$  horas, em torno de 9 horas após o início das dispersões e reagrupamentos. É possível que após este período, a necessidade de água faça com que as ninfas busquem áreas com maior umidade. Segundo Todd (1989), ninfas de 1º instar são particularmente vulneráveis à dessecação durante períodos de baixa umidade e alta temperatura, assim a fim de garantir a sobrevivência, as ninfas de *N. viridula* se deslocariam para áreas com maior umidade.

Nas primeiras três dispersões o tempo médio que as ninfas permaneceram separadas até se agregarem novamente foi de 33,8 minutos, passando para 42,8 minutos nas dispersões subseqüentes (4 – 6). Estes resultados sugerem que à medida que as dispersões e reagrupamentos ocorrem, a capacidade das ninfas de 1º instar de se reagrupar junto ao córion torna-se mais difícil, até o abandono definitivo do córion.

A cada reagrupamento, o tempo que as ninfas permaneceram agregadas diminui gradativamente (Fig. 5.5). Após o primeiro reagrupamento, o tempo em que as ninfas ficaram agrupadas antes de se dispersarem novamente foi de 102,2 minutos; após cinco reagrupamentos, o tempo que as ninfas permaneceram sobre a postura foi de 24,0 minutos; desta forma, o tempo do comportamento gregário diminuiu até as ninfas abandonarem completamente o córion.

As ninfas deslocaram-se da superfície dos ovos para as áreas com UR mais alta após  $31,2 \pm 1,36$  horas. Este deslocamento aparentemente é aleatório: após o abandono definitivo da postura, à medida que as ninfas entram em contato com a umidade (fita de papel filtro saturada com água) permanecem junto à margem do papel saturado e reiniciam o reagrupamento formando um ou dois grupos junto à margem (Fig. 5.7). Técnicas de criação de *N. viridula* demonstram que, apesar das ninfas de 1º instar não se alimentarem, a adição de vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) nas gaiolas de criação ajuda na sobrevivência das ninfas (Jones 1985), provavelmente devido ao incremento da umidade no ambiente.

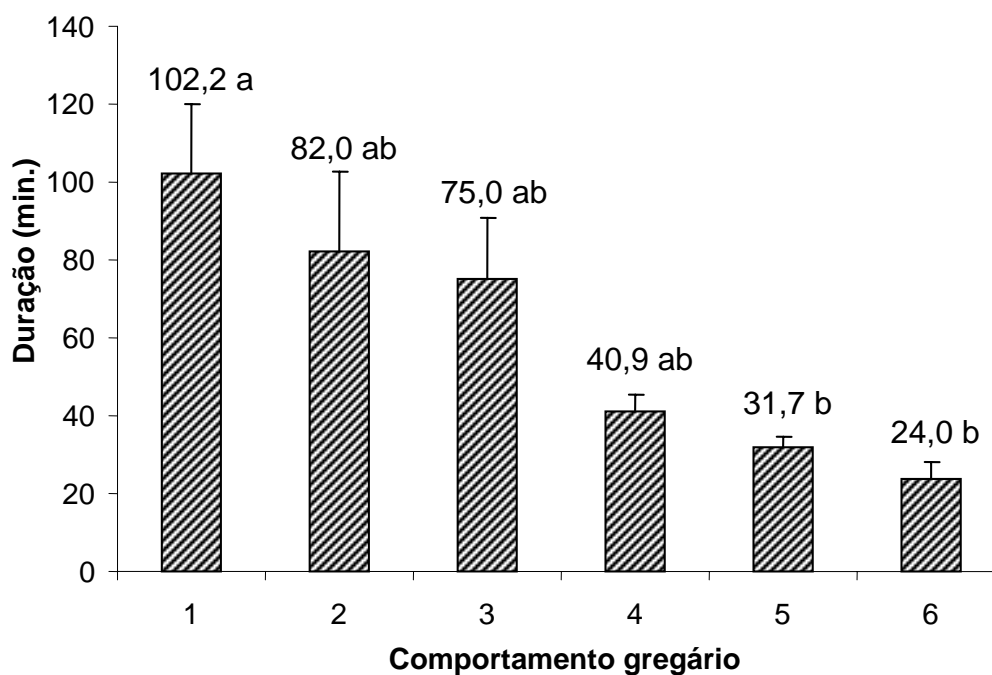


Figura 5.5. Duração (min.) (média  $\pm$  EP) do comportamento gregário a cada reagrupamento de ninfas de 1<sup>o</sup> instar de *Nezara viridula*, mantidas em câmaras climatizadas ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR, fotoperíodo 24h L:0h E). Médias seguidas pela mesma letra entre as colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

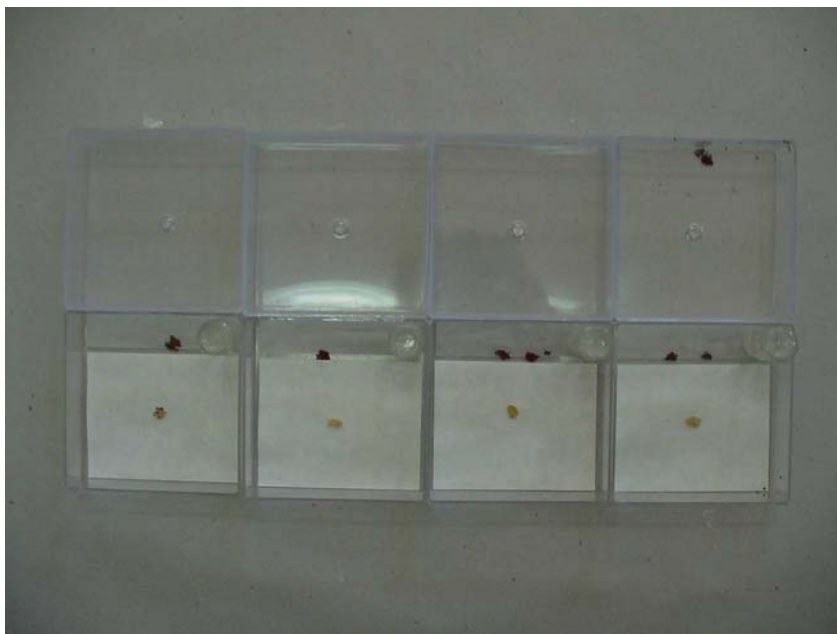


Figura 5.6. Ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar de *Nezara viridula* mantidas em câmaras climatizadas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 24 h L:0h E), deslocadas para áreas com umidade.

De modo geral, as ninfas se reagrupam a margem da área com água, mas não permanecem diretamente sobre o papel saturado (Fig. 5.6). Ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar de *N. viridula* são capazes de ganhar peso, bebendo ou adquirindo água diretamente da atmosfera em condições de umidade alta, mostrando um ganho de peso contínuo durante o seu desenvolvimento, levantando a possibilidade da existência de um mecanismo para retirar vapor d'água da atmosfera (Lockwood & Story 1986).

O excesso de umidade também se mostrou um fator de mortalidade das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar. Ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar que se reagruparam totalmente sobre o papel saturado com água tiveram mortalidade alta. Ninfas emergidas de posturas colocadas sobre papel constantemente saturado com água não atingiram o 2<sup>o</sup> ínstar, com 100% de mortalidade.

Foi demonstrado neste trabalho como a umidade relativa afeta o desenvolvimento do embrião, e o comportamento e sobrevivência das ninfas de 1º instar de *N. viridula*, sendo necessário UR elevada para o bom desenvolvimento das ninfas de 1º instar, e a necessidade de reduzir a perda de água para o meio ambiente, um dos fatores que influenciariam o comportamento gregário das ninfas sobre o córion.

#### **5.4. Literatura citada**

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Bursell, E. 1974.** Environmental aspects – humidity. P. 44-84. In Rockstein, M. (ed.). The physiology of Insecta. Academic Press, New York, NY. 568 p.

**Chapman, R.F. 1998.** The insects: structure and function. 4ª ed. Cambridge University Press, New York, NY. 788p.

**Guarneri, A.A., C. Lazzari, L. Diotaiuti & M.G. Lorenzo. 2002.** The effect of relative humidity on the behavior and development of *Triatoma brasiliensis*. Physiol. Entomol. 27: 142-147.

**Jones, Jr., W.A. 1985.** *Nezara viridula*. P. 339-344. In Singh, P. & R.F. Moore (eds.). Handbook of insect rearing, vol. 1. Elsevier Sci., New York, NY. 488 p.

**Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1985.** Photic, thermic and sibling influences on the hatching rhythm of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.). Environ. Entomol. 14: 562-567.

- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1986.** Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* 15: 739-749.
- Panizzi, A.R. 2003.** Adaptive advantages for egg and nymph survivorship by egg deposition in masses or singly in seed-sucking Heteroptera. P. 60-73. In Gujar G.T. (ed.). *Contemporary trends in insect science*. Campus Books International, New Delhi. 424 p.
- StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.
- Willmer, P.G. 1982.** Microclimate and the environmental physiology of insects. *Adv. Insect Physiol.* 16: 1-57.
- Yonke, T.R. 1991.** Ordem Hemiptera. P. 22- 65. In Stehr, F.W. (ed.). *Immature insect*, vol. 2. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa. 975 p.

## CAPÍTULO 6

### Sistema digestório de *Nezara viridula* (L.)

#### 6.1. Introdução

A família Pentatomidae apresenta importância especial entre os percevejos-pragas que atacam a cultura da soja, [*Glycine max* (L.) Merrill] devido aos danos diretos e irreversíveis às sementes em desenvolvimento (Panizzi & Slansky 1985). Entre os pentatomídeos, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) é um dos mais estudados, devido à sua ampla distribuição geográfica e polifagia (Todd 1989, Panizzi 1997). Apesar disso, ainda há uma carência de informações sobre as possíveis relações simbióticas entre microrganismos e esse inseto.

Heteroptera é uma das maiores ordens entre os insetos, com aproximadamente 37.000 espécies conhecidas, sendo várias de importância econômica (Yonke 1991, Schaefer & Panizzi 2000). Bactérias simbióticas em Heteroptera são muitas vezes extracelulares e se encontram no lúmen do trato digestório (Goodchild 1978, Haas & König 1987, Eichler & Schaub 2002). Os simbiossitos do trato digestório geralmente são de herança materna e adquiridos através do córion contaminado superficialmente com bactérias. Presume-se que a presença destas bactérias seja essencial para a sobrevivência e/ou desenvolvimento do inseto (Steinhaus 1967, Abe *et al.* 1995, Fukatsu & Hosokawa 2002).

Para realizar estudos das bactérias do trato digestório é necessário, antes de tudo, reconhecer as partes do sistema digestório de *N. viridula*, sua localização, compartimentação e

dimensões de cada região do trato, para determinar a localização e a população das bactérias presentes. Assim, baseado no trabalho de Malouf (1933) e Goodchild (1966), foi possível um melhor detalhamento das diferentes partes do sistema digestório de *N. viridula*, utilizando-se novas tecnologias disponíveis.

## **6.2. Material e Métodos**

### **6.2.1. Criação de insetos**

Adultos e ninfas do percevejo *N. viridula* foram obtidos da criação mantida no “Chemicals Affecting Insect Behavior Laboratory” no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA-ARS) em Beltsville, MD, EUA.

Os insetos foram criados em potes plásticos transparentes (40 x 30 cm de diâmetro) forrados com papel filtro, e mantidos em sala climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16 h L: 8h E). Em cada pote, para manutenção da umidade, foi colocado um tubo de vidro (1,5 x 10,5 cm) com água destilada fechado com algodão. Os insetos foram alimentados com vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e semente de girassol (*Helianthus annuus* L.). A cada dois dias, o alimento e a água foram trocados e os ovos coletados para continuidade da criação.

### 6.2.2. Dissecação asséptica

Para a dissecação de adultos e ninfas de *N. viridula*, primeiramente os insetos foram anestesiados utilizando-se CO<sub>2</sub>; pernas, asas e laterais do abdômen foram cortados. Cada inseto foi mergulhado em hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto e transferido para uma placa de Petri (5 cm de diâmetro) com parafina esterilizada em estufa a 121°C por 20 minutos. O inseto foi imobilizado com alfinetes entomológicos e coberto com água autoclavada. Partes do sistema digestório (intestino anterior, médio e posterior) foram retiradas pela face dorsal do abdômen do inseto (Fig. 6.1), com o auxílio de pinças.

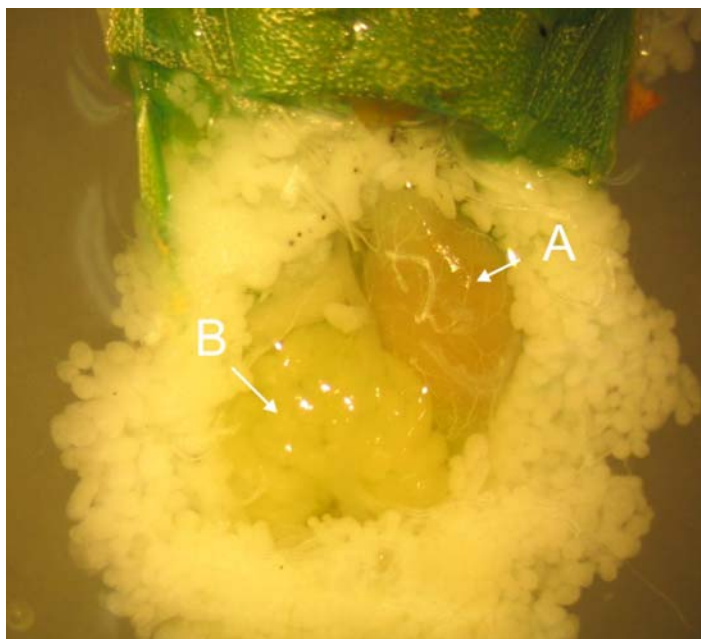


Figura 6.1. Fêmea de *Nezara viridula* preparada para a retirada do sistema digestório (posição dorsal). A = ventrículo 3; e B = ventrículo 4 (região dos cecos gástricos).

### **6.2.3. Dimensões de parte do sistema digestório**

Dez adultos de *N. viridula* (5 machos e 5 fêmeas) foram dissecados e tiveram parte do sistema digestório fotografado com uma câmera digital com o auxílio de uma lupa estereoscópica. As dimensões (comprimento e largura) das diferentes partes do sistema digestório foram obtidas através da análise das fotografias digitais onde cada parte foi comparada com um segmento padrão de 2,8 mm, utilizado o programa para desenho gráfico Corel Draw versão 11 (Corel 2002).

### **6.2.4. Determinação do pH de parte do sistema digestório**

Quarenta adultos de *N. viridula* (20 machos e 20 fêmeas) foram dissecados visando à determinação do pH do sistema digestório. Quatro partes do sistema digestório foram escolhidas devido à facilidade na retirada e volume obtido, sendo estas: ventrículo 1 (V1), V2, V3 e V4 (região dos cecos gástricos). Essas partes foram individualizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL com a adição de 50 µL de água bidestilada e deionizada. As partes foram homogenizadas minutos antes da leitura no pHmetro, com o auxílio de um micromixer. Uma alíquota de 20 µL foi retirada de cada suspensão e colocada sobre o sensor e procedeu-se então a leitura do pH.

As dimensões e as leituras de pH das partes do trato digestório foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

### 6.3. Resultados e discussão

Parte do intestino anterior, o intestino médio e posterior de *N. viridula* podem ser visualizados na Fig. 6.2. As dimensões (comprimento e largura) de cada região do trato digestório são apresentadas na Tabela 6.1. As quatro regiões do trato digestório observadas tiveram o comprimento total médio de 30,7 mm e 33,9 mm para macho e fêmea, respectivamente. Para todas as partes mensuradas, as estruturas retiradas das fêmeas tenderam a serem maiores.

Tabela 6.1. Comprimento (C) e largura (L) (mm) (média  $\pm$  EP) em diferentes regiões do sistema digestório de *Nezara viridula*.

Sexo		Estomodeo <sup>1</sup>		Mesêntero <sup>1</sup>	
		V1	V2	V3	V4
Fêmea	C	5,3 $\pm$ 0,20 a (5)	14,9 $\pm$ 0,60 a (5)	4,3 $\pm$ 0,37 a (5)	9,4 $\pm$ 0,61 a (5)
	L	3,1 $\pm$ 0,23 a (5)	0,8 $\pm$ 0,01 a (5)	1,8 $\pm$ 0,24 a (5)	1,3 $\pm$ 0,09 a (5)
Macho	C	5,1 $\pm$ 0,14 a (5)	14,5 $\pm$ 1,89 a (5)	3,3 $\pm$ 0,21 b (5)	7,7 $\pm$ 0,53 a (5)
	L	3,1 $\pm$ 0,22 a (5)	0,7 $\pm$ 0,04 a (5)	1,9 $\pm$ 0,15 a (5)	1,2 $\pm$ 0,11 a (5)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra para cada parâmetro (C e L) nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

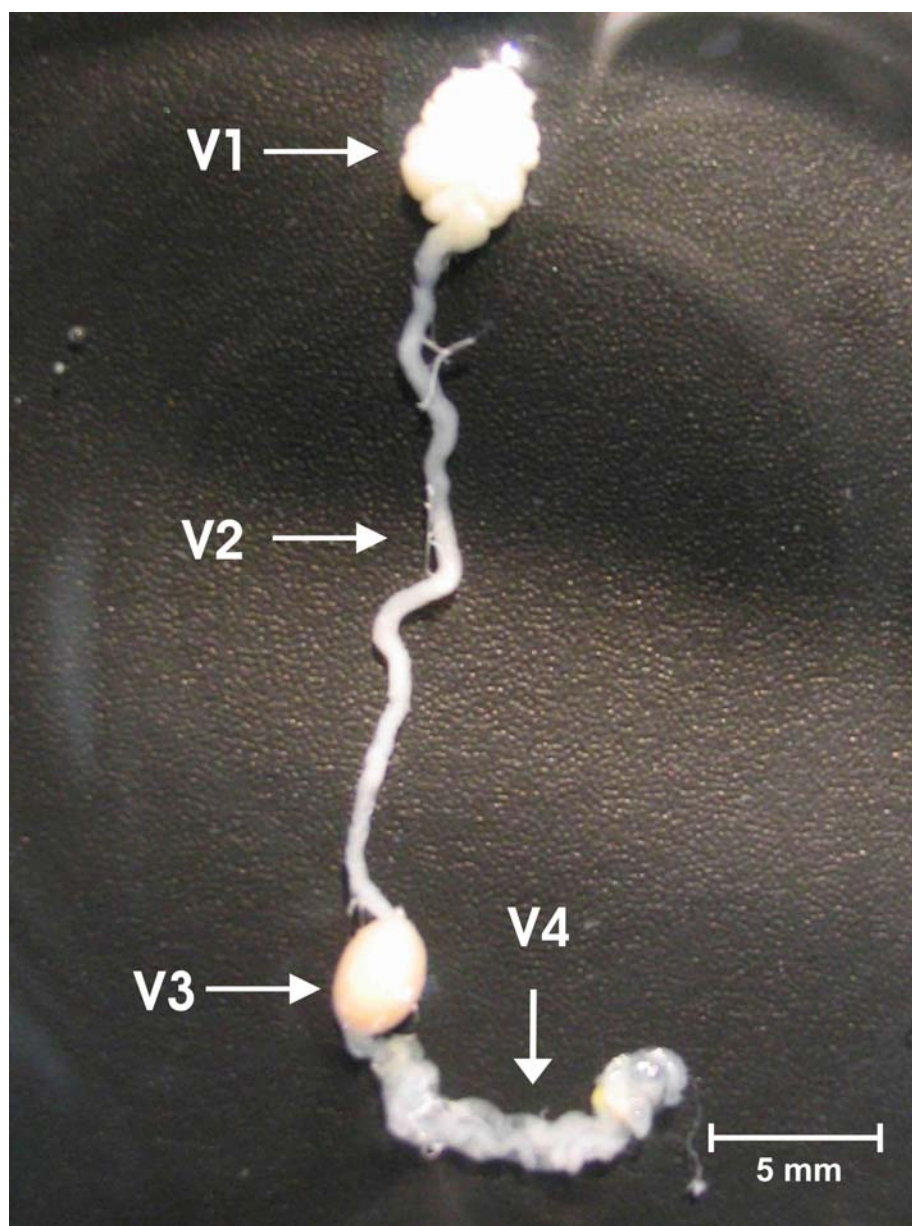


Figura 6.2. Parte do sistema digestório de *Nezara viridula* (ventrículo = V), V1 – parte anterior, V4 – parte posterior do sistema digestório.

O intestino médio inicia-se logo após o papo ventrículo (V1) e apresenta-se como um órgão tubular conhecido como ventrículo 2 (V2). O ventrículo 3 (V3) liga-se ao final do V2 e apresentou-se expandido dependendo de seu conteúdo (Figs. 6.1, 6.2 e 6.3). O ventrículo 4 (V4 - região dos cecos gástricos) está ligado ao final de V3. O volume e a cor destes ventrículos variou de acordo com o estado alimentar do inseto, normalmente, V1 e V2 apresentam uma coloração creme, V3 a cor varia de verde escuro a marrom (Fig. 6.4). Em V2 e V3 ocorrem características histológicas semelhantes (Malouf 1933).

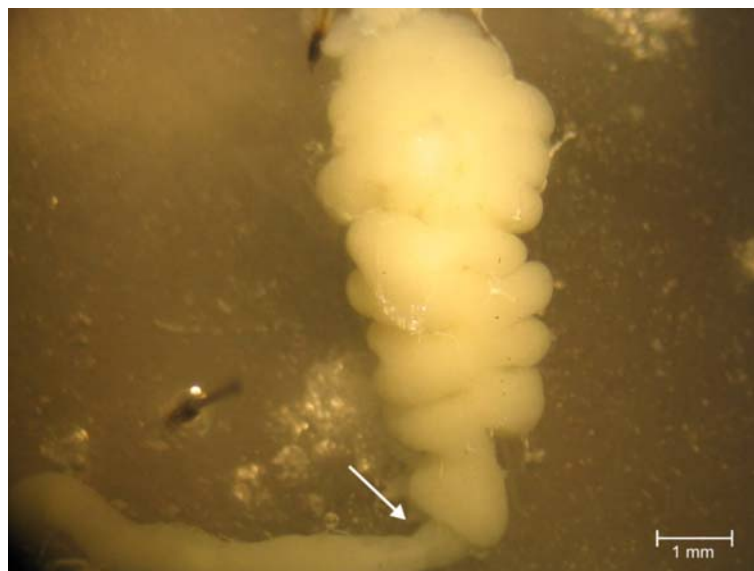


Figura 6.3. Ventrículo 1 (V1) de *Nezara viridula* conectado ao ventrículo 2 (V2 – estrutura tubular) indicado pela seta.

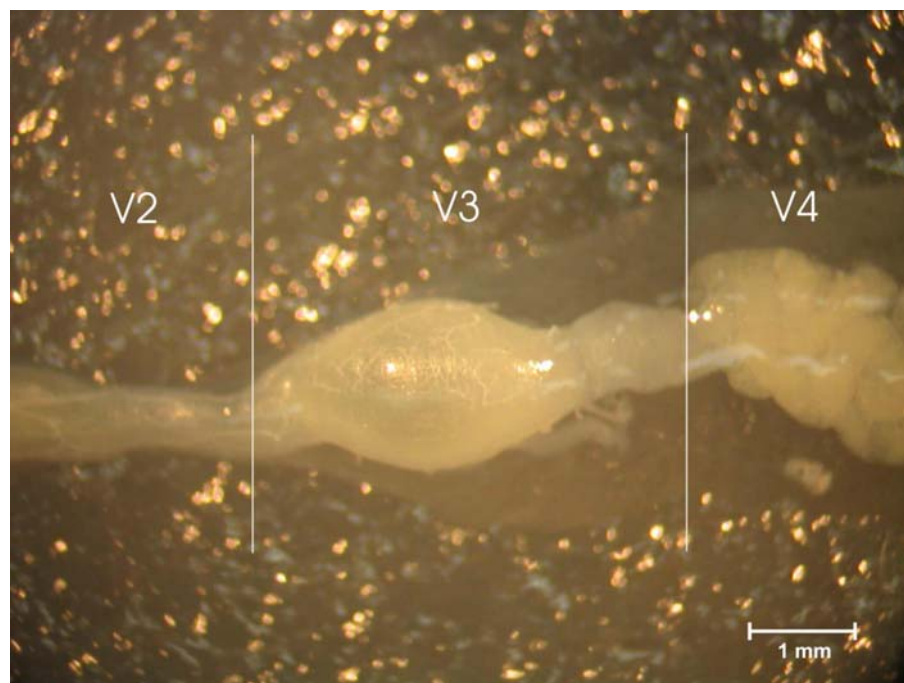


Figura 6.4. Detalhes do intestino médio de *Nezara viridula*. Ventriculo = V, V4 = região dos cecos gástricos.

O V4 é conhecido como região dos cecos gástricos e está localizado na parte final do intestino médio (Fig. 6.5). Muitas famílias de Heteroptera apresentam invaginações chamados cecos ou criptas na parte final do intestino médio (Dolling 1991). Esses cecos variam consideravelmente em número e arranjo de acordo com os diferentes grupos taxonômicos. Em Pentatomidae os cecos são constituídos por quatro fileiras longitudinais em forma de cordões separados (Malouf 1933, Goodchild 1963, 1966).



Figura 6.5. Detalhes da região dos cecos gástricos (V4) de *Nezara viridula*, formado por quatro cordões de cecos e traquéias (túbulos de coloração prateada). A = parte proximal; B = parte mediana, setas indicando um dos cordões de cecos; e C = parte distal, seta indicando final dos cecos e início do reto.

Este estudo mostrou que, em *N. viridula*, o pH variou de quase neutro (6,7) a ácido (5,1) de acordo com a região do sistema digestório, porém os pHs não foram diferentes entre os sexos (Tabela 6.2). Houve redução significativa no valor do pH do V1 (6,6) e V2 (6,1), para o V3 (5,2). Em V4 (região dos cecos gástricos), que é adjacente ao V3, o pH voltou a subir para 6,6.

Tabela 6.2. Valores de pH (média  $\pm$  EP) em diferentes regiões do sistema digestório de *Nezara viridula*.

Sexo	Estomodeo <sup>1</sup>		Mesêntero <sup>1</sup>	
	V1	V2	V3	V4
	6,6 $\pm$ 0,18 a	6,1 $\pm$ 0,08 a	5,2 $\pm$ 0,46 b	6,6 $\pm$ 0,06 a
Fêmea	(5)	(5)	(5)	(5)
	6,7 $\pm$ 0,22 a	6,0 $\pm$ 0,35 a	5,1 $\pm$ 0,56 b	6,7 $\pm$ 0,03 a
Macho	(5)	(5)	(5)	(5)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Goodchild (1978) verificou em *Piezosternum calidum* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) mudanças no bolo alimentar na expansão do intestino médio, onde o alimento sofre o processo de digestão em baixo pH. Biggs & McGregor (1996), analisando o pH em larvas de *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae), verificaram variação de pH, dependendo da região do intestino médio. O pH foi de 8,4 na região pré-cecos elevando-se para 10,8 na região

dos cecos. Em *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), também apresentou variações no pH dependendo de região do trato digestório, a razão dessa variação talvez se deva a compartimentação da digestão do alimento (Silva & Terra 1994).

É bem conhecido o fato de que o conteúdo do intestino médio (mesêntero) de certas larvas, particularmente entre Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Isoptera, ser alcalino (p. ex., Dadd 1975, Berenbaum 1980, Biggs & McGregor 1996, Kappler & Brune 1999). Em Orthoptera, Appel & Joern (1998) demonstraram que o pH varia da neutralidade à acidez. Insetos herbívoros realizam várias reações bioquímicas no lúmen do intestino, que apresentam condições especiais de pH e concentração de oxigênio, para melhorar a digestibilidade do material vegetal e/ou limitar a atividade de aleloquímicos e patógenos que poderiam ser prejudiciais ao inseto (Appel & Joern 1998). Essas variações de pH também podem determinar a presença ou ausência de simbioses em determinada parte do sistema digestório.

#### **6.4. Literatura citada**

**Abe, Y., K. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Appel, H.M. & A. Joern. 1998.** Gut physicochemistry of grassland grasshoppers. J. Insect Physiol. 44: 693-700.

**Berenbaum, M. 1980.** Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. Am. Nat. 115: 138-146.

- Biggs, D.R. & P.G. McGregor. 1996.** Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*: Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 69-75.
- Corel, Corp. 2002.** COREL DRAW. version 11. [www.corel.com](http://www.corel.com).
- Dadd, R.H. 1975.** Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-activite digestive enzymes. *J. Insect Physiol.* 21: 1847-1853.
- Dolling, W.R. 1991.** *The Hemiptera*. Oxford University Press, Oxford, UK. 274 p.
- Eichler, S. & G.A. Schaub. 2002.** Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasit.* 100: 17-27.
- Fukatsu, T. & T. Hosokawa. 2002.** Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 389-396.
- Goodchild, A.J.P. 1963.** Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 141: 851-910.
- Goodchild, A.J.P. 1966.** Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol. Rev.* 41: 97-140.

- Goodchild, A.J.P. 1978.** The nature and origin of the mid-gut contents in a sap-sucking Heteropteran, *Piezosternum calidum* Fab. (Tessaratominae) and the role of symbiotic bacteria in its nutrition. Ent. Exp. Appl. 23: 177-188.
- Haas, F. & H. Koenig. 1987.** Characterization of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). FEMS Microbiol. Ecol. 45: 99-106.
- Kappler, A. & A. Brune. 1999.** Influence of gut alkalinity and oxygen status on mobilization and size-class distribution of humic acids in the hindgut of soil-feeding termites. Appl. Soil Ecol. 13: 219-229.
- Malouf, N.S.R. 1933.** Studies on the internal anatomy of the stink bug *Nezara viridula* L. Bull. Soc. Royale Entomol. d'Egypte 1-3: 96-119.
- Panizzi, A.R. & F. Slansky Jr. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. Fla. Entomol. 68: 184-214.
- Panizzi, A.R. 1997.** Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. Annu. Rev. Entomol. 42: 99-122.
- Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi. 2000.** Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.

**Silva, C.P. and Terra, W.R. 1994.** Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 493-505.

**StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6.  
[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

**Steinhaus, E.A. 1967.** *Insect microbiology*. Hafner Pub. Com., New York, NY. 763 p.

**Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.

**Yonke, T.R. 1991.** Order Hemiptera. P. 22- 65. In Stehr, F.W. (ed.). *Immature insect*, vol. 2. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa. 975 p.

## CAPÍTULO 7

### **Bactérias do trato digestório do *Nezara viridula* (L.) caracterizadas por sequenciamento da região do DNA ribossomal 16S**

#### **7.1. Introdução**

O percevejo-verde-da-soja, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) é um pentatomídeo polífago, de ampla distribuição geográfica e grande importância econômica (Todd 1989, Panizzi *et al.* 2000). Uma característica do comportamento de membros da família Pentatomidae é colocar ovos agrupados em massas e as ninfas permanecerem junto às cascas dos ovos durante o 1<sup>o</sup> ínstar, aparentemente sem se alimentar (Kiritani 1964, Javahery 1994).

Possíveis explicações para este comportamento são: necessidade de regulação de umidade devido à alta relação superfície/volume o que faz com que as ninfas necessitem permanecerem unidas para evitar dessecação; proteção contra predadores (Lockwood & Story 1986); e/ou aquisição de microrganismos simbiotes que estariam presentes na superfície dos ovos (Abe *et al.* 1995).

As associações simbióticas influenciam no desenvolvimento e na sobrevivência dos insetos (Berenbaum 1988, Frederick & Caesar 2000), sendo que o trato digestório dos insetos comporta uma grande variedade de microrganismos extracelulares não patogênicos que podem ser agentes de uma associação simbiótica (Bignell 1984, Campbell 1989, Hackstein & Stumm 1994, Cazemier *et al.* 1997, Vries *et al.* 2001).

Devido à importância destas relações simbióticas, algumas espécies de insetos, nas mais variadas ordens, apresentam estruturas modificadas no trato digestório para conter e manter esses microrganismos (Douglas 1989).

Nos pentatomídeos existem apêndices em forma de sacos localizados no intestino médio. Estas estruturas chamados cecos gástricos ou criptas bacterianas se apresentam em diferentes formas e tamanhos, mas sempre contêm grande número de bactérias (Steinhaus 1967). A importância destes microrganismos na biologia destes insetos, no entanto permanece desconhecida.

Com o advento das técnicas moleculares modernas, o estudo da microbiota de insetos teve um grande avanço, permitindo a identificação de espécies de bactérias sem a necessidade de cultivo em meio de cultura, através da amplificação de seqüências altamente conservadas de DNA ribossomal 16S (p. ex., O'Neill *et al.* 1992, Brauman *et al.* 2001, Zchori-Fein & Brown 2002).

Assim, este trabalho objetivou examinar a diversidade microbiana no trato digestório de *N. viridula*, a localização destas bactérias e sua identificação através de técnicas moleculares e bioquímicas.

## **7.2. Material e métodos**

### **7.2.1. Dissecção de *N. viridula***

Adultos e ninfas, obtidos da criação mantida no “Chemicals Affecting Insect Behavior Laboratory” no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço de Pesquisa

Agrícola (USDA-ARS) em Beltsville, MD, EUA, foram dissecados em condições assépticas. Partes do sistema digestório, ventrículos 1 a 4 (detalhes no Capítulo 6), foram individualizadas e colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

### **7.2.2. Bactérias em meio de cultura**

Os tecidos do intestino de *N. viridula* foram macerados, e espalhados por técnica de esgotamento em placas com meio de cultura Agar Luria Bertani (LB), para obter colônias isoladas de bactérias. Para determinar o número de bactérias culturáveis, as diferentes partes do trato digestório foram homogeneizadas e submetidos a diluições sucessivas em água estéril e plaqueadas em meio LB. As placas foram mantidas em incubadora à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . O número de colônias bacterianas foi obtido após 48 h de incubação.

### **7.2.3. Extração do DNA bacteriano**

#### **7.2.3.1. Bactérias culturáveis**

Colônias de bactérias isoladas do trato digestório de três insetos (uma fêmea, um macho e uma ninfa de 4<sup>o</sup> ínstar) foram cultivadas em meio de cultura LB sem subcultura. Dez colônias bacterianas de cada inseto coletadas ao acaso foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução de extração (0,05 M NaOH, 0,25% SDS) e colocados em banho-maria por 15 minutos. Após a lise das células bacterianas, a

suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto. As células lisadas foram diluídas 25X em água destilada autoclavada. O DNA bacteriano foi quantificado em gel de agarose (1%).

### **7.2.3.2. Bactérias não culturáveis**

Dez adultos de *N. viridula* foram dissecados assepticamente e as partes do sistema digestório foram separadas e liofilizadas em tubos de microcentrífuga (2 mL). O material liofilizado foi pulverizado em nitrogênio líquido. Adicionaram-se 900 µL de tampão de extração (NaCl 2M, 0,4% ácido desoxicólico sal-sódico, 1% Brij 58) em agitação manual. O material biológico foi então incubado a 55°C por 10 minutos e adicionaram-se 600 µL de CIA (álcool isoamil clorofórmico 24:1), para formar uma emulsão que foi centrifugada a 10.000 rpm por cinco minutos. Removeram-se 700 µL do sobrenadante para um tubo novo com 700 µL de tiocianato de guanidina 6M e 10 µL de pó de vidro (325 *mesh*) em suspensão, que foi incubado à temperatura ambiente por cinco minutos. O pó de vidro foi precipitado, ressuspenso em 1 mL de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl, pH 8; 0,1 mM EDTA, pH 8; 50% etanol absoluto) e novamente precipitado. O *pellet* (do pó de vidro + DNA) foi seco a 55°C por cinco minutos. Após a secagem, o *pellet* foi suspenso em 50 a 100 µL de TBE e aquecido por 1 minuto a 55°C, e o eluente com o DNA, transferido para um tubo novo. O DNA foi quantificado em gel de agarose (1%) (Rehner & Buckley 2003).

#### 7.2.4. Amplificação do segmento DNA ribossomal 16S

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar fragmentos de DNA ribossomal 16S, no volume final de 50  $\mu$ L de *mix* contendo 50mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNDP, 20 pM de cada *primer* (8F 5'– AGAGTTTGATCCTGGCTAG - 3' 1429R 5' - ACGGCTACCDTTGTTAACGACTT - 3') (Esikova *et al.* 2002), 2.0 U Taq DNA polimerase e 30 ng de suspensão de células bacterianas lisadas ou a mesma concentração de DNA purificado dos tecidos do trato digestório.

As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer 9600). A primeira fase: desnaturação inicial (94°C, 2 minutos) seguido por 10 ciclos de desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (62°C, 1 minuto reduzindo  $-1^\circ$  por ciclo) e extensão (72°C, 2 minutos). A segunda fase consistiu de 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (52°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 2 minutos) e uma extensão final (72°C, 5 minutos). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose de baixa fusão (1,5%) e purificado usando método padrão (Sambrook & Russel 2001).

#### 7.2.5. Seqüenciamento

O produto de PCR obtido das bactérias culturáveis foi diretamente seqüenciado usando a técnica de “Taq-mediated DyeDeoxy terminator cycle sequencing”. Os produtos das bactérias não culturáveis dos tecidos do trato digestório (V1, V2-V3 e V4) foram clonados com TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. Colônias

brancas contendo os plasmídeos com seqüências desejadas foram extraídas por métodos padrões (Sambrook & Russel 2001).

Os plasmídeos foram amplificados usando os *primers* M13 (Invitrogen) nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C, 2 minutos), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (50°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 2 minutos). Os produtos foram separados e purificados usando método padrão (Sambrook & Russel 2001). *Primers* M13 *forward* 16SinF (5'-TGCCGCGTGAGTGAAGAA-3') e M13 *reverse* 16SinR (5'-ATAAGGGCCATGATGACTTGAC-3') foram usados para a reação de seqüenciamento.

Os pacotes de programas de computadores Lasergene Sequence Analysis (versão 5) (DNASTar Inc.,Madison,WI) e BLAST (Altschul *et al.* 1997) foram usados para as análises das seqüências de DNA.

#### **7.2.6. Sensibilidade de bactérias culturáveis a antibióticos**

A bactéria culturável obtida do trato digestório do inseto foi testada quanto à sensibilidade a antibióticos. Colônias de bactérias foram suspensas em 10 mL de água estéril, agitadas em vortex e semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com o auxílio de uma alça estéril; em seguida, foram colocados discos de sensibilidade (6,5 mm de diâmetro) com ampicilina, kanamicina, eritromicina, rifampicina e neomicina. As placas foram mantidas em incubadora a 25±1°C e avaliadas após 48 hs.

### 7.2.7. Biologia de ninfas tratadas com antibiótico

Posturas de *N. viridula* obtidas da criação, mantida no “Chemicals Affecting Insect Behavior Laboratory” no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA-ARS) em Beltsville, MD, EUA, foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizadas e forradas com papel de filtro umidificado com solução de antibiótico (kanamicina 60 mg/L). As placas contendo as posturas foram mantidas em sala climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16h L:8h E), até as ninfas atingirem o 2<sup>o</sup> ínstar.

No 1<sup>o</sup> dia do 2<sup>o</sup> ínstar, as ninfas foram individualizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL com algodão umedecido com solução de antibiótico (tratamento) ou água destilada (testemunha) e uma vagem verde de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). As ninfas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado e observadas diariamente, sendo o alimento e as soluções de antibióticos substituídos a cada dois dias. Os insetos foram sexados e pesados em balança eletrônica, no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta.

As porcentagens de mortalidade das ninfas foram calculadas, e os dados de tempo de duração de cada ínstar, o tempo total de desenvolvimento ninfal (2<sup>o</sup> – 5<sup>o</sup> ínstar) e o peso no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P\leq 0,05$ ), utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

### 7.2.8. Bactérias do trato digestório de *N. viridula* proveniente do campo

Adultos de *N. viridula* (5 fêmeas e 5 machos) foram coletados a campo, na Fazenda Experimental da Embrapa – Soja, Londrina, PR, Brasil. Os insetos foram dissecados em condições assépticas e o conteúdo do sistema digestório foi macerado individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O macerado foi semeado com o auxílio de uma alça estéril por técnica de esgotamento, em placas com meios de cultura: Ágar Luria Bertani (LB) – não específico, Ágar sangue (AS) – não específico, Ágar MacKonkey (MC) – específico para bactérias Gram negativas, Ágar confirmatório de enterococos (CE) – específico para enterococos – Gram positivos. As placas foram mantidas em incubadora à temperatura de  $35\pm 1^{\circ}$  C. Após 48 h de incubação, as colônias bacterianas foram repicadas em tubos contendo LB.

Colônias de bactérias em meio LB e AS, foram submetidas à reação de Gram. Bactérias isoladas em meio MC foram submetidas a testes bioquímicos: EPM - para avaliar a produção de gás, urease e triptofano desaminase; MILi – avaliar motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase; e Citrato de Simmons, para verificar a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio com fonte de carbono (Toledo *et al.* 1982a, b). Os testes bioquímicos foram utilizados para identificar as bactérias da família Enterobacteriaceae. Para a identificação da espécie dentro desta família foi utilizado o sistema API 20E – BioMérieux SA, seguindo as instruções do fabricante.

### 7.3. Resultados e discussão

Os *primers* e o programa para amplificação funcionaram apropriadamente (Fig. 7.1). Sendo que as três bactérias culturáveis isoladas do V1-V3 e submetidas a seqüenciamento do segmento 16S apresentaram seqüências limpas, o que exclui a possibilidade de haver mais de uma espécie de bactéria presente, e todas as seqüências se apresentaram idênticas. As seqüências foram comparadas no banco de dados e identificadas como pertencendo à espécie *Klebsiella pneumoniae* (Enterobacteriaceae).

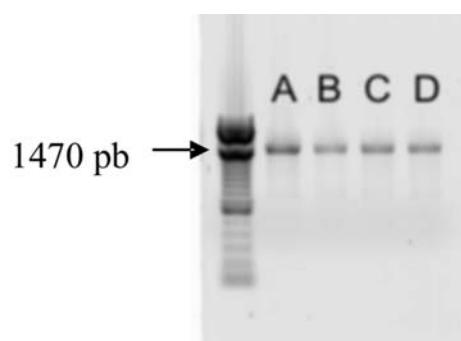


Figura 7.1. Gel de agarose (0,8%) com o produto da reação de PCR de bactérias culturáveis obtidas de ninfas e adultos de *Nezara viridula* com *primers* específicos para a região 16S DNA ribossomal. Banda A = bactéria isolada da superfície de ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar; B = bactéria isolada do estômago de ninfa de 4<sup>o</sup> ínstar; C = bactéria isolada do estômago de uma fêmea; e D = bactéria isolada do estômago de um macho.

Em muitos casos a associação entre microrganismos e insetos é casual e transitória, onde os microrganismos são, provavelmente, derivados do alimento do inseto (Douglas 1989). É possível que *K. pneumoniae* tenha sido adquirida pelo inseto através do alimento e tenha se

adaptado às condições do inseto criado em laboratório, não causando danos significativos à colônia de insetos e ajudando a prevenir o estabelecimento de microrganismos nocivos. Por exemplo, as colonizações de gafanhotos (livres de germes) por *Pantoea agglomerans* foram favorecidas pela presença de duas espécies indígenas, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *Enterococcus casseliflavus*. A simples inoculação com estes três isolados foi suficiente para estabelecer uma população que persistiu por várias semanas alimentados com dietas estéreis (Dillon & Dillon 2004).

O número de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) em meio LB, presentes no V1 a V3 foram, respectivamente,  $5,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC e  $1,0$  a  $1,5 \times 10^8$  UFC; em V4 (região dos cecos gástricos) esse número foi reduzido para  $0$  a  $3,0 \times 10^3$  UFC. Todas as colônias das bactérias apresentaram as mesmas características morfológicas, cor e tamanho.

Os segmentos de rDNA 16S amplificados diretamente dos tecidos do sistema digestório indicaram a presença de mais duas bactérias, *Enterococcus faecalis*, isolada diretamente do V1 e do V2 e V3, e uma bactéria (próxima a *Pantoea* sp.) presente apenas na região dos cecos gástricos – V4 (Tabela 7.1). A diversidade da microbiota deve-se à variação nas estruturas presentes e ao efeito do pH, à presença de enzimas digestivas e ao tipo de alimento ingerido (Dillon & Dillon 2004). O segmento do rDNA 16S seqüenciado da bactéria isolada da região dos cecos gástricos mostrou-se idêntico a outro segmento seqüenciado desta mesma região obtido de *N. viridula* no Havaí – EUA (número de acesso do Genbank AY679762 por R.P.P. Almeida & D. Rubinoff Universidade do Havaí comunicação pessoal, 2004). O que levanta a possibilidade da existência de uma bactéria simbiótica presente na região dos cecos gástricos.

Bactérias intestinais podem contribuir com a digestão de alimentos e produzir vitaminas essenciais, mantendo patógenos potenciais sob controle (Dillon & Dillon 2004). O sistema digestório de insetos é particularmente vulnerável ao ataque de patógenos, parasitas e organismos oportunistas ingeridos com o alimento (Lehane *et al.* 1997). A mais importante função da microbiota intestinal, pelo menos em humanos, é a habilidade de resistir à colonização de patógenos e prevenir infecções intestinais (Berg 1996).

Tabela 7.1 Número de acesso ao depósito das seqüências de rDNA 16S no Genbank das bactérias encontradas no trato digestório de *Nezara viridula*.

Espécie	Região do trato <sup>1</sup>	Número de acesso
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	V1 – V3	AY830394, AY830395, AY830396
<i>Enterococcus faecalis</i>	V1 – V3	AY830397, AY830398, AY830399, AY830400, AY830401, AY830402, AY830403, AY830404, AY830405, AY830406, AY830407, AY830408
Bactéria próxima <i>Pantoea</i> sp.	V4	AY830409, AY830410, AY830411, AY830412, AY830413, AY830414

<sup>1</sup> V = ventrículo.

Dos antibióticos testados, apenas kanamicina e neomicina apresentaram halo de inibição de crescimento bacteriano de 16,2 mm e 15,1 mm, respectivamente. Neomicina apresentou um halo de inibição menor e pouco intenso quando comparado a kanamicina, por isto esta foi escolhida para avaliação do seu efeito na biologia de ninfas de *N. viridula*.

A mortalidade em cada instar e no total foi similar tanto para as ninfas tratadas com kanamicina, como para as ninfas testemunha. A maior mortalidade ocorreu no 5º instar tanto para as ninfas tratadas com o antibiótico como para as ninfas sem tratamento. A mortalidade total (2º – 5º instar) foi 27,5 e 30,0% para ninfas tratadas com kanamicina e para as ninfas testemunha, respectivamente (Fig. 7.2).

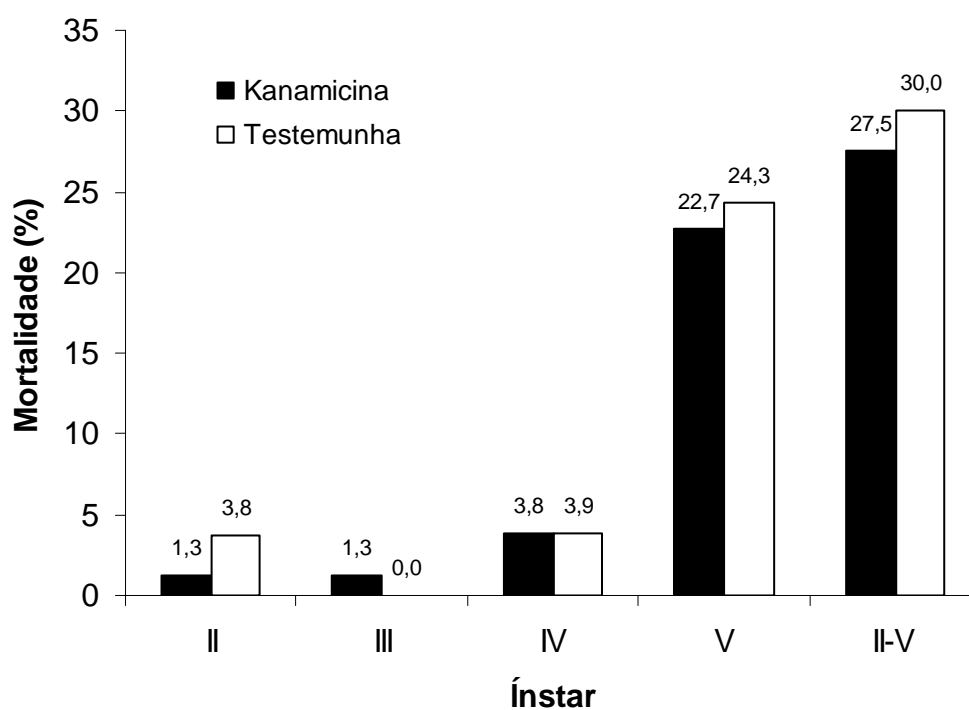


Figura 7.2. Mortalidade de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L), e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verde de feijão e mantidas em sala climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16h L: 8h E).

O tempo de desenvolvimento em cada instar e no total não diferiu significativamente entre as ninfas tratadas com o antibiótico kanamicina e as ninfas testemunha (Tabela 7.2). O tempo médio total foi de 23,8 dias e 24,0 dias para fêmeas e machos originados de ninfas tratadas com kanamicina, e 24,0 dias (fêmeas) e 23,1 dias (machos) para as ninfas testemunhas. Estes resultados sugerem que a kanamicina não interfere no tempo de desenvolvimento ninfal.

Tabela 7.2. Tempo de desenvolvimento (dias) (média  $\pm$  EP) de ninfas de *Nezara viridula* tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L), alimentadas com vagens verdes de feijão e mantidas em sala climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16 h L: 8h E) (número de ninfas entre parênteses).

Tratamentos	Instar <sup>1</sup>				Fêmea <sup>1</sup>	Macho <sup>1</sup>
	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>		
Kanamicina	6,1 $\pm$ 0,12 a (79)	4,3 $\pm$ 0,09 a (78)	5,6 $\pm$ 0,20 a (75)	8,4 $\pm$ 0,26 a (58)	23,8 $\pm$ 0,37 a (33)	24,0 $\pm$ 0,60 a (25)
Testemunha	5,8 $\pm$ 0,09 a (77)	4,4 $\pm$ 0,14 a (77)	5,8 $\pm$ 0,15 a (74)	8,0 $\pm$ 0,17 a (56)	24,0 $\pm$ 0,48 a (23)	23,1 $\pm$ 0,25 a (33)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

As fêmeas originadas de ninfas tratadas com kanamicina apresentaram peso médio no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta significativamente menor (121,8 mg), do que fêmeas das ninfas testemunha (136,1 mg) (Fig. 7.3). Para machos, os pesos no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta foram

estatisticamente iguais. Entre os sexos, as fêmeas foram significativamente mais pesadas que machos. Normalmente fêmeas de *N. viridula* são maiores e mais pesadas que os machos (Panizzi & Hirose 1995). É difícil prever os efeitos e o tipo de associação entre um microrganismo e outro, se a relação é mutualista, parasítica, comensal ou apenas transitória, devido à natureza dinâmica dessas relações (Van Borm *et al.* 2002).

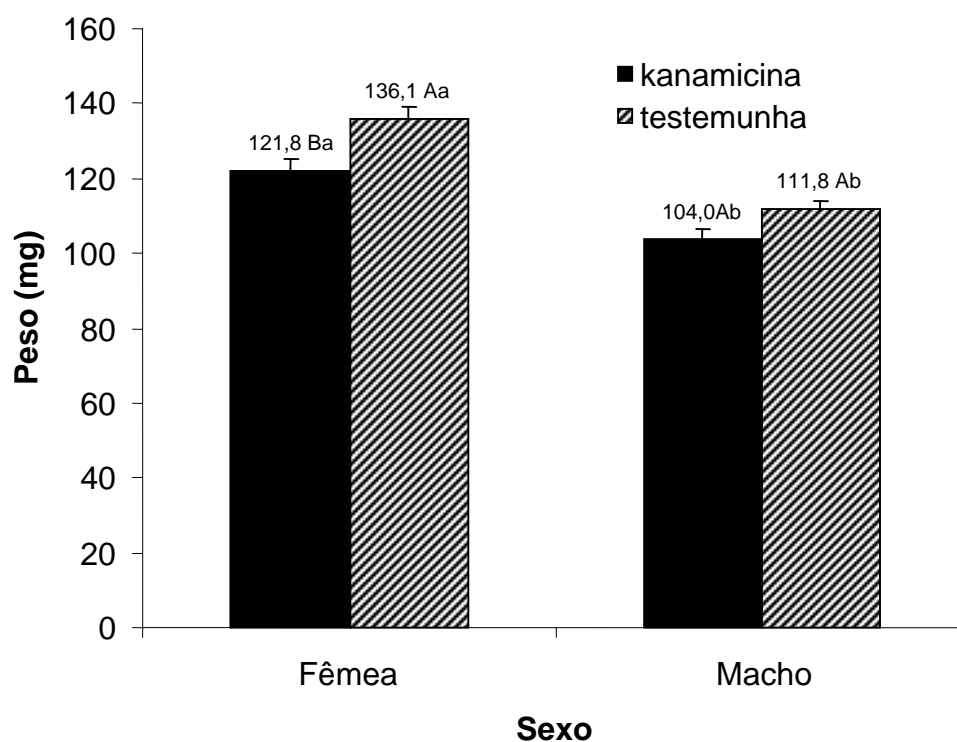


Figura 7.3. Peso (média  $\pm$  EP) no 1<sup>o</sup> dia de vida adulta de *Nezara viridula* oriundas de ninfas tratadas com o antibiótico kanamicina (60 mg/L) e não tratadas (testemunha), alimentadas com vagens verdes de feijão e mantidas em sala climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16 h L: 8h E). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos e minúscula entre sexos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Foi observada maior diversidade de bactérias provenientes do trato digestório de *N. viridula* coletados a campo, em diferentes meios de cultura. Nos meios LB e sangue (S) foram isoladas 10 colônias bacterianas ao acaso, sendo seis identificadas como Gram negativas, através da reação de Gram, e subculturada em meio MacKonkey (MC), meio específico para bactérias Gram negativas. Ao microscópio, as bactérias Gram positivas apresentaram a forma de cocos. Dos 10 insetos dissecados apenas três (duas fêmeas e um macho) apresentaram crescimento de colônias bacterianas no meio confirmatório para enterococos (CE). As colônias bacterianas isoladas em meio MC foram submetidas a testes bioquímicos e 14 colônias bacterianas foram identificadas como pertencente à família Enterobacteriaceae. Das 14 bactérias isoladas, quatro foram escolhidas ao acaso e utilizando o sistema API 20 E, e estas foram identificadas como *Serratia marcescens* (99% de probabilidade) ou *Serratia liquefaciens* (1% de probabilidade).

Foi possível observar uma maior variedade bacteriana nos insetos coletados a campo no Brasil, possivelmente devido ao maior contato com microrganismos presentes no ambiente. As bactérias do trato digestório de insetos do laboratório da USDA-ARS em Beltsville, cultivados em meio LB apresentaram uma uniformidade no tamanho e formato das colônias de bactérias; a mesma uniformidade entre as colônias das bactérias cultivadas em meio LB, não foi observada quando se semeou o conteúdo do trato digestório de insetos do campo no Brasil, apresentando colônias de bactérias com formas, cor e tamanho diferentes.

Existem outros aspectos da associação entre insetos e microrganismos que devem ser considerados; é importante reconhecer que muitas relações são formadas entre insetos e uma comunidade microbiana e não uma simples interação uma a uma. Outro aspecto é que

comunidades microbianas não são necessariamente constantes em composição ou funcionalidade através do curso da interação (Kaufman *et al.* 2000).

A presença de uma bactéria (identificada como próxima a *Pantoea* sp.) restrita à região dos cecos gástricos, sinaliza para de uma relação simbiótica entre o inseto e a bactéria. A natureza desta relação e sua importância ainda necessitam de estudos adicionais. Outro aspecto interessante foi à recuperação de *Klebsiella pneumoniae* em alta densidade em insetos criados em laboratório. Provavelmente a ocorrência de *K. pneumoniae* em grande população na colônia de laboratório se deva a uma contaminação do inseto pelo alimento, mas sua boa adaptação em colonizar insetos de laboratório sem causar prejuízo aparente à colônia merece um estudo mais detalhado. Especula-se que desta bactéria entérica não permitiria a proliferação de bactérias patogênicas no trato digestório. A sua adaptabilidade ao sistema digestório de *N. viridula* em condições de laboratório pode permitir sua utilização como uma bactéria marcada, buscando entender sua verdadeira função e como seria a distribuição das bactérias entéricas dentro do trato digestório do inseto.

#### **7.4. Literatura citada**

**Abe, Y., L. Mihiro & M. Tanakashi. 1995.** Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39: 109-115.

**Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

- Berenbaum, M.R. 1988.** Micro-organisms as mediators of intertrophic and intratrophic interactions. P. 91-123. In Barbosa, P. & D.K. Letourneau (eds.). Novel aspects of insect-plant interactions. Wiley, New York, NY. 362 p.
- Berg, R.D. 1996.** The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol. 4: 430-435.
- Bignell, D.E. 1984.** The arthropod gut as an environment for microorganisms. P. 205-228. In Anderson, J.M., A.D.M. Rayner & D.W.H. Walton (eds.). Invertebrate-microbial interactions. Cambridge University Press. New York, NY. 352 p.
- Brauman, A., J. Doré, P. Eggleton, D.E. Bignell, J.A. Breznak & M.D. Kane. 2001.** Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. FEMS Microb. Ecol. 35: 27-36.
- Campbell, B.C. 1989.** On the role of microbial symbionts in herbivorous insects, v. 1. P. 1-45. In Bernays, E.A. (ed.). Insect-plant interactions. CRC Press, Boca Raton, FL. 164 p.
- Cazemier, A.E., J.H.P. Hackstein, H.J.M. Op den Camp, J. Rosenberg & C. van der Drift. 1997.** Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. Microb. Ecol. 33: 189-197.
- Dillon, R.J. & V.M. Dillon. 2004.** The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu. Rev. Entomol. 49: 71-92.
- Douglas, A.E. 1989.** Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. 64: 409-434.

- Esikova, T.Z., Y.V. Temirov, S.L. Sokolov & Y.B. Alakhov. 2002.** Secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic *Bacillus* spp. strains VK2 and VK21. Appl. Biochem. Microbiol. 38: 226-231.
- Frederick, B.A. & A.J. Caesar. 2000.** Analysis of bacterial communities associated with insect biological control agents using molecular techniques. P. 261-267. In Spencer, N.R. (ed.). Proc. X Int. Symp. Biol. Contr. Weeds, Bozeman, Montana.
- Hackstein, J.H.P. & C.K. Stumm. 1994.** Methane production in terrestrial arthropods. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5441-5445.
- Javahery, M. 1994.** Development of eggs in some true bugs (Hemiptera: Heteroptera). Part I. Pentatomoidea. Can. Ent. 126: 141-433.
- Kiritani, K. 1964.** The effect of colony size upon the survival of larvae of the southern green stink bug, *Nezara viridula*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 8: 45-53.
- Lehane, M.J., D. Wu & S.M. Lehane. 1997.** Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect calcitrans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11502-11507.
- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1986.** Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern sting bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 15: 739-749.

- Kaufman, M.G., E.D. Walker, D.A. Odelson & M.J. Klug. 2000.** Microbial community ecology insect nutrition. *Am. Entomol.* 46:173-184.
- O'Neill, S., R. Giordano, A. Colbert, T. Karr & H. Robertson. 1992.** 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2699-2702.
- Panizzi, A.R. & E. Hirose. 1995.** Survival, reproduction and starvation resistance of adult southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) reared on sesame or soybean. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 661-665.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Economic importance of stink bug (Pentatomidae). P. 421-474. In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds). *Heteroptera of economic importance*. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.
- Rehner, S.A. & E.P. Buckley. 2003.** Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mol. Ecol. Notes* 3: 409-411.
- Sambrook, J. & D.M. Russell. 2001.** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 999 p.
- StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

- Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. Annu. Rev. Entomol. 34: 273-292.
- Steinhaus, E.A. 1967.** Insect microbiology. Hafner Publ. Co., New York. NY. 763 p.
- Toledo, M.R.F., C.F. Fontes & L.R. Trabulsi. 1982a.** MILi um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol. 13: 230-235.
- Toledo, M.R.F., C.F. Fontes & L.R. Trabulsi. 1982b.** EPM - modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, uréase e triptofano desaminase. Rev. Microbiol. 13: 309-315.
- Vries, E.J., G. Jacobs & J.A.J. Breeuwer. 2001.** Growth and transmission of gut bacteria in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. J. Inverteb. Pathol. 77: 129-137.
- Van Borm, S., J. Billen & J.J. Boomsma. 2002.** The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter. BMC Evol. Biol. 2: 9-20.
- Zchori-Fein, E. & J.K. Brown. 2002.** Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 95: 711-718.

## CAPÍTULO 8

### Ação tóxica de *Chromobacterium suttsuga* sobre adultos de *Nezara viridula* (L.)

#### 8.1. Introdução

*Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) é um dos percevejos mais estudados devido à sua importância econômica e sua ampla distribuição geográfica, atacando a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e várias outras culturas (Todd 1989, Panizzi *et al.* 2000).

*Chromobacterium violaceum*, uma  $\beta$ -proteobactéria Gram-negativa descrita pela primeira vez no término do século XIX, é encontrada em uma variedade de ecossistemas em regiões tropicais e subtropicais (Consortium 2003). Essa bactéria tem sido isolada ocasionalmente em insetos, mas não era considerada patogênica até recentemente (Bucher 1981). Em *Prostephanus truncatus* (Horn.) (Coleoptera: Bostrichidae) esta bactéria pode estar envolvida com a digestão de celulose (Vazquez-Arista *et al.* 1997) formando uma relação simbiótica com este inseto.

O pigmento violaceína produzido por espécies do gênero *Chromobacterium* possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Duran *et al.* 1983) e *Trypanosoma cruzi* Chagas (Duran *et al.* 1994). Essas bactérias também possuem um gene similar ao encontrado em *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* (Consortium 2003).

A *Chromobacterium suttsuga* apresentou toxidez a *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (Martin *et al.* 2004). Este estudo foi realizado com o objetivo de

verificar a possível ação tóxica de *C. suttsuga* sobre *N. viridula* e possível efeito inibitório sobre *Klebsiella pneumoniae* (Enterobacteriaceae), bactéria encontrada em alta densidade em insetos provenientes da criação mantida no “Chemicals Affecting Insect Behavior Laboratory” no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA-ARS) em Beltsville, MD, EUA, onde foi realizada esta pesquisa.

## **8.2. Material e métodos**

### **8.2.1. Criação de insetos**

Adultos e ninfas do percevejo *N. viridula* foram obtidos da criação mantida no “Chemicals Affecting Insect Behavior Laboratory”. Os insetos foram criados em potes plásticos transparentes (40 x 30 cm de diâmetro) forrados com papel filtro, e mantidos em sala climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  UR, fotoperíodo 16 h L: 8h E). Em cada pote foi colocado um tubo de vidro (1,5 x 10,5 cm) com água destilada fechado com algodão para manutenção da umidade. Os insetos foram alimentados com vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e semente de girassol (*Helianthus annuus* L.). A cada dois dias, o alimento foi trocado e os ovos coletados para continuidade da criação.

### **8.2.2. Bactérias**

Foi utilizada a cepa PRAA4-1 de *Chromobacterium suttsuga*, isolada originalmente de solo da floresta de Maryland (EUA) em meio Agar Luria Bertani (LB) em 2000 (Martin 2002).

### **8.2.3. Preparo da *C. suttsuga* cepa PRAA4-1**

A cepa PRAA4-1 de *C. suttsuga* foi subculturada semanalmente em LB a 25°C por 2 a 5 dias, quando foram coletadas bactérias das placas de meio em 15 mL de água destilada e esterilizada. As suspensões de células foram utilizadas diretamente para os bioensaios. Culturas completas foram autoclavadas a 121°C por 10 minutos. Células foram removidas da cultura por centrifugação a 15000 rpm/30 minutos ou filtradas em filtro Millipore 0,45 µm.

### **8.2.4. Bioensaio**

Adultos de *N. viridula* com uma semana de vida adulta, provenientes da criação, foram privados de alimento e água por 48 horas antes do início do bioensaio. Após este período, os insetos foram separados por sexo e colocados em grupos de cinco, em gaiolas plásticas (500 mL) transparentes forradas com papel toalha. As gaiolas foram separadas em grupos de oito, sendo 4 gaiolas - machos e 4 gaiolas - fêmeas perfazendo 40 insetos/tratamento. Em cada gaiola foi colocado um frasco de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 0,5 mL de água destilada

e 0,5 mL de suspensão bacteriana de *C. suttsuga* cepa PRAA4-1. Para os insetos testemunha foi fornecida água destilada. Os frascos contendo os preparados foram substituídos após 72 horas. Os insetos foram observados diariamente por um período de uma semana e os mortos retirados.

#### **8.2.5. Recuperação de *C. suttsuga* de insetos mortos após ingestão da suspensão de células**

Insetos mortos (n = 11) provenientes do tratamento com suspensão completa de bactérias (cinco dias de cultura) foram coletados no período máximo de 12 horas após a morte, esterilizados externamente com hipoclorito de sódio (2%) por 2 minutos, perfurados com o auxílio de uma alça estéril e parte do sistema digestório (V1-V4) espalhado em placas de Petri contendo meio de cultura Luria Bertani (LB), por técnica de esgotamento, de modo a obter colônias isoladas de bactérias. As placas foram mantidas em incubadora a  $25\pm 1^\circ$  C e avaliadas após 48 hs.

#### **8.2.6. Análise dos dados**

Os dados de mortalidade foram submetidos ao teste do qui-quadrado, utilizando o programa para análise de dados Statistica versão 6.0 (StatSoft 2001).

### 8.3. Resultados e discussão

Para suspensões de células viáveis de *C. suttsuga*, a mortalidade para ambos os sexos de *N. viridula* normalmente se iniciou após 4 dias de exposição e alcançou 100% após sete dias. Os machos, de modo geral, morreram mais rapidamente que as fêmeas. Os insetos testemunha apresentaram mortalidade após sete dias, que variou de 5 a 27,5% (Fig. 8.1).

Quando a suspensão de *C. suttsuga* foi centrifugada, o sobrenadante mostrou a mesma atividade que a suspensão com células viáveis, causando mortalidade, que chegou a 100% para ambos os sexos após sete dias. A mesma curva de mortalidade foi observada a suspensão de células foi autoclavada (121°C – 10 min.), mas a mortalidade total para fêmeas após sete dias foi de 80% tanto para a suspensão autoclavada como para a suspensão com células viáveis. A mortalidade natural da testemunha após sete dias foi de 20%. A suspensão filtrada em Millipore 0,45 µm também apresentou mortalidade para fêmeas que chegou há 100% após sete dias tanto para a cultura completa como para o filtrado. Estes resultados sugerem que não há necessidade de células bacterianas vivas para promover a mortalidade de adultos de *N. viridula*, possivelmente devido à presença de compostos produzidos pelo metabolismo da bactéria, que de alguma forma têm ação tóxica sobre o inseto.

Em todos os 11 insetos mortos cujos conteúdos internos foram colocados em meio de cultura LB, não foi possível recuperar nenhuma colônia de *C. suttsuga*. Estes resultados sugerem que esta bactéria não é capaz de se reproduzir nas carcaças dos insetos.

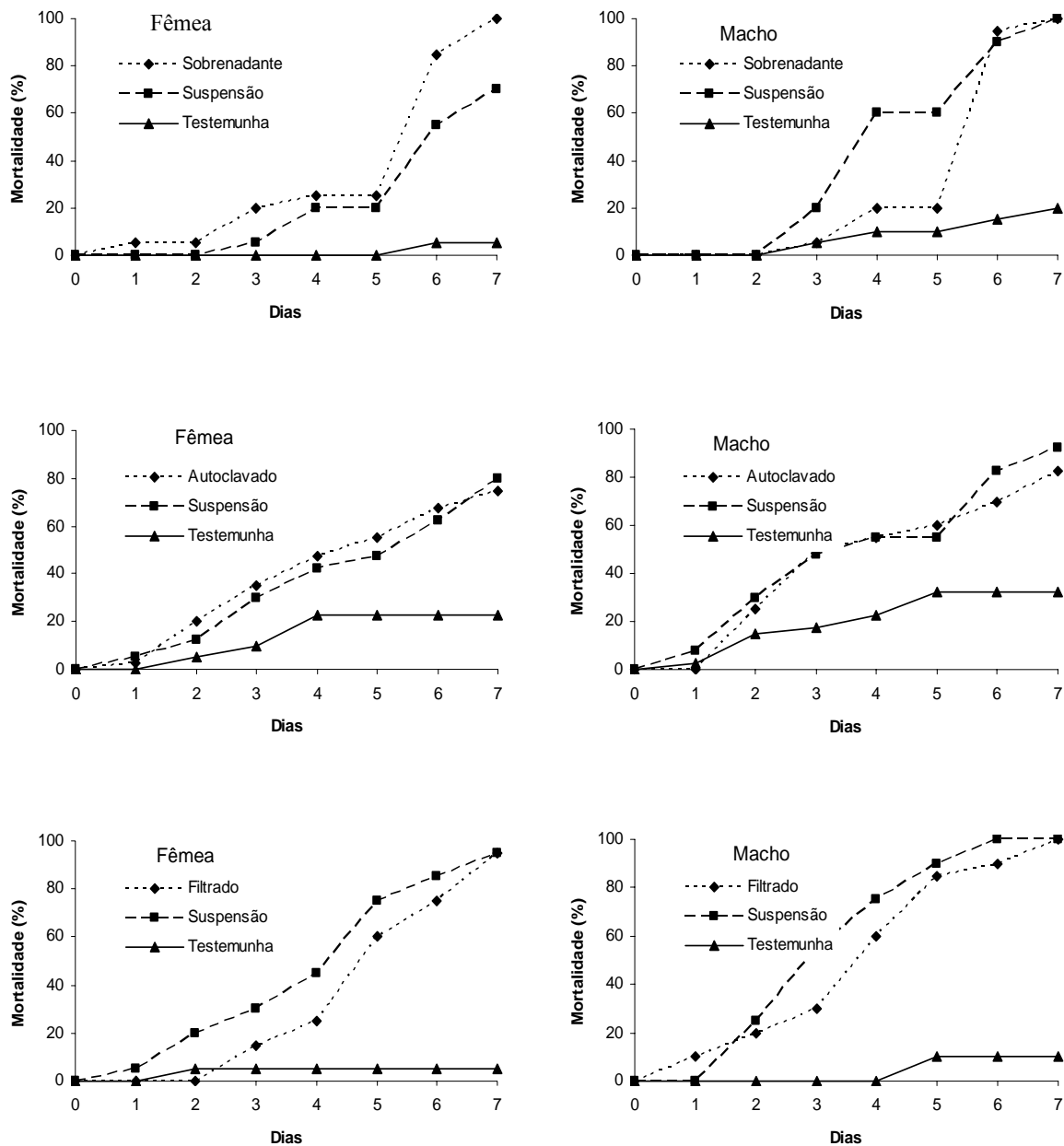


Figura 8.1. Mortalidade de adultos de *Nezara viridula* submetidos a diferentes suspensões de *Chromobacterium suttsuga* cepa PRAA4-1. Suspensão = colônias coletadas em placas de meio em 15 mL de água destilada e esterilizada; Sobrenadante = suspensão centrifugada a 15000 rpm/30 minutos; Autoclavado = suspensão autoclavada a 121°C/10 minutos; e Filtrado = suspensão filtrada em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m.

A aplicação prática desta bactéria no controle de *N. viridula* ainda necessita de maiores estudos. Por exemplo, *N. viridula*, necessitaria ingerir a suspensão, o que precisaria ser viabilizado em condições de campo. Entretanto, o estudo das interações entre microrganismos e insetos pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de controle (Durvasula *et al.* 1999). Além disso, deve-se verificar a segurança do uso dessa bactéria.

#### **8.4. Literatura citada**

**Bucher, G.E. 1981.** Identification of bacteria found in insects. p. 7-33. In Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, New York, 949 p.

**Consortium, B.N.G.P. 2003.** The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 11660-11665.

**Duran, N., S. Erazo & V. Campos. 1983.** Bacterial chemistry II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. Anais Acad. Bras. Ciências 55: 231-234.

**Duran, N., R.V. Antonio, M. Haun & R.A. Pilli. 1994.** Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 685-690.

**Durvasula, R.V., A. Kroger, M. Goodwin, A. Panackal, O. Kruglov, J. Taneja, A. Gumbs, F.F. Richards, C.B. Beard, & C. Cordon-Rosales. 1999.** Strategy for

introduction of foreign genes into field populations of Chagas disease vectors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 937-943.

**Martin, P.A.W. 2002.** An *in vitro* inhibition test that predicts toxicity of bacterial pathogen combinations in the Colorado potato beetle. *Bio. Sci. Tech.* 12: 643-647.

**Martin, P.A.W., M. Blackburn & A.S. Shropshire. 2004.** Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 774-780.

**Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Economic importance of stink bug (Pentatomidae). P. 421-474. In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds). *Heteroptera of economic importance*. CRC Press, Boca Raton, FL. 856 p.

**StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

**Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.

**Vazquez-Arista, M., R.H. Smith, V. Olalde-Portugal, R.E. Hinojosa, R. Hernandez-Delgadillo & A. Blanco-Labra. 1997.** Cellulolytic bacteria in the digestive system of *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1371-1376.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos inúmeros estudos realizados com *Nezara viridula* (L.), ainda há deficiência no entendimento das relações deste inseto e seus possíveis microrganismos simbiotes.

A esterilização da superfície dos ovos de *N. viridula*, tanto por métodos físicos quanto químicos, não mostrou grandes diferenças na biologia de ninfas deste inseto. Isto pode ser devido à inexistência de bactérias essenciais sobre a superfície dos ovos, ou a ineficiência na eliminação desses microrganismos. Como as metodologias utilizadas neste estudo só permitem mensurar a eliminação de bactérias culturáveis, não se pode garantir a eliminação completa das bactérias. Além disto, à superfície dos ovos é repleta de irregularidades e processos, que poderiam servir de abrigo aos microrganismos, não permitindo a completa eliminação dos simbiotes. Se esta relação entre o microrganismo e o inseto fosse essencial ao desenvolvimento do inseto, a evolução seria no sentido de proteger ao máximo estas bactérias para garantir a contaminação e, conseqüentemente, a sobrevivência do inseto.

Existe uma influência negativa no desenvolvimento de *N. viridula*, quando este se desenvolve isoladamente, ou quando as ninfas de 1<sup>o</sup> instar são removidas de seu córion. Isto demonstra o efeito de estresse durante a fase inicial de desenvolvimento e se estende até o início da fase adulta. Se isto impediu o contato com simbiotes essenciais, ainda não se pode afirmar categoricamente.

A umidade é um fator abiótico importante para o desenvolvimento e sobrevivência das ninfas de 1<sup>o</sup> instar. Este estudo permitiu avaliar o efeito da umidade no comportamento das ninfas de 1<sup>o</sup> instar a procura de condições ambientes mais favoráveis para seu desenvolvimento. As ninfas não se alimentam no 1<sup>o</sup> instar e permanecem, por pelo menos, 20 horas sobre as posturas após a emergência, mesmo em condições não ideais para o seu

desenvolvimento. Este comportamento pode ser devido à necessidade da contaminação por microrganismos.

Antibióticos de amplo espectro disponibilizados durante o desenvolvimento ninfal de *N. viridula* mostraram efeitos positivos e negativos na biologia do inseto. Ainda há a necessidade de uma melhor compreensão do real funcionamento destes antimicrobianos na fisiologia do inseto e de como eles afetam as bactérias presentes em *N. viridula*. A estreptomicina poderia ser utilizada na recepção de insetos provenientes do campo, antes da introdução em sistemas de criação massal, uma vez que mostrou efeitos positivos no desenvolvimento ninfal.

A descrição do sistema digestório de *N. viridula*, através de fotografias digitais, pode facilitar estudos subseqüentes das bactérias do trato digestório. A diferença no pH nas diferentes partes do sistema digestório poderia ser um fator que influenciaria a densidade e a variabilidade da microbiota do trato digestório.

Insetos nas condições de laboratório apresentaram uma menor variedade de microbiota, em comparação a insetos vindos do campo. A presença de uma bactéria (identificada como próxima a *Pantoea* sp.) restrita à região dos cecos gástricos, e a identificação desta mesma bactéria em colônia de *N. viridula* no Havaí por R.P.P. Almeida & D. Rubinoff (comunicação pessoal), sinaliza para de uma relação simbiótica entre o inseto e a bactéria. A natureza desta relação e sua importância ainda necessitam de estudos adicionais. A possibilidade de outros pentatomídeos apresentarem uma bactéria exclusiva na região dos cecos gástricos pode abrir uma nova fronteira de estudos com este grupo de insetos, e isto só é possível com as novas técnicas de biologia molecular, que permitem a recuperação de DNA bacteriano sem a necessidade de desenvolvimento de meios de culturas. Outro aspecto interessante foi à recuperação de *Klebsiella pneumoniae* em alta densidade em insetos criados em laboratório.

Especula-se que a função desta bactéria entérica seria não permitir o desenvolvimento de bactérias patogênicas. A sua adaptabilidade ao sistema digestório de *N. viridula* em condições de laboratório pode permitir sua utilização como uma bactéria marcada, buscando entender sua verdadeira função e como seria a distribuição das bactérias entéricas dentro do trato digestório do inseto.

*Chromobacterium suttsuga* mostrou-se tóxica a adultos de *N. viridula*. No entanto a aplicação prática desta bactéria para o controle deste inseto é extremamente difícil, devido à necessidade de sua ingestão. A melhor compreensão do modo de ação das toxinas produzidas por esta bactéria e seu possível efeito na flora intestinal do inseto pode servir de base para diversos estudos.