

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI UFVJM**

Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal

Tarcisio Tomás Cabral de Sousa

**DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA
DIGESTÓRIO DE *Thaumastocoris peregrinus*.**

DIAMANTINA-MG

2016

Tarcisio Tomás Cabral de Sousa

**DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA
DIGESTÓRIO DE *Thaumastocoris peregrinus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência Florestal da
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia

DIAMANTINA-MG

2016

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S725d

Sousa, Tarcisio Tomás Cabral de

Detecção de endobactéria e morfologia do sistema digestório de
Thaumastocoris peregrinus / Tarcisio Tomás Cabral de Sousa. –
Diamantina, 2016.

54 p. : il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência
Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, 2015.

1. Percevejo Bronzeado. 2. Histologia. 3. PCR-RFLP.
4. Micro-organismo. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 632.7

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tarcisio Tomás Cabral de Sousa

**DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA
DIGESTÓRIO DE *Thaumastocoris peregrinus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência Florestal da
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre

Orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia

APROVADO EM 18/08/2016

Dra. Conceição Aparecida dos Santos

Departamento de Ciências Biológicas-FCBS/UFVJM/

Dr. Sebastião Loureço de Assis Junior

Departamento de Engenharia Florestal-FCA/UFVJM/

Dr. Marcelo Luiz de Laia

Presidente da banca- FCA/UFVJM

DIAMANTINA-MG

2016

Aos meus avós: Santo Tomaz, Ludugeria Neves e Rita Cabral (*in memorian*).

Tia Laura (in memorian)

Pela educação que me deram, e pelo homem que me tornei.

DEDICO

“Quando se nasce pobre, ser estudioso é o maior ato de rebeldia contra o sistema” (desconhecido)

Aos meus pais, José Anchieta e Maria José. Aos meus irmãos Tomás de Aquino e Tatianne Cabral.

Meu Tio José Tomaz e Penha Neves.

Vocês fizeram toda a diferença sem vocês não teria conseguido!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela proteção e ter me dado fé e coragem pra continuar essa caminhada.

A todos que me acolheram aqui em Diamantina –MG. Pois não é nada fácil um matuto lá do Interior da PB lá de Coxixola a menor cidade do estado com 1771 habitantes, a mais 1800 km de distância, de família pobre, sem conhecer nada nem ninguém, sair cortando o Brasil pra estudar. A acolhida de vocês mineiros foi o que me fez persistir e dizer vou continuar mesmo diante as dificuldades e a distâncias da família.

Aos meus avós que me ajudaram muito, infelizmente não estão mais entre nós pra ver mais essa vitória alcançada, agradeço pelo apoio, confiança, aconchego, pelos conselhos e puxões de orelhas, hoje só quem sou graças a vocês.

Aos meus pais, José Anchieta e Maria José por ter me auxiliado nessa caminhada, que não mediram esforços para que eu me tornasse o que sou hoje.

Agradeço aos meus irmãos, Tomás e Tatianne, que me ajudaram, incentivaram e aconselharam a seguir sem olhar pra trás.

A toda a minha família, em especial a meu Tio José Tomaz e sua esposa Penha que tenho como se fosse meus 2º pais, do qual são minha grande fonte de inspiração.

Aos amigos que aqui encontrei Any Pinto, Leo Palhares, Marcos Murta, Luana Martins, Kamilla Carvalho que foram muitas vezes, meus braços e minhas pernas, me ensinado e aconselhando.

A Dona Chiquinha e Dona Andreлина grande força no acolhimento e são minhas família aqui em Diamantina juntamente com toda a família de Dona Andreлина que me adotaram como se fosse da família.

A Samuel Giordani técnico do laboratório de Histologia a qual agradeço imensamente pela ajuda e a Prof. Dra. Conceição Aparecida que não mediram esforços para que esse trabalho pode-se acontecer.

Ao orientador Marcelo Laia pela oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos e confiança, seus ensinamentos acrescentaram e muito para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À banca examinadora, pela contribuição ao trabalho e disponibilidade.

A toda equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal, em especial ao Any, Ariadne e Luana, pela contribuição durante o desenvolvimento da pesquisa.

As minhas orientadoras da Graduação Adriana Vital e Raunira Costa pela oportunidade e confiança que depositaram em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e a UFVJM pela oportunidade.

A CAPES, FAPEMIG, APERAM bioenergia, VERACEL E GERDAU pelo auxílio.

Por fim a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para concretização desta conquista.

A todos sou eternamente grato.

RESUMO

SOUSA, Tarcisio Tomás Cabral de: DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Thaumastocoris peregrinus* 2016. 56 p. (Dissertação–Mestrado em Ciências Florestais)–Universidade dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

A produção de eucalipto vem sofrendo grandes prejuízos com o ataque de uma nova praga, o *Thaumastocoris peregrinus*, seu nome popular é percevejo bronzeado devido seu hábito alimentar, succivoro. Essa alimentação causa danos diretos às árvores, deixando as folhas com aspecto bronzeado, diminuindo a fotossíntese, chegando a secar e cair, o que pode culminar com a morte da planta. Poucos são os estudos relacionados a essa praga, não existindo um controle eficaz. Com o intuito de conhecer sobre a morfologia do sistema digestório, bem como a interação deste com micro-organismos e visando fornecer informações ao controle dessa praga, foram realizadas a histologia do sistema digestório e sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos de micro-organismos internos ao inseto. A histologia permitiu observar que o percevejo não tem os cecos gástricos, parte do intestino médio que armazena micro-organismos que auxiliam na digestão dos alimentos e que é possuidor de um par de glândulas salivares que são compostas de dois lóbulos cada. As análises moleculares possibilitaram verificar que, possivelmente, existem micro-organismos presentes no sistema digestório vivendo em associação com o mesmo.

PALAVRAS-CHAVE: Percevejo Bronzeado. Histologia. PCR-RFLP. Micro-organismo.

ABSTRACT

SOUSA, Tarcisio Tomás Cabral: DETECTION ENDOBACTÉRIA AND MORPHOLOGY OF THE DIGESTIVE SYSTEM *Thaumastocoris peregrinus* 2016. 56 p. (Dissertation - Mestrado in Forest Science) - University of the Valley of Jequitinhonha and Mucuri, Diamantina, 2016.

The Eucalyptus production has suffered great losses from the attack of a new pest, the *Thaumastocoris peregrinus*, popularly known as bronze bug to cause silvering on eucalyptus leaves. This symptom occurs because of your eating habits, because it sucks the sap of its host. This feeding causes direct damage to trees, because its leaves stay with tanned look, reducing photosynthesis, reaching dry and fall off, which can lead to the death of the plant. There are few studies relating to this pest, with no effective control. With intuited to know about the digestive morphology and the interaction of this with micro-organisms, targeting subsidies to the control of this pest were performed histology of the digestive system and sequencing of DNA fragments obtained from internal micro-organisms to the insect. The histology allowed to observe that the bronze bug does not have the gastric cecum of the midgut that stores micro-organism to assist in digestion of food, and their digestive system is divided into three parts, foregut, middle and posterior, which is possessor of a pair of salivary glands that are composed of two lobes each. Molecular analysis enabled us to verify that, possibly, there are micro-organisms present in the digestive system living in association with the same.

Keywords: bronze bug. Histology. PCR-RFLP. Microorganism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Criação massal em laboratório de *T. peregrinus* em buquês de eucalipto.....24
- Figura 2** - Meio de cultura seletivo para verificar crescimento de bactéria transformada, após a clonagem, colônias brancas indica a presença do plasmídeo e azuis indicam a não transformação da bactéria.28
- Figura 3** - Secções histológicas das glândulas salivares de *Thaumastocoris peregrinus*, (ls) líquido granular (Secreção salivar), (ep). Tecido epitelial, (c). Ducto salivar (Canal que liga os dois lóbulos ao esôfago), (11) primeiro lóbulo, (12) segundo lóbulo. Barra=0,1mm.....31
- Figura 4** - Desenho esquemático de uma glândula de percevejo bronzeado com destaque para os dois lóbulos, anterior e posterior, e o ducto salivar. Adaptado de Azevedo et al., 2007.32
- Figura 5** - Desenho esquemático do intestino de inseto. F Faringe, Gs Glândulas salivar, Es esôfago, V Ventrículo, I Íleo, TM Túbulos de Malpighi, R-Reto e A-Ânus.....33
- Figura 6** - Secção histologia longitudinal do corpo de *T. peregrinus*. (ia) intestino anterior, (im) intestino médio, (ip) intestino posterior, (rt) reto e (an) ânus. Barra= 1 mm33
- Figura 7** - Secção histológica de *Thaumastocoris peregrinus*. (pv). Proventrículo, (ia) Intestino anterior, Secção histológica (B) (im) Intestino médio , (tm). Túbulos de Malpighi, Secção histológica (C) (ip) Intestino posterior.34
- Figura 8** - Imagem de gel de agarose à 0,8% demonstrando: DNA Total = padrão da amostra de DNA genômico extraído a partir de espécimes de *T. Peregrinus*, DNA Diluído = padrão da amostra de DNA genômico extraído a partir de espécimes de *T. Peregrinus* diluída na proporção de 1:25, PCR A e B = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores 63f/1087r, PCR C e D = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores 63f/1494r, PCR E e F = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores Ar3f/Ar927r, M = Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific).35
- Figura 9** - Imagem de gel de agarose após o produto da PCR com os iniciadores 63f/1087r serem clivados com enzimas de restrição. A – enzima de restrição Eco RI. B – enzima de restrição Bam HI (7 e 8) e HindIII (9 e 10). M = marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Thermoscientific Inc).....36
- Figura 10** - Resultado da análise de contaminação da sequência alvo com sequência do vetor de clonagem. A parte na cor vermelha indica a contaminação. A - sequência ML1-M13F. B - sequência ML2-M13F. C - sequência ML5-M13F.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na reação da PCR para detectar a micro-organismo no <i>T. peregrinus</i>	27
Tabela 2 - Enzimas de restrição utilizadas na clivagem (PCR-RFLP).....	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Sequência DNA da amostra ML1-M13F	49
Anexo B - Sequência DNA da amostra ML2-M13F	49
Anexo C - Sequência DNA da amostra ML3-M13F	49
Anexo D - Sequência DNA da amostra ML4-M13F	49
Anexo E - Sequência DNA da amostra ML5-M13F.....	50
Anexo F - Comparação da sequência ML2-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastN.....	51
Anexo G - Comparação da sequência ML3-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastX	52
Anexo H - Comparação da sequência ML5-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastN	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Eucalipto.....	17
2.2 Percevejo Bronzeado.....	17
2.3 Interação inseto e micro-organismos.....	19
2.4 Técnicas utilizadas para detecção de micro-organismo em insetos.....	22
2.5 Histologia do sistema digestório de Inseto.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Criação do inseto.....	24
3.6 Histologia.....	25
3.3 Extração de DNA de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	25
3.4 Reação em cadeia da polimerase - PCR.....	26
3.5 Análise de polimorfismo por meio de PCR-RFLP.....	22
3.5.1 Clonagem.....	27
3.5.2 Extração do DNA plasmidial.....	28
3.5.3 Sequenciamento.....	29
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Histologia.....	31
4.1.0 Glândulas Salivares.....	31
4.1.1 Intestino.....	32
4.2 Análise molecular de DNA extraído de espécimes de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	35
4.2.1 Extração de DNA e análises PCR.....	35
4.2.2 Análise pela técnica PCR-RFLP.....	36
4.2.3 Análise dos produtos de DNA amplificados por sequenciamento automático de DNA.....	36
5. CONCLUSÕES.....	40

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado como o país com maior área plantada de florestas do mundo e esta vem crescendo a cada dia. O aumento na produtividade se deve a várias ações, tais como bom manejo silvicultural, melhoramento genético das espécies florestais utilizadas e clima favorável (IBÁ, 2015).

O eucalipto foi introduzido no Brasil em 1904, para fins comerciais, pelo Sr. Edmundo Navarro de Andrade, então funcionário da Companhia Paulista de Estrada de Ferro. Tinha-se como a principal finalidade servir de matéria-prima para a produção de lenha e para dormentes a ser utilizados na construção da estrada de ferro (VENTURIN et al., 2014).

A partir da sua introdução no Brasil o eucalipto tornou-se uma espécie importante para a economia do País (ROCHA; SANTOS, 2007). Suas principais utilidades são matéria-prima para a produção de celulose e papel, óleo essencial, madeira para serraria, movelaria e para energia (carvão, lenha, etc) e tem grande importância para meio ambiente, já que o seu cultivo auxilia na fixação de carbono, disponibiliza alimento para abelhas produtoras de mel e ainda uma alternativa para a recuperação de áreas degradadas.

Em 2015, foram plantados mais de 5,56 milhões de hectares de eucalipto em todo o território brasileiro (IBÁ, 2015).

Em que pese a sua importância e grande potencial de produtividade, inúmeras são as perdas causadas por fatores abióticos e bióticos na eucaliptocultura. Esses últimos podem ser causados por distúrbios fisiológicos ou ataque de pragas e, ou doenças, acarretando grandes perdas econômicas para o produtor.

A pouco mais de sete anos a eucaliptocultura brasileira vem sofrendo danos severos ocasionados pelo ataque de uma nova praga, detectada em 2008 no estado do Rio Grande do Sul, conhecida popularmente como percevejo bronzeado (*Thamaustocoris peregrinus*) (Heteroptera-Thaumastocoridae). Esse inseto é um fitófago succívoro que se alimenta de fluídos de seiva presentes nas folhas e galhos finos de eucalipto, causando grandes prejuízos ao setor produtivo. Devido o seu hábito alimentar ser sugador, ele pode ocasionar uma redução da área fotossintética da planta, causando um aspecto amarelado passando a arroxeadado, semelhante a um bronzeamento, podendo levar à morte da mesma (WILCKEN et al., 2010).

O sistema digestório permite que partículas alimentares possam ser quebradas em partículas menores possibilitando, assim, sua absorção. Nos insetos, o intestino é responsável pela digestão, absorção dos nutrientes, formação e eliminação das fezes. Há, ainda, as

glândulas salivares que estão relacionadas, diretamente, com o processo alimentar, são responsáveis pela produção de enzimas digestivas encontradas no fluido salivar e no próprio intestino dos insetos (LACOMBE, 1999; TERRA; FERREIRA, 2009). Muitas dessas enzimas são requeridas para a digestão e para a inibição de compostos tóxicos. Logo, ao inibir a ação de uma ou mais dessas enzimas, pode-se chegar ao controle da praga de maneira indireta, como, por exemplo, pela ação de um composto tóxico produzido pela planta.

Apesar de os insetos serem os organismos que mais se desenvolveram, tiveram maior sucesso sobre o planeta e se alimentaram de uma grande variedade de alimentos, eles não conseguem digerir todo material alimentar devido muitas dessas dietas são de difícil digestão. Assim, em alguns casos, quando as dietas possuem pouco teor nutricional ou possuem algum fator adverso, não raro os insetos possuem simbioses que os auxiliam nestas deficiências (TAMAS et al., 2002; ISHIKAWA, 2003; HIROSE; PANIZZI, 2009).

De acordo com Hirose e Panizzi (2009), existem inúmeros micro-organismos envolvidos no processo alimentar dos insetos, devido, principalmente, muitas das dietas alimentares serem de difícil digestão, em grande parte devido à presença de moléculas complexas na sua composição (BREZNAK; BRUNE, 1994; DILLON, DILLON, 2004).

Micro-organismos normalmente são encontrados em insetos, tanto internos como externamente, podendo manter uma relação harmônica ou desarmônica em relação ao hospedeiro (ALVES, 1998). Insetos vivem da melhor forma em interação com micro-organismos no seu interior. Esses desenvolvem internamente papel na regulação do metabolismo, auxilia na digestão, proporcionando o máximo de extração de energia, além de proteger seus hospedeiros ao ataque de micro-organismos que possam vir a prejudica-los (YUN et al., 2014).

Os estudos simbióticos vêm obtendo, cada vez, mais avanço, especialmente após o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram o entendimento dessa interação de modo simples, rápido e com baixo custo (PANIZZI; PARRA, 2009).

Conhecer os possíveis micro-organismos que estão associados ao percevejo bronzeado é de extrema importância para aumentar as possibilidades de execução de trabalhos moleculares relacionados com o controle dessa praga. A identificação dos micro-organismos encontrados aparelho digestório poderá possibilitar o desenvolvimento de estratégias de controle do percevejo bronzeado. Se houver um simbiote imprescindível à sobrevivência do inseto, a ação sobre esse micro-organismo, indiretamente, poderá controlar a praga. Por isso, a importância de saber se há e quais são os micro-organismos que vivem associados ao percevejo bronzeado.

Portanto, o estudo da histologia do sistema digestório e a identificação de simbioses do inseto praga são de grande importância para subsidiar estratégias de controle populacional de *T. peregrinus*.

Com essas premissas, objetivou-se realizar a histologia do sistema digestório de percevejo bronzeado e verificar se existem micro-organismos interagindo no seu sistema digestório.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EUCALIPTO

O Brasil vem se destacando no mercado florestal com sua produção de eucalipto equivalente a 5.558.653 ha de área plantadas. De toda produção de madeira em nosso país, 91% são oriundos de floresta plantada (IBÁ, 2015).

Pertence à família Myrtaceae o eucalipto é originário da Oceania e possui cerca de 700 espécies descritas. Atualmente, constituem árvores ou arbustos pertencentes a os gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora* (Parra-O. et al., 2009; Wilson et al., 2005). No Brasil, foi plantado pela primeira vez por Dom Pedro I, em 1825, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (VENTURIN et al., 2014). No entanto sua plantação para fins comerciais foi iniciada por Edmundo Navarro de Andrade no século XX, mais precisamente, no ano de 1904 (MARTINI, 2004; DIAS; SIMONELLI, 2013).

O eucalipto é uma essência florestal de grande importância econômica para diversos países, como em plantios para fins energéticos, visando produção de carvão vegetal e lenha. Outra utilidade é o suprimento de madeira para serraria, movelaria e para a construção civil. De suas folhas, também, pode ser extraído óleo essencial para consumo em indústrias farmacêuticas e de cosméticos. No entanto, o setor de produção de celulose de fibra curta é que mais têm importância quanto ao seu uso, sendo o Brasil o maior produtor. Além disso, o eucalipto têm outras finalidades, como a utilização das suas flores como pasto apícola, onde as abelhas coletam o pólen e o utiliza na produção de mel, na fixação de carbono, que pode inibir o efeito estufa, e na recuperação de áreas degradadas. Portanto, são inúmeros os produtos aproveitáveis a partir do plantio de eucalipto, mostrando a grande importância socioeconômica e ambiental que essa planta pode proporcionar. Por fim, o cultivo dessa árvore gera grande quantidade de empregos diretos e indiretos e atua favoravelmente ao equilíbrio da balança comercial (BRACELPA, 2010; IBA, 2015).

2.2 PERCEVEJO BRONZEADO

Os plantios na área florestal são semelhantes a qualquer outra cultura. Sofrem estresse causado por fatores abióticos e bióticos como pragas e doenças (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003), comprometendo a produção e elevando os custos, gerando grandes perdas financeiras e significativas para o setor florestal. Esse setor vem sofrendo com o ataque de novas pragas, como o percevejo bronzeado (*Thamaustocoris peregrinus*/ Hemiptera:

Thaumastocoridae) (WILCKEN, 2008). Este inseto começou a ter grande importância econômica em 2002, após infestação de *Eucalyptus* na cidade de Sydney (NOACK; ROSE, 2007; SOUZA, 2012) e, de lá para cá, vem causando grandes prejuízos econômicos para os produtores de eucaliptos no Brasil e em várias outras partes do mundo.

No Brasil ele foi encontrado pela primeira vez em 2008, pela primeira vez, em plantações de eucalipto em São Francisco de Assis-RS. Rapidamente esse inseto praga se disseminou, pelos principais estados produtores do país. Em São Paulo ele foi encontrado nas proximidades dos aeroportos internacionais de Viracopos, em Campinas, e em Guarulhos, um indicativo de que ele chegou naquele Estado por via aérea. Assim, devido à sua alta agressividade aliada a sua facilidade para a sua disseminação, o percevejo bronzeado é considerado uma praga com alto índice de danos econômicos aos plantios de eucalipto, elevando os custos de produção e significativa redução na produção. Em alta incidência, ele pode levar a planta à morte (WILCKEN et al., 2010).

O percevejo bronzeado é um hemíptero da família *Thaumastocoridae* que corresponde a pequenos percevejos fitófagos succívoros de aproximadamente 3 milímetros (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). Esta praga originária da Austrália foi descrita por esses pesquisadores na Argentina.

O gênero *Thaumastocoris* é um gênero pouco estudado e seu primeiro trabalho na área de biologia dos insetos ocorreu já no início do século XXI Noack e Rose (2007). Porém, informações sobre esse gênero ainda são muito escassas.

Thaumastocoris peregrinus é um inseto de coloração marrom, originário da Austrália, com reprodução sexuada, sendo que cada indivíduo do sexo feminino pode chegar a ovipositar 60 ovos que são de coloração preta, normalmente colocados de forma agrupada nas folhas de eucalipto. Suas ninfas eclodem em seis dias, entre 17-22° C, passando para a fase adulta após 35 dias e tem um período de longevidade de aproximadamente 20 a 40 dias. São insetos fitófagos succívoros tanto na fase ninfal, quanto adulta, alimentando-se da seiva das plantas (CARPINTERO; DELLAPE, 2006). São insetos que têm preferência por plantas acima de 2 anos de idade e por folhas maduras, ou seja, as mais velhas (NOACK, CASSIS, ROSE, 2011; SOUZA, 2012). Devido a essas preferências, o ataque sempre ocorre em plantas adultas e no terço inferior da copa. A alimentação de percevejos fitófagos succívoros ocorre por meio da introdução do seu aparelho bucal, do tipo sugador, nas folhas e galhos finos, fato que causa danos severos devido a liberação de possíveis enzimas presente no fluido salivar (PEIFFER; FELTON, 2014). Estas enzimas são produzidas nas glândulas salivares do sistema

digestório desses insetos. Portanto, o estudo desse sistema é de suma importância para a busca de possíveis meios de controle da praga.

Por fim, o percevejo bronzeado se alimenta de uma variedade de espécies de eucalipto, tais como *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. smithii*, *E. tereticornis*, *E. viminalis*, *E. scoparia* e *E. nicholii* e, também, alguns híbridos de *E. camaldulensis* x *E. grandis* e de *E. grandis* x *E. urophylla* (NOACK et al., 2009; SOLIMAN, 2010).

2.3 INTERAÇÃO INSETO E MICRO-ORGANISMOS

Os insetos foram os organismos que melhor se desenvolveram e que tiveram melhor sucesso sobre a superfície terrestre. Todo esse processo de rápida adaptação foi ocasionado pela capacidade de se alimentar de uma vasta gama de alimentos (HIROSE, PANIZZI, 2009). No entanto, as plantas, que compõem um dos grupos de alimentos dos insetos, também evoluíram e puderam produzir compostos tóxicos aos insetos. Ao contrário dessas, outras espécies de plantas podem produzir compostos caimônios que atraem os insetos. É por esse motivo que algumas espécies atraem mais insetos que outras.

A fim de obter ajuda para a utilização de dietas oriundas de alimentos que possuam algum tipo de composto adverso ao inseto, estes podem conviver em simbiose com micro-organismos, existindo uma relação de associação, exemplos de bactérias envolvidas na digestão de alimentos mais complexos ou na desintoxicação de compostos vegetais (PANIZZI, PARRA, 2009; CAZEMIER et al., 2003). A mesma simbiose pode existir quando a fonte alimentar apresentar deficiências nutricionais, sendo estas supridas pelo micro-organismo simbiote. Além de estarem envolvidos no processo alimentar dos insetos, estes podem atuar na reprodução (BREZNAK, BRUNE, 1994; HIROSE, PANIZZI, 2009).

Existem dois tipos de simbioses entre insetos e micro-organismos: a ectosimbiose, na qual os insetos cultivam fungos para se alimentar, a exemplo das formigas e a endossimbiose, na qual os insetos carregam os micro-organismos internamente, podendo estar no intestino dos insetos ou em outros órgãos (STEVENS; GIORDANO; FIALHO, 2001; WERNEGREN, 2002; HIROSE, PANIZZI, 2009).

A maioria dos insetos está envolvida com alguma forma simbiótica com micro-organismos e a maior parte dessas relações está ligada a bactérias, podendo, também, ser com fungos ou protozoários (BRUNE, 2003; RIO et al., 2003).

As bactérias encontradas no sistema digestório dos insetos são, na maioria, gram-negativas e bactérias coliformes, podendo, muitas vezes, serem facilmente encontradas no

meio ambiente e cultivável em meio de cultura. (DILLON, DILLON, 2004 HIROSE et al., 2006).

Atualmente, técnicas de biologia molecular de última geração vêm permitindo a identificação de micro-organismos em diversos sistemas. Essas técnicas baseiam-se na amplificação de sequências altamente conservadas de DNA, estas após o seu sequenciamento, permitem identificar, por meio de comparação em banco de dados genômicos, se existem similaridades entre elas e outras de micro-organismos conhecidos. Isso permite identificar, por comparação, quais são os simbiontes que estão interagindo com um dado inseto, por exemplo, (BRAUMAN et al., 2001; WERNEGREN, 2002).

2.4 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM INSETOS

Os micro-organismos podem ser estudados por meio de técnicas de biologia molecular. Estas técnicas consideram a extração, amplificação e análise de sequência de DNA diretamente do inseto. Uma dessas técnicas é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é um método de amplificação, *in vitro*, de fragmentos específicos de ácidos nucleicos proposta por Kary Mullis, em 1987 (MULLIS; FALOONA, 1987). A PCR permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores sobre um DNA molde. Esta técnica é conduzida em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, o qual alterna as temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese de DNA (KONEMAM, et al., 2001). A característica principal dessa técnica é amplificar exponencialmente cópias do material genético a partir de pouca quantidade dele (MESQUITA et al., 2001).

Os produtos de PCR permitem analisar a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana, tanto para ambiente aquático, quanto terrestres. Após a amplificação da região de interesse, as sequências de DNA obtidas podem ser sequenciadas, em um sequenciador automático de DNA, e analisadas, por meio de comparação contra bancos de dados genômicos. Caso uma dada sequência seja similar a alguma outra presente no Banco de Dados, há grande chance de que aquela sequência seja daquele organismo. Portanto, essa metodologia, PCR seguida de sequenciamento de DNA, permite afirmar, com certa segurança, que o inseto em estudo possui interação com um dado micro-organismo (

MARTIN-LOURENT et al., 2001; MOTA et al., 2005; MESQUITA, 2011). Mas, se o objetivo for simplesmente saber se há um ou vários micro-organismos em interação com o inseto, a técnica PCR-RFLP pode ser utilizada. Essa técnica baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA por meio da técnica PCR seguida de uma restrição do fragmento de DNA amplificado por ação de endonucleases. Essas enzimas clivam a molécula de DNA previamente amplificada em sítios específicos, gerando perfis de restrição (VOLPINI et al., 2004; ROTUREAU; CATZEFLIS; CARME 2006). Assim, essa técnica, possibilita a detecção de variações nucleotídicas existentes entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes (polimorfismo). O resultado é a presença de variados fragmentos de restrição, que podem servir como um *fingerprint* genético de uma determinada espécie (BALINI, et al, 2015).

Assim, estas técnicas, PCR e PCR-RFLP, podem ser utilizadas para taxonomia de fungos, por meio da amplificação da região Espaçador Transcrito Interno (ITS) do DNA Ribossomal (rDNA) bem como para taxonomia de bactérias e arquea, por meio da amplificação de regiões do gene Ribossomal 16S. A região ITS está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos. Essa região ITS é dividida em duas: ITS1 (espaço intergênico entre os genes 18S e o 5.8S) e ITS2 (espaço intergênico entre os genes 5.8S e 28S) (HILLIS; DIXON, 1991; SCHLOTTERER et al., 1994). Os genes ribossomais são altamente conservados dentro de uma espécie. Por outro lado, as regiões intergênicas ITS, por não codificarem para nenhum gene, evoluem mais rapidamente, podendo apresentar variações intraespecificamente tanto na sequência de bases quanto no comprimento da região (GERBI, 1985). Por esse motivo, essas sequências servem para a taxonomia de espécies e gêneros (SCHLOTTERER et al., 1994; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002). Do mesmo modo, as sequências de 16S rDNA se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998) em bactérias e archaea. O 16S rRNA possui 9 regiões variáveis, alternadas com regiões conservadas, denominadas de V1 a V9. Estas regiões podem ser utilizadas para determinação de filogenia (WOESE et al., 1983 e DAMS et al., 1988) e diversidade microbiana. Áreas variáveis, normalmente, são utilizadas para determinar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos (mesma espécie, às vezes). Já as regiões conservadas desse gene podem elucidar relações evolutivas distantes, de tempos remotos, entre duas moléculas de rRNA 16S.

Com isso, a diversidade de micro-organismos em uma dada amostra poderá ser observada por meio do uso dessas técnicas.

2.5 HISTOLOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE INSETO

Os estudos de glândulas salivares e do sistema digestório vem cada vez mais se destacando no mundo acadêmico. ANHÊ (2011) relata o estudo de glândulas salivares em triatomíneos e enfatiza a importância das glândulas secretoras de saliva no processo de alimentação, as quais são formadas por um par de lobos. COSTA et al. (2003) descrevem o sistema digestório de *Tropidacris collaris*, o qual é composto pelo canal alimentar, órgãos excretores e glândulas acessórias. O canal alimentar é subdividido em 3 partes: o intestino anterior (estomodéu), intestino médio (mesêntero) e o intestino posterior (proctodéu).

Souza (2012) enfatiza que estudos da biologia de *Thaumastocoris peregrinus* são altamente escassos e aqueles relacionados à glândula salivar e sistema digestório podem auxiliar no processo de controle dessa praga florestal. Estudos relacionados à histologia do inseto podem disponibilizar informações para um controle eficaz, já que não existe um método de controle específico para o percevejo bronzeado que possa ser utilizado, sem restrições, na eucaliptocultura.

As glândulas salivares em insetos são bem diversificadas em relação ao tamanho e quantidade e normalmente estão situadas no tórax, onde encontram espaço suficiente para seu desenvolvimento. Mas, isso pode variar de acordo com cada espécie de inseto (LACOMBE, 1999).

Glândulas salivares e intestino estão altamente interligados e são responsáveis pelo processo alimentar dos insetos. As secreções salivares são depositadas diretamente no esôfago e isso facilita a ingestão e digestão do alimento pelo inseto (MEIRELLES et al., 2003; ROCHA, 2010). Além disso, as glândulas salivares também são responsáveis por produzirem o fluido salivar que envolve o bolo alimentar e o levar até o intestino, local em que ocorre a absorção dos nutrientes na pelos epitélio intestinal (LACOMBE, 1999; PANIZZI, PARRA, 2009).

Durante o processo de herbivoria, os insetos sugadores introduzem seu estilete no hospedeiro para obter o alimento, normalmente, seiva do floema, causando o mínimo de dano mecânico às plantas. A seiva que percorre é uma boa dieta, com substâncias menos tóxicas (DOUGLAS, 2005). No entanto, metabólitos secundários e proteínas de defesa, tais como inibidores de alcaloides, glucosinolatos, glucósidos, espécies reativas de oxigênio, quitinase,

proteases e outras proteínas, são detectáveis no floema e podem exercer efeitos negativos sobre os sugadores de seiva (WALZ et al., 2004). Este comportamento alimentar sugere que os hemípteros têm que suprimir as respostas de defesa da planta para ter acesso ao floema. Provavelmente, eles conseguem anular a defesa da planta por meio da secreção de enzimas das glândulas salivares no interior do tecido vegetal. Dessa maneira, eles conseguem se alimentar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal, Laboratório de Entomologia Florestal, ambos localizados no Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Biológicas situados na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri no Campus JK na Cidade de Diamantina, MG e no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica na UNESP-Campus de Jaboticabal-SP.

3.1 CRIAÇÃO DO INSETO

Os insetos foram coletados a campo e trazidos para compor uma criação em laboratório, onde foi disponibilizado buquê de eucalipto (Figura 1) com a finalidade de suprir as necessidades nutricionais dos insetos.



Figura 1. Criação massal em laboratório de *T. peregrinus* em buquês de eucalipto.

Fonte: Autor

Foram distribuídas tiras de papel sobre os ramos para a ovoposição dos insetos. A cada dois dias os buquês eram substituídos. Os ramos substituídos permaneciam próximos aos galhos recém colocados com o objetivo de que os insetos que estavam nos galhos secos

passassem para os novos galhos. O *Erlenmeyer* de 2 litros era abastecido com água todos os dias, mantendo-se sempre cheio, de modo a manter as folhas túrgidas por mais tempo.

3.6 HISTOLOGIA

Cinquenta insetos não sexados foram fixados com solução *Bouin* (Ácido pícrico solução saturada 375 ml, Formalina 37-40% 100 ml e Ácido Acético glacial 25 ml). Em seguida foi feita a desidratação com etanol (80%, 90%, 95%, 100% duas vezes nesse último). As peças passaram 15 minutos em cada concentração de álcool e depois foram acondicionadas em metanol gelado e armazenadas em Freezer a -20°C por 7 horas. Ao final desse período, as peças foram acondicionadas em Xilol duas vezes, passando 15 minutos em cada fase. Essa substância é responsável pela clarificação das peças, retirando o álcool, água e gorduras que, ainda, poderiam estar no interior dos insetos a fim de permitir a penetração da parafina no interior das peças. Finalmente, foram mergulhadas em três tipos de parafina a 60°C, sendo transferidas para o molde de inclusão. Após a parafina solidificar-se, foram submetidas a cortes em um micrótomo a uma espessura de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE *T. PEREGRINUS*

Insetos foram coletados em árvores de eucalipto nas proximidades do Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e armazenados em freezer à -20°C. Antes do procedimento de extração do DNA, os insetos foram desinfestados superficialmente em álcool a 70% durante 1 minuto e em hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. Posteriormente, eles foram mergulhados, duas vezes, em água destilada.

O DNA total foi extraído a partir de insetos desinfestados superficialmente segundo o protocolo 12, com alguns modificações, (NISHIGUCHI, et al., 2001). Este protocolo é denominado *DNA isolation from small insects and crustaceans*.

Todos os passos foram realizados a 4°C, porém, no protocolo de origem indicava que o processo deveria ser realizado em temperatura ambiente, e foram seguidos os seguintes passos:

Insetos desinfestados foram transferidos para um tubo de 1,5 ml e adicionado 30 µl de tampão de lise (100 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl pH 8,0). Os insetos foram macerados com um pistilo de acrílico. Logo após a maceração, adicionaram-se mais 970 µl do tampão de lise.

Nestes 1.000 µl foram adicionados 100 µl de SDS 10% e 4 µl da enzima Proteinase K e mantido a 55°C por 12 a 16 horas. No dia seguinte, adicionaram-se 500 µl de fenol, homogeneizou a solução por meio de inversões por 5 minutos e submeteu a centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Posterior, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 500 µl de clorofórmico. Homogeneizou a solução por meio de inversões por 5 minutos e submeteu a centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 700 µl de isopropanol gelado. Então, as amostras foram mantidas por 15 minutos em um ultra freezer a -80°C, submetidas à centrifugação por 30 minutos a 12.000 rpm a 4°C, quando se observou a presença de pélete no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 1.000 µl de etanol à 70%. Após o pélete ser seco a temperatura ambiente por 30 minutos, adicionaram-se 30 µl de TE com RNase e manteve-se as amostras por 30 minutos em banho-maria a 37°C para a degradação do RNA e manutenção somente de DNA na amostra.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade de DNA obtida em cada amostra. A eletroforese foi realizada por 2 h a 70 V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador, e fotodocumentado em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia Transluminator L. Pix) acoplado a um microcomputador. Com base na intensidade das bandas de DNA no gel, as amostras foram diluídas 1:50 (98 µl de H₂O e 2 µl da amostra de DNA).

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

A PCR foi composta de 5,0 µl de tampão para PCR 10X, 2,0 µl de MgCl₂ 25 mM, 4,0 µl de dNTP 250 µM, 0,5 µl da enzima *Taq* DNA polimerase, 2,0 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 1), 2,0 µl das amostras de DNA diluídas e água ultra pura tipo I esterilizada para volume final de 50 µl. As amostras foram levadas ao termociclador automático MyCycler (BioRAD) nas condições de 95°C por 5 minutos seguido por 40 ciclos compostos por 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundo, 72° por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, um passo adicional a 72°C por 10 minutos foi empregado. Ao final, as reações permaneceram no termociclador a 4°C até que fossem retiradas do aparelho.

Os resultados foram analisados em gel 1,5% de agarose em tampão TAE. A eletroforese foi realizada por 2h a 70V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador, e fotodocumentado em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia Transluminator L. Pix) acoplado a um microcomputador.

Tabela 1. Primers utilizado na reação da PCR para detectar a micro-organismos no *T. peregrinus*

Primer	Sequencia (3'-5')	Especificidade	Região alvo
63f	AGGCCTAACACATGCAAGTC	<i>Eubacteria</i>	16S
1087r	CTCGTTGCGGGACTTACCCC	<i>Eubacteria</i>	16S
1494r	TACGGYTACCTTGTTACGAC	<i>Eubacteria</i>	16s
Ar3f	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	<i>Archaea</i>	16S
Ar927r	CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC	<i>Archaea</i>	16S
ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	All fungi	ITS
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC	All fungi	ITS

3.5 ANÁLISE DE POLIMORFISMO POR MEIO DE PCR-RFLP

Após as amplificações de regiões do DNA das amostras por meio da técnica de PCR, cada uma das amostras amplificadas foi submetida à clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Hind*III e *Eco* RI (Termo Scientific) (Tabela 2). As reações de clivagem foram realizadas adicionando-se 1µl da enzima de restrição, 10µl do produto da PCR, 2µl do tampão da enzima e 7µl H₂O. As amostras foram mantidas por 1 hora a 37°C em banho-maria e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 2h a 70V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador, e fotodocumentado em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia Transluminator L. Pix) acoplado a um microcomputador.

Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas na clivagem (PCR-RFLP).

Enzimas	Sítio de corte	Tampão
<i>Bam</i> HI	G_GATCC	1X buffer <i>Bam</i> HI
<i>Hind</i> III	A_AGCTT	1Xbuffer R
<i>Eco</i> RI	G_AATTC	Tampão <i>Eco</i> RI 1X

3.5.1 CLONAGEM

Após a amplificação do DNA extraído a partir de insetos desinfestados, a clonagem dos fragmentos no plasmídeo foi realizada em um tubo de microcentrífuga de 500µl contendo 3,5µl de água tipo I estéril, 1,0µl de tampão 10x que acompanha a enzima de ligação, 0,5µl (200 U) de enzima T4 DNA ligase, 2,0µl (~150 ug) do produto da PCR e 3,0µl (~1,2 µg) do DNA do plasmídeo. A reação de ligação foi mantida a 16°C por 12h. Os plasmídeos resultantes desta ligação foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH10B.

Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em células da bactéria *Escherichia coli* DH10B eletrocompetentes com o auxílio de um eletroporador *Eppendorf Ag*. Foram adicionados 2µl da reação de ligação em 50µl de células eletrocompetentes e submeteu a um

choque elétrico de 2.500kV em eletroporador. Em seguida, adicionou-se ao tubo 1mL de meio de cultura SOC (20g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 25 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose). Os tubos foram mantidos sob agitação a 200 rpm em um SHAKER a 37°C por 45 minutos. Após esse período, 200µl da solução foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura Luria- Bertani (LB) (10 g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 15g de ágar, água destilada suficiente para completar 1 litro) contendo 10µl de ampicilina, 40µl de IPTG e 40µl de X-Gal. As células foram espalhadas sobre o meio de cultura com a ajuda de um bastão de vidro esterilizado. Após 16 horas de crescimento em estufa a 37°C, observaram-se colônias brancas, indicando que o plasmídeo foi inserido nas células bacterianas (Figura 2).

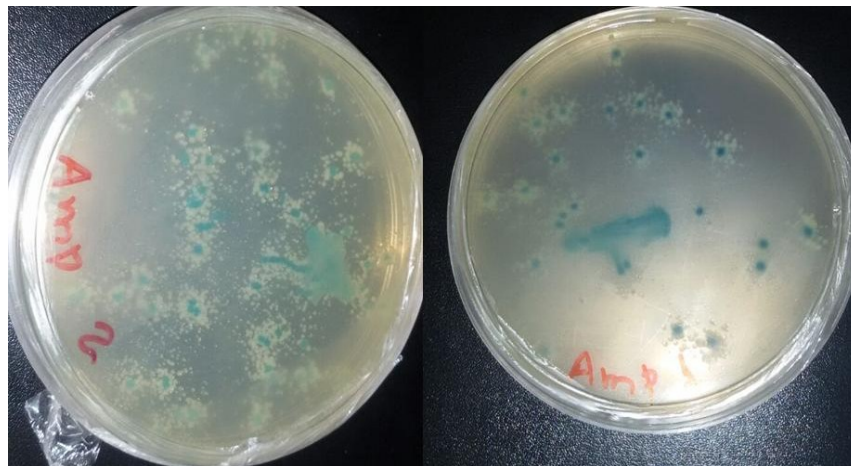


Figura 2. Meio de cultura seletivo para verificar crescimento de bactéria transformada, após a clonagem, colônias brancas indica a presença do plasmídeo. Colônias azuis indicam a não transformação da bactéria.

Fonte: Autor

3.5.2 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Com o auxílio de um palito de dente devidamente autoclavado, selecionou-se uma colônia recombinante e a transferiu para um tubo *falcon* estéril contendo 30ml de meio de cultura LB líquido suplementado com 3µl de ampicilina. A suspensão foi submetida à agitação constante a 200 rpm em shaker a 37°C por 12 a 16h. Após a multiplicação celular, procedeu-se a extração do DNA plasmidial conforme a seguir. As células foram recuperadas por meio de centrifugação por 5 minutos a velocidade 12.000 rpm (Allegra X-22R). O sobrenadante foi descartado e o pélete de células recebeu 200µl da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose). Após 5 minutos a temperatura

ambiente, adicionaram-se 200µl da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS), preparada antes do uso. A suspensão celular foi mantida em banho de gelo por 5 minutos. Após esse período, foi adicionado 150µl da solução III (3 M de acetato de potássio, 2 M de ácido acético). As amostras foram mantidas em banho de gelo por mais 5 minutos, quando foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a velocidade de 12.000 rpm em centrífuga (Allegra X-22R). O DNA foi precipitado por meio da adição de 700µl de etanol 95-100%, gelado, 5 minutos em temperatura ambiente, e centrifugação a 12.000 rpm em centrífuga (Allegra X-22R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado com 1.000 µl de etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspensionado em 30µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0) contendo RNase (1µg/mL). As amostras foram mantidas por 1 hora a 37°C em banho-maria. A fim de confirmar o sucesso ou não das extrações, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 2h a 70V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador, e fotodocumentado em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia Transluminator L. Pix) acoplado a um microcomputador.

3.5.3 SEQUENCIAMENTO

As amostras de DNA plasmidial foram submetidas ao sequenciamento genético automático em sequenciador automático ABI 3500, conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento constaram de 3,0µl de água tipo I estéril, 2,0µl de tampão de sequenciamento, 2,0µl de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 2,0µl de DNA plasmidial e 1,0µl do oligonucleotídeo iniciador M13/pUC Forward -40 (GTT TTC CCA GTC ACG AC). Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 35 ciclos compostos por uma etapa a 96°C por 10s, uma etapa a 52°C por 5s e uma etapa de polimerização a 60°C por 4 min, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso. Em seguida, 80µl de isopropanol foram adicionados a cada amostra. Após 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas aparelho Allegra X-22R a 4.000 rpm com rotor para microplacas, por 45 min a 20°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 µl de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000rpm por 15 min a 20 °C, na mesma centrífuga. As amostras foram secas a vácuo e submetido ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI 3500 conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas por bioinformática, a fim de remover possíveis partes do vetor de clonagem (plasmídeo), e submetidas à análise de similaridade frente ao banco de dados genômicos GenBank por meio das ferramentas BLASTn e BLASTx (Altschul et al., 1990).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 HISTOLOGIA

4.1.0 GLÂNDULAS SALIVARES

Os cortes histológicos de glândula salivar de *T. peregrinus* permitiu constatar a presença de duas glândulas salivares, onde cada uma é composta por dois lóbulos (Figura 3). A partir da junção deste sai o ducto salivar, que liga a glândula ao esôfago (Figura 3). Esse canal é responsável por transportar a secreção salivar até o esôfago. De acordo com Habibi et al. (2008) e Peiffer e Felton (2014), parte dessa secreção salivar (Figura 3-ls) é injetada no tecido foliar do hospedeiro, iniciando o processo de digestão das partículas alimentares ainda na folha. Além disso, há relatos de que nessa saliva, injetada nas folhas, existem compostos que bloqueiam as defesas da planta. Essa secreção é injetada através de um estilete presente no aparelho bucal do percevejo.



Figura 3. Secção histológica das Glândulas salivares de *Thaumastocoris peregrinu*, (ls) líquido granular (Secreção salivar), (ep) Tecido epitelial, (c). Ducto salivar (Canal que liga os dois lóbulos ao esôfago), (l1) primeiro lóbulo, (l2) segundo lóbulo. Barra= 0,1 mm

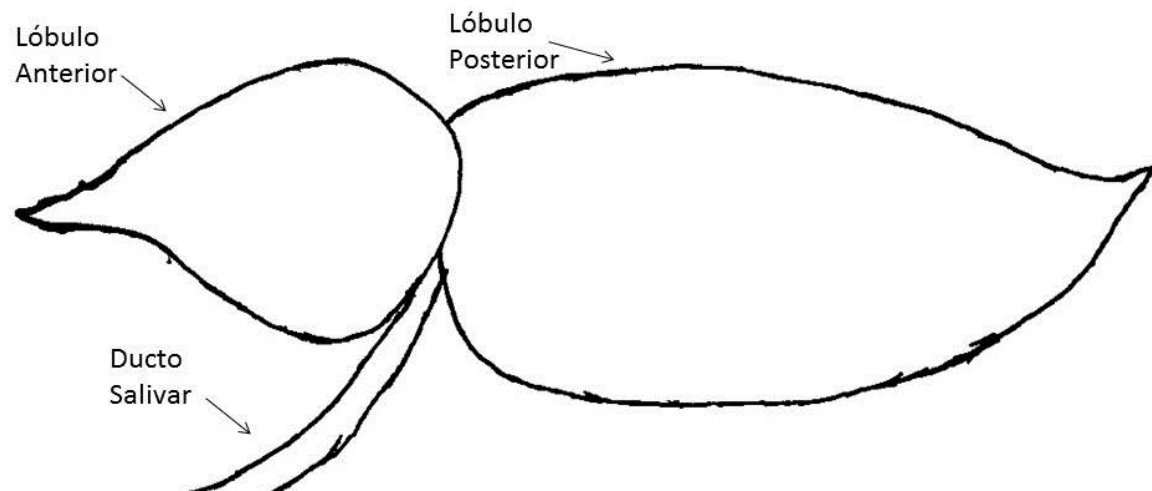


Figura 4. Desenho esquemático de uma glândula de percevejo bronzeado com destaque para os dois lóbulos, anterior e posterior, e o ducto salivar. Adaptado de Azevedo et al., 2007.

As glândulas salivares estão diretamente ligadas ao intestino anterior, secretando saliva em todo o processo de alimentação do inseto auxiliando, assim, na quebra de partículas no processo de digestão. De acordo com Terra e Ferreira (2009), muitas dietas são de difícil digestão, necessitando de enzimas que quebrem os alimentos em moléculas menores que possam ser digeridas pelo organismo. Essas enzimas estão presentes na secreção salivar, sendo o ponto inicial para o processo de digestão em insetos fitófagos.

(WENK; LUCIC; BETZ, 2010; ANHÊ, 2011) destacaram que o líquido da secreção salivar apresenta várias funções, tais como: lubrificar o estilete do aparelho bucal para ser introduzindo no tecido do hospedeiro com a finalidade de iniciar a quebra de partículas de difícil digestão pelo organismo, além de limpar o estile antes dele ser retraído novamente para a bainha do aparelho bucal.

4.1.1 INTESTINO

Os insetos possuem intestino dividido em três partes: o intestino anterior, médio e posterior (Figura 5). Os cortes histológicos do intestino de *T. peregrinus* mostraram que o intestino desse inseto não é diferente do dos demais, porém, no percevejo bronzeado não foi encontrado cecos gástricos (Figura 6), órgão presente na maioria dos demais insetos mastigadores.

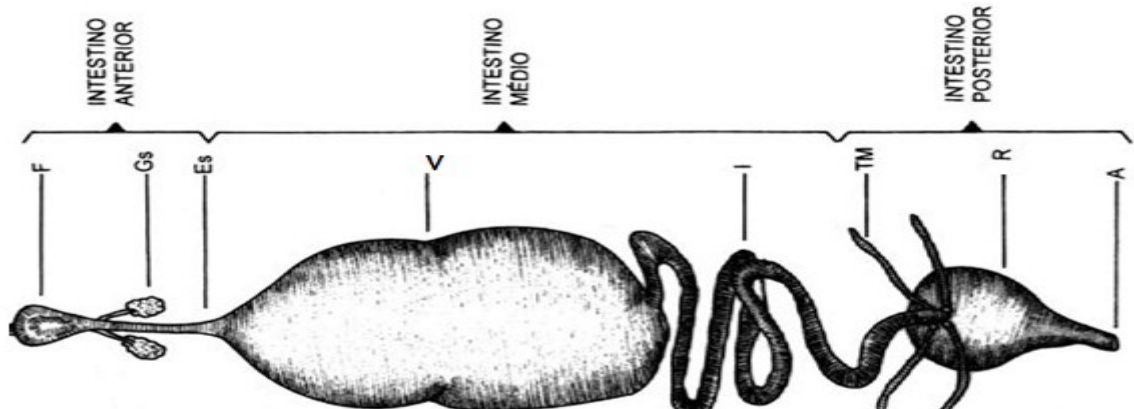


Figura 5. Desenho esquemático do sistema digestório de inseto. F Faringe, Gs Glândulas salivar, Es esôfago, V Ventrículo, I Íleo, TM Túbulos de Malpighi, R Reto e A Ânus

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/5351024/>

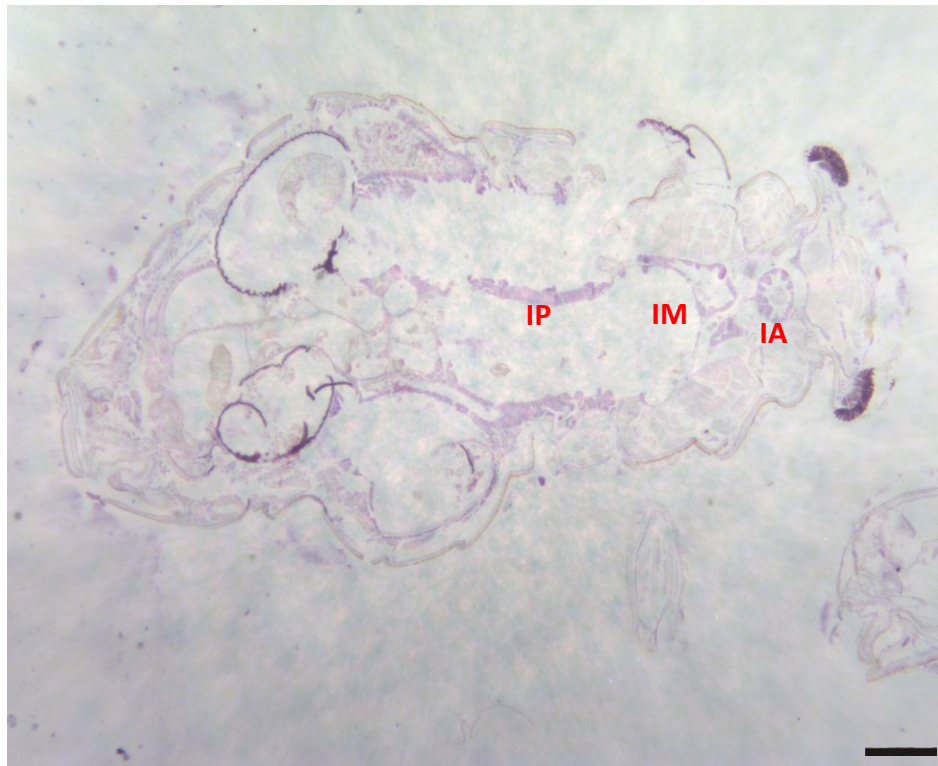


Figura 6. Secção histologia longitudinal do corpo de *T. peregrinus*. (ia) intestino anterior, (im) intestino médio, (ip) intestino posterior, (rt) reto e (an) ânus. Barra= 1 mm

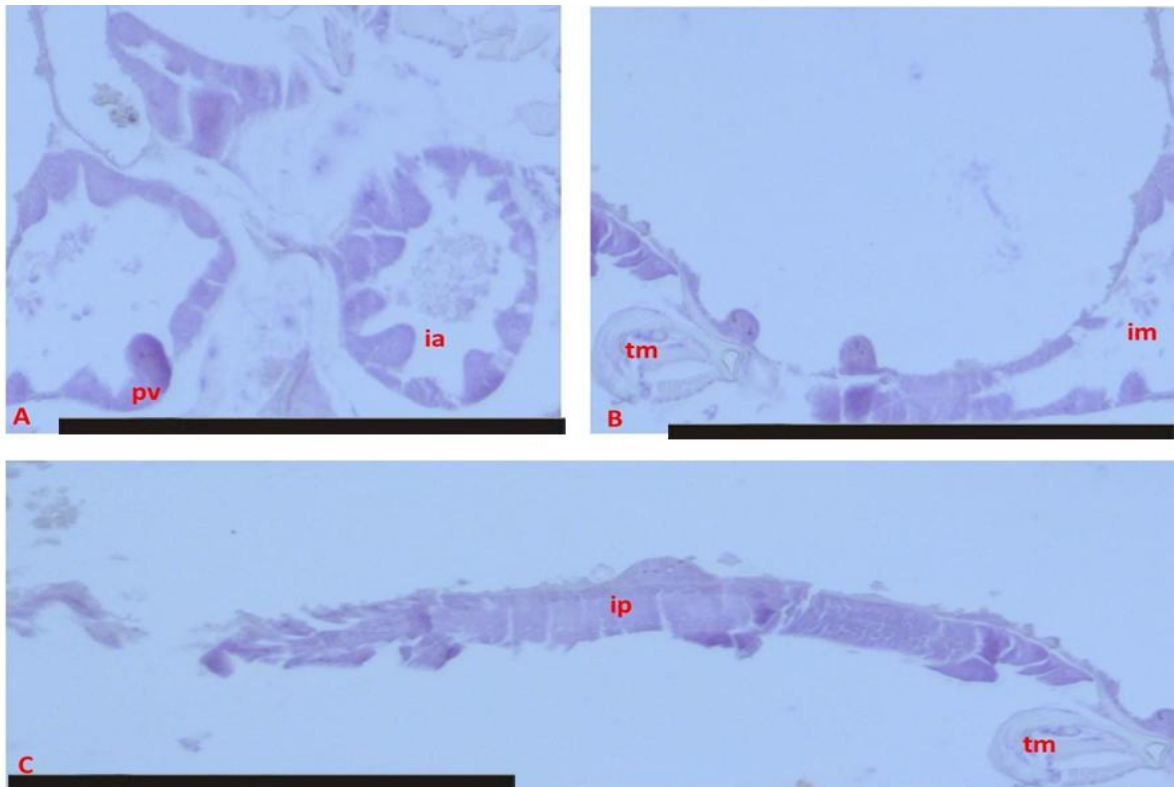


Figura 7. Secção histológica de *Thaumastocoris peregrinus*.

- A- (pv). Proventrículo, (ia) Intestino anterior,
- B- (im) Intestino médio, (tm). Túbulos de Malpighi,
- C- (ip) Intestino posterior, (tm). Túbulos de Malpighi.

O intestino anterior (Figura 7-A) de *T. peregrinus* é composto pelo aparelho bucal, do tipo sugador, apresenta uma faringe curta, que tem o papel de sugar os alimentos usando o estilete presente no aparelho bucal para levá-lo para o esôfago. Tudo isso acontece por meio dos movimentos peristálticos que ocorrem no esôfago, também situado no intestino anterior, que segue até o proventrículo (Figura 7-A). Diversos autores (TERRA, 1988, TERRA; FERREIRA, 2009; UTIYAMA, 2011; CHAPMAN, 2013) destacam que o proventrículo tem a função de controlar a entrada de alimento no intestino médio ou de triturar partículas maiores de alimento.

O intestino médio (Figura 7-B) inicia-se logo após a válvula cardíaca. No percevejo bronzeado ele é composto por um ventrículo (Figura 7-B), sem cecos gástricos. É no ventrículo onde se completa a digestão que se iniciou no intestino anterior. No final do intestino médio observa-se os túbulos de Malpighi (Figura 7-B) e (Figura 7-C), que são responsáveis pela excreção dos insetos (TERRA; FERREIRA, 2009; CHAPMAN, 2013).

O intestino posterior (Figura 7-C) do inseto estudado é composto pelo íleo, que, juntamente com os túbulos de Malpighi, terminam o processo de digestão de fluídos ainda não absorvidos pelo organismo, como água e alguns nutrientes, expelindo o que não é absorvido pelo organismo através do orifício anal.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DE DNA EXTRAÍDO DE *THAUMASTOCORIS PEREGRINUS*

4.2.1 Extração de DNA e análises PCR

As extrações de DNA resultaram em ácidos nucleicos de boa qualidade e em quantidade suficiente para as análises posteriores (FIGURA 8).

As ampliações com iniciadores específicos para fungos, archaea não resultaram em bandas no gel de agarose, o que indica não haver esses micro-organismos no interior desse inseto. Por outro lado, as reações com os oligonucleotídeos iniciadores 63f/1087r, específicos para eubactéria, apresentaram amplificação, mostrando uma banda com tamanho aproximado de 1,0 Kb (Figura 8). Teste com o par de iniciador 63f/1494r, também específico para eubactéria, não mostraram resultado positivo (Figura 9).

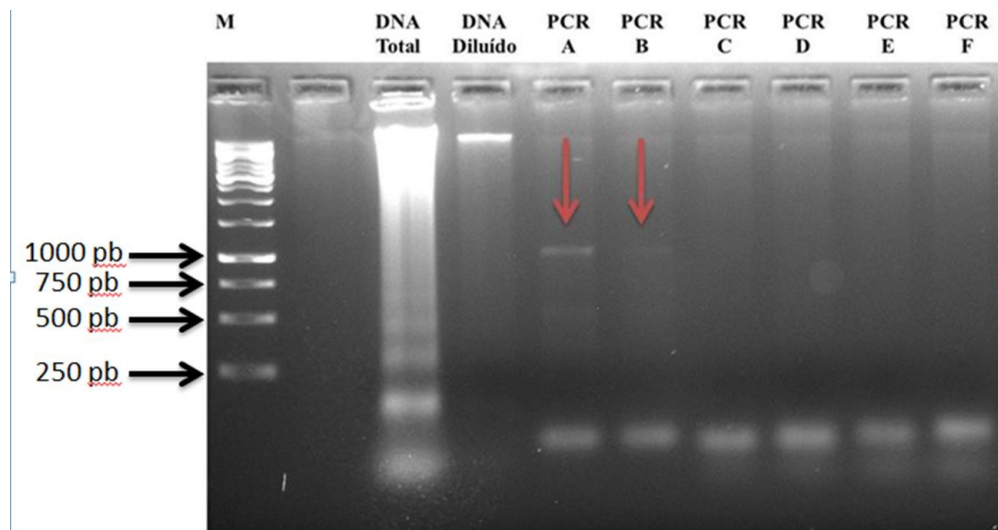


Figura 8. Imagem de gel de agarose à 0,8% demonstrando: DNA Total = padrão da amostra de DNA genômico extraído a partir de espécimes de *T. Peregrinus*, DNA Diluído = padrão da amostra de DNA genômico extraído a partir de espécimes de *T. Peregrinus* diluída na proporção de 1:25, PCR A e B = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores 63f/1087r, PCR C e D = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores 63f/1494r, PCR E e F = amplificação da amostra de DNA diluída com os iniciadores Ar3f/Ar927r, M = Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific).

Uma vez que as análises por PCR com iniciadores específicos para eubactéria foram positivas, pode-se supor que no interior de percevejo bronzado existem esses microorganismos. Mas, não é possível saber se há uma única ou mais espécies ou se existem mais de uma espécie. Para esclarecer essa dúvida, o produto da PCR que amplificou o DNA foi submetido à análise com enzimas de restrição.

4.2.2 ANÁLISE PELA TÉCNICA PCR-RFLP

O produto da PCR com os iniciadores 63f/1087r foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*R1. As análises mostraram que a enzima de restrição *Eco*R1 identificou polimorfismo entre amostras, gerando dois padrões de bandas: um com bandas de 750 e 780 pb (Figura 9 A) e outro com bandas de 250 e 300 pb (Figura 9 A). As outras duas enzimas de restrição utilizadas não detectaram polimorfismos.

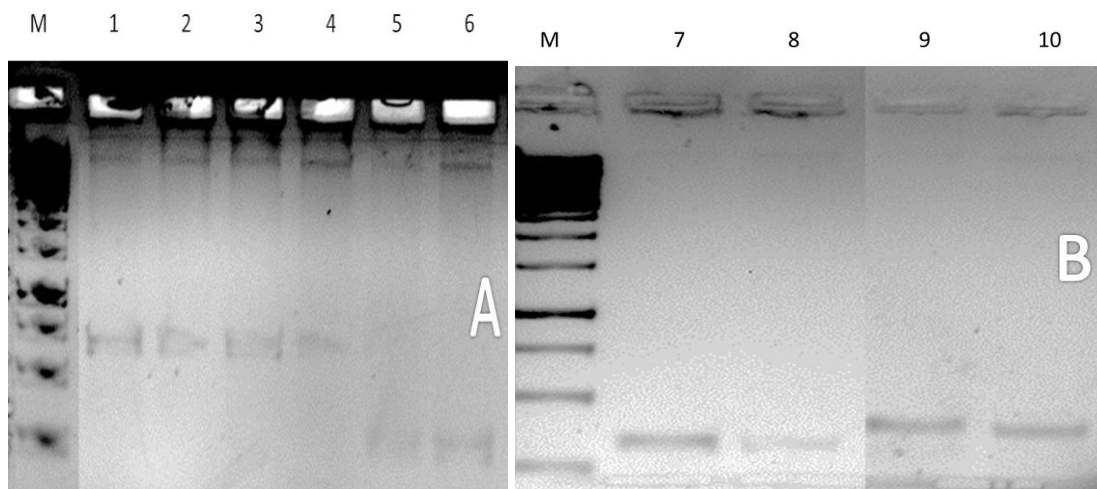


Figura 9. Imagem de gel de agarose após o produto da PCR com os iniciadores 63f/1087r serem clivados com enzimas de restrição. A– enzima de restrição *Eco*RI. B– enzima de restrição *Bam*HI (7 e 8) e *Hind*III (9 e 10). M = marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Thermoscientific Inc)

4.2.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE DNA

O processo de clonagem de DNA gerou cinco clones, nomeados como ML1, ML2, ML3, ML4 e ML5. Esses clones foram devidamente preparados para a submissão ao sequenciamento automático de DNA que, após o sequenciamento, gerou cinco sequências de DNA: ML1-M13f (ANEXO A), ML2-M13f (ANEXO B), ML3-M13f (ANEXO C), ML4-M13f (ANEXO D) e ML5-M13f (ANEXO E).

Em uma primeira análise, essas sequências foram submetidas a um *script* de bioinformática para a retirada de contaminação com sequência de DNA do vector de

clonagem. A ferramenta utilizada para esse fim foi o VecScreen disponível na plataforma “National Center for Biotechnology Information, NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/). Essa ferramenta apresenta um gráfico (Figura 10) em que a cor vermelha indica a contaminação com sequência do vetor de clonagem, parte indesejada.

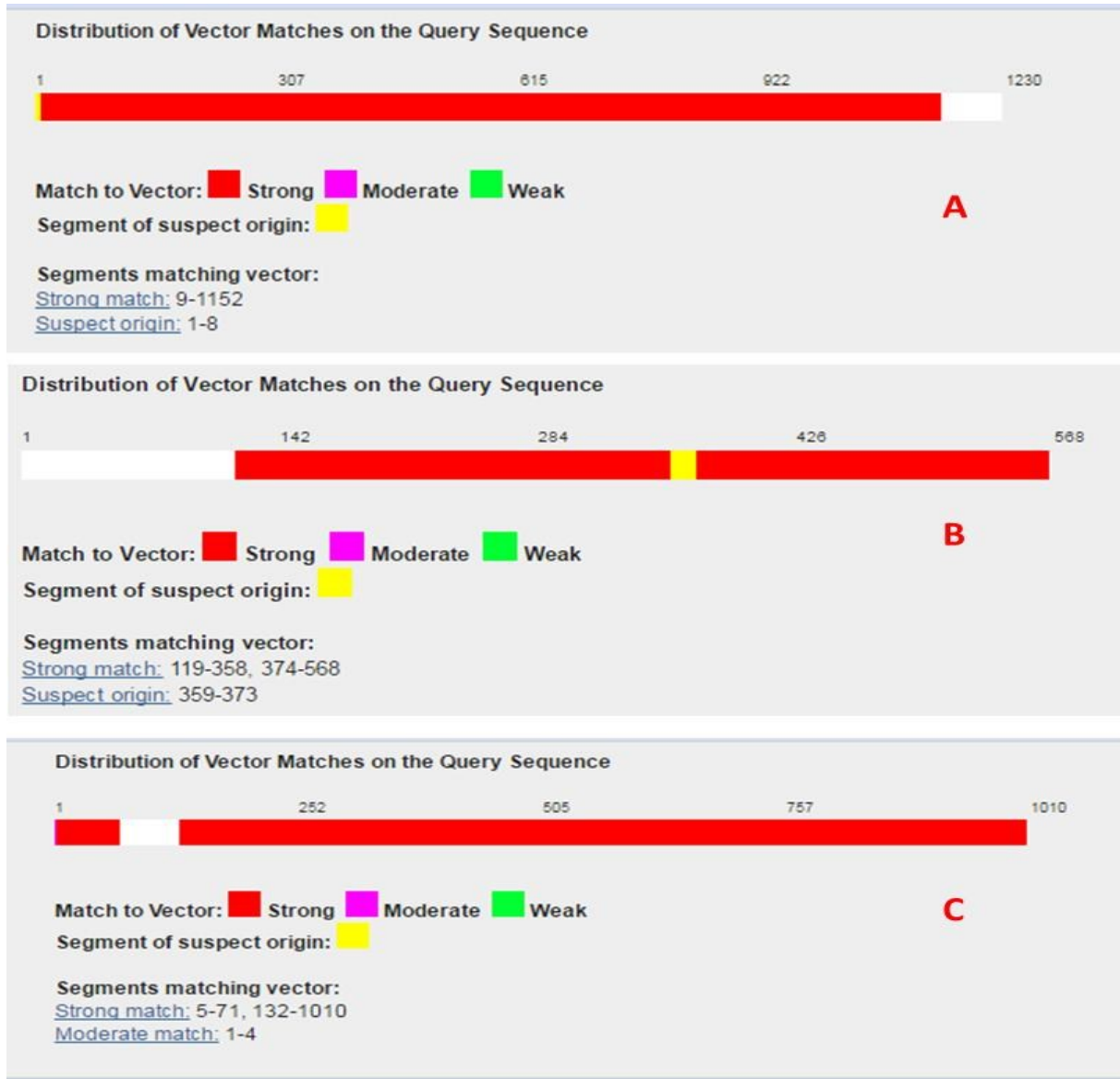


Figura 50. Resultado da análise de contaminação da sequência alvo com sequência do vetor de clonagem. A parte na cor vermelha indica a contaminação. A - sequência ML1-M13F. B - sequência ML2-M13F. C - sequência ML5-M13F.

Uma vez identificada, a parte contaminada com DNA do vetor é eliminada. A parte em branco é a sequência de interesse para as análises futuras em banco de dados genômicos (Figura 10).

As sequências ML1-M13F e ML4-M13F não encontraram similaridade com outras sequências de DNA no GenBank. Isso é um indicativo de que os micro-organismos que essas sequências representam, ainda não foram catalogados. Desse modo, outros clones dessas sequências deverão ser sequenciados para a confirmação se, de fato, elas representam novas bactérias ou não.

A sequência ML2-M13F foi similar a sequências de *Wolbachia* sp., *Firmicutes*, *Spirochaetes* e *Candidatus portiera*. Este último é um endossimbionte obrigatório de *Bemisia tabaci* biotipos B e Q que teve o respectivo genoma sequenciado recentemente (JIANG et al., 2012). Segundo a literatura, essa bactéria fornece nutrientes essenciais ao seu hospedeiro. Todas as quatro sequências similares a ML2-M13F são provenientes de bactérias não cultiváveis em meio de cultura (Anexo G).

A sequência ML3-M13F foi similar a de uma proteína hipotética proveniente de *Elizabethkingia anophelis*, uma bactéria isolada do intestino de *Anopheles gambiae* (KAMPFER et al., 2010) (Anexo H).

Por fim, a sequência ML5-M13F foi similar a sequências de quatro bactérias diferentes, *Pseudomonas acephalitica*, *Burkholderia ambifaria*, *Arsenophonus* sp. e *Candidatus portiera* (Anexo J). Para as duas primeiras, há pouca informação na literatura. Por outro lado são bem conhecidas as outras duas, são simbioses de *Bemisia tabaci* (MOUTON et al., 2012; KAMPFER et al., 2010).

Diante dos resultados, é bem provável que existam bactérias no interior de percevejo bronzeado. Possivelmente, dados os resultados de similaridade encontrados, tratam-se de organismos simbioses. Uma maneira de confirmar é o isolamento dessas bactérias para cultura pura e proceder ao estudo individual das mesmas. Mas, pode-se verificar que algumas delas não são cultiváveis. Logo, para essas, somente um estudo metagenômico pode identificá-las com precisão.

Muitos insetos vivem em simbiose com bactérias que auxiliam tanto na obtenção de nutrientes e alguns na sua reprodução (BREZNAK, 1994; HIROSE, PANIZZI, 2009) a integração inseto micro-organismo tem grande importância para o mesmo auxiliando muitas vezes na sobrevivência do inseto.

Os estudos dirigidos para a espécie do percevejo bronzeado é bastante carente de informações, não se encontrou na literatura estudos moleculares relacionados a essa espécie esta foi a primeira pesquisa dessa natureza, abrindo inúmeros caminhos para posteriores trabalhos relacionados.

5. CONCLUSÕES

- O ceco gástrico, encontrado em alguns insetos, está ausente em *T. peregrinus*;
- Existem bactérias colonizando o interior de *T. peregrinus*;
- Algumas dessas bactérias ainda não são catalogadas;
- Provavelmente, de acordo com os resultados de similaridade encontrados, tratam-se de organismos simbiontes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINI, B. C. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa maldi-tof.** 2014. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014

ALTSCHUL, S.F., et al. "Basic local alignment search tool." **Journal of molecular. biology.** 215:403-410, 1990.

ALVES, S. B. Microorganismos associados a insetos. In: ALVES, S.B. (Ed). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: Fealq,1998. p. 75-96.

ANHÊ, A. C. B. **Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Triatominae).** 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG, 2011.

ANTONIOLLI, Z.I.; et al. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. *Mycological Research*, v.104, n.1, p.708-715, 2000.

AZEVEDO, D. O. et al. Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p.469-477, 2007.

BALINI, L.C. et al. **Identificação pela técnica de PCR-RFLP, de *Aspergillus* spp. Isolados de grãos de soja e milho.** Revista Brasileira de Energia Renováveis, v. 4, p.83-99, 2015.

BARBOSA, T. L. **Influência do local de crescimento na qualidade da madeira,** 2010

BRACELPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Evolução da Produção Brasileira de Celulose.** 2016.

BRAUMAN, A. et al. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. **Fems Microbiology Ecology**, n. 35, p.27-36, 2001.

BREZNAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p.453-489, 1994.

BRUNE A: Symbionts aiding digestion. In **Encyclopedia of insects** Edited by: Cardé RT, Resh VH. New York: Academic Press; 2003:1102-1107.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v. 1228, p.61-68, 2006.

CAZEMIER, A. E. et al. Promicromonospora pachnodae sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, n. 2, p.135-148, mar. 2003.

CHAPMAN, R.f. **The Insects: Structure And Function**. 5. ed. Fifth, 2013. 929 p.

COSTA, M.K.C.M. et al. Descrição histológica do estômago de *Tropidacris Collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p.259-263, 2003.

DAMS, E. et al., Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v.16, p.87-173, 1988.

DIAS, O. A.; SIMONELLI, G.. Qualidade da Madeira para a produção de celulose e papel MADEIRA PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE E PAPEL. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 17, p.3632, 2013.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M.. The Gut Bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 49, n. 1, p.71-92, 2004.

Douglas A.E. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. **J Exp Bot**, 57:747–754, 2005.

GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum, 1985. p.419-517

GOMES, E.A. et al., Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.477-483, 2002.

HABIBI J, et al., Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus Hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). *Annals Entomological Society of America* 13: 159-171, 2008.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology** v.35, p.1-21, 1998.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v.66, n.4, p.411-453, 1991.

HIROSE, E. et al. Bacteria in the Gut of Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of The Entomological Society of America**, v. 99, n. 1, p.91-95, 2006.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. In: R. PANIZZI, A.; PARRA, J. R. **Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 6. p. 19-1164.

IBÁ-Indústria Brasileira de Árvores. A Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ) em números: Ano base 2014. Publicado em 16/04/ 2015.

ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: an introduction. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T.A (Ed). **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC P, 2003. p 1-21

JIANG, Z. F et al. Genome Sequences of the Primary Endosymbiont. **Journal Of Bacteriology**, v.194, n.23, p.6678-6679, 2012.

KAMPFER, P. et al. *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, n.11, p.2670-2675, 2010.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LACOMBE, D. Anatomia e Histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.557-564,1999.

MARTINI, A. **J.O plantador de Eucaliptos:**A questão da preservação Florestal no Brasil e o Resgate Documental do Legado de Edmundo Navarro de Andrade. 2004. 332 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de História Social, Departamento de História da Faculdade de Filosofia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARTIN-LAURENT,F. et al. DNA extraction from soil: ald bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environ Mental Microbiology**, v.67, n.5, p.2354-2359, 2001.

MEIRELLES, R.M.S. et al. **Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus*** Neiva e Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Submicroscopic Cytology Pathology*, v. 35, n. 2, p. 199-207, 2003.

MESQUITA, R.A et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, p.314-319, 2001.

MOUTON, A., et al. Evidence of a complex phylogeographic structure in the common dormouse, **Muscardinus avellanarius** (Rodentia, Gliridae). – **Biological Journal of the Linnean Society** 105: 648–664, 2012.

MOTA, F.F et al. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel rpoB-based PCR-DGGE method. **FEMS Microbiology Ecology**, v.53, n.2, p.317-328, 2005

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods In Enzymology**, p.335-350, 1987.

NISHIGUCHI, Michele K. et al. DNA Isolation Procedures. In: DESALLE, Rob; GIRIBET, Gonzalo; WHEELER, Ward (Ed.). **Techniques in Molecular Systematics and Evolution**. Springer Basel Ag, 2001. Cap.12, p.272.

NOACK, A. E.; ROSE, H.A. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. In the laboratory with some observations on behaviour. **General And Applied Entomology: The Journal of the Entomological Society of New South Wales Inc.**, v. 36, p.27-34, 2007.

NOACK, A. E. et al. Efficacy of Imidacloprid in the Control of *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus scoparia* in Sydney, Australia. **Arboriculture & Urban Forestry**, v. 344, p.192-196, 2009.

NOACK, A. E.; CASSIS, G.; ROSE, H. A. Systematic revision of *Thaumastocoris Kirkaldy* (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae). **Zootaxa**, v. 3121, p.1-60, 2011.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R.P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasilia-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 1164 p.

Parra O C. et al. Phylogeny, major clades and infrageneric classification of *Corymbia* (Myrtaceae), based on nuclear ribosomal DNA and morphology. **Australian Systematic Botany**, 22, 384–399, 2009.

PEIFFER, M.; FELTON, G. W. Insights into the Saliva of the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). **Plos One**, v.9, n.2, p.1-10, 2014

RIO, R. V.M. et al. Comparative Genomics of Insect-Symbiotic Bacteria:: Influence of Host Environment on Microbial Genome Composition. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6825-6832, 2003.

ROCHA, F. F. Cultivo primário da glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos (Hemiptera, Reduvidae) para o estudo de moléculas bioativas relacionadas com a hematofagia. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L.. O Uso Comercial e Popular do Eucalipto *Eucalyptus Globulus* Labill-Myrtaceae. **Saúde & Ambiente**, v.2, n.2, p.23-34, 2007.

ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. Short report: Absence of Leishmania in Guianan bats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.2, p.318–321, 2006.

SCHLOTTERER, C. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v.11, n.3, p.513-522, 1994.

SOLIMAN, E. P. **Bioecologia do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em eucalipto e prospecção de inimigos naturais**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu - SP, 2010.

SOUZA, G. K. **Morfologia de ovos, glândulas salivares e sistemas digestivo e reprodutor de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera Thaumastocoridae)**. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2012.

STEVENS, L., GIORDANO, R., FIALHO, R. F. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. **Annual Review of Ecology and Systematics** 32: 519-545, 2001.

TAMAS, I. et al. 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. **Science**, New York, v. 296, n. 5577, p.2376-2379, 2002.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. (Ed.). Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J.. **Bioecologia e Nutrição de Insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 4, p. 175.

TERRA, W. R. **Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolution perspective**. Brazilian J Med Res, V. 21, 1988.

UTIYAMA, A. H. **Estudo morfofuncional do sistema digestivo da cigarrinha *Bucephalonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae)**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

VENTURIN, N. et al. Histórico. In: VALE, A. B. et al. **Eucaliptocultura no Brasil: Silvicultura, Manejo e Ambiência**. Viçosa: Sociedade de Investigação Florestal, 2014. Cap. 1. p. 18-551

VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.90, p.31-37, 2004.

WALZ C, et al. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, 65:1795–1804, 2004.

WANG, W., VINOCUR, B., ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218, n.1, p.1-14, 2003.

WENK, P., LUCIC, S., BETZ, O. Functional anatomy of the hypopharynx and the salivary pump in the feeding apparatus of the assassin bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Heteroptera). **Zoomorphology**, p.225-234, 2010.

WERNEGREEN, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.11, p.850-861, 2002.

WILCKEN, C.F. Percevejo bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. **IPEF Programa de proteção florestal - PROTEF/IPEF**. Botucatu, SP, Setembro de 2008. Disponível em: <>. Acesso em: 05 jul. 2016.

WILCKEN, C. et al. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2010.

WILSON P. et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, 251: 3–19, 2005.

WOESE, C. R. et al. Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids. **Microbiological Reviews**, v.47, n 4, p.621-669, 1983.

YUN, J.H. et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p.5254-5264, 2014.

ANEXOS

ANEXO A. SEQUÊNCIA DNA DA AMOSTRA ML1-M13F**ML1-M13F**

TGGTTTGCAAGGCGCTAGAATTACCCGCCGAAATAAAGGGATCTCTAGAAAGATC
CCCTTGATGATCTTTCTCTCATC

ANEXO B. SEQUÊNCIA DNA DA AMOSTRA ML2-M13F**ML2-M13F**

TTATATCCTAATGGGCCCCGACTTCTTTTGCTCCCGGTCGCCATGGGGGAGTATGAT
GTAATTCTAGTGAATTCCCGGTCGCCTGTTTTTCGAACATATGGGAGAGCTCTCAA
CACCTCG

ANEXO C. SEQUÊNCIA DNA DA AMOSTRA ML3-M13F**ML3-M13F**

AGGTCATTGATGTTCCCTTAGACATGACCGCGAACGTTTCATCAAACTGTGAAGGC
GTCTAGTTTTGGTTGTCGGTTGTTTCGGCGCATCCGTTTGGTTGTGGCTCGATCAT
CCGCCAATTCATTATCCTCGACCTTCCAACACCGACGGTTACTCCCTTGCGAGGG
AGGTCTGACCGGAATGGTGGCCGAACAACCAAGAGACGCAGATTTGCGTCAAGG
AACTTGAAAAATGACAACGCCTGGCATTAGTCGGTGTGTTAACCGCGCTGGTAAT
GAACGACTCACGGCAACTGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA
AGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCAAAGTTTTTTGCAAAGGGCA

ANEXO D. SEQUÊNCIA DNA DA AMOSTRA ML4-M13F**ML4-M13F**

TAAGTATTCTTTTTGCTTAGGTCTTAAATCCATCAGTAGACAACCATTATTATTAC
CCTGCAATGTGGGGAAAAACAGGTTTTTTGTAATTCGCCTATGTTCTGTGAAGAC
TTTTAGTTTGTGGCCACGCCTGGTTTAAATTTAGACTCTGTGTCTGGGCCCAGGGG
AAGATTCCACAAAGAACATATCCTCTAAAGACGAAAAAAAAGCCGTTTGGGCGA
CCTTTTCCTTCAACATGTAAATATGGAAAAATTTCCGCCCTTTTTGGAACATCCC
TCAAGGAAAGAAGAAGAGACATTCTTCTCTGTTTGGGAAGCAATATAAAGGGGAG
TGAAGA

ANEXO E. SEQUÊNCIA DNA DA AMOSTRA ML5-M13F**ML5-M13F**

ACTATAGGGCCAATTGGGCCCTACGTTTCATGCTCCCGGACGCCATGGGGGCCGC
GGGAATTCGATT

ANEXO F. Comparação da sequência ML2-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastN.

ID %	Nº Acesso	Evalue	Organismo	Autor
75%		2e-10	Uncultured <i>Wolbachia</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone Ocac_m_102	Montagna,M., Chouaia,B., Sacchi,L., Porretta,D., Martin,E.,Giorgi,A., Lozzia,G.C. and Epis,S.
86%		5e-06	<i>Candidatus Portiera</i> endosymbiont of <i>Bemisia tabaci</i> partial 16S rRNA gene	Bibi,A., Haider,M.S., Herrmann,H.W. and Brown,J.K.
82%		2e-05	Uncultured Firmicutes bacterium partial 16S rRNA gene, clone NL10BD-04-D03	Ladygina,N., Johansson,T., Canback,B., Tunlid,A. and Hedlund,K.
82%		2e-05	Uncultured Spirochaetes bacterium clone 33mos_0s_F11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Goffredi,S.K. and Orphan,V.J.

ANEXO G. Comparação da sequência ML3-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastX

ID %	Nº Acesso	Evalue	Organismo	Autor
86%		2e-19	hypothetical protein [Elizabethkingia anophelis]	Não tem autor cadastrado

ANEXO H. Comparação da sequência ML5-M13F com outras sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do algoritmo BlastN

ID %	Nº Acesso	Evalue	Organismo	Autor
93%		8e-18	<i>Pseudomonas acephalitica</i> partial 16S rRNA gene, strain Ind01	Pinjari,A.B
91%		1e-16	<i>Burkholderia ambifaria</i> partial 16S rRNA gene, strain L3	Li,R., Redmond,A.K., Wang,T., Bird,S., Dooley,H. and Secombes,C.J
91%		1e-16	<i>Arsenophonus</i> endosymbiont of <i>Bemisia tabaci</i> partial 16S rRNA gene, clone 13_1_5	Bibi,A.
91%		1e-16	<i>Candidatus portiera</i> endosymbiont of <i>Bemisia tabaci</i> partial 16S rRNA gene,Clone 1_3_1	Bibi,A., Haider,M.S., Herrmann,H.W. and Brown,J.K.