



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RACHEL COLAUTO MILANEZI AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TECIDOS  
GERMINATIVOS E COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM  
POPULAÇÕES DE *EUSCHISTUS HEROS* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE) SELECIONADAS COM TIAMETOXAM E  
LAMBDA-CIALOTRINA**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

RACHEL COLAUTO MILANEZI AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TECIDOS  
GERMINATIVOS E COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM  
POPULAÇÕES DE *EUSCHISTUS HEROS* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE) SELECIONADAS COM TIAMETOXAM E  
LAMBDA-CIALOTRINA**

RACHEL COLAUTO MILANEZI AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TECIDOS  
GERMINATIVOS E COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM  
POPULAÇÕES DE *EUSCHISTUS HEROS* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE) SELECIONADAS COM TIAMETOXAM E  
LAMBDA-CIALOTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Aguiar, Rachel Caçuto Milanezi.

Caracterização morfológica de tecidos germinativos e comportamento meiótico em populações de *euschistus heros* (heteroptera: pentatomidae) selecionadas com tiametoxam e lambda-cialotrina / Rachel Caçuto Milanezi Aguiar. - Londrina, 2016. 65 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Percevejo - Tese. 2. Resistência - Tese. 3. Citogenética - Tese. 4. Morfologia testicular - Tese. I. Rosa, Renata da . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

RACHEL COLAUTO MILANEZI AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TECIDOS  
GERMINATIVOS E COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM  
POPULAÇÕES DE *EUSCHISTUS HEROS* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE) SELECIONADAS COM TIAMETOXAM E  
LAMBDA-CIALOTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profª. Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 11 de Março de 2016.

Dedico este trabalho a minha família, em especial meu esposo Andreo e minha filha Nicole, meus maiores incentivadores.

*Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.  
(1 Coríntios 13:13)*

## AGRADECIMENTOS

*Este trabalho, pelos fins acadêmicos, é considerado um trabalho individual, mas não posso deixar de ressaltar que outras pessoas colaboraram, direta ou indiretamente, para que este objetivo fosse concretizado. A colaboração que tive de muitas pessoas, não se restringe apenas à relação científica e prática, mas também a um sorriso, um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, uma compreensão, etc... Todos os agradecimentos listados abaixo são especiais, espero não ter me esquecido de ninguém.*

*Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada neste mundo é concebido. Agradeço pelo dom da vida e pelo privilégio de poder aprender a cada dia. Viver é maravilhoso! Eu te amo com todo o meu coração, toda minha alma, todo meu entendimento, toda minha força!*

*Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Renata da Rosa, por ter confiado na minha capacidade e nos frutos deste projeto, sempre transmitindo com extrema dedicação e profissionalismo seu conhecimento científico. Estes dois anos foram muito valiosos para a minha formação científico-pessoal, isto jamais será perdido. Sou imensamente grata por todo seu empenho e dedicação!*

*Agradeço aos meus pais, Sérgio Ronaldo Milanezi e Maria Madalena Colauto Milanezi por todo apoio, amor, carinho e dedicação que me proporcionaram. Vocês são exemplos de caráter, integridade e humildade. Obrigada por assumirem a paternidade e a maternidade de forma tão grandiosa e por me ensinarem o verdadeiro valor desta vida, o amor e a simplicidade. Vocês me presentearam com o melhor desta vida. Amo vocês!*

*Agradeço aos meus queridos irmãos, Rebeca Colauto Milanezi de Souza e Rafael Colauto Milanezi, por todo carinho, amor e apoio. Foi um grande privilégio ter crescido ao lado de vocês. Tenho muito orgulho de tê-los como irmãos. Amo vocês!*

*Agradeço ao meu esposo, Andreo Fernando Aguiar, por todo apoio, amor, carinho e dedicação. É uma honra dividir meus dias ao seu lado. Seria impossível resumir suas qualidades neste simples agradecimento, no entanto, não posso deixar de mencionar a tua sabedoria, o teu discernimento, esforço, cuidado e labor que você tem dedicado a nossa família. Eu te amo muito!*

*Agradeço à minha filha, Nicole Milanezi Aguiar, pelo amor mais puro, inocente e sincero. É um privilégio vê-la crescer em estatura e em conhecimento. Você é nossa herança nesta Terra. É inexplicavelmente grande o amor que sinto por você!*

*Agradeço aos meus avós, Carolina do Carmo Milanezi e Reynaldo Milanezi, pelos cuidados na infância, pelos exemplos de dignidade e honestidade.*

*Agradeço as professoras Ana Lúcia Dias e Lúcia Giuliano Caetano por todos os ensinamentos, conselhos e colaboração neste projeto. Aprendi muito com vocês.*

*Agradeço a todos os colegas, amigos e alunos do Laboratório de Citogenética Animal (LACA): Ana Beatriz, Angélica, Fábio, Jaqueline, Juceli, Larissa, Mariana, Matheus, Poliana, Raquel e Thainá. Foi muito bom conhecer cada um de vocês e compartilhar estes dois anos de convivência!*

*Agradeço as minhas amigas, Poliana Alves Sidol Wolf e Raquel Bozini Gallo pela amizade, companheirismo e apoio ao longo destes dois anos. Sempre levarei com muito carinho nossa amizade! Vocês são especiais!*

*Agradeço a todos os funcionários do departamento de Biologia Geral, em especial aos técnicos Dário e Melissa, pelo auxílio prestado com extrema competência e prontidão.*

*Agradeço aos Professores Mário Sérgio e Sandra Lepri, por toda ajuda e colaboração no desenvolvimento de pontos importantes deste projeto.*

*Agradeço a todos os professores e alunos do laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias – Bioinseticida pela colaboração e auxílio em etapas essenciais deste trabalho.*

*Agradeço ao Pesquisador Dr. Daniel Sosa-Gómez e a doutoranda Patrícia Husch, por auxiliarem diretamente em todos os aspectos deste trabalho.*

*Agradeço a Embrapa Soja - Londrina pelo fornecimento de material biológico selecionado para a realização deste projeto.*

*Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura e pelos recursos necessários para a realização deste projeto.*

*Agradeço a Capes, pelo suporte financeiro deste projeto.*

AGUIAR, Rachel Caçuto Milanezi. **Caracterização morfológica de tecidos germinativos e comportamento meiótico em populações de euschistus heros (heteroptera: pentatomidae) selecionadas com tiametoxam e lambda-cialotrina.** 2016. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) é uma das espécies pragas mais importantes que ocorrem nas lavouras de soja do Brasil. Diversas estratégias de controle por meio de inseticidas químicos têm sido utilizadas, no entanto, as contínuas aplicações e as progressivas doses empregadas ao longo das últimas décadas, contribuíram para a seleção de diferentes mecanismos de resistência, que podem estar associados a alterações cromossômicas. Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento cromossômico nesta espécie. Logo, o objetivo deste estudo foi analisar a morfologia testicular, o perfil citogenético e a localização do DNA ribossômico 18S (DNAr 18S) em populações selvagens e selecionadas (suscetíveis e resistentes) com o inseticida tiametoxam e lambda-cialotrina, de percevejos *Euschistus heros* (*E. heros*) para identificação de possíveis alterações morfológicas e cromossômicas. Para tanto, 45 exemplares de *E. heros* foram divididos em 3 grupos ( $N=15$ /grupo): selvagens, suscetíveis e resistentes. As análises histológicas confirmaram a presença de 6 lóbulos testiculares em todos os grupos de percevejos, sendo o 5º lóbulo menor em relação aos outros. O número cromossômico observado foi de  $2n = 14$  (12A + XY) e o DNAr 18S foi localizado em um único bivalente em posição intersticial para todos os grupos. As contagens dos meiócitos evidenciaram a predominância de espermatozoides em todos os lóbulos para todos os grupos e o comportamento meiótico foi considerado normal para todos eles, não sendo observadas quebras cromossômicas ou gametas com número diplóide desbalanceado. Os resultados indicam que a capacidade de resistência pode não estar associada a modificações morfológicas testiculares e alterações citogenéticas em nível cromossômico na espécie *E. heros*.

**Palavras-chave:** Percevejo. Resistência. Citogenética. Morfologia testicular. DNAr 18S.

GALLO, Raquel Bozini. **Morphological characterization of germinative tissues and meiotic behavior in populations of *euschistus heros* (heteroptera: pentatomidae) selected with tiametoxam and lambda-cialotrina.** 2016. 65p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### ABSTRACT

The brown stink bug *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) is one of the most important pest species occurring in Brazilian soybeans. Several insecticides-control strategies have been used to control this pest. However, continuous application and progressive doses contributed to the development of different resistance mechanisms that may be associated with chromosome changes. Nevertheless, the chromosomal behavior this specie remains unknown. The aim of this study was analyze the testicular morphology, cytogenetic profile and location of 18S ribosomal DNA (18S rDNA) in wild, susceptible and resistant populations of the *Euschistus heros* (*E. heros*). For this, 45 stink bug *E. heros* were divided into 3 groups ( $N = 15/\text{group}$ ): wild, susceptible and resistant. The histological analysis confirmed the presence of 6 testicle lobes in all groups, in which the 5<sup>th</sup> lobule was lower than others. The chromosome number observed was  $2n = 14$  (12A + XY) and the 18S rDNA located in a single bivalent in intercalary position for all groups. The counts of meiocytes showed a prevalence of sperms in all lobes for all groups. The meiotic behavior was considered normal for all groups, and was not observed chromosome breakage or gametes with unbalanced diploid number. The results indicate that the resistance capacity may not be associated with testicular morphological alterations, and cytogenetic changes at the chromosomal level in the species *E. heros*.

**Key words:** Stinky Bug. Resistance. Cytogenetics. Testicular morphology. 18S rDNA.

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1** – Testículo de *E. heros* recoberto externamente por uma bainha de tecido conjuntivo com coloração avermelhada. a - região distal (RD) menos pigmentada e região proximal (RP) do ducto ejacatório (DE), mais pigmentada. b - comprimento aproximado do testículo em escala real (2 mm) .....56
- Figura 2** – Cortes histológicos em testículos de *E. heros* suscetíveis (a, b, c, d) e resistentes (e, f, g, h), corados com Hematoxilina-Eosina. Corte transversal em testículos (a, e) evidenciando 6 lóbulos (LB1, LB2, LB3, LB4, LB5 e LB6). Note a menor espessura do 5º lóbulo. Separando os lóbulos, uma camada de tecido conjuntivo (TC) (b, c, d, f, g) e externamente a bainha peritoneal vermelha (BP) (a, b, e, f, g). Células císticas (cc1, cc2, cc3) contendo milhares de cistos espermatogoniais e cistos de espermátócitos (ci) em seu interior (b, f). Milhares de cistos de espermátócitos (ci) no interior das células císticas (cc) (c, d, g, h) .....57
- Figura 3** – Análise citogenética convencional dos diferentes estágios meióticos de *E. heros* selvagens e selecionados com tiametoxam + lambda-cialotrina. Grupo selvagem Parque Nacional do Iguaçu (a-d); Resistentes(e-h); Suscetíveis(i-l). Paquíteno (a, e, i); metáfase mitótica (b, f, j); metáfase I (c, g, k); metáfase II (d, h, l). As setas indicam os cromossomos sexuais durante o paquíteno. As letras X e Y correspondem aos cromossomos sexuais X e Y, respectivamente. Barra = 5µm .....58
- Figura 4** – Distribuição dos diferentes estágios meióticos no interior dos lóbulos testiculares nos grupos experimentais. Lóbulo 1 (a), lóbulo 2 (b), lóbulo 3 (c), lóbulo 4 (d), lóbulo 5 (e), lóbulo 6 (f) .....59
- Figura 5** – Localização do sítio de DNAr 18S em cromossomos de *E. heros* suscetíveis (a, b, c, d), resistentes (e, f, g, h) e selvagens (i, j, k, l). Em paquíteno (a, b, e, f, i, j) os cromossomos exibem duas marcações que correspondem ao bivalente autossômico. Algumas marcações apresentam evidente heteromorfismo de tamanho (a, b, c, e, f, g). Em metáfase I (c, g, k) os cromossomos exibem quatro marcações, que correspondem às quatro cromátides. Em metáfase II (d, h, l), é possível identificar duas marcações, isto é, uma em cada cromátide. As setas indicam os cromossomos sexuais. Barra = 5µm .....60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
<b>2.1 Importância agro-econômica dos pentatomídeos</b> .....	14
<b>2.2 Controle químico e resistência a inseticidas</b> .....	16
<b>2.3 Aspectos citogenéticos do percevejo marrom</b> .....	20
<b>2.4 Morfologia testicular</b> .....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	25
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1 Seleção das amostras e formação dos grupos</b> .....	26
<b>4.2 Criação dos insetos e preparação das amostras</b> .....	26
<b>4.3 Pressão de seleção e inseticida</b> .....	27
<b>4.4 Material biológico e preparações cromossômicas</b> .....	28
<b>4.5 Análises histológicas e inclusão de tecidos em historresina</b> .....	28
<b>4.6 Extração de DNA e caracterização do DNA ribossômico 18S</b> .....	28
<b>4.7 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)</b> .....	29
<b>4.8 Caracterização dos lóbulos testiculares</b> .....	30
<b>4.9 Aquisição e análise das imagens</b> .....	30
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>Capítulo 1- Artigo Científico</b> .....	36
<b>APÊNDICES</b> .....	62
<b>APÊNDICE A – Sequência consenso do fragmento de DNAr 18S contida no clone         pEh18S</b> .....	63
<b>APÊNDICE B – BLAST® Basic Local Alignment Search Tool</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização da agricultura e alimento das Nações Unidas [do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO)] o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. No entanto, grande parte da safra é perdida anualmente devido ao ataque de pentatomídeos pragas, incluindo o percevejo marrom da soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae). Esta espécie representa uma das principais pragas da lavoura de soja no Brasil (Sosa-Gómez e Silva 2010), sendo considerada a espécie de pentatomídeos mais amplamente distribuída nas latitudes brasileiras abaixo de 23° S (Panizzi e Niva 1994), que abrange desde o norte do Paraná até o centro-oeste do Brasil.

O percevejo marrom ataca a soja principalmente na fase reprodutiva da planta, prejudicando a formação das vagens e a maturação dos grãos. Atinge as sementes através da introdução do aparelho bucal nas vagens, tornando-as murchas e enrugadas, comprometendo o vigor e a qualidade dos grãos (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999). Diversas estratégias de controle por meio de inseticidas químicos têm sido utilizadas na tentativa de reduzir os prejuízos causados por esta espécie, no entanto, as contínuas aplicações e as progressivas doses contribuíram para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência em várias populações de *E. heros* (Sosa-Gómez et al. 2001, 2004, 2010) configurando assim, um grande problema para a agricultura nacional.

Estudos moleculares envolvendo insetos resistentes demonstraram que os mecanismos de resistência estão associados a alterações que ocorrem em relevantes famílias gênicas, promovendo alterações no perfil da expressão de genes, principalmente relacionados ao tegumento e ao revestimento do trato digestivo (Scott 1991; Zhu et al. 2013). No entanto, os exatos mecanismos morfológicos relacionados a estas características em *E. heros*, bem como os padrões citogenéticos e comportamento cromossômico permanecem desconhecidos. Logo,

as análises do comportamento meiótico e da morfologia dos órgãos reprodutores podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de resistência associados à ação de inseticidas.

O presente estudo investigou as possíveis alterações cromossômicas e histológicas em populações suscetíveis e resistentes de *E. heros*, por meio de quatro abordagens: (1) análises histológicas para a identificação de alterações causadas pelos inseticidas em tecidos germinativos do testículo; (2) análises citogenéticas para verificar o comportamento e a integridade dos cromossomos nos gametas; (3) análise da localização dos sítios de DNA repetitivo nos cromossomos, tal como a família gênica de DNA ribossômico 18S, através da técnica de hibridização *in situ*; e (4) caracterização da distribuição dos espermatócitos nos lóbulos testiculares. Portanto, este estudo destaca-se pela relevância biológica e econômica de se entender os possíveis mecanismos citogenéticos e morfológicos associados à resistência do percevejo marrom da soja e, assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias inovadoras para o amplo controle biológico desta praga.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Importância agro-econômica dos pentatomídeos

Os heterópteros são conhecidos popularmente como percevejos e sua distribuição geográfica estende-se por toda região tropical e subtropical do planeta (Schuh e Slater 1995). A subordem Heteroptera apresenta mais de 40.000 espécies descritas e é um dos grupos mais amplamente distribuídos de insetos (Weirauch e Schuh 2011). Além da importância biológica relacionada ao papel dos heterópteros na diversidade de espécies e no equilíbrio das populações, alguns heterópteros possuem destaque agrônomico por serem considerados pragas de lavouras (Kono 1989; Yamanaka 1990).

De acordo com a FAO, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2014/2015, a cultura da soja ocupou uma área aproximada de 31,5 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 95,07 milhões de toneladas de grãos (Embrapa soja 2015). No entanto, grande parte da safra é perdida anualmente devido ao ataque de percevejos pragas.

A família Pentatomidae apresenta as principais espécies de percevejos fitófagos que atacam as culturas agrícolas. Estes insetos são exclusivamente terrestres e podem se alimentar de raízes, frutos em desenvolvimento, sementes e até flores, no entanto, a maioria alimenta-se diretamente da seiva dos vasos condutores das plantas (Grazia et al. 1999). Indivíduos desta família, pertencentes aos gêneros *Euschistus*, *Nezara* e *Piezodorus*, possuem aparelho bucal especializado para o hábito fitófago e são exemplos de heterópteros que causam danos econômicos principalmente em lavouras de soja e de milho (Kono 1989; Yamanaka 1990). Estes percevejos são conhecidos popularmente como “maria-fedidas” ou “percevejos fedorentos”, dentre os quais destaca-se o percevejo marrom *Euschistus heros* (Figura 1) (Rebagliati et al. 2005; Sosa-Gómez et al. 2009), que representa uma das principais pragas da lavoura de soja no Brasil.

O percevejo marrom da soja, *Euschistus heros*, comparado às demais espécies de pentatomídeos é considerada a espécie mais amplamente distribuída nas latitudes brasileiras abaixo de 23° S (Panizzi e Niva 1994), que compreende desde o norte do Paraná até o centro-oeste do Brasil e pode ser encontrado em todos os maiores estados produtores de soja do país, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Sosa-Gómez et al. 2009).



**Figura 1.** Percevejo marrom *Euschistus heros* (Fonte: J. J. Silva)

Nas últimas duas décadas, tem sido relatado grande aumento da ocorrência deste percevejo, principalmente na região Sul do país, na qual sua distribuição não era tão abundante como outras espécies de pentatomídeos. Por exemplo, estudos realizados no campo de soja do Centro de Pesquisa da Embrapa-Soja em Londrina/PR, revelaram que as populações de *E. heros* aumentaram, em média, 12 vezes nos últimos 20 anos (Corso 1989, 2005). Logo, considerando sua alta prevalência e intensa dificuldade de controle, o percevejo marrom *E. heros* tem sido o principal alvo das aplicações de inseticidas químicos em campos de soja.

Os adultos de *E. heros* geralmente são marrons, apresentam 11 mm de comprimento e podem apresentar um ciclo de vida com longevidade aproximada de 116 dias (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999). A maturidade reprodutiva comumente é atingida por volta do 32º dia e a postura dos ovos ocorre principalmente nas folhas e nas vagens da planta, apresentando normalmente de 5 a 7 ovos por postura (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999). O tempo médio de incubação dos ovos é de 7 dias e o número de gerações anuais pode variar de 5 até 7 em regiões mais quentes (Cividanes e Parra 1994; Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999).

Estes insetos ocorrem nas lavouras de soja desde o início do desenvolvimento da planta, no entanto, começam a causar prejuízos na fase reprodutiva, quando se inicia a formação das vagens e a maturação dos grãos (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999; Nunes e Corrêa-Ferreira 2002). É neste período que os percevejos passam a se alimentar das vagens e sementes, alterando o teor de proteína e óleos afetando, conseqüentemente, o vigor e a qualidade dos grãos (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999; Nunes e Corrêa-Ferreira 2002). Além disso, os percevejos podem favorecer o desenvolvimento de fungos oportunistas e causar distúrbios fisiológicos, como a retenção foliar da soja (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999).

Diversas estratégias de controle por meio de inseticidas químicos têm sido utilizadas na tentativa de reduzir os prejuízos causados por esta espécie, no entanto, as contínuas aplicações e as progressivas doses contribuíram para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência em várias populações de *E. heros* (Sosa-Gómez et al. 2001, 2004, 2009, 2010) configurando assim, um grande problema para a agricultura nacional.

## **2.2 Controle químico e resistência a inseticidas**

O controle das populações de percevejos é extensivamente empregado nas plantações de soja do Brasil, principalmente nas lavouras que apresentam centenas de hectares. Comumente, o controle é realizado por meio da aplicação de inseticidas químicos (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999; Sosa-Gómez et al. 2001; Musser e Catchot 2008; Brown et al. 2012).

A partir de 1960, com a expansão do cultivo da soja no Brasil houve um aumento significativo na utilização de inseticidas químicos para o controle de percevejos pragas. Até o ano de 2004, as populações de *Euschistus heros* eram exclusivamente controladas com inseticidas não-seletivos que pertencem a dois grupos químicos principais: (1) os organofosforados (OPs) inibidores da enzima acetilcolinesterase e (2) endossulfam (ciclodienos) que atuam como antagonistas dos canais de cloro (Cl<sup>-</sup>) mediadas por GABA (ácido g-aminobutírico), impedindo a entrada do Cl<sup>-</sup> nas células nervosas, levando a paralisação e morte do percevejo (Omoto 2000; Sosa-Gómez et al. 2010).

Após 2004, outros grupos químicos, como os piretróides e neonicotinóides (inseticidas sistêmicos de contato e ingestão) foram majoritariamente empregados no controle desta praga. Nesta ocasião, foram desenvolvidas as primeiras misturas entre neonicotinóides (imidacloprido) e piretróides (beta-ciflutrina) e, em 2005, uma nova mistura de tiametoxam mais lambda-cialotrina passou a ser majoritariamente empregada (Sosa-Gómez e Silva 2010).

Inseticidas obtidos a partir da combinação de químicos dos grupos piretróides e neonicotinóides são a base para o controle de percevejos na atualidade. No entanto, a ineficiência causada pelo uso progressivo e contínuo de agrotóxicos ao longo dos anos, torna o controle de percevejos uma difícil tarefa (Sosa-Gómez et al. 2001; Romero 2007; Sosa-Gómez et al. 2010). Este fato resulta na necessidade de se utilizar grandes quantidades e diferentes combinações de inseticidas para o controle eficiente das populações de *E. heros*. Todavia, esta típica prática pode contribuir para a seleção de populações de insetos resistentes (Sosa-Gómez et al. 2001, 2009, 2010), além de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (Sosa-Gómez e Silva 2010).

Os primeiros problemas de ineficiência no controle do percevejo marrom da soja ocorreram no início da década de 1990. Na ocasião, as falhas no controle em muitas lavouras foram atribuídas a problemas de formulação do inseticida endossulfam, que era o inseticida

mais utilizado na época. Entretanto, um estudo realizado por Sosa-Gómez et al. (2001) que avaliou a ação de diferentes inseticidas sobre populações geograficamente distantes de percevejos marrom, relataram pela primeira vez que o percevejo *Euschistus heros* havia se tornado resistente aos inseticidas.

Sosa-Gómez et al. (2009) conduziram um estudo de dose mortalidade em *E. heros* coletados em campo, de populações das regiões Central, Sudeste e Sul do Brasil, para avaliar a suscetibilidade aos inseticidas acefato, metamidofós e endossulfan. A atividade da enzima esterase também foi avaliada entre as populações, pelo fato desta enzima estar relacionada com o mecanismo de desintoxicação metabólica e resistência aos organofosforados. Nos bioensaios de dose-mortalidade, houve variação significativa na suscetibilidade aos inseticidas acefato e endossulfan entre as populações. A população de percevejos de Londrina (Centro de Pesquisa Embrapa-Soja – Norte do Paraná) foi uma das mais suscetíveis, com alto índice de mortalidade, enquanto que a população de Pedrinhas Paulista (sudoeste do Estado de São Paulo) apresentou menor suscetibilidade, com baixo índice de mortalidade. Foi observada uma variação significativa entre as populações quanto a atividade de esterases, onde a população de Pedrinhas Paulista obteve os mais altos níveis de esterases enquanto a população de Londrina obteve os níveis mais baixos. Esta diferença na suscetibilidade entre as populações pode estar relacionada ao fato deste percevejo apresentar limitada capacidade de dispersão, sugerindo que as populações geograficamente distantes podem estar expostas a diferentes fatores e concentrações de agrotóxicos (Sosa-Gómez et al. 2004, 2009). Como consequência, populações de diferentes regiões podem apresentar distintos níveis de suscetibilidade e resistência, de acordo com a condição a qual estão expostas.

A resistência a químicos é um fenômeno amplamente observado em centenas de espécies de importância médica, urbana e agrícola (Sosa-Gómez et al. 2010; Zhu et al. 2013; Gordon et al. 2014), e tem sido considerada uma das principais razões para a elevada

prevalência destas espécies ao longo dos anos. A resistência pode ser definida como o desenvolvimento da habilidade de um organismo, em tolerar doses de um produto tóxico, que normalmente seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população de uma mesma espécie (Who, 1957 *apud* Liu et al. 2006).

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à resistência a inseticidas podem evoluir ao longo do tempo (McKenzie 1996; Liu et al. 2006) de diferentes maneiras. Ao interagir com o inseticida, o organismo pode desenvolver resistência graças a modificações na cutícula do tegumento ou no revestimento do trato digestivo, que impedem ou reduzem a penetração dos inseticidas (Scott 1991; Zhu et al. 2013). Logo que o inseticida entra no organismo, mecanismos de desintoxicação começam a atuar diminuindo a concentração de inseticidas antes mesmo de atingirem os sítios alvos (Scott 1991; Mckenzie 1996; Liu et al. 2006). Em alguns casos, o inseticida pode ser excretado do organismo em taxas extremamente aceleradas em populações resistentes (Argentine 1994).

Insetos resistentes também podem desenvolver mecanismos de insensibilidade ao sítio alvo, reduzindo ou eliminando a afinidade de ligação entre o inseticida e suas proteínas alvo (Liu et al. 2006; Dong 2007). Um fenômeno comum presente em várias classes de insetos resistentes é a existência de múltiplos mecanismos que operam simultaneamente (Liu e Pridgeon 2002; Xu et al. 2005; Zhu et al. 2013). Tipicamente, uma combinação de diversos mecanismos fornece níveis significativamente maiores de resistência do que um mecanismo atuando isoladamente (Scott 1991; Zhu et al. 2013).

Zhu et al. (2013) realizaram um estudo com populações de percevejos-da-cama, *Cimex lectularius* (espécie hematófaga de grande importância médica) suscetíveis e resistentes à piretróides. A partir da técnica de *RNA-seq* e pela análise do transcriptoma, os pesquisadores encontraram 14 marcadores moleculares associados à resistência aos inseticidas piretróides. Esses marcadores foram testados e validados por RT-PCRq. O estudo revelou que a maioria

dos genes associados à resistência são altamente expressos na camada epidérmica do tegumento, a qual poderia impedir ou diminuir a ação do inseticida antes mesmo de atingir o sítio alvo no interior das células, onde é possível a existência de uma camada adicional de proteção.

Portanto, estudos sobre as bases moleculares e morfológicas destas características adaptativas são de suma importância para a compreensão da evolução dos mecanismos de resistência e para a elaboração de estratégias sustentáveis e eficazes para o controle biológico de pragas resistentes (Ffrench-Constant et al. 2004).

### **2.3 Aspectos citogenéticos do percevejo marrom**

Uma das características citogenéticas mais marcantes da subordem Heteroptera é a presença de cromossomos holocêntricos, também chamados holocinéticos. Diferente dos cromossomos monocêntricos (que apresentam um único centrômero), os cromossomos holocêntricos não apresentam constrição primária e a organização do cinetócoro é difusa e ocorre ao longo de todo o cromossomo (Guerra et al. 2010; Melters 2012). Este tipo de cromossomo parece tolerar mais facilmente eventos de quebra e fusão cromossômica, pois permitem que os possíveis fragmentos cromossômicos gerados por quebras permaneçam viáveis em divisões celulares posteriores, aumentando assim, a chance de variação cromossômica numérica (Hughes-Schrader 1961; Melters 2012).

Cromossomos holocêntricos não ocorrem exclusivamente nos heterópteros, mas foram observados também em outras ordens de insetos, aracnídeos, nematóides e em algumas plantas (Melters, 2012). Os organismos que apresentam cromossomos holocêntricos, comumente apresentam comportamento meiótico diferenciado para os bivalentes autossômicos e cromossomos sexuais. Durante a meiose, os cromossomos sexuais são identificados a partir dos primeiros estágios da prófase, porque são positivamente heteropicnóticos. Durante a metáfase I, os bivalentes autossômicos se organizam em círculo

com os univalentes sexuais em seu centro. Os cromossomos sexuais se posicionam lado a lado e segregam como se fossem cromátides irmãs na anáfase I. Portanto, a primeira divisão meiótica é reducional apenas para os cromossomos autossomos, enquanto é equacional para os sexuais. Na metáfase II os cromossomos autossomos dispõem-se na periferia do eixo, enquanto os sexuais formam um pseudo-bivalente. Na anáfase II, X e Y segregam para pólos opostos, ou seja, a segunda divisão é reducional para os cromossomos sexuais (Melters, 2012).

O percevejo *Euschistus heros* apresenta número diplóide igual a 14 ( $2n = 12A + XY$ ) e sistema cromossômico sexual simples (XY/XX) (Rebagliati et al. 2005) e, até o momento, o comportamento meiótico típico para cromossomos holocêntricos tem sido relatado para esta espécie (Souza e Itoyama, 2010). Dentro da família Pentatomidae são relatadas variações no número cromossômico entre as diferentes espécies, que pode variar de  $2n = 6$  a  $2n = 27$ , no entanto, 85% das espécies até o momento analisadas apresentam  $2n = 14$  (Rebagliati et al. 2005). Em relação aos sistemas de determinação sexual, 86,1% dos heterópteros apresentam sistema de determinação sexual cromossômico simples (Papeschi e Bressa, 2006).

Um importante marcador cromossômico é a família multigênica de DNA ribossômico (DNAr) 45S, que tem sido amplamente utilizada para estudos de diferenciação cariotípica em animais (Cabral-de-Mello et al. 2011; Bardella et al. 2013; Bueno et al. 2013). O DNAr 45S está organizado no genoma em múltiplas cópias repetidas em *tandem*, o qual é formado pelos genes que transcrevem o RNA ribossômico 28S, 5,8S e 18S. Cada uma destas sequências é separada uma da outra por espaçadores transcritos internos (ITS) e cada cluster de DNAr 45S é separado por espaçadores transcritos externos (ETS) e por espaçadores intergênicos (IGS) (Long e Dawid 1980; Alves-Costa et al. 2006; López-Flores e Garrido-Ramos 2012). A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), aplicada em cromossomos de animais e

plantas, permite a localização e o mapeamento de seqüências específicas de DNA nos cromossomos, como por exemplo, a localização dos sítios de DNA ribossômico (Cabral-de-Mello et al. 2011; Bueno et al. 2013). Com o entendimento da distribuição e localização destes marcadores ribossômicos é possível, também, estabelecer análises comparativas entre indivíduos de espécies iguais ou distintas, elucidar a organização do genoma e identificar possíveis rearranjos cromossômicos (Cabral-de-Mello et al. 2011; Bueno et al. 2013).

O DNA ribossômico 45S comumente localiza-se em posições subterminais nos cromossomos de insetos. Bueno et al. (2013), investigaram a localização dos sítios de DNA ribossômico 18S em gafanhotos da espécie *Abracris flavolineata* e relataram uma ampla distribuição deste DNAr entre os cromossomos e todas as marcações foram terminais. Para *Euschistus heros* foi relatado que o sinal de hibridização do DNA ribossômico 18S encontra-se em posição intersticial em apenas um par de bivalentes autossômicos (Bardella et al. 2013). Estes dados são muito interessantes porque apenas outras duas espécies da família Pentatomidae exibem sinais de DNAr 18S em posição intersticial: *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Papeschi et al. 2003) e *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Grozeva et al. 2011).

Considerando a problemática da resistência aos inseticidas e o impacto agro-econômico de *E. heros* para a cultura da soja, os estudos citogenéticos convencionais e moleculares, como o isolamento e a localização de DNAs ribossômicos, podem contribuir para esclarecer os mecanismos de ação desses inseticidas no genoma desta espécie.

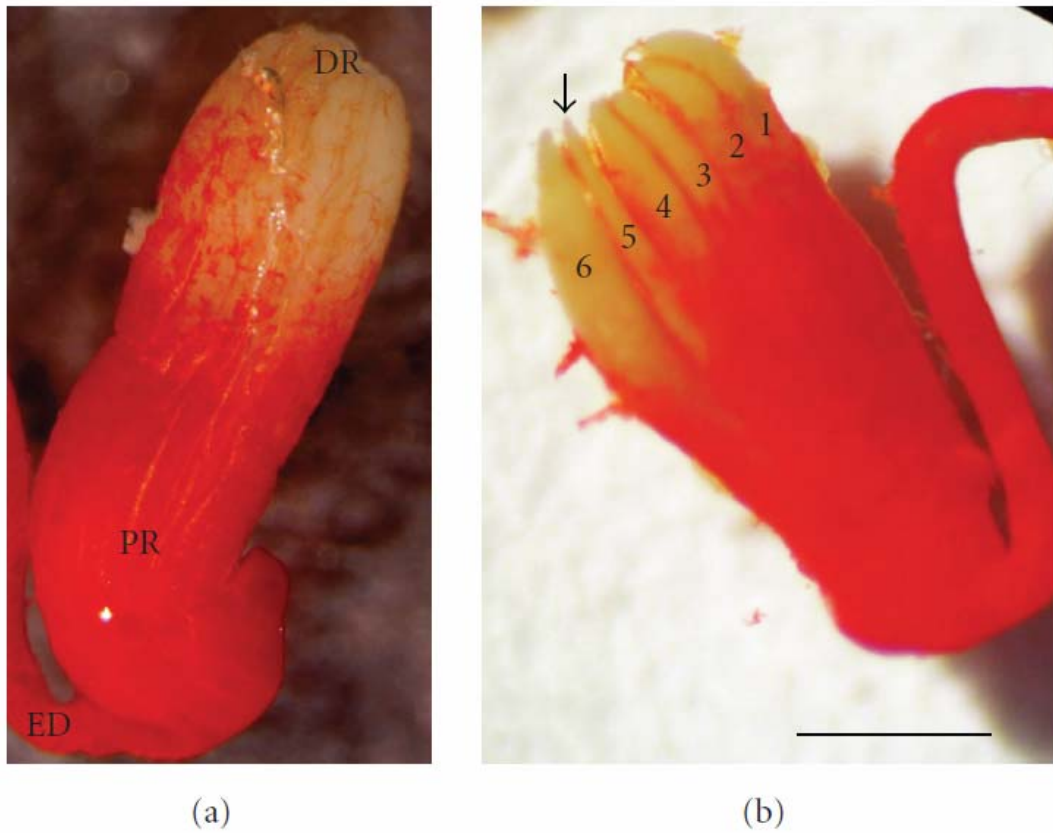
#### **2.4 Morfologia testicular**

A presença de testículos formados por um número variável de lóbulos é uma característica dos heterópteros (Souza e Itoyama, 2010). Os testículos de *Euschistus heros* possuem 6 lóbulos e são externamente delimitados por uma capsúla conjuntiva (bainha peritoneal) de coloração avermelhada. Apresentam uma região distal (DR), menos pigmentada, na qual se concentram maior número de espermátócitos e uma região proximal

(PR), mais intensamente pigmentada, que se conecta ao ducto ejaculatório (ED), onde prevalece a ocorrência de espermatozóides maduros (Figura 2).

Algumas espécies da família Pentatomidae apresentam um lóbulo testicular diferente dos demais, classificado como harlequim. Comumente, no interior deste lóbulo atípico são encontrados espermatozóides heteromórficos e inférteis (Souza e Itoyama, 2010). Todavia, a existência destes espermatozoides, pode estar relacionada ao fornecimento adicional de nutrientes, especialmente nucleoproteínas para o desenvolvimento de ovos (Schrader 1960a, 1960b *apud* Souza e Itoyama, 2010).

Souza e Itoyama (2010) relataram que o 5º lóbulo de *Euschistus heros* apresentou-se mais estreito em relação aos demais. Os autores mensuraram o diâmetro de 100 células e seus respectivos núcleos em fase de paquíteno (prófase I) e 100 células espermáticas de cada lóbulo testicular, escolhidas aleatoriamente. O diâmetro das células nos lóbulos 1, 2 e 3 foi estatisticamente menor comparado ao diâmetro das células do lóbulo 5, que por sua vez, apresentou células menores do que as células nos lóbulos 4 e 6. Estes dados sugerem que as diferenças morfológicas (ex: tamanho) entre os lóbulos de um mesmo testículo, podem resultar na formação de gametas heterogêneos em *E. heros*. Dessa forma, conhecer a estrutura desse tecido é extremamente importante para compreender a organização dos gametas, bem como elucidar mecanismos envolvidos com a reprodução nesse interessante grupo de insetos.



**Figura 2.** Testículos de *Euschistus heros* envoltos externamente por uma túnica vermelha. Região proximal (PR) do ducto ejaculatório (ED) mais intensamente pigmentada do que a região distal (DR) (a). Observe em (b) a presença de 6 lóbulos alongados, aproximadamente com o mesmo comprimento, exceto pelo lóbulo 5, que apresenta-se mais estreito (seta) Bar = 1mm. (Foto: Souza e Itoyama, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Considerando a importância agro-econômica de *Euschistus heros* na cultura da soja e a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito da resistência e suscetibilidade deste percevejo, esse trabalho tem por objetivo geral uma análise integrada de dados morfológicos e cito-moleculares para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência nessa espécie.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- (1) Caracterizar morfológicamente os testículos de percevejos selvagens, e selecionados (resistentes e suscetíveis) com o inseticida tiametoxam+lambda-cialotrina;
- (2) Avaliar o perfil morfológico e a integridade do tecido testicular, a partir de técnicas histológicas;
- (3) Analisar o comportamento meiótico dos cromossomos;
- (4) Verificar a frequência dos espermátocitos (em diferentes estágios meióticos) nos lóbulos testiculares em todos os grupos;
- (5) Isolar, seqüenciar e localizar nos cromossomos os sítios de DNA ribossômico 18S.
- (6) Comparar os dados obtidos com os existentes na literatura, a fim de elucidar possíveis alterações à ocorrência de resistência na espécie.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção das amostras e formação dos grupos

Para este estudo, foram utilizados percevejos machos (adultos) selvagens ( $N=15$ ) e selecionados em laboratório: linhagem resistente ( $N=15$ ) e linhagem suscetível ( $N=15$ ). Os percevejos selvagens foram coletados na base de estudos do Parque nacional do Iguaçu (Foz do Iguaçu), enquanto que os percevejos resistentes e suscetíveis foram pré-selecionados em laboratório pela Embrapa Soja - Londrina/Paraná. Os percevejos foram tratados com o inseticida Engeo Pleno® (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) que possui em sua composição a mistura de dois ingredientes ativos: tiametoxam e lambda-cialotrina, durante 14 gerações consecutivas e divididos em dois grupos: resistentes e suscetíveis, por meio de testes enzimáticos e ensaios de dose-mortalidade estipulados por Husch e Sosa-Gómez (2014).

### 4.2 Criação dos insetos e preparação das amostras

Os percevejos adultos de *Euschistus heros* foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes e Entomopatógenos da Embrapa Soja (CNPSO) de Londrina-Paraná, Brasil.

A criação de percevejos *Euschistus heros* em laboratório teve início a partir de indivíduos coletados em campos de soja de diversos municípios do Estado do Paraná, São Paulo e Goiás. Os percevejos foram mantidos em câmaras climatizadas com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, de acordo com os protocolos definidos por Corrêa-Ferreira e Panizzi (1999). Os percevejos adultos de *E. heros* foram mantidos em sala de criação com temperatura controlada sob  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ( $60 \text{ U.R.} \pm 10\%$ ) e fotoperíodo de 14h, em recipientes plásticos (19cm x 22cm x 26cm) de aproximadamente 8 Litros. Para a alimentação dos insetos foram utilizados grãos de soja (*Glycine Max*), vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.). O recipiente foi recoberto por uma tampa

plástica contendo uma tela de malha fina para permitir a aeração. Após a postura, os ovos foram recolhidos e colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro e acondicionadas em câmaras do tipo B.O.D., sob as mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo citadas anteriormente. A partir do segundo estágio de desenvolvimento, as ninfas foram transferidas para os recipientes plásticos, contendo a mesma dieta alimentar dos adultos. A manutenção e o tratamento dos percevejos foram realizados pela Embrapa, três vezes por semana, para evitar a proliferação de fungos (Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999; Panizzi et al. 2000; Meiga et al. 2007).

#### **4.3 Pressão de seleção e inseticida**

Para a seleção de linhagens resistentes e suscetíveis foram realizados bioensaios periódicos utilizando o inseticida Engeo™ Pleno®. Este inseticida pertence ao grupo químico dos neonicotinóides e piretróides (Tiametoxam + Lambda Cialotrina), sendo classificado como inseticida sistêmico de contato e ingestão. Todos os bioensaios foram realizados pela Embrapa-soja, por Husch e Sosa-Gómez (2014).

Para realizar os bioensaios e discriminar a resposta de suscetibilidade foi estabelecida a suspensão comercial, contendo a mistura de tiametoxam ( $141 \text{ g.L}^{-1}$ ) + lambda-cialotrina ( $106 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Engeo™ Pleno®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.), de acordo com Sosa-Gómez et al. (2011). Cada percevejo adulto foi tratado com  $2 \mu\text{L}$  da mistura ( $0,0846 \mu\text{g}$  de tiametoxam +  $0,0636 \mu\text{g}$  de lambda-cialotrina) topicamente no pronoto (primeiro segmento do tórax do percevejo), com o auxílio de um microaplicador (Burkard Manufacturing Co. Ltd. Rickmansworth, Hertfordshire, WD31PJ, England). Após tratamento, os percevejos foram mantidos em frascos esterilizados com condições de umidade, temperatura e fotoperíodo controlados (Sosa-Gómez e Silva, 2010). A mortalidade foi avaliada após 48h. Os insetos foram considerados mortos quando houve ausência de movimento ao serem pressionados com a pinça entomológica. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Henderson e

Tilton (1955) e comparados pelo teste de Dunn ( $P < 0.05$ ), utilizando-se para as análises o programa Sigmaplot para Windows 11.0 ([www.systat.com](http://www.systat.com)).

#### **4.4 Material biológico e preparações cromossômicas**

Os insetos machos, de todos os grupos, foram conduzidos ao laboratório de citogenética animal (LACA) da Universidade Estadual de Londrina, onde foram pesados e imediatamente eutanasiados para obtenção dos testículos, que foram dissecados e fixados em solução de metanol e ácido acético (3:1), e armazenados em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises. Para a confecção das lâminas, o material foi incubado em ácido acético 45% por, aproximadamente, 20 minutos e submetido à técnica de esmagamento. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secaram ao ar. Após a preparação, as lâminas foram coradas com Giemsa 4%.

#### **4.5 Análises histológicas e inclusão de tecidos em historresina**

Amostras testiculares ( $N=4$ ) de percevejos selvagens e selecionados (suscetíveis e resistentes) foram coletadas e imediatamente fixadas em karnovsky. Após a fixação, os tecidos foram mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão e do processamento. As amostras foram incluídas em historresina Leica® para posterior análise morfológica. Cortes histológicos ( $3\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo e corados com Hematoxilina-Eosina (H.E), segundo o protocolo descrito por Bancroft e Steven (1996).

#### **4.6 Extração de DNA e caracterização do DNA ribossômico 18S**

Para a extração de DNA e caracterização do DNA ribossômico 18S foi selecionado um percevejo adulto de *Euschistus heros* selvagem, proveniente do Parque Nacional do Iguaçu. Este local foi escolhido por ser uma região de preservação ambiental, possibilitando, assim, a coleta de exemplares livres da ação de inseticidas.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo fenol/clorofórmio. O DNAr 18S foi amplificado utilizando os primers 18S Forward 5' CCTGAGAAACGGC TACCACATC-3' e 18S Reverse 5'- GAGTCTCGTTCGTTATCGGA-3', relatado por Whiting et al. (2002). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para um volume final de 25µL, contendo 1µL (100ng) de DNA da amostra, 1µL de cada primer (100mM) e 12,5µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega). O programa da PCR consiste em um primeiro passo a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um passo final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram clonados utilizando o Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) com células competentes de *E. coli* TOP 10, seguindo as especificações do fabricante. Todas as clonagens foram realizadas em triplicata. Os clones selecionados foram sequenciados por seqüenciador automático 3500xL (Applied Biosystems). A limpeza, a determinação da qualidade das seqüências e a construção dos contigs foram realizadas pelo software Phred-Phrap Consed. As seqüências consensos foram submetidas aos programas (1) CENSOR para procura de elementos de DNAs móveis (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) e (2) RepeatMasker para busca de classes de DNA repetitivo (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) e comparada com outras seqüências depositadas no banco de dados do GenBank através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

#### **4.7 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)**

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada segundo o protocolo de Pinkel et al. (1986) em, pelo menos, 2 indivíduos de cada grupo: selvagem, resistente e suscetível. O clone selecionado, p*Eh*18S, contendo a seqüência parcial do rDNA 18S foi marcado com digoxigenina-11dUTP por *nick translation* (Dignick translation Roche).

As lâminas foram tratadas com 50µL do Mix de hibridação contendo 7,5µL da sonda marcada, 30µL formamida 50%, 12µL polyethylene glycol 50%, 16µL 20× SSC. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em formamida 70%, a 70°C por 4 minutos em banho-maria. A hibridização ocorreu overnight por 16 h a 37°C em câmara úmida. Para detecção do sinal, foi utilizado 1µL de anti-digoxigenina rodamina em 49µL BSA 5%. Após as lavagens pós-deteção, cada lâmina foi montada com meio de montagem contendo 25µL de DABCO, 3µL de DAPI e 3µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM).

#### **4.8 Caracterização dos lóbulos testiculares**

Para a caracterização dos lóbulos testiculares, foi avaliada a frequência das células espermáticas em diferentes estágios meióticos no interior de cada lóbulo do testículo. Para tanto, foi selecionado um exemplar adulto de cada grupo ( $N=1$ ), o qual teve um único testículo retirado. Cada lóbulo testicular foi individualmente dissecado e submetido à técnica de esmagamento em lâmina para obtenção das células espermáticas. Foi realizada a contagem de aproximadamente 1000 células (em diferentes estágios meióticos) por lóbulo testicular de cada grupo, totalizando 6000 células por testículo.

#### **4.9 Aquisição e análise das imagens**

As lâminas submetidas à coloração convencional com Giemsa 4% e a hibridização *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300FX e software Motic Images Plus 3.2. As imagens dos cromossomos foram adquiridas separadamente em filtros específicos para cada fluoróforo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves-Costa FA, Wasko APOC, Foresti F, Martins C. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica* 127: 234-252, 2006.
2. Argentine JA, Zhu KY, Lee SH, Clark JM. Biochemical-Mechanisms of Azinphosmethyl Resistance in Isogenic Strains of Colorado Potato Beetle. *Pestic Biochem Physiol* 48:63–78, 1994.
3. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practices of histological techniques. Churchill Livingstone, 4: 166, 1996.
4. Bardella VB, Fernandes T, Vanzela ALL. The conservation of number and location of 18S sites indicates the relative stability of rDNA in species of Pentatomomorpha (Heteroptera). *Genome* 56: 425-429, 2013.
5. Brown SA, Davis JA, Richter AR. Efficacy of foliar insecticides on eggs of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist* 95:1182-1186, 2012.
6. Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PLoS ONE* 8: e66532, 2013.
7. Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, Moura RC, Martins C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics* 12: 88, 2011.
8. Cividanes FJ, Parra JRP. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja no Brasil. *An. Soc Entomol Brasil* 23: 219-226, 1994.
9. Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas J, Cassis G, Gray MR. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46: 419–437, 1998.
10. Corrêa-Ferreira BS, Panizzi AR. Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: Embrapa Soja, 45p. (Circular Técnica N° 24), 1999.

11. Corso IC. Controle químico de percevejos que atacam soja, pp. 27-32. *In* Resultados de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, Embrapa- Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil, 1989.
12. Corso IC. Avaliação da eficiência de diferentes doses de inseticidas no controle de percevejo marrom, *Euschistus heros*, pp. 133-134. *In* Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2005, Londrina, PR. Embrapa- Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil, 2005.
13. Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 7: 17–30, 2007.
14. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Dados econômicos 2015 – soja em números. Disponível em <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>
15. Ffrench-Constant RH, Dabon PJ, Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* 20: 163–70, 2004.
16. Grazia J, Fortes NDF, Campos LA. Superfamília Pentatomoidea. *In*: Brandão CRF, Cancellato EM. Invertebrados Terrestres: biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XXI. São Paulo: FAPESP, p. 101-112, 1999.
17. Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA. Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)<sub>n</sub> repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* 5: 355-374, 2011.
18. Guerra M, Cabral G, Cuacos M, Conzalez-Garcia M, Gonzalez-Sanches M, Vega J, Puertas MJ. Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 82-96, 2010.
19. Henderson CF, Tilton EW. Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology*, 48: 157-161, 1955.
20. Hughes-Schrader S, Schrader F. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350, 1961.
21. Husch PE e Sosa-Gómez DR. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Euschistus heros* a tiametoxam + lambdacialotrina e acefato. Resumos expandidos da XXXIV Reunião de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, Londrina, 78-80, 2014.

22. Kono S. Analysis of soybean seed injuries caused by three species of stink bugs. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 33: 128-133, 1989.
23. Liu NN, Pridgeon JW. Metabolic detoxication and the kdr mutation in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 73: 157–163, 2002.
24. Liu NN, Zhu F, Xu Q, Pridgeon JW, Gao XW. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. *Acta Entomologica Sinica* 49 (4): 671-679, 2006.
25. Long EO, Dawid IB. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 727-764, 1980.
26. López-Flores I, Garrido-Ramos MM. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 7:1-28, 2012.
27. McKenzie JA. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Academic Press, Austin, 1996.
28. Meiga AYY, Siqueira F, Panizzi AR. Aprimoramento de dieta artificial seca para a criação de percevejos fitófagos em laboratório. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. Anais...[S.I.]: Sociedade de ecologia do Brasil, p.1-2, 2007.
29. Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* 20: 579-593, 2012.
30. Musser FR, Catchot A. Mississippi soybean insect losses. *Midsouth Entomology* 1:29-36, 2008.
31. Nunes MC, Corrêa-Ferreira BS. Desempenho alimentar e sobrevivência de *Euschistus heros* parasitado por *Hexacladia smithii* em sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1219-1223, 2002.
32. Omoto C. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: Guedes JC, da Costa ID, Castiglioni E. Bases técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM, p. 248, 2000.
33. Panizzi AR, Niva CC. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. *Pesq Agropec Bras* 29: 509-511, 1994.

34. Panizzi AR, Parra JRP, Santos CH, Carvalho DR. Rearing the southern green stink bug using artificial dry diet and artificial plant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 1709-1715, 2000.
35. Papeschi AG, Mola LM, Bressa MJ, Greizerstein EJ, Lía V, Poggio L. Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Research* 11: 725–733, 2003.
36. Papeschi AG, Bressa MJ. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *Journal of Biological Research* 5: 3-21, 2006.
37. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938, 1986.
38. Rebagliati PJ, Mola LM, Papeschi AG, Grazia J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43: 199-213, 2005.
39. Romero A, Potter MF, Potter DA, Haynes KF. Insecticide resistance in the bed bug: a factor in the pest's sudden resurgence. *J Med Entomol* 44: 175–8, 2007.
40. Schrader F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). *Chromosoma*, 11(1) 103–128, 1960.
41. Schrader F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). *Evolution*, 14: 498–508, 1960.
42. Schuh RT, Slater JA. *True Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history*. Ithaca, NY: Cornell Univ. Press, 1995.
43. Scott JG. *Handbook of Pest Management in Agriculture*. (ed. Pimentel D.) 663 (CRC Press, Boca Raton), 1991.
44. Sosa-Gómez DR, Corso IC, Morales L. Inseticide resistance to endossulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (Fabr.) *Neotropical Entomology* 30: 317-320, 2001.

45. Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Almeida AMR, Hirose E. Genetic Differentiation among Brazilian Populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) Based on RAPD Analysis. *Neotropical Entomology*, 33: 179-187, 2004.
46. Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Lopes IO, Corso IC, Almeida AM, Moraes GC, Baur ME. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 102: 1209-1216, 2009.
47. Sosa-Gómez DR, Silva JJ. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 45: 767-769, 2010.
48. Sosa-Gómez DR, Takachi MT, Almeida AMR. Variabilidade de resposta de subpopulações de *Euschistus heros* (F.) a mistura de tiametoxam e lambda cialotrina. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 32, São Pedro, São Paulo, Resumos expandidos. Londrina: Embrapa, p. 80-81, 2011.
49. Souza HV, Itoyama MM. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche: A journal of Entomology*. Article ID 428673, 10 pages doi:10.1155/2010/428673, 2010.
50. Weirauch C, Schuh T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. *Annu Rev Entomol* 56: 487–510, 2011.
51. Whiting MF. Phylogeny of the holometabolous insect 293 orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta*, 31(1): 3-15, 2002.
52. Xu Q, Liu H, Zhang L, Liu N. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pest Manag Sci* 61: 1096–1102, 2005.
53. Yamanaka M, Takemoto H, Takasaki T. The annual fluctuation of the rate of damaged seeds by several pod feeders and seasonal occurrence of three species of stink bugs in autumn soybean. *Bull Fukuoka Agriculture Research Center*, 10: 47-52, 1990.
54. Zhu F, Gujar H, Gordon JR, Haynes KF, Potter MF, Palli SR. Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Scientific Reports* 3: 1456, 2013.

## **Capítulo 1- Artigo Científico**

**Caracterização morfológica de tecidos germinativos e comportamento meiótico em populações de *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) selecionadas com tiametoxam e lambda-cialotrina**

Esse artigo será submetido ao periódico Agricultural and Forest Entomology

## **Caracterização morfológica de tecidos germinativos e comportamento meiótico em populações de *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) selecionadas com tiametoxam e lambda-cialotrina**

Rachel Colauto Milanezi Aguiar<sup>1</sup>, Patrícia Elizabeth Husch<sup>4</sup>, Raquel Bozini Gallo<sup>1</sup>, Sheila Michele Levy<sup>3</sup>, Laurival Antônio Vilas-Bôas<sup>2</sup>, Daniel Ricardo Sosa-Gómez<sup>4</sup>, Renata da Rosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Animal (LACA), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Bioinformática, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Insetos, Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa de Soja (EMBRAPA/CNPSO), Londrina, Paraná, Brasil.

**Autor de correspondência:** Renata da Rosa ✉

Laboratório de Citogenética Animal (LACA), Universidade Estadual de Londrina (UEL).  
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 350, Campus Universitário, Caixa Postal: 10.011,  
CEP: 86.057-970, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 3371 4417 (Departamento) +55 43  
3371 5504 (Laboratório). Email: renata-darosa@uel.br

**Resumo**

*Euschistus heros* é uma das espécies pragas mais importantes que ocorrem nas lavouras de soja do Brasil. Diversas estratégias de controle por meio de inseticidas químicos têm sido utilizadas, no entanto, as contínuas aplicações e as progressivas doses empregadas contribuíram para a seleção de diferentes mecanismos de resistência. Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento meiótico dessa espécie e se alterações cromossômicas e morfológicas testiculares estão relacionadas à condição de resistência. Logo, o objetivo deste estudo foi analisar a morfologia testicular, o perfil citogenético dos meiócitos e a localização do DNA ribossômico 18S (DNAr 18S) em grupos selvagens e selecionados (suscetíveis e resistentes) com o inseticida Engeo Pleno, de percevejos *Euschistus heros* (*E. heros*), para identificação de possíveis alterações morfológicas e cromossômicas. Para tanto, 45 exemplares de *E. heros* foram divididos em 3 grupos ( $N = 15/\text{grupo}$ ): selvagens, suscetíveis e resistentes. As análises histológicas confirmaram a presença de 6 lóbulos testiculares em todos os grupos, sendo o 5º lóbulo menor em relação aos outros. O número cromossômico observado foi de  $2n = 14$  (12A + XY), não sendo evidenciadas alterações nas divisões meióticas ou quebras cromossômicas. O DNAr 18S foi localizado em um único bivalente autossômico em posição intersticial para todos os grupos, sendo observado heteromorfismo de tamanho nesses sítios. As contagens dos meiócitos evidenciaram a predominância de espermatozoides em todos os lóbulos para todos os grupos. Os resultados indicam que a capacidade de resistência, possivelmente, não está associada a modificações morfológicas testiculares e alterações citogenéticas em nível cromossômico em *E. heros*. A análise conjunta de diferentes ferramentas permitiu concluir que não houve alteração na reprodução dos machos na formação dos gametas para ambas linhagens resistentes e suscetíveis.

**Palavras-chave:** Percevejo marrom, Resistência, Citogenética, Morfologia testicular, DNAr 18S.

## Introdução

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) é uma das espécies pragas mais recorrentes nas lavouras de soja do Brasil (Sosa-Gómez e Silva, 2010). Diversas estratégias de controle por meio de inseticidas químicos têm sido utilizadas na tentativa de reduzir os prejuízos causados por esta espécie, no entanto, as contínuas aplicações e as progressivas doses contribuíram para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência em várias populações de *E. heros* (Sosa-Gómez et al., 2001; Sosa-Gómez et al., 2009; Sosa-Gómez e Silva, 2010), configurando assim, um grande problema para a agricultura mundial.

A resistência a inseticidas pode ser considerada um modelo conciso de seleção natural, pois o uso intensivo de inseticidas pode induzir o acúmulo de diversos mecanismos de resistência nos exemplares sobreviventes (Zhu et al., 2013), incluindo modificações metabólicas associadas as enzimas citocromo P450, glutatona S-transferases, e esterases (Liu et al., 2006; Zhu et al., 2013; Hegeto et al., 2015). Por exemplo, Zhu et al. (2013) identificaram 14 genes associados a resistência, (entre eles: enzimas P450s, esterases, glutadiona S-transferase, proteínas cuticulares e transportadores de membrana) em percevejos-de-cama, *Cimex lectularius*. Os autores também mostraram que a maioria desses genes foi altamente expressa na camada epidérmica, indicando que tais alterações podem atenuar a penetração de inseticida até os sítios alvos das células nervosas – local de ação de inseticidas.

Adicionalmente, Hegeto et al. (2015) demonstraram distintos padrões das enzimas esterases 2 e 4 em linhagens de percevejos *Euschistus heros* expostas e não-expostas ao inseticida Engeo™ Pleno, indicando que modificações nestas enzimas podem estar associadas ao mecanismo de resistência a xenobióticos. Coletivamente, os resultados destes estudos sugerem que modificações metabólicas podem contribuir para promoção dos mecanismos de resistência.

No entanto, até o momento, nenhum estudo investigou se alterações citogenéticas e morfológicas em tecidos germinativos também podem contribuir para aprimoramento dos mecanismos de resistência em percevejos. Considerando que a exposição a inseticidas piretróides pode afetar a função e estrutura testicular em roedores (Yuan et al., 2010; Omotoso et al., 2014), é possível que tais alterações também ocorram em insetos, e estejam relacionadas à condição de resistência. Estudos envolvendo análises dos tecidos germinativos podem contribuir para elucidar os mecanismos adaptativos de resistência aos diversos tipos de inseticidas e, assim, favorecer o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis no controle desta espécie.

Portanto, os objetivos do presente estudo foram: (1) investigar possíveis alterações morfológicas em tecidos germinativos de exemplares machos selecionados com o inseticida Engeo Pleno (tiametoxam + lambda-cialotrina); (2) avaliar o comportamento meiótico dos cromossomos e a distribuição do DNAr 18S; e (3) analisar a frequência de distribuição dos espermatócitos nos lóbulos testiculares de grupos selvagens e selecionados (suscetíveis e resistentes) de percevejos *Euschistus heros*. A hipótese deste estudo é de que as linhagens selecionadas de *E. heros* resistentes e suscetíveis apresentem diferenças morfológicas testiculares e distinto padrão cromossômico de distribuição do DNAr 18S comparados a linhagem selvagem. Também avaliamos se o inseticida empregado durante 14 gerações consecutivas na seleção de linhagens resistentes foi responsável pela formação de gametas geneticamente desbalanceados nestes grupos.

## **Material e Métodos**

### **Seleção da amostra e grupos experimentais**

Foram utilizados percevejos machos (adultos) selvagens ( $N=15$ ) e selecionados em laboratório: linhagem resistente ( $N=15$ ) e linhagem suscetível ( $N=15$ ). Os percevejos selvagens foram coletados na base de estudos do Parque nacional do Iguaçu (Foz do Iguaçu), enquanto que os percevejos resistentes e suscetíveis foram pré-selecionados em laboratório pela Embrapa Soja - Londrina/Paraná. Os percevejos foram tratados durante 14 gerações consecutivas com o inseticida Engeo Pleno® (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) que possui em sua composição a mistura de dois ingredientes ativos: tiametoxam e lambda-cialotrina. Posteriormente foram classificados em dois grupos: resistentes e suscetíveis, por meio de testes enzimáticos e ensaios de dose-mortalidade, estipulados por Husch e Sosa-Gómez (2014).

### **Material biológico e preparação da amostra**

Os percevejos selvagens e selecionados foram trazidos ao laboratório de citogenética animal (LACA), da Universidade Estadual de Londrina, onde foram imediatamente eutanasiados para obtenção dos testículos, que foram fixados em solução de metanol e ácido acético (3:1, v:v), e armazenados em freezer à  $-20^{\circ}$  C até o momento das análises. Para a confecção das lâminas, o material testicular foi incubado em ácido acético 45% por, aproximadamente, 20 minutos e submetido à técnica de esmagamento. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secaram ao ar. Após a preparação, as lâminas foram coradas com Giemsa 4%.

### **Análises histológicas e inclusão de tecidos em historresina**

Amostras testiculares ( $N=4$ ) de percevejos selvagens e selecionados (suscetíveis e resistentes) foram coletadas e imediatamente fixadas em karnovsky. Após a fixação, os

tecidos foram mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão e do processamento. As amostras foram incluídas em historresina Leica® para posterior análise morfológica. Cortes histológicos (3µm) na altura da região distal dos testículos foram obtidos em micrótomo e corados com Hematoxilina-Eosina (H.E), segundo o protocolo descrito por Bancroft e Steven (1996).

### **Extração de DNA e caracterização do DNA ribossômico 18S**

Para a extração de DNA e caracterização do DNA ribossômico 18S foi selecionado um percevejo adulto de *Euschistus heros* selvagem, proveniente do Parque Nacional do Iguaçu. Este local foi escolhido por ser uma região de preservação ambiental possibilitando, assim, a coleta de exemplares livres da ação de inseticidas.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo fenol/clorofórmio. O DNAr 18S foi amplificado utilizando os primers 18S Forward 5' CCTGAGAAACGGC TACCACATC-3' e 18S Reverse 5'- GAGTCTCGTTCGTTATCGGA-3', relatado por Whiting et al. (2002). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para um volume final de 25µL, contendo 1µL (100ng) de DNA da amostra, 1µL de cada primer (100mM) e 12,5µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega). O programa da PCR consiste em um primeiro passo a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um passo final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram clonados utilizando o Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) com células competentes de *E. coli* TOP 10, seguindo as especificações do fabricante. Todas as clonagens foram realizadas em triplicata. Os clones selecionados foram sequenciados pelo seqüenciador automático 3500xL (Applied Biosystems). A limpeza, a determinação da qualidade das sequências e a construção dos contigs foram realizadas pelo software Phred-Phrap Consed. As sequências consensos foram submetidas aos programas (1) CENSOR para procura de elementos de DNAs móveis

(<http://www.girinst.org/censor/index.php>) e (2) RepeatMasker para busca de classes de DNA repetitivo (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) e comparada com outras sequências depositadas no banco de dados do GenBank através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### **Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)**

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada segundo o protocolo de Pinkel et al. (1986) em, pelo menos, 2 indivíduos de cada grupo: selvagem, resistente e suscetível. O clone selecionado, *pEh18S* e contendo a sequência parcial do DNAr 18S foi marcado com digoxigenina-11dUTP por *nick translation* (Dignick translation Roche).

As lâminas foram tratadas com 50µL do Mix de hibridação, contendo 7,5µL da sonda marcada, 30µL formamida 50%, 12µL polyethylene glycol 50%, 16µL 20× SSC. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em formamida 70%, a 70°C por 4 minutos em banho-maria. A hibridização ocorreu overnight por 16 h a 37°C em câmara úmida. Para detecção do sinal, foi utilizada 1µL de anti-digoxigenina rodamina em 49µL BSA 5%. Após as lavagens pós-deteção, cada lâmina foi montada com meio de montagem contendo 25µL de DABCO, 3µL de DAPI e 3µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM).

### **Caracterização dos lóbulos testiculares**

Para a caracterização dos lóbulos testiculares, foi avaliada a frequência das células espermáticas em diferentes estágios meióticos no interior de cada lóbulo do testículo. Para tanto, foi selecionado um exemplar adulto de cada grupo ( $N=1$ ), o qual teve um único testículo retirado. Cada lóbulo testicular foi individualmente dissecado e submetido à técnica de esmagamento em lâmina para obtenção das células espermáticas. Foi realizada a contagem de aproximadamente 1000 células (em diferentes estágios meióticos) por lóbulo testicular de cada grupo, totalizando 6000 células por testículo.

### **Aquisição e análise das imagens**

As lâminas submetidas à coloração convencional com Giemsa 4% e a hibridização *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300FX e software Motic Images Plus 3.2. As imagens dos cromossomos foram adquiridas separadamente em filtros específicos para cada fluoróforo.

## Resultados

Todos os grupos de percevejos *E. heros* apresentaram similar característica morfológica testicular, incluindo 2 testículos em formato de bastão (~ 2mm), e recobertos externamente por uma camada de tecido conjuntivo avermelhada denominada bainha peritoneal (Figura 1a, b). O tamanho dos testículos foi similar entre os grupos. Cada testículo apresentou 6 lóbulos, no entanto, comumente o quinto lóbulo exibiu menor espessura em relação aos demais (Figura 2a, b, e).

As análises histológicas confirmaram a presença de 6 lóbulos testiculares, envoltos externamente por uma cápsula conjuntiva denominada bainha peritoneal vermelha (Figura 2a, b, e, f). Abaixo desta membrana, uma fina camada de tecido conjuntivo emite septos entre os lóbulos, separando-os em compartimentos individualizados (Figuras 2a, b, c, d, e, f, g). Cada lóbulo é composto por inúmeras células císticas, que por sua vez, envolvem milhares de cistos de espermatogônias e cistos de espermatócitos (Figuras 2b, c, d, f, g, h). A histologia testicular foi semelhante entre os percevejos selvagens, resistentes e suscetíveis e confirmou em todos estes grupos a presença do 5º lóbulo menos espesso (Figura 2a, b, e). Foi observado a presença de cistos espermatogoniais, cistos de espermatócitos (Figura 2d, h) e espermatozoides maduros (dados não mostrados) em todos os lóbulos testiculares analisados.

Análises citogenéticas convencionais confirmaram que todos os exemplares de *E. heros* apresentaram número diplóide  $2n=14$  (12A + XY), sistema de determinação sexual simples (XX/XY) com o cromossomo X maior que o cromossomo Y (Figura 3c, d, g, h, k e l). Em paquíteno todos os exemplares resistentes e suscetíveis, incluindo o selvagem, apresentaram os autossomos formando bivalentes e os cromossomos sexuais como uma região heteropicnótica positiva. (Figura 3a, e, i). Em metáfase I todos os bivalentes alinharam-se na placa equatorial, incluindo os cromossomos sexuais que foram heteropicnóticos negativos (Figura 3c, g, k). Nas células em metáfase II foi possível observar os autossomos

formando bivalentes e os cromossomos sexuais formando um pseudobivalente na conformação *touch-and-go* (Figura 3d, h, l).

As contagens das células espermáticas no interior dos lóbulos testiculares evidenciaram a predominância de espermatozóides em todos os lóbulos (Figura 4). As linhagens selecionadas apresentaram alta quantidade de células em prófase I e intérfase (Tabela 1), enquanto que os selvagens apresentaram maior quantidade de intérfase e prófase I respectivamente (Tabela 1). Os resultados demonstram que em todos os lóbulos, de todos os grupos, existe a formação de espermatozóides e que em todos eles há meiócitos em diferentes estágios (Figura 4). A quantidade de meiócitos em fase de diplóteno, diacinese, anáfase e metáfase I e II foi muito baixa, o que pode ser resultado da rápida transição entre essas fases. Metáfases mitóticas foram observadas em todos os grupos (Figura 4), sendo predominante no grupo suscetível.

Pela técnica de FISH, foi possível determinar o perfil da distribuição do DNAr 18S nos diferentes grupos de *E. heros*. Para a hibridização *in situ* utilizamos um fragmento de DNAr 18S obtido por PCR a partir de um primer geral de artrópode, que foi clonado e sequenciado. A sequência consenso inserida no clone *pEh18S* apresentou comprimento de 1041 pb (Apêndice 1) e mostrou alta similaridade de 1034pb (99-98%) com a região conservada de DNAr 18S de diversas outras espécies de heterópteros (Apêndice 2), tais como *Rhaphigaster nebulosa*, *Eurydema maracandica*, *Pentatomidae sp.*, *Graphosoma lineatum*, *Megacopta aff. Cribraria*, além de outros depositados no GenBank (NCBI).

Quando o clone *pEh18S* foi marcado e hibridizado nos cromossomos dos três grupos de percevejos, todos exibiram marcações similares de hibridização em um único bivalente autossômico (Figura 5), com os sinais de hibridização em posição intersticial. Em algumas fases foi possível visualizar claramente o heteromorfismo de tamanho entre os sinais de

hibridização, com algumas marcações apresentando quase o dobro do tamanho (Figura 5a, b, c, e, f, g).

## Discussão

Este é o primeiro estudo que investigou os padrões morfológicos em tecidos germinativos e o comportamento dos meiócitos em *Euschistus heros* machos de linhagens selecionadas com tiametoxam e lambda-cialotrina, além de ser o primeiro estudo citogenético realizado em exemplares selvagens de *Euschistus heros* provenientes do Parque Nacional do Iguaçu. A hipótese deste estudo é de que a morfologia testicular e o padrão cromossômico de distribuição do DNAr 18S poderiam ser distintos entre as linhagens selecionadas, comparados à selvagem.

### *Análise morfológica e histológica*

Os resultados encontrados no presente estudo rejeitam a hipótese de que a morfologia testicular e o padrão histológico poderiam ser distintos entre os grupos. O tamanho dos testículos (~ 2mm) e o número de lóbulos (total: 6) foram similares entre os grupos analisados, e consistente com prévios estudos que demonstraram a presença de testículos compartimentalizados em lóbulos (Souza e Itoyama, 2010a). Estes lóbulos podem variar em quantidade nas espécies da família Pentatomidae (de 3 a 8 lóbulos, com maior prevalência de 7 lóbulos) (Souza e Itoyama, 2010a).

Interessante notar que o 5º lóbulo de todos os grupos apresentou uma espessura menor em relação aos outros lóbulos, como previamente relatado por Souza e Itoyama (2010a) em percevejos *E. heros* selvagens. Estes autores demonstraram que o 5º lóbulo apresenta menor espessura comparado aos outros, e células espermáticas com maior diâmetro em relação às células dos lóbulos 1, 2 e 3, e menor diâmetro em relação aos lóbulos 4 e 6. Nossos resultados sugerem que esta característica é inerente a espécie *E. heros*, e que a mesma não foi afetada pela suscetibilidade e resistência, considerando que todos os exemplares estudados até o momento exibiram o 5º lóbulo menor em relação aos demais.

Outras espécies de Pentatomidae também apresentam um lóbulo diferente, comumente chamado de harlequim (Souza e Itoyama, 2010a; Rebagliati et al., 2005). Estes lóbulos geralmente apresentam em seu interior espermatozóides atípicos e/ou inférteis (Souza et al., 2007; Souza et al., 2008; Souza e Itoyama, 2010a) com diferenças metabólicas significativas e distintos padrões morfológicos (como por exemplo, polimegalia, ou aumento do diâmetro) – como observado em *Antiteuchus tripterus*, Pentatomidae (Souza et al., 2007; Souza et al., 2008). Estudos clássicos mostram que a presença destes lóbulos pode estar relacionada ao fornecimento adicional de nutrientes, especialmente nucleoproteínas para o desenvolvimento de ovos (Schrader 1945, 1960a, 1960b *apud* Souza e Itoyama, 2010a).

Embora não haja relatos de espermatozóides inférteis em *E. heros*, tem sido demonstrada a presença de espermatozóides com tamanho e diâmetro diferentes (Souza e Itoyama, 2010a). Cossolin (2015) descreve 3 tipos distintos de espermatozóides *para E. heros*, considerando a ultraestrutura e a morfologia destes gametas. O autor demonstra que cada lóbulo testicular é responsável pela produção de um tipo específico de espermatozóide, sendo que os lóbulos 1, 2 e 3 produzem gametas do tipo 1, o lóbulo 5 do tipo 2 e os lóbulos 4 e 6 do tipo 3.

A formação de gametas heteromórficos ocorre em diversos grupos de insetos e consiste na produção diferencial de gametas por um mesmo organismo (Swallow e Wilkinson, 2002) que podem variar em comprimento, diâmetro e estrutura (Jamieson et al., 1999; Swallow e Wilkinson, 2002; Souza e Itoyama, 2010a). Em Hemiptera, o polimorfismo espermático é bastante comum e já foi identificado em diversas famílias, incluindo a família Pentatomidae (Souza e Itoyama, 2010b; Araújo et al., 2011). No presente estudo, os padrões estruturais e morfológicos típicos dos testículos de *E. heros* não foram afetados pela resistência e suscetibilidade, sugerindo que outros fatores podem estar associados a estas condições.

### *Análises citogenéticas*

Similar a prévios estudos (Rebagliati et al., 2005; Souza e Itoyama, 2010; Bardella et al., 2013), nossos resultados revelaram um padrão normal de segregação dos cromossomos entre os grupos estudados. Especificamente, os grupos apresentaram similar número diplóide e sistema de determinação sexual XY, com o cromossomo X maior que o cromossomo Y. Estes resultados revelam um padrão normal de comportamento meiótico e segregação cromossômica nos grupos investigados, sugerindo que a resistência pode não estar associada a alterações cromossômicas durante a formação dos gametas. Além disso, a exposição prolongada ao inseticida Engeo<sup>TM</sup> Pleno não resultou em quebras cromossômicas e os meiócitos apresentaram equilíbrio do conteúdo cromossômico, demonstrando que o composto não apresentou ação nociva sobre a estrutura e segregação cromossômica.

Adicionalmente, foi avaliado o posicionamento e localização do DNAr 18S como um marcador citomolecular de alterações cromossômicas. A ocorrência de sinais 18S em um único bivalente autossômico é recorrente nas espécies de Pentatomorpha estudadas (Papeschi et al., 2003; Cattani et al., 2004; Bressa et al., 2008; Bardella et al., 2010). Dentro da infraordem Pentatomorpha, a localização do DNAr 18S já foi avaliada em pelo menos 35 espécies, das quais 30 apresentaram o DNAr localizado em cromossomos autossômicos (Papeschi et al., 2003; Cattani et al., 2004; Bressa et al., 2008; Bardella et al. 2010).

O posicionamento dos sítios de DNAr 18S é altamente conservado na infraordem Pentatomorpha, mesmo em espécies próximas que apresentam ampla variação no número diplóide ( $2n$ ), o posicionamento cromossômico do DNAr 18S é comumente terminal (Bardella et al., 2013), no entanto, apenas 3 espécies exibem marcações em posição intersticial, incluindo *Euschistus heros*, *Nezara viridula* e *Pyrrhocoris apterus* (Papeschi et al., 2003; Grozeva et al., 2011; Bardella et al., 2013). A ocorrência de sítios de DNAr 18S em posição intersticial parece estar relacionada a eventos de inversão, uma vez que não há

evidências de alterações no número cromossômico nestas espécies e, portanto, pode ser considerada uma característica apomórfica em relação a outras espécies da infraordem Pentatomorpha (Bardella et al., 2013). Nossos resultados suportam tais padrões cromossômicos em populações suscetíveis e resistentes de *E. heros*, indicando que a condição de resistência não influencia os padrões de posicionamento e localização do DNAr 18S.

Além disso, nosso estudo verificou a presença de heteromorfismo de tamanho nos sítios de DNAr 18S em quase todas as fases meióticas. Esta característica também foi observada em estudos prévios em *E. heros* selvagens e em outras 13 espécies da infraordem Pentatomorpha por Bardella et al. (2013) e indicam uma possível associação com mecanismos de duplicação e/ou crossing-over desigual. Tais achados são consistentes com o fato de que variações nos sítios de DNAr podem ocorrer em tamanho e no homólogo portador (Bressa et al., 2008; Bardella et al., 2010; Bardella et al., 2013).

As contagens dos meiócitos revelaram que os espermatozoides representam o estágio mais abundante em todos os lóbulos. Além disso, uma grande quantidade de intérfase e prófase I foi observada em todos os grupos. Isso pode estar relacionado com a própria função do tecido, que é a produção e armazenagem de gametas. Nossos dados demonstram que todos os grupos apresentam meiócitos em diferentes estágios com número diplóide consistente com a espécie, indicando que a função reprodutiva dos machos sobre a formação dos gametas permanece intacta.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a capacidade de resistência não está associada a modificações morfológicas em tecidos germinativos e alterações cromossômicas em machos de *E. heros*, considerando que a estrutura reprodutiva apresentou-se intacta. Estudos adicionais envolvendo análises funcionais e moleculares poderão contribuir para o entendimento dos possíveis mecanismos de resistência e, assim, possibilitar a elaboração de estratégias eficazes para o manejo e controle desta espécie.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem a Embrapa-Soja (Londrina-PR) pela autorização e fornecimento dos percevejos selecionados em laboratório. À Universidade Estadual de Londrina por possibilitar a execução deste trabalho. À assistência dos técnicos do Parque Nacional do Iguaçu por sua ajuda na coleta das amostras. À Capes pelo suporte financeiro.

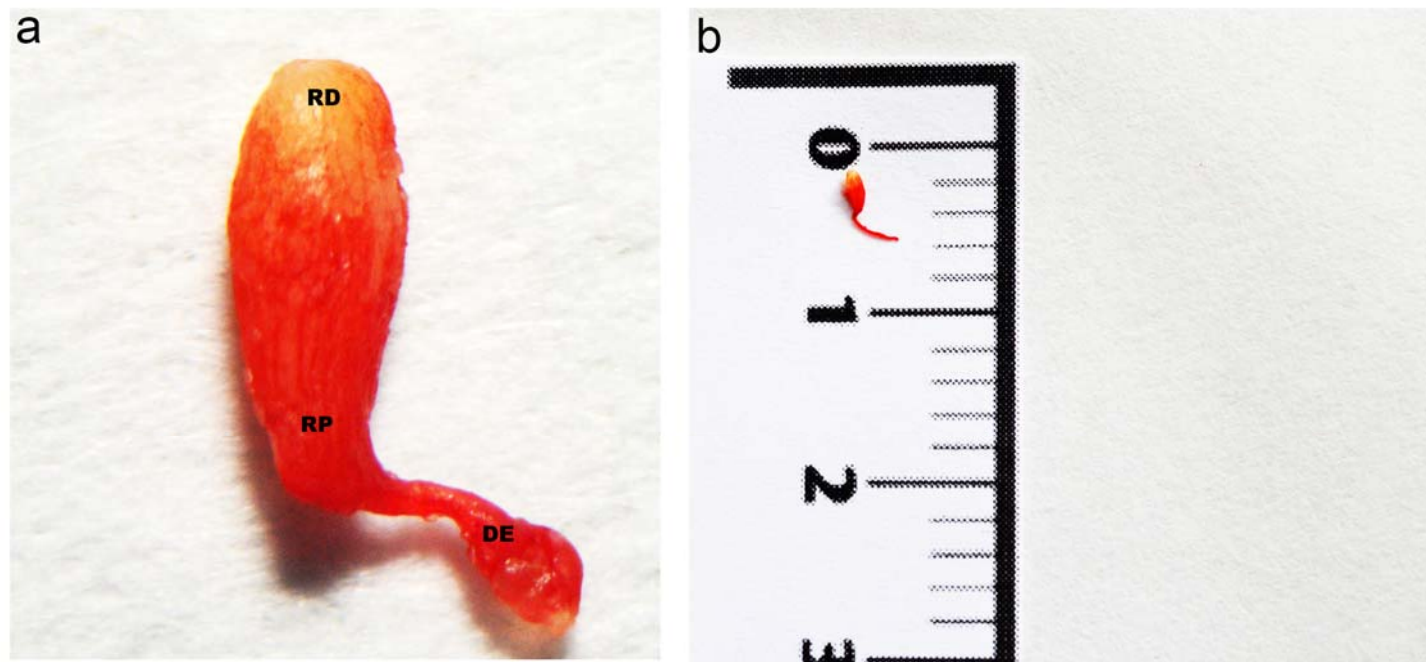
## Referências bibliográficas

1. Araújo VA, Lino-Neto J, de Souza Ramalho F, Zanuncio JC, Serrão JE. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron*, 42(6): 560-567, 2011.
2. Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela ALL, Azeredo-Oliveira MTV. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comparative Cytogenetics* 4: 141–149, 2010.
3. Bardella VB, Fernandes T, Vanzela ALL. The conservation of number and location of 18S sites indicates the relative stability of rDNA in species of Pentatomomorpha (Heteroptera). *Genome* 56: 425-429, 2013.
4. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practices of histological techniques. Churchill Livingstone, 4: 166, 1996.
5. Bressa MJ, Franco MJ, Toscani MA, Papeschi AG. Heterochromatin heteromorphism in *Holhymenia rubiginosa* (Heteroptera: Coreidae). *European Journal of Entomology* 105: 65–72, 2008.
6. Cattani MV, Greizerstein EJ, Papeschi AG. Male meiotic behaviour and nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera) analyzed by fluorescent banding and in situ hybridization. *Caryologia* 57(3): 267-273, 2004.
7. Cossolin, Jamile Fernanda Silva. Polimorfismo e ultraestrutura dos espermatozóides de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae). Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa-MG, 2015.
8. Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA. Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)<sub>n</sub> repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* 5(4): 355-374, 2011.
9. Hegeto LA, Ronqui L, Lapenta AS, Albuquerque FA. Identification and functional characterization of esterases in *Euschistus heros* (Hemiptera, Pentatomidae) and their relationship with thiamethoxam and lambda-cyhalothrin. *Genet. Mol. Res.* 14 (3): 11079-11088, 2015.

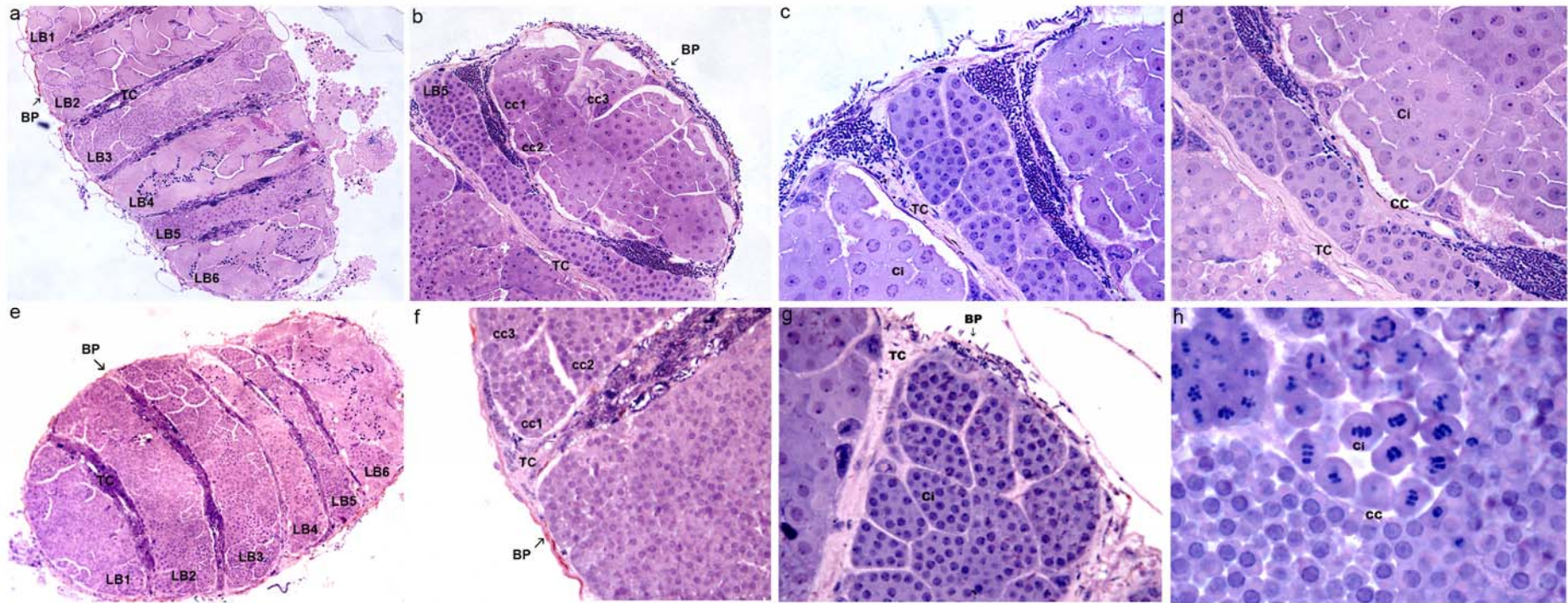
10. Husch PE e Sosa-Gómez DR. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Euschistus heros* a tiametoxam + lambdacialotrina e acefato. Resumos expandidos da XXXIV Reunião de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, Londrina, 78-80, 2014.
11. Jamieson BGM, Dallai R, Afzelius BA. Insects: their spermatozoa and phylogeny. B.G.M. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, U.S.A. 555 pp, 1999.
12. Liu NN, Zhu F, Xu Q, Pridgeon JW, Gao XW. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. *Acta Entomologica Sinica* 49 (4): 671-679, 2006.
13. Omotoso GO, Onanuga IO, Ibrahim RB. Histological Effects of Permethrin Insecticide on the Testis of Adult Wistar Rats. *Ibnosina J Med BS* 6 (3): 125-129, 2014.
14. Papeschi AG, Mola LM, Bressa MJ, Greizerstein EJ, Lía V, Poggio L. Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Research* 11: 725–733, 2003.
15. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:2934-2938, 1986.
16. Rebagliati PJ, Mola LM, Papeschi AG, Grazia J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): a review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43:199–213, 2005.
17. Schrader F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). *The Biological Bulletin*, 88: 63–70, 1945.
18. Schrader F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera),” *Chromosoma* 11(1):103–128, 1960a.
19. Schrader F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). *Evolution* 14: 498–508, 1960b.
20. Sosa-Gómez DR, Corso IC, Morales L. Inseticide resistance to endossulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (Fabr.) *Neotropical Entomology* 30: 317-320, 2001.

21. Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Lopes IO, Corso IC, Almeida AM, Moraes GC, Baur ME. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 102: 1209-1216, 2009.
22. Sosa-Gómez DR, Silva JJ. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 45: 767-769, 2010.
23. Souza HV, Bicudo HEMC, Costa LAA, Itoyama MM. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). *European Journal of Entomology*. 104: 353–362, 2007.
24. Souza HV, Castanhole MMU, Bicudo HEMC, Itoyama MM. Pattern of silver nitrate-staining during meiosis and spermiogenesis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Genetics and Molecular Research*, 7: 196–206, 2008.
25. Souza HV, Itoyama MM. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche: A journal of Entomology*. Article ID 428673, 10 pages doi:10.1155/2010/428673, 2010a.
26. Souza HV, Itoyama MM. Study of acrosome formation, interspecific and intraspecific, in the testicular lobes of some pentatomid species. *Journal of Insect Science*, 10: 132 available online: [insectscience.org/10.132](http://insectscience.org/10.132), 2010b.
27. Swallow JG, Wilkinson GS. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biological Reviews*, 77(2): 153-182, 2002.
28. Whiting MF. Phylogeny of the holometabolous insect 293 orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta*, 31(1): 3-15, 2002.
29. Yuan C, Wang C, Gao SQ, Kong TT, Chen L, Li XF et al. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicol In Vitro* 24 (2): 382-6, 2010.
30. Zhu F, Gujar H, Gordon JR, Haynes KF, Potter MF, Palli SR. Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Scientific Reports* 3: 1456, 2013.

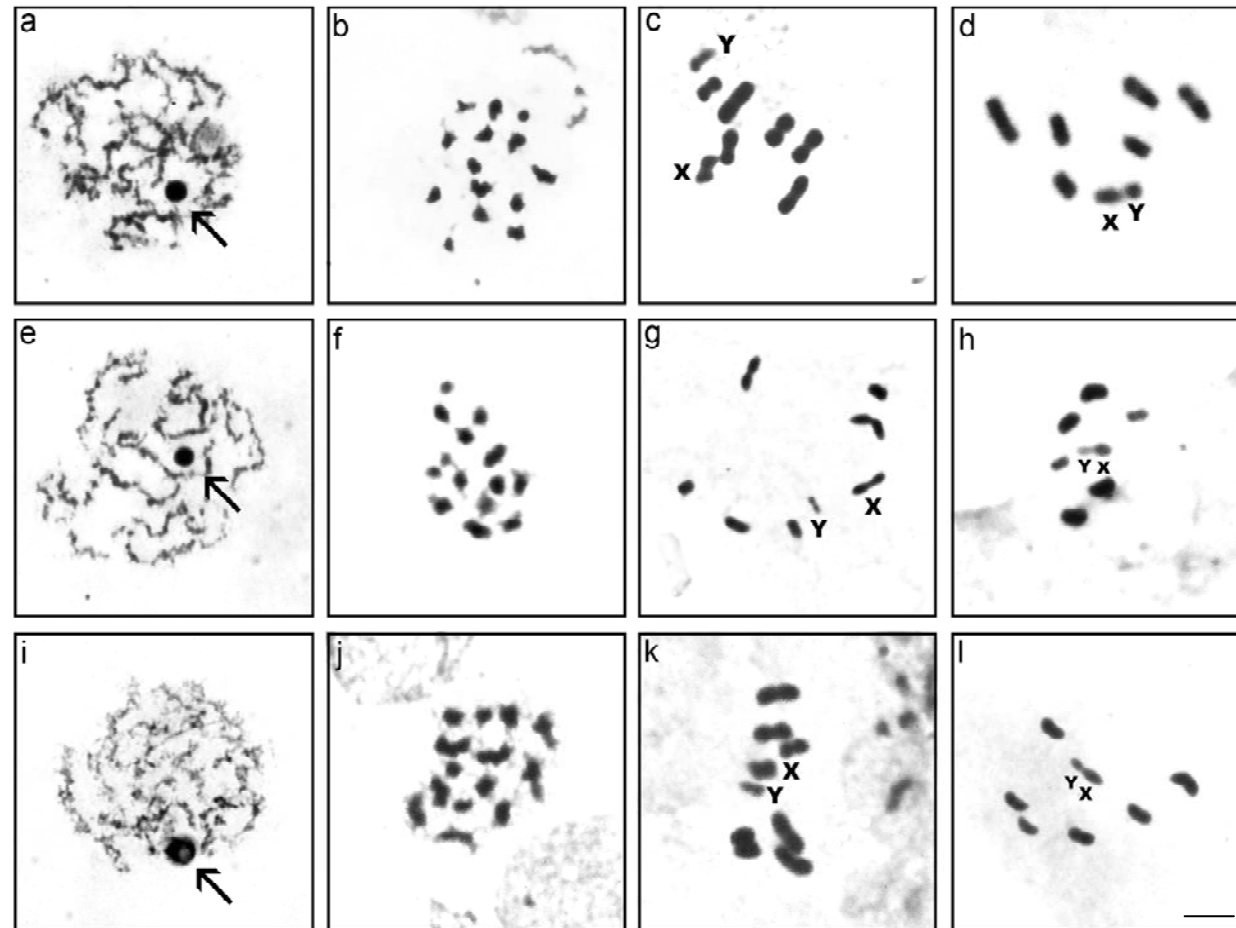
## FIGURAS



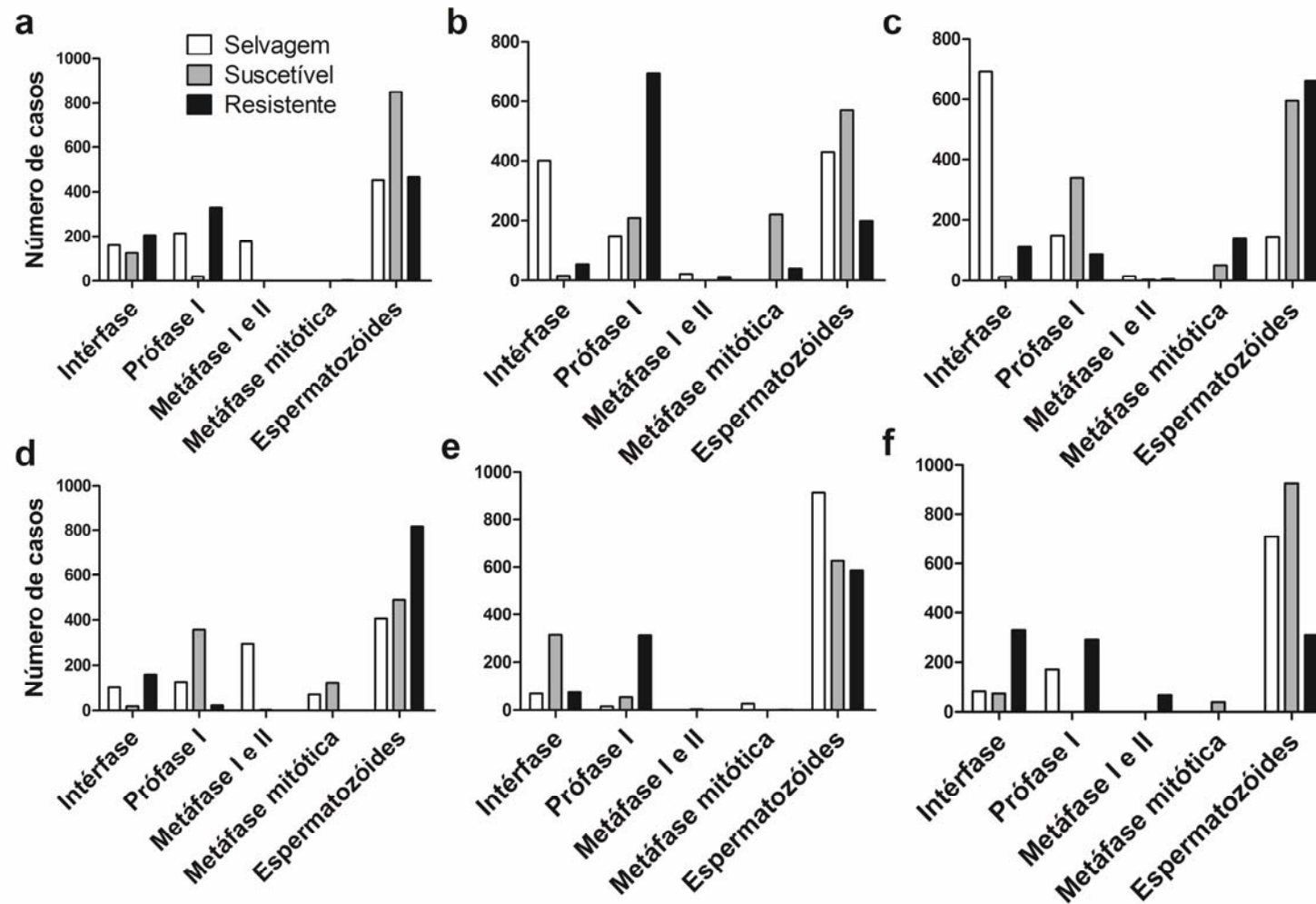
**Figura 1.** Testículo de *E. heros* recoberto externamente por uma bainha de tecido conjuntivo com coloração avermelhada. a - região distal (RD) menos pigmentada e região proximal (RP) do ducto ejaculatório (DE), mais pigmentada. b - comprimento aproximado do testículo em escala real (2 mm).



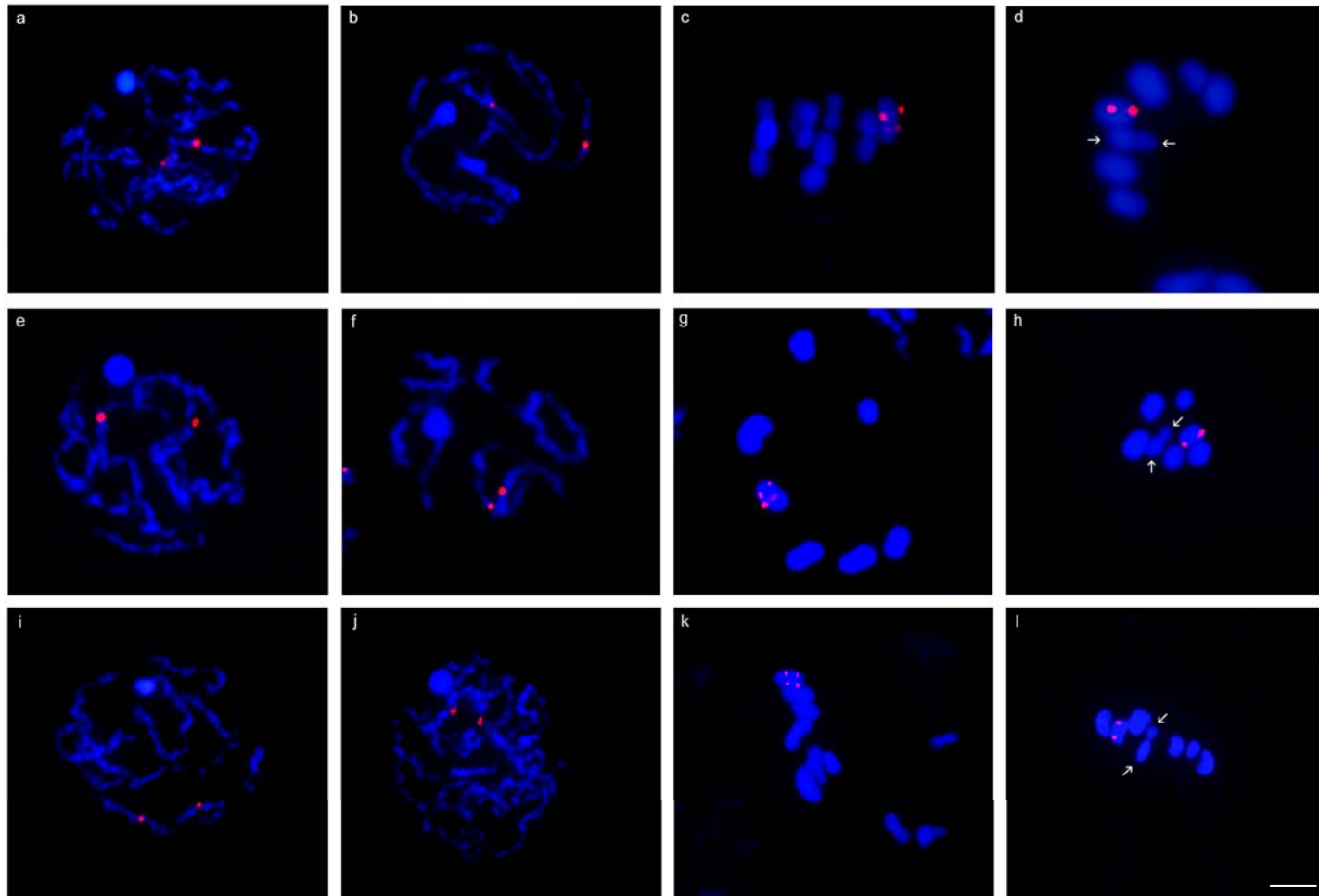
**Figura 2.** Cortes histológicos em testículos de *E. heros* suscetíveis (a, b, c, d) e resistentes (e, f, g, h), corados com Hematoxilina-Eosina. Corte transversal em testículos (a, e) evidenciando 6 lóbulos (LB1, LB2, LB3, LB4, LB5 e LB6). Note a menor espessura do 5º lóbulo (a, b, e). Separando os lóbulos, uma camada de tecido conjuntivo (TC) (b, c, d, f, g) e externamente a bainha peritoneal vermelha (BP) (a, b, e, f, g). Células císticas (cc1, cc2, cc3) contendo milhares de cistos espermatogoniais e cistos de espermatócitos (ci) em seu interior (b,f). Milhares de cistos de espermatócitos (ci) no interior das células císticas (cc) (c, d, g, h).



**Figura 3.** Análise citogenética convencional dos diferentes estágios meióticos de *E. heros* selvagens e selecionados com tiametoxam + lambda-cialotrina. Grupo selvagem Parque Nacional do Iguaçu (a-d); Resistentes (e-h); Suscetíveis (i-l). Paquíteno (a, e, i); metáfase mitótica (b, f, j); metáfase I (c, g, k); metáfase II (d, h, l). As setas indicam os cromossomos sexuais durante o paquíteno. As letras X e Y correspondem aos cromossomos sexuais X e Y, respectivamente. Barra = 5µm.



**Figura 4.** Distribuição dos diferentes estágios meióticos no interior dos lóbulos testiculares nos grupos experimentais. Lóbulo 1 (a), lóbulo 2 (b), lóbulo 3 (c), lóbulo 4 (d), lóbulo 5 (e), lóbulo 6 (f).



**Figura 5.** Localização do sítio de DNAr 18S em cromossomos de *E. heros* suscetíveis (a, b, c, d), resistentes (e, f, g, h) e selvagens (i, j, k, l). Em paquíteno (a, b, e, f, i, j) os cromossomos exibem duas marcações que correspondem ao bivalente autossômico. Algumas marcações apresentam evidente heteromorfismo de tamanho (a, b, c, e, f, g). Em metáfase I (c, g, k) os cromossomos exibem quatro marcações, que correspondem às quatro cromátides. Em metáfase II (d, h, l), é possível identificar duas marcações, isto é, uma em cada cromátide. As setas indicam os cromossomos sexuais. Barra = 5 $\mu$ m.

**TABELA 1**

**Tabela 1.** Frequência dos estágios meióticos nos grupos experimentais.

	Selvagem	Suscetível	Resistente	Total
	<i>N</i> casos (%)	<i>N</i> casos (%)	<i>N</i> casos (%)	<i>N</i> casos (%)
Intérfase	1759 (58,6)	324 (10,8)	917 (30,6)	3000 (100)
Prófase I	1243 (35,1)	1111 (31,4)	1184 (33,5)	3538 (100)
Metáfase I e II	574 (93,9)	17 (2,8)	20 (3,3)	611 (100)
Metáfase mitótica	96 (13,8)	415 (59,7)	184 (26,5)	695 (100)
Espermatozóides	2328 (22,9)	4133 (40,7)	3697 (36,4)	10158 (100)

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Sequência consenso do fragmento de DNAr 18S contida no clone *pEh18S*

Sequência consenso do fragmento de DNAr 18S contida no clone *pEh18S*

>pEh\_18S\_c1

>Contig1

```
CCCTTAGAGGGGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCACGCATATTACCCACTCCCGGCACG
GGGAGGTAGTGACAAAAATAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCGGAATGAGAACA
CCCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAG
CTCCAATAGCGTATATGAAAGTTGTTGCGGTAAAAAGCTCGTAGTTGGTTCTGCGTGCCACGCTGT
CGGTTACCCGCTGTCGGTGCAACTGGCATGCCGTGGCATGTCCTGTCGGTGGCTGACGGGCTTCG
CTGCGCGCCCCGCTCGCTAACGCGTGTGTGGTCTACGCGCAGTGTGTCCTCGTTGGCCGGCTCAAT
CCTACCGCGGTGCTCTTAAACGAGTGTGCGAGGTAGGCCGACACTGTTTACTTTGAACAAATTAGAG
TGCTTCACGCAGGCTCTGAAAGCAGCCTGAATAGTGGTGCATGGAATAATGGAACAGGACCTTGGT
TCTATTTTGTGGTTCCGGAATCCAAGGTAATGATCAATAAGGACAGGCCGGGGGCATTTCGTATTG
CGACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGTCGCAAGACGTA TAGAGCGAAAGCATTGCCAAGTAT
GTCTTAATTGATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTT CGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACC
ATAAACGATGCCAGCCAGCGATCCGCCGATGTTCTCCGATGACTCGGCGGGGAGCTTTCCCCGGG
AAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGG
AAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGCC
CGGACATTGGAAGGATTGACAGATCGATAGCTCTTTCTCGATT CAGTGGGTAGTGGTGCATGGCCG
TTCTTAGTTGGTGGACTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTC
```

## APÊNDICE B

## BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

BLAST ®

## Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - X94D4BS7013](#)[Formatting options](#)[Download](#)[Blast report description](#)

18s\_Eh\_c1

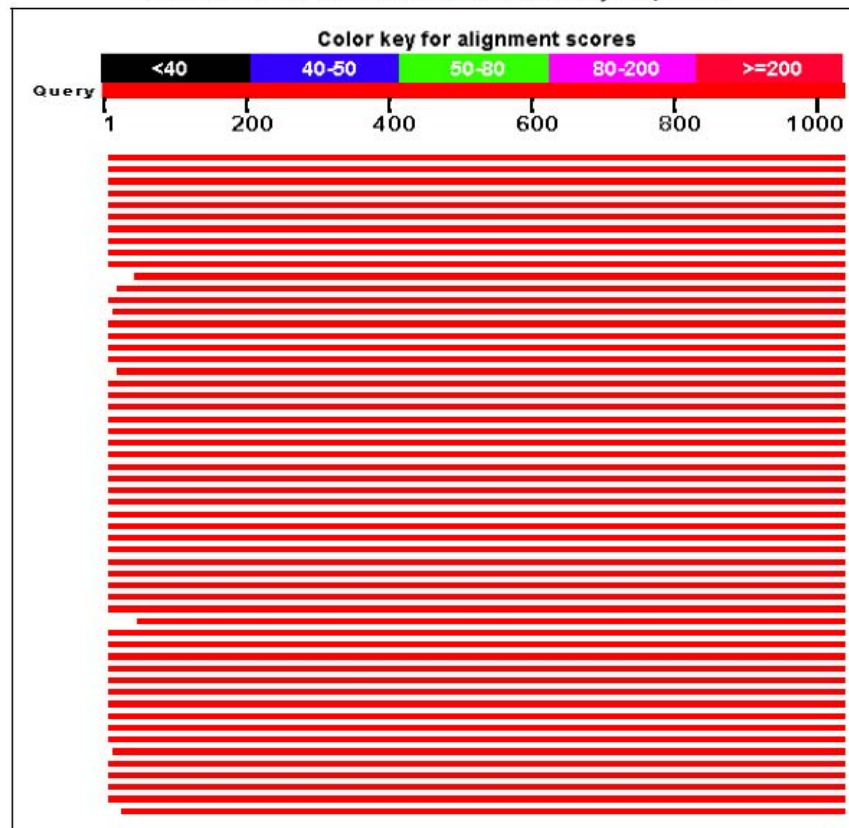
RID [X94D4BS7013](#) (Expires on 08-20 22:24 pm)

**Query ID** Id|Query\_34603  
**Description** 18s\_Eh\_c1  
**Molecule type** nucleic acid  
**Query Length** 1041

**Database Name** nr  
**Description** Nucleotide collection (nt)  
**Program** BLASTN 2.2.32+

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



## APÊNDICE B (continuação)

**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
R.nebulosa DNA for 18S ribosomal RNA	1842	1842	98%	0.0	99%	<a href="#">X89495.1</a>
Eurydema maracandica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1829	1829	98%	0.0	99%	<a href="#">JX997807.1</a>
Pentatomidae sp. BYU ACHP008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1807	1807	98%	0.0	98%	<a href="#">DQ133578.1</a>
Graphosoma lineatum 18s ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	98%	0.0	98%	<a href="#">U88339.1</a>
Megacopta aff. cribraria TW2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	98%	0.0	98%	<a href="#">KF356324.1</a>
Megacopta aff. cribraria CV2-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	98%	0.0	98%	<a href="#">KF356307.1</a>
Megacopta cribraria isolate GA2-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	98%	0.0	98%	<a href="#">KF356298.1</a>
Megacopta cribraria haplotype GA1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	98%	0.0	98%	<a href="#">JQ254888.1</a>
Megacopta aff. cribraria M1-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	98%	0.0	97%	<a href="#">KF356326.1</a>
Megacopta aff. cribraria H1168-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	98%	0.0	97%	<a href="#">KF356332.1</a>
Onymocoris izzardi voucher S448 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1751	1751	95%	0.0	98%	<a href="#">EU683167.1</a>
Hypogomphus sp. WCW-2003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1740	1740	97%	0.0	97%	<a href="#">AY252278.1</a>
Pentatomidae sp. JRC-2012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	98%	0.0	97%	<a href="#">JN797287.1</a>
Tholosanus sp. WCW-2003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1727	1727	98%	0.0	97%	<a href="#">AY252279.1</a>
Tessarotoma papillosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1724	1724	98%	0.0	97%	<a href="#">AY627312.1</a>
Poecilocoris latus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	98%	0.0	97%	<a href="#">AY627311.1</a>
Notobitus meleagris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1705	1705	98%	0.0	97%	<a href="#">AY627321.1</a>
Erthesina fullo 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1703	1703	98%	0.0	97%	<a href="#">AY627315.1</a>
Ocirrhoe sp. WCW-2003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1703	1703	97%	0.0	97%	<a href="#">AY252277.1</a>
Riptortus pedestris genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	1698	1698	98%	0.0	96%	<a href="#">AB725684.1</a>
Mictis fuscipes 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1698	1698	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627317.1</a>
Leptocorisa sp. HL-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1694	1694	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627320.1</a>
Aponsila montana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1694	1694	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627314.1</a>
Riptortus linearis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1692	1692	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627324.1</a>
Coleotichus costatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1683	1683	98%	0.0	96%	<a href="#">AY252274.1</a>
Blaptostethoides esakii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1681	1681	98%	0.0	96%	<a href="#">FJ914543.1</a>
Anoplocnemis binotata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1681	1681	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627329.1</a>
Leptocorisa acuta 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1679	1679	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627322.1</a>
Megacopta cribraria 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1679	1679	98%	0.0	96%	<a href="#">AY627313.1</a>