

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
FACULTAD DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA APLICADA Y ALIMENTOS
CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA

***Comunidades microbianas asociadas al intestino de la chinche
verde, Nezara viridula: Biodiversidad y función biológica.***

Autora: Lic. Virginia Medina
Director: Dr. Jorge A. Zavala
Codirector: Dr. Gabriel O. Gutkind

2016

A mis padres Norma y Hugo,
que me dieron alas

A Lisandro,
que me ayudó a construir el nido
al que vuelvo después de un día agitado

A mi pichón, Juan Martín,
que me agrandó el corazón y
me mostró lo importante de la vida

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director, Dr. Jorge Zavala, por haberme dado la posibilidad de hacer este doctorado. Por ocuparse de que no falte nada y promover un ambiente de paz, en el que siempre es más fácil pensar. Por emocionarse con los resultados y enseñarme a valor mi trabajo. Por reírse de los experimentos fallidos y por querer siempre un poco más. Por enseñarme a escribir, a exponer, a resumir, a investigar. Por enseñarme que el único camino a recorrer es hacia adelante. Por no cansarse de repetirme conceptos de ecología una y otra vez. Por corregir los domingos. Por su bondad.

Agradezco a mi codirector, Dr. Gabriel Gutkind, por aceptarme sin referencias. Por darme una mano cuando lo necesité y por rescatarme cuando me ahogaba en el pantano de la taxonomía. Por su invaluable ayuda en la discusión de los resultados y la corrección de esta tesis. Gracias por su tiempo.

Agradezco al jefe de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Dr. Eduardo Pagano, por darme el espacio para trabajar en paz. Por obsesionarse en que todos puedan trabajar y cobrar, y en hacer la cátedra más grande. Por no darme nunca la espalda.

Agradezco al Dr. Marcelo Soria, por su ayuda en la elaboración de los árboles filogenéticos. Por enseñarme los fundamentos, por discutir los resultados, por hacer y rehacer. Por no guardarse nada. Agradezco su dedicación y valoro su calidad como investigador y docente.

Agradezco a la Dra. Susana Perelman, por su ayuda en el proceso de discusión de resultados y análisis estadísticos. Por insistirme en “hacerme la pregunta”, por valorar mi trabajo, por emocionarse, por recibirme en su oficina todas las veces que fueron necesarias. Por lograr que me guste la estadística.

Agradezco al Dr. Carlos Vay y a su equipo del laboratorio de la sección “Bacteriología”, del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, de la CABA, por su colaboración en la identificación de las yokenellas por la técnica de espectrometría de masa MALDI-TOF.

Agradezco a Andrea Puebla y Verónica Nishinakamasu de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar donde se realizó la etapa de electroforesis capilar de la técnica ARISA, por el tiempo dedicado a enseñarme la técnica, el uso del software y por su pronta respuesta frente a mis pedidos.

Agradezco a los Ings. Agrs. Jorge Frana del INTA Rafaela y Fernando Flores del INTA Marcos Juárez por su colaboración en la colecta de chinches y la ayuda recibida para la concreción de los viajes de colecta.

Agradezco a la Dra Margarita Rodríguez por su colaboración en el análisis de sensibilidad a antibióticos de las yokenellas.

Agradezco a todos mis compañeros, que ahora son amigos. Les agradezco no solo por su amistad, los mates, las cervezas, las reuniones extraoficiales, los viajes a la costa, los regalos de cumpleaños, su preocupación frente a alguna enfermedad de Juan, por ayudarme a juntar chinches. También va mi agradecimiento por la energía puesta en conformar un buen equipo de trabajo, porque nos ayudamos, porque sabemos ser investigadores/docentes de los buenos, de los que no se guardan nada. Por eso, particularmente agradezco:

A Veronica Feuring, Lic. Alina Crelier e Ing. Agr. Silvina Monti del Laboratorio de Análisis Especiales de la Cátedra de Bioquímica, FAUBA, por su colaboración en el uso del equipo de cromatografía (HPLC) durante el análisis de muestras de TBARS.

Al Ing Pedro Sardoy por enseñarme todo lo que tenía que saber sobre la chinche verde, sobre los pentatómidos, los hemípteros... y por qué no, todo el resto de los insectos. Por enseñarme a diseccionar con lupa, criar chinches, identificar mudas, etc.

A la Lic Daniela Tejedor, la Dra Natalia Iliina y la Dra Carolina di Santo, que machete en mano, limpiaron el camino para que los ensayos de actividad enzimática y biología

molecular sean un juego de niños. Agradezco el tiempo invertido en la puesta a punto de las técnicas y su voluntad para responder dudas y discutir resultados.

A los Ings. Agrs. Andrés Petón y Patricia Codó, por la discusión de resultados y por enseñarme a enseñar y a respetar la profesión docente.

A los Ing. Agr. Jesica Barneto, Francisco Dillon y Lucia Barriga por enseñarme a sembrar, a ralear, a regar y a cuidar las plantas. Por discutir los resultados, por ser pragmáticos, por bajar un cambio y manejar mis ataques de pánico.

A la Dra. Romina Giacometti, por su predisposición incondicional, por su energía y su tiempo dedicados a la discusión de resultados con una capacidad intelectual formidable.

A la Lic. Vanesa Jacobi por su entusiasmo, la inyección de buena onda diaria, y el brillo en sus ojos cuando piensa en un experimento, lo que hace querer un poco más la profesión.

A Mariana Manetti, que con una obsesión espeluznante, me ayudó con los ensayos, el mantenimiento de la cría, y estuvo ahí siempre que fue necesario.

Les agradezco por ser catalizadores de un aprendizaje que, de no ser por todos y cada uno de ellos, hubiese sido termodinámicamente posible pero incompatible con la vida.

Por último, un agradecimiento especial a mis suegros, Graciela y Osvaldo, que estuvieron siempre cuidándonos las espaldas, compartiendo buenos momentos, con el único objetivo de ser felices.

RESUMEN

El estudio de las interacciones entre los cultivos y los insectos plaga es de suma importancia a nivel mundial, ya que permite la generación de herramientas tecnológicas para lograr una producción agrícola sustentable sin perder rentabilidad. La soja es el principal cultivo de Argentina y el complejo de chinches es una de las principales plagas de este cultivo, frente a la que no se tienen tecnologías alternativas a los pesticidas químicos. Los insectos plaga han logrado desarrollar mecanismos para tolerar las defensas de las plantas y, en algunos casos esta tolerancia es debida a la presencia de ciertas bacterias intestinales. A pesar de la importancia de la chinche verde como plaga de soja, se conoce muy poco sobre su flora intestinal, y las consecuencias de la presencia de estas bacterias sobre la biología de la chinche verde.

En esta tesis se analizó la relación bacteria-chinche verde-soja, con el objetivo de estudiar el papel de las bacterias en el intestino de la chinche verde en la interacción planta-insecto. Para ello se caracterizó la comunidad microbiana del insecto en zonas productoras de soja y se puso a prueba la funcionalidad *in vitro* e *in vivo*. Para la caracterización de las comunidades microbianas se utilizó el análisis automático del espaciador intergenico (ARISA) y cultivos en placas, y las bacterias aisladas se identificaron por secuenciación del 16S ARNr.

Los resultados indican que los ventrículos (V2-V3) donde se produce la digestión de la dieta pueden presentar bacterias con una riqueza variable entre 0 y 5 especies. La frecuencia en la presencia de bacterias en el intestino medio fue del 24% y se encontró una mayor abundancia relativa de enterobacterias y enterococos, entre 10^3 y 10^6 UFC/mg de intestino, y una menor abundancia relativa de una microbiota transitoria conformada por *Bacillus*, *Micrococcus*, actinobacterias y otros, y que no superó 100 UFC/mg intestino. Se vio que los géneros *Yokenella* y *Enterococcus* fueron los más frecuentes y la probabilidad de encontrarlos aumentó con el índice de agriculturización. Además, estos géneros estuvieron estrechamente emparentados con los aislados en Brasil. También se confirmó la presencia de un simbionte alojado en la cloaca (V4) de la chinche verde y filogenéticamente emparentado con *Erwinia*.

Para evaluar la funcionalidad *in vitro* de las bacterias aisladas del intestino medio V2-V3 de la chinche verde se utilizaron pruebas bioquímicas y medios específicos. También se realizaron ensayos de fermentación de harina de soja, para evaluar el efecto de la fermentación sobre los inhibidores de cistein proteasas que pueden afectar las enzimas digestivas de la chinche verde. Los resultados indicaron que las *Yokenellas* no tienen la capacidad de degradar los componentes de la dieta más importantes: proteínas de reserva y sacarosa. Sólo algunas cepas pudieron degradar lípidos. Los enterococos no pudieron degradar proteínas ni lípidos, aunque sí degradaron sacarosa. De todas maneras, el proceso fermentativo redujo el poder inhibitorio de la harina de soja frente a la cistein proteasa Papaína, *in vitro*.

Para evaluar la interacción bacteria intestinal-chinche verde se utilizaron metodologías de eliminación de las bacterias intestinales y reinfección con cepas puras. Los resultados mostraron que el índice de infección de los ventrículos V2-V3 de las ninfas de 1er estadio en cautiverio es baja, lo que indica una transferencia ineficiente de estos simbioses desde la madre hacia la descendencia. En ensayos de reinfección se vio que *Yokenella* sp. NvU02 afecta negativamente el desarrollo de las ninfas en 2do estadio y 4to estadio generando un índice de mortalidad del 80% en 6 y 20 días respectivamente. Los adultos infectados con *Yokenella* sp NvU02 no se vieron afectados en su supervivencia, ni se ven alterados los índices de peroxidación lipídica o actividad proteolítica intestinal. Se vio además, que la ausencia del simbionte ubicado en la cloaca (v4) no afecta la supervivencia, ni el desarrollo de las ninfas que se alimentan de soja en cautiverio.

Para los experimentos en los que se evaluó la interacción bacteria intestinal-chinche verde en plantas de soja los resultados indicaron que las bacterias tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de las chinches cuando se alimentan de plantas de soja, ya que disminuyen el peso final alcanzado por las ninfas en 5to estadio. Se vio que afectan negativamente la actividad proteolítica del intestino y aumentan la peroxidación lipídica. La supervivencia de las ninfas infectadas con *Yokenella* sp. NvU02 sólo se vio afectada en los estadios más jóvenes. Además, cuando la chinche verde

infectada con *Yokenella* sp NvU02 se alimenta sobre plantas de soja a campo, el insecto puede eliminar estas bacterias del intestino.

Los resultados de esta tesis demuestran que las bacterias encontradas en el intestino de la chinche verde en zonas productoras de soja de Argentina, no tienen un efecto positivo sobre los insectos que facilite su alimentación de la soja. Contrariamente a lo esperado, las bacterias mostraron efectos negativos sobre las chinches, disminuyendo su supervivencia, crecimiento y desarrollo. Tanto en cautiverio como en plantas de soja, los estadios ninfales jóvenes fueron más susceptibles a la infección bacteriana, mientras que los estadios más avanzados (adultos) toleran la infección y la presencia de bacterias en el intestino medio. La presencia de bacterias en el intestino está relacionada con la diversidad de hospederos y el índice de agriculturización, por lo tanto las bacterias deben tenerse en cuenta cuando se estudia la interacción entre la chinche verde y la soja.

INDICE

Índice

CAPITULO 1 – ANTECEDENTES.	1
1. La problemática de la sustentabilidad en el sistema chinche verde-soja.....	3
2. Relación planta-insecto en el modelo soja-chinche verde: defensas naturales de la planta y mecanismos de adaptación del insecto.	4
3. La chinche verde, <i>Nezara viridula</i> y su comportamiento alimentario en zonas productoras de soja.....	6
4. Relación bacteria-insecto en ambientes naturales: Naturaleza y estabilidad de las relaciones simbióticas	9
5. Relación bacteria-insecto-planta: abriendo el abanico de hospederos	14
6. El sistema simbiótico intestinal de la chinche verde.....	16
7. El estudio de las comunidades microbianas en el intestino de los insectos: La técnica ARISA y el cultivo microbiano	19
8. El estudio de la relación simbiótica bacteria-insecto a escala de laboratorio y la importancia de las pruebas a campo.....	20
9. HIPOTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	21
10. OBJETIVO GENERAL.....	22
CAPITULO 2 – MATERIALES Y METODOS	25
1. <i>Caracterización de la flora microbiana y aislamientos microbianos</i>	27
2. Caracterización de las bacterias aisladas de intestino de la chinche verde.....	32
3. <i>Identificación de las bacterias aisladas de intestino de la chinche verde</i>	35
4. Identificación por la técnica de MALDI-TOF	39
5. Evaluación del efecto de la fermentación sobre la harina de soja.....	40
6. Funcionalidad de las bacterias intestinales in vivo	42

7. Determinación de la sensibilidad a antibióticos e identificación de la expresión de β -lactamasas para el género <i>Yokenella</i> sp	44
CAPITULO 3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
1. Análisis de la estructura del intestino de la Chinche verde y distribución de las bacterias en cautiverio	53
2. Hospederos de la chinche verde en áreas de producción de soja.....	55
3. La incidencia del hospedero sobre el índice de infección de bacterias en el intestino de la chinche verde	57
4. Identificación y caracterización de bacterias aisladas del intestino medio	59
5. Criterios de selección de aislados para caracterización y ensayos de funcionalidad	63
6. Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias	64
7. Análisis filogenético de las cepas aisladas de Enterobacterias.....	64
8. Caracterización fenotípica y bioquímica de las Enterobacterias y los Enterococos	71
9. Aislados del género <i>Enterococcus</i>	78
10. Efecto de la acidificación sobre los inhibidores de cistein- proteasas de la soja	80
11. Fermentación de soja: evolución del pH y degradación de inhibidores de proteasas	82
CAPITULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
1. Efecto de la presencia del simbionte obligado de la cloaca sobre la supervivencia de las ninfas de <i>Nezara viridula</i>	91
2. Evaluación de la transferencia horizontal de bacterias del intestino medio (V2-V3) en la población de ninfas en cautiverio	96
3. Evaluación de los antibióticos estreptomycin y amoxicilina en la eliminación de las bacterias del v2-v3 en ninfas de 2do estadio	98

4. Supervivencia de ninfas en cautiverio tras una infección con Yokenella sp.....	102
5. Evaluación de la relación bacteria-insecto en el sistema Nezara viridula – Yokenella sp NvU02 – Glycine max. var Williams en condiciones de campo	109
CAPITULO 5 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
1. Incidencia del paisaje sobre la comunidad microbiana de la chinche verde	119
2. El consumo de soja aumenta la riqueza y abundancia de las enterobacterias y los enterococos en el intestino medio de la Chinche verde.	123
3. Probabilidad de encontrar Enterobacterias y/o Enterococos en los sitios de colecta: análisis discriminante	125
4. La intensificación de la agricultura y su efecto en la probabilidad de encontrar chinches infectadas en el v1-v3.....	127
CONCLUSIÓN	136
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>137</u>
ANEXOS	153

INDICE DE FIGURAS

Fig 1 Área sembrada de soja. Año 2014. Fuente: Bolsa de Comercio de Rosario.....	3
Fig 2 Estadios fenológicos del cultivo de soja y período de ataque de la chinche verde <i>Nezara viridula</i>	7
Fig 3 Dibujo de los cinco estadios ninfales de la chinche verde y su estadio adulto	8
Fig 4 Foto de ninfas I sobre postura. Las ninfas se protegen de la deshidratación y de los predadores y adquieren simbioses intestinales	8
Fig 5 Posicionamiento filogenético del simbiote intestinal alojado en la cloaca. Las especies más cercanas corresponden al género <i>Erwinia</i> (Prado y col. 2009).....	18
Fig 6 Intestino de la chinche verde tomada en nuestro laboratorio.....	53
Fig 7. Distribución de las bacterias según ventrículo.	54
Fig8. Hospederos en los que se encontró a la chinche verde y su relación con el ciclo anual.	56
Fig9 Distribución de individuos con presencia (negro)/ausencia (gris) de bacteriasl....	58
Fig 10. Diagrama de flujo de una primera aproximación de la identificación bacteriana	62
Figure 11. Posicionamiento filogenético de las siete cepas aisladas de <i>Yokenella</i> sp ...	66
Fig 12. Ubicación filogenética de <i>Pantoea</i> sp. NvPO1 (Flecha negra).	67
Fig 13. Posicionamiento filogenético de cepas aisladas de <i>Enterococcus</i>	69
Fig 14. Posicionamiento filogenético de simbiote alojado en la cloaca de <i>Nezara viridula</i>	70
Fig 15. Actividad lipolítica de las cepas de <i>Yokenella</i> sp	76
Fig 16 Acidificación de un suspensión de harina de soja al 20%.....	81
Fig 17 Acidificación de un suspensión de harina de soja al 20%	82
Fig 18. Porcentaje de inhibición de la enzima cistein proteasa papaina frente a extractos de inhibidores de cistein proteasas.....	84
Fig 19. Proteínas solubles (mg/ml)	85
Fig 20. Perfiles ARISA.	92
Fig 21. Supervivencia y pesos promedio de adulto simbióticos y aposimbióticos. de caja y bigotes para los pesos promedio alcanzados por las chinches al día 35 del ensayo..	96

Fig 22. Índice de Infección de <i>N. viridula</i> en sus estadios ninfales en cuativerio,	97
Fig 23. Perfil ARISA obtenido en cautiverio.....	98
Figure 24. Efectividad del coctel de antibióticos.....	101
Fig 25. Foto que confirma el nivel de infección de las chinches	104
Fig 26. Supervivencia de ninfas infectadas con <i>Yokenella</i> sp NvU01 y NvU02.	104
Fig 27. Supervivencia de ninfas infectadas con <i>Yokenella</i> sp NvU02.....	105
Fig 28. Supervivencia de ninfas infectadas con <i>Yokenella</i> sp NvU02.	107
Fig 29. Peroxidación lipídica (TBARS) (a) y actividad cistein proteasa (b).....	109
Fig 30. Curvas de supervivencia de <i>N. viridula</i> infectada con <i>Yokenella</i> sp NvU02	111
Fig 31. Índice de infección (a) y peso promedio (b)	112
Fig 32. Análisis de correlación.	113
Fig 33. Peroxidación lipídica (a) y actividad cistein proteasa total (b)	115
Fig 34. Mapa de las 24 colectas realizadas entre los años 2012-2014.....	119
Fig 35 (a) Frecuencia en la presencia de bacterias por colecta teniendo en cuenta el hospedero en el que se encontraban los insectos.....	124
Fig36 .Análisis discriminante de los sitios de colecta.....	126
Fig 37. Distribución de las colectas según proporción de individuos infectados (Ninf/Nt) con Enterobacterias o Enterococos, teniendo en cuenta la superficie sembrada de soja en el departamento ($p=0.0072$).	128

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización de las colectas	28
Tabla 2- Análisis microscópico y molecular de los aislados.	61
Tabla 3: Identificación de Enterobacterias por el método de galerías de pruebas bioquímicas API 20E (Biomerieux). x.....	63
Tabla 4 Aislados en este trabajo y aquellas que fueron utilizadas para los análisis filogenéticos de <i>Yokenella</i> , <i>Pantoea</i> y <i>Enterococcus</i>	68
Tabla 5 Prueba bioquímica de identificación de API 20E para las cepas aisladas de <i>Yokenella</i> sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr.	73
Tabla 6 Pruebas bioquímicas de identificación de API 50 CHE (50 fuentes de hidratos de carbono para Enterobacterias) para las cepas aisladas de <i>Yokenella</i> sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr.....	74
Tabla 7 Caracterización bioquímica del aislado identificado como <i>Pantoea conspicua</i> NvP01 con batería de reacciones Bioquímicas API 20E y API 50 CHE.	77
Tabla 8. Prueba bioquímica de identificación de API 50 CHL (50 fuentes de hidratos de carbono para identificación de <i>Lactobacillus</i>) para las cepas aisladas de <i>Enterococcus</i> sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr.	78
Tabla 9 Salida del análisis estadístico ANOVA.....	84
Tabla 10 pH alcanzado por los fermentos luego de 24h de incubación a 37°C.....	86
Tabla 11 Análisis de correlación entre el pH final del fermento y su capacidad de inhibir la papaína	87
Tabla 12 Sensibilidad de <i>Yokenella</i> sp a antimicrobianos.....	99
Tabla 13 Salida del análisis ANOVA	102
Tabla 14 Peso Promedio e índice de infección de chinches	113
Tabla 15 Comunidades microbianas descriptas en cada sitio de colecta.	121

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1. La problemática de la sustentabilidad en el sistema chinche verde-soja

La soja es el cultivo que ocupa la mayor superficie agrícola en Argentina con 20 millones de ha. anuales. Este cultivo se distribuye en 13 provincias con variados niveles de intensificación, con una zona de producción mayor al 50% del territorio departamental en el Sur de la provincia de Santa Fé, Noroeste de Buenos Aires y Este de Córdoba, y zonas con producciones menores que se extienden desde el sur de la provincia de Buenos Aires hasta el Centro Norte del país (Fig 1).

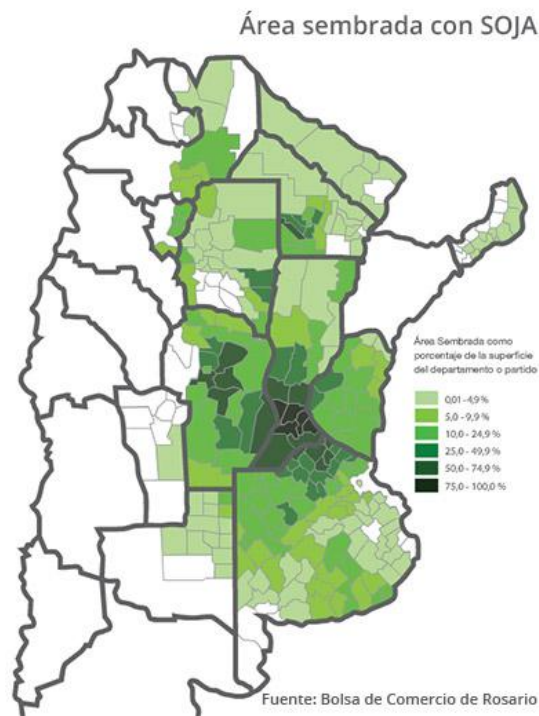


Fig 1 Área sembrada de soja. Año 2014. Fuente: Bolsa de Comercio de Rosario

En nuestro país se estimó para el 2015 una producción de 60 MT (55,6 MT en la campaña anterior) con un rendimiento promedio de 33,3 qq/ha y un área sembrada de 20,2 millones de ha (Informe GEA-BCR 21/4/15). Con este volumen, Argentina fue el tercer exportador mundial de soja con 8,5 MT, detrás de Brasil 49,8 MT y EEUU 48,3

MT. Pero, mantiene su primer lugar como exportador de harina con 31 MT y de aceite con 5,1 MT, respectivamente ¹. Para obtener altos rendimientos de soja, el paquete tecnológico incluye la aplicación de agroquímicos para controlar malezas e insectos plaga, como el complejo de chinches, en el que se incluye a la chinche verde (*Nezara viridula*). Para evitar pérdidas de rendimiento, los productores utilizan pesticidas como bifentrina 10%, tiametoxan 14% y 25%, zetametrina 20%, Imidacloprid 20%, entre otros, que tienen probada toxicidad sobre insectos benéficos y controladores naturales ²⁻⁵. La liberación de los nuevos cultivos de soja transgénicos, que expresan la toxina cry producida por el *Bacillus turigiensis* (BT), genera resistencia al ataque de orugas lepidópteras pero no es una herramienta eficiente contra el ataque del complejo de chinches ⁶. Además, otras complejidades, como el apropiado manejo de los sistemas de manejo integrado de plagas (MIP's) hace que se continúe con el uso de pesticidas químicos de amplio espectro, que afectan directamente a la biodiversidad y la sustentabilidad de los agroecosistemas. Tanto las consideraciones ambientales, como las económicas hacen que sea urgente el desarrollo de conocimiento del sistema chinche verde-soja, para generar soluciones alternativas.

Para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan el control de plagas manteniendo la sustentabilidad del sistema, es necesario tener un profundo conocimiento sobre la compleja interacción que se produce cuando la planta es atacada por un insecto.

2. Relación planta-insecto en el modelo soja-chinche verde: defensas naturales de la planta y mecanismos de adaptación del insecto.

La chinche verde es una de las plagas más importantes del cultivo de soja en Argentina y Brasil. Este insecto se alimenta de semillas de soja en desarrollo, para lo cual debe

picar y atravesar la vaina con su sistema picador y succionador. Durante el picado de las semillas la chinche inyecta enzimas digestivas que disuelven las paredes celulares para succionar el contenido celular, produciendo el aborto o la deformación de las semillas y la penetración de microorganismos patógenos, que pueden provocar podredumbre ⁷.

La respuesta *inmunológica* comienza con el reconocimiento, por parte de la planta, de las secreciones bucales de los insectos y de los daños celulares que ellos producen, y se transmiten dentro de la planta en una serie de procesos que le otorga cierta resistencia ⁸. Mediante la amplificación y transducción de las señales derivadas de la interacción con insectos, las proteínas quinasas activadas por mitógenos, o del inglés MAPKs, cumplen un papel central en la inducción de los mecanismos de defensa en soja. Estas proteínas activan pasos metabólicos como la síntesis de la fitohormona ácido jasmónico (AJ), que regula la producción de defensas contra herbívoros, como isoflavonoides e inhibidores de proteasas digestivas ⁸. Los isoflavonoides disminuyen la capacidad proteolítica de las enzimas digestivas de los insectos, uniéndose covalentemente a las proteínas y evitando su hidrólisis. En particular, la daidzeína y la genisteína de la soja tienen una función defensiva contra el ataque de chinches debido a que disminuyen su supervivencia, crecimiento y ganancia de peso ⁹.

Por su parte, los inhibidores de proteasas digestivas disminuyen la asimilación de aminoácidos en el intestino de los insectos que los consumen, afectando negativamente su crecimiento y desarrollo ¹⁰. En particular, las enzimas de tipo cistein proteasas presentes en el intestino de los hemípteros, se podría ver afectada por inhibidores específicos de tipo cistatinas ¹¹. Las cistatinas de las plantas o fitocistatinas son inhibidores competitivos de la familia de cistein proteasas C1A (tipo papaína) presentes en una amplia variedad de plantas ¹². La orizacistatina, presente en el grano de arroz ha sido ampliamente estudiada ya que constituye una herramienta biotecnológica para el diseño de cultivos resistentes a insectos plaga con un probado efecto deletéreo sobre el desarrollo de áfidos, coleópteros y nematodos ¹³⁻¹⁶. La

cistatina de soja fue purificada, secuenciada y su actividad inhibitoria se probó frente a extractos de intestino de cinco coleópteros plaga: *A. obtectus*, *C. maculatus*, *T. castaneum*, *E. variuensis*, y *Z. subfaciatus*¹⁷. Este estudio demostró que la cistatina de soja tiene la capacidad de inhibir las proteasas digestivas de los insectos in vitro, en diferentes grados aunque no pudo identificar si esto se debió a diferencias en la afinidad entre proteínas o a la existencia de proteasas digestivas que puedan suplantar la actividad de aquellas inhibidas.

Algunos insectos presentan mecanismos que le permiten evadir los efectos de los inhibidores de proteasas: i) aumentando la síntesis de la enzima inhibida, II) sintetizando nuevas isoenzimas que no sean inhibidas por los inhibidores, III) sintetizando enzimas que degraden a los inhibidores e isoflavonoides, IV) seleccionando semillas con menos niveles de antinutrientes, o V) favoreciéndose de la actividad metabólica de la flora microbiana que coloniza el intestino^{14,18}.

3. La chinche verde, Nezara viridula y su comportamiento alimentario en zonas productoras de soja

La chinche verde (*Nezara viridula*, Linnaeus, 1758; Hemiptera: Pentatomidae) es una especie cosmopolita y puede encontrarse en regiones subtropicales de América, Asia, Australasia y Europa entre las latitudes 45° N y 45° S¹⁹. Sin embargo, trabajos recientes ubican a la chinche verde en zonas más templadas posiblemente debido al cambio climático y la expansión del área sembrada de soja^{20,21}, indicando que se sigue distribuyendo hacia nuevas áreas. En estadio adulto, esta especie es un volador fuerte y sin dudas a utilizado el viento y los transportes comerciales en su amplia dispersión¹⁹.

La chinche verde es polifitófaga. Se han identificado hasta el momento más de 100 especies diferentes de plantas pertenecientes a más de 30 familias que actúan como

hospederas y entre las cuales figura la soja (*Glycine max*) como la fuente de alimento preferencial de este insecto ¹⁹. Dentro del complejo de chinches que atacan a este cultivo, *N. viridula* es considerada la plaga más importante porque al alimentarse directamente de las semillas reduce su calidad y su potencial germinativo, afectando la producción ²¹⁻²³.

N. viridula tiene un ciclo anual que comprende cinco generaciones ¹⁹. La dinámica poblacional de las chinches está sincronizada con el crecimiento reproductivo del cultivo de soja. Por lo general estos insectos manifiestan un marcado crecimiento poblacional desde floración en adelante ⁷. Las chinches colonizan el cultivo en forma de manchones en la etapa de floración o poco antes y luego comienzan a dispersarse hacia otros sectores del cultivo, coincidiendo con la formación de vainas. A partir del estado fenológico de la soja R5, la población aumenta marcadamente hasta la madurez fisiológica del cultivo. Luego, desde R5.5 la distribución comienza a ser uniforme en el cultivo y se mantiene hasta la madurez ⁷. Este comportamiento posiblemente esté ligado a la dispersión de las ninfas, las que a partir del cuarto estadio pueden desplazarse aproximadamente 7- 10 m desde el lugar de oviposición ²⁴. La cuarta y quinta generación ocurre dentro del cultivo ¹⁹.

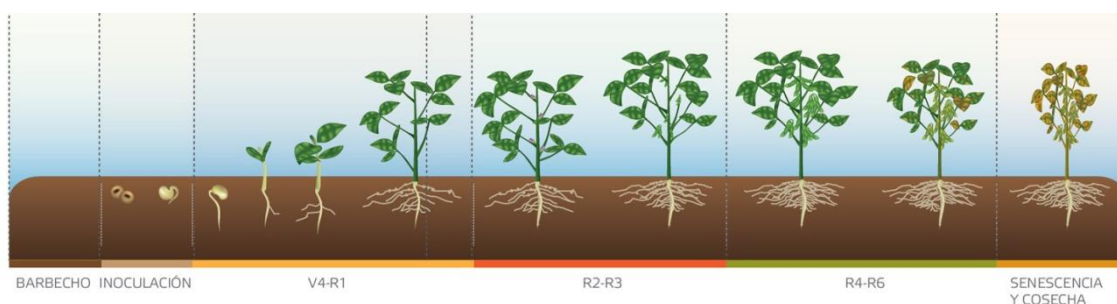


Fig 2 Estadios fenológicos del cultivo de soja y período de ataque de la chinche verde *Nezara viridula*.

En general, el adulto de *Nezara viridula* ovipone entre 30-90 huevos preferentemente en el envés de la hojas de las plantas y sobre vainas de leguminosas. Al nacer, las

ninfas permanecen sobre los huevos, alimentándose y protegiéndose de la deshidratación y los depredadores ²⁵.

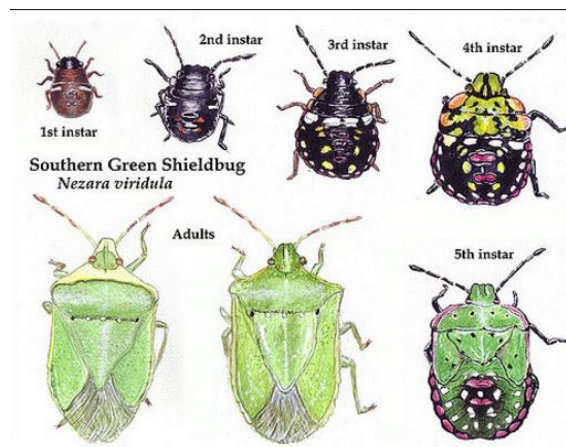


Fig 3 Dibujo de los cinco estadios ninfales de la chinche verde y su estadio adulto (Modificado de Ashley Wood).

Las ninfas I y II tienen hábitos gregarios, y no producen daños en la planta. A partir de las ninfas III se inicia el periodo normal de alimentación. En la soja, las ninfas del cuarto y quinto estadio son las responsables de la dispersión de esta plaga. Asimismo se ha señalado que las formas adultas causan más daños en la producción que las ninfas IV y V ²⁵.



Fig 4 Foto de ninfas I sobre postura. Las ninfas se protegen de la deshidratación y de los depredadores y adquieren simbiosis intestinales

Mientras la soja no se encuentra disponible o no tiene fruto, las chinches se alimentan de hospederos alternativos y su preferencia varía de acuerdo a la maduración y la fenología de estos, siendo más atractivas aquellas plantas con frutos y vainas en formación ²⁶. En áreas de inviernos templados cuando la soja no está disponible en el campo, la chinche verde se alimenta de hospederos secundarios ²⁶, mientras que en zonas más frías, como Argentina, la última generación en alcanzar la adultez busca refugio debajo de la corteza de los árboles donde comienza la diapausa. Este es un período crítico para el insecto ya que su población es más susceptible a sufrir disminución en la supervivencia frente a situaciones climáticas adversas ²⁰.

Este comportamiento alimentario y la diversidad de hospederos de *N. viridula*, enfrenta al insecto a una gran variedad de dietas con diferencias en los valores nutricionales y en los contenidos de antinutrientes, así como también a una diversidad de microorganismos epífitos y endófitos que podrían formar parte de la comunidad microbiana intestinal, permitiéndole al insecto adaptarse a las distintas condiciones. Las posibles relaciones simbióticas entre microorganismos y la chinche verde tienen una particular importancia debido a que este insecto debe tolerar muchos compuestos químicos defensivos de las plantas para poder alimentarse, y las bacterias podrían estar cumpliendo un papel importante en esta adaptación.

4. Relación bacteria-insecto en ambientes naturales:

Naturaleza y estabilidad de las relaciones simbióticas

La diversificación y el éxito evolutivo de los insectos ha dependido, en parte, de un sinnúmero de relaciones con microorganismos benéficos que han sido conocidos por aumentar el valor nutricional de las dietas, permitir la digestión de compuestos recalcitrantes, protegerlos de predadores, parásitos y patógenos, contribuir en comunicaciones intra e interespecíficas, disminuir la eficiencia de vectores de enfermedad y gobernar sistemas de cópula y reproducción ²⁷⁻³⁰.

La relación simbiótica entre un microorganismo y su insecto hospedero es toda aquella que comprende la adquisición y el mantenimiento de la bacteria y que resulta en una nueva estructura o metabolismo, que puede beneficiar o no al hospedero ²⁷. Las relaciones simbióticas bacteria-insecto involucradas en la interacción planta-insecto están gobernadas por cuatro variables principales: a) naturaleza de la simbiosis, b) transmisión y establecimiento del simbiote, c) estructura y fisiología del intestino y d) dieta.

Naturaleza de la simbiosis

La simbiosis puede ser obligada o facultativa, dependiendo de si la bacteria y el insecto pueden tener vida libre. Las simbiosis obligadas están generalmente asociadas a la infección de estructuras especializadas, como los bacteriocitos en áfidos ^{31,32} o la cloaca de los hemípteros ³³. Generalmente, la simbiosis obligada viene acompañada de una reducción del genoma bacteriano como parte de la evolución del sistema, posiblemente relacionado a una redundancia en pasos metabólicos o a la generación de compuestos tóxicos debido al entrecruzamiento de vías análogas ³⁴. Por ejemplo, la chicharrita *Homalodisca coagulata*, que se alimenta de xilema y presenta dos simbiontes obligados: *Baumannia cicadellinicola* y *Sulcia muelleri* ³⁵. El primero tiene un genoma de 686 kpb con la capacidad de sintetizar vitaminas y cofactores, pero con la imposibilidad de sintetizar aminoácidos. El segundo, con un pequeño genoma de 150 kpb, tiene la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos esenciales para el hospedero. Esto genera una co-dependencia vital entre ambos simbiontes y el insecto.

Por otro lado, las simbiosis facultativas favorecen el *fitness* del insecto pero no son necesarias para la supervivencia. Las bacterias tienen vida libre, son obtenidas del ambiente, suelo o planta, y han sido responsables en muchos casos de la

especialización de los insectos por nuevos hospederos ²⁹. En el apartado V se hará referencia más exhaustiva sobre la importancia de esta interacción.

Transmisión y establecimiento del simbiote

La adquisición de las bacterias intestinales puede ser por transmisión vertical u horizontal ²⁷⁻²⁹. La transmisión vertical está regulada por el accionar de la madre. *Nezara viridula* unta la superficie de los huevos durante la oviposición y las ninfas se infectan con el simbiote al emerger o durante las primeras horas de vida ³⁶. Otra chinche, *Megacopta punctatissima*, deposita cápsulas que contienen al simbiote y que son ingeridas por las ninfas al nacer ³⁷. La más común es la transferencia transovárica que se produce dentro del conducto ovipositor y antes de que la pared de los huevos quede rígida. La transferencia vertical garantiza que la descendencia sea infectada con el simbiote lo que le permitirá subsistir en el hospedero elegido por la madre, y en general son simbiosis obligadas. Los hemípteros han transformado a la última porción del intestino, la cloaca, en una estructura compleja donde alojan un simbiote obligado especie-específico, transmitido verticalmente por la madre ³³. Se encuentra parcialmente aislada del resto del intestino por un septo taponado con mucus, que solo el simbiote es capaz de atravesar para lograr colonizar las paredes de la cloaca. La chinche verde, perteneciente a esta familia, y también posee esta estructura diferenciada ³⁸.

La transmisión horizontal es individuo-dependiente. La mecánica de infección fecal-oral es importante para los insectos sociales o altamente gregarios como las termitas, abejas, cucarachas, etc. ^{28,39}. Les confiere homogeneidad en las comunidades y una transferencia eficiente de simbioses obligadas y facultativas. Los insectos que atraviesan una metamorfosis completa (holometábolos) sufren una drástica reducción de su flora microbiana ⁴⁰. En particular las abejas, necesitan 10 días para restablecer la flora intestinal propia de la colmena ³⁹. Así, los insectos sociales presentan comunidades

homogéneas entre individuos, con géneros bacterianos establecidos que cumplen roles fundamentales en la supervivencia de sus hospederos. Los antecedentes de insectos que adoptan simbioses beneficiosos colectados de las plantas o el suelo será revisado en la sección V de este capítulo.

Estructura y fisiología del intestino

Las estructuras de los sistemas digestivos son diversos y varían de acuerdo a las especies y estadio de desarrollo de los insectos, desde el tubo recto y uniforme de las larvas ⁴¹, hasta los complejos sistemas de células especializadas en los áfidos ^{31,32} y cochinillas ^{42,43}. Para muchas especies de insectos, esta estratificación permite que cada ventrículo tenga funciones específicas, acompañadas de cambios de pH y concentraciones de oxígeno que promueven el crecimiento de algunas bacterias y limitan el de otras ²⁸. El intestino de los insectos consta de tres regiones primarias: intestino anterior, medio (ventrículos) y posterior. El intestino medio es el sitio donde se produce la digestión y absorción en la mayoría de los insectos ²⁸.

Las células epiteliales del intestino medio segregan una membrana peritrófica (MP) formada por proteínas, glicoproteínas y microfibrillas de quitina en una matriz de proteoglicanos ⁴⁴. Esta MP divide el lumen intestinal en dos espacios endo y ectoperitrófico lo que la convierte en una primer barrera de protección, ya que evita que toxinas y patógenos ingeridos con la dieta entren en contacto de la pared intestinal ⁴⁵. El silenciamiento de dos genes involucrados con la formación de la MP, quitina sintasa y peritrofina en la termita subterránea, *R. flavipes*, aumentó sensiblemente la mortalidad cuando fueron expuestas al pesticida imidacloprid ⁴⁶. También se observó que si se altera el entrecruzamiento proteico de la matriz, esta pierde la función de barrera ante exotoxinas de microorganismos patógenos como *P. aureuginosa* ⁴⁷. Algunos insectos no producen MP, entre ellos se encuentran la

mayoría de los homópteros (orden Hemiptera)⁴⁴. De todas maneras, no se ha registrado la ausencia de MP en chinche verde.

Dieta

Varios estudios muestran el efecto de la dieta en la relación bacteria-insecto⁴⁸⁻⁵¹. La diversidad bacteriana es significativamente más alta en insectos omnívoros que en estenófagos (carnívoros o herbívoros)⁵². Un estudio de 62 especies de insectos, incluida *N. viridula*, demostró que la dieta afecta la relación intraespecífica cuando las bacterias y el hospedero están íntimamente relacionados, como por ejemplo aquellos que degradan lignocelulosa en el intestino de insectos xilófagos⁵³. De todas maneras, también se ha observado que muchas especies de insectos mantienen un *core* estable de especies bacterianas a pesar de los cambios ambientales. El tracto intestinal de adultos de *Bactrocera dorsalis* (Diptera, Tephritidae) contiene una comunidad bacteriana diversa, algunas de las cuales son estables. Las más representativas fueron *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pectobacterium* y *Serratia*. Luego, distintas condiciones ambientales y fuentes de alimentos influyen sobre la diversidad de la comunidad^{50,54}. Las comunidades microbianas del intestino medio de individuos de *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae) de cinco poblaciones y alimentándose de tres dietas diferentes revelaron que la composición de la comunidad es cuantitativa y cualitativamente bastante estable, siendo *Clostridium*, *Coriobacterium* y *Gordonibacter* los más abundantes⁵⁵. Esto demuestra que la dieta puede influir en la relación planta-insecto y que está fuertemente asociado a la relación simbiótica entre estos. A partir de los antecedentes presentados se podría inferir cuán diversa y abundante es la microflora de la chinche verde, aunque es importante resaltar el impacto que podrían tener los agroecosistemas en comparación con los ecosistemas naturales. Las relaciones bacteria-insecto en sistemas alterados por la producción agrícola son tema de análisis en la sección siguiente.

5. Relación bacteria-insecto-planta: abriendo el abanico de hospederos

El objetivo de la presente tesis fue estudiar el papel que cumplen las bacterias intestinales de la chinche verde cuando se alimentan de semillas de soja. Por lo tanto, se profundiza en el estudio de las relaciones simbióticas que han permitido a los insectos adaptarse a nuevos hospederos mediados por bacterias.

Interacciones primitivas en la naturaleza

Uno de los casos más estudiados de adaptación de insectos a un hospedero mediada por bacteria, es la relación de los áfidos con su simbiote, *Buchnera aphidicola*, que fue originada hace más de 200 millones de años ³¹. *B. aphidicola* es un simbiote obligado que se aloja en una célula diferenciada, denominada bacteriocito y que complementa la dieta sintetizando aminoácidos esenciales. El bacteriocito le permite a los áfidos alimentarse del floema, lo cual significa una dieta pobre en amino ácidos y principalmente constituida por agua, sales y azúcares. Del mismo modo, las termitas xilófagas dependen de la comunidad microbiana de su intestino para degradar la lignocelulosa de la dieta. Esta comunidad incluye especies de actinomicetes, bacillus, pseudomonas, entre otros ⁵⁶⁻⁶⁰. Sumado a esto, las condiciones extremas de alcalinidad en la sección anterior del intestino de las termitas permite mantener un reservorio de nuevas especies bacterianas extremófilas desconocidas que podrían estar cumpliendo un papel fundamental en la digestión de la dieta ⁶¹. Otro ejemplo interesante sobre la función de las bacterias en insectos es la larva del escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), que ha logrado adaptarse al hospedero eludiendo el sistema de defensas de la planta. El insecto utiliza las bacterias que se encuentran en la saliva para disfrazar su ataque ⁴¹, ya que la planta percibe un ataque

microbiano y desata su mecanismo de defensa específica para controlar esta invasión, que no afecta al insecto.

Estos son algunos ejemplos de sistemas en los que las bacterias han permitido la especialización de los insectos por nuevos hospederos, lo que le permite colonizar nuevos nichos y evolucionar hacia nuevas especies. De todas maneras, es importante analizar qué ocurre en los sistemas de producción agrícola, donde las interrupciones sobre grandes extensiones afectan la flora microbiana, la vegetal y la fauna autóctona.

Nuevas interacciones en los agroecosistemas

Las tecnologías utilizadas en los sistemas de producción agrícola como cambios en el manejo del suelo, las rotaciones de cultivos o los agroquímicos, como pesticidas y herbicidas, moldean las comunidades microbianas del suelo y las plantas. Los insectos pueden adoptar estas nuevas especies como medio para adaptarse rápidamente a los ambientes alterados ⁶². Un caso de adaptación a un nuevo hospedero es el de la chinche japonesa *Megacopta punctatissima*, plaga de soja en Japón, con su simbiote *Ishikawaella capsulata* ⁶³. La especie relacionada *Megacopta cribaria*, no se desarrolla bien cuando se alimenta de soja y esto se revierte cuando se la infecta con el simbiote de *M. punctatissima*. Estos resultados sugieren que el estatus de peste no está relacionado a la especie de insecto sino a su relación con el simbiote obligado ⁶⁴. Un caso similar ocurre con *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte, plaga del maíz en el norte de los Estados Unidos ¹⁸. El sistema de rotación de cultivos maíz-soja permitió controlar las poblaciones de *D. virgifera* que no estaban adaptadas a alimentarse de soja, hasta que se observaron los primeros insectos resistentes a la rotación. Los resultados de los análisis de la microbiota intestinal sugieren que son las bacterias las que estarían permitiendo al insecto adaptarse al nuevo hospedero (soja), a pesar de las defensas específicas contra estos insectos.

Para el caso de los insecticidas, en Korea y Japón se comprobó que la resistencia de la plaga de soja *Riptortus pedestris* al pesticida organofosforado Fenitrotión, se debió a la actividad degradadora del pesticida de una bacteria simbiótica del género *Burholderia*⁶⁵. Esta bacteria debe ser adquirida del suelo por las ninfas de cada nueva generación⁶⁶. Los antecedentes presentados nos llevan a preguntarnos cuál es el resultado de 40 años de producción de soja sobre el moldeado de la flora microbiana de la chinche verde en Argentina y qué relación se estableció en esta interacción insecto-bacteria-planta.

6. El sistema simbiótico intestinal de la chinche verde

Mecanismo de alimentación de la chinche verde: aparato bucal y sistema digestivo.

La chinche verde presenta un sistema picador-chupador⁶⁷. Cuando se alimenta de soja, las mandíbulas de un adulto, en forma de estilete, perforan el tejido de las vainas y los tallos, y pueden alcanzar a las semillas en formación. Algunas chinches utilizan un método de lacerado y alimentación al ras mientras que otros, incluido *Nezara viridula*, utilizan un mecanismo vascular⁶⁷. La saliva es liberada dentro del tejido de la planta, lo que resulta en una degradación enzimática de los componentes de la célula vegetal (azúcares y lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), y los productos de la digestión son luego reabsorbidos para su posterior digestión en el intestino¹¹. Pueden alimentarse de diferentes partes de la planta: tallos, follaje, flores, vainas y semillas, pero una vez iniciada la etapa reproductiva del cultivo muestran una marcada predilección por vainas y semillas⁷.

El intestino de *N. viridula* se ajusta a la estructura modelo de los hemípteros ^{33,38}. Consta de cuatro ventrículos (V): intestino anterior (V1), intestino medio (V2), estómago (V3), cloaca (V4); y el intestino posterior (H: por hindgut). El intestino anterior y el posterior están internamente recubiertos por cutícula y sufren leves alteraciones cada vez que el insecto muda de estadio ^{19,28}. El pH del intestino de la chinche verde varía en cada ventrículo: V1: 6.6 +- 0.18; V2: 6.1+- 0.08, V3:5.2 +- 0.46; V4: 6.6+- 0.06 ³⁸. Debido a que la chinche se alimenta de soja que produce inhibidores de proteasas digestivas, las cistein proteasas de la chinche que tienen un pH óptimo a 5.5-6 pueden ser inhibidas por estos péptidos ^{8,11,68,69}.

Bacterias en el intestino de la chinche verde

Muy poco es lo que se sabe sobre la comunidad microbiana de la chinche verde. Hasta el momento se ha reportado la identificación de dos especies en el intestino medio, *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) y *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder), y posiblemente *Pantoea* sp. en la cloaca ³⁸. Otros dos estudios se focalizaron en el simbionte obligado, alojado en la cloaca de este hemíptero, que está presente en una gran variedad de lugares, incluyendo Japon, Hawaii, California y Brasil ^{70,71}. El simbionte obligado fue detectado en la superficie de los huevos pero no en los ovarios de las chinches, lo que sugiere una transferencia oral antes que transovárica. La madre luego de la oviposición, unta los huevos con una suspensión del simbionte que es adquirida por la ninfa cuando emerge y se alimenta del contenido del huevo ³⁶. Análisis filogenéticos de la secuencia del 16S ARNr obtenidos de la cloaca de las chinches ubicaron a todos los simbioses en un *clade* con especies de *Erwinia* y *Pantoea*, ambas bacterias asociadas a plantas ⁷⁰(Fig 5).



Fig 5 Posicionamiento filogenético del simbiote intestinal alojado en la cloaca. Las especies más cercanas corresponden al género *Erwinia* (Prado y col. 2009)

Con respecto a la importancia del simbiote en las chinches, existen dos estudios independientes con resultados contradictorios^{36,71}. En el primer estudio la eliminación del simbiote sólo produjo una leve elongación en los períodos de muda de las ninfas. El experimento se realizó a 25°C y fotoperiodo 14:10 (L:D) y las ninfas fueron alimentadas con vainas verdes frescos de *Phaseolus vulgaris*, repollo y maní tostado sin sal³⁶. En un segundo estudio menos del 20% de las ninfas del 3er estadio sobrevivieron al tratamiento de eliminación del simbiote, y el experimento fue realizado en condiciones similares al primer estudio, pero las ninfas fueron alimentadas con granos de soja maduros y secos, y maní crudo⁷¹. Estos resultados sugieren que la dieta podría ser un factor determinante en la supervivencia de las ninfas cuando el simbiote es eliminado del sistema.

Por lo expresado en las secciones anteriores, se entiende que también es importante caracterizar la flora microbiana del intestino medio de la chinche verde, y el vacío de conocimiento sobre quiénes son y qué función cumplen estas bacterias, impide utilizar esta información para el desarrollo de nuevas herramientas para el control de la plaga en el cultivo de soja. Para una profunda caracterización de la flora microbiana de la chinche verde en zonas de producción de soja se consideró necesaria la utilización de técnicas de biología molecular complementadas con técnicas tradicionales de cultivo.

7. El estudio de las comunidades microbianas en el intestino de los insectos: La técnica ARISA y el cultivo microbiano

Las bacterias intestinales de la chinche se han relacionado con este insecto por medio del cultivo de soja por al menos 40 años. Para poder estudiar el mecanismo de simbiosis entre las bacterias intestinales y el insecto, y determinar si las bacterias permiten a la chinche verde adaptarse a las defensas de la soja, es necesario realizar una identificación precisa de la comunidad microbiana asociada al intestino de chinches de zonas de producción sojera. La combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo de bacterias permite una mejor aproximación no sólo cualitativa sino cuantitativa de los distintos componentes de la comunidad^{72,73}.

Las técnicas de análisis de comunidades y metagenómicas de intestinos han sido revisadas y discutidas extensamente⁷⁴⁻⁷⁷. En este trabajo se optó por utilizar la técnica de análisis automático del espaciador intergénico entre la secuencia del 23S y el 16S ribosomal (del inglés ARISA), ya que permite comparar entre comunidades microbianas y evaluar el efecto de cierto tratamiento de manera eficiente^{48,78-84}. De todas maneras, es una técnica cualitativa que debe ser acompañada por una metodología que permita cuantificar ciertos parámetros que nos den un panorama más certero y completo de lo que ocurre en el sistema. En este trabajo se eligió una técnica de

cultivo en placas para evaluar la abundancia de las bacterias, lo que también permitió el aislamiento de cepas para su posterior identificación y caracterización. El aislamiento de bacterias también permitió evaluar propiedades funcionales y su efecto sobre la supervivencia y el crecimiento y desarrollo del insecto.

8. El estudio de la relación simbiótica bacteria-insecto a escala de laboratorio y la importancia de las pruebas a campo.

Algunas de las asociaciones simbióticas tienen un origen muy antiguo y son de naturaleza obligada mientras que otras se han generado recientemente y son facultativas. Los simbiosomas obligados raramente tienen vida libre mientras que los facultativos pueden ser cultivados y transfectados, mientras se encuentre la metodología correcta ⁸⁵. La mecánica utilizada para estudiar la relación simbiótica bacteria- insecto suele mantener la siguiente estructura: La primer etapa es la obtención de insectos aposimbióticos mediante la esterilización superficial de los huevos ^{36,71}, la eliminación de sacos que contienen al simbiote ⁶⁴ o, lo que es más común, el uso de antibióticos ^{18,30,41,49}. Una segunda etapa es la de someter a los insectos con y sin simbiote, a distintos tratamientos y evaluar ciertos parámetros como la supervivencia, la ganancia de peso y la oviposición. También se suelen evaluar parámetros específicos, como las actividades enzimáticas o la expresión ^{18,41,49}.

Es difícil encontrar trabajos en los que se manipule el sistema bacteria-insecto y este sea luego probado en experimentos a campo, sobre un hospedero natural del insecto. En esta tesis se intenta atravesar por todas las etapas necesarias para alcanzar el objetivo crucial: conocer cómo responde la chinche verde cuando se alimenta de una planta de soja en presencia de un simbiote específico.

9. HIPOTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las comunidades microbianas discurren entre suelo, planta e insectos, colonizando nuevos nichos y transformando interacciones. Estos procesos se dan naturalmente o con la presión ejercida por las actividades del ser humano. Frente a estos cambios algunas especies se ven beneficiadas, otras afectadas y otras tienen la plasticidad suficiente como para adaptarse, y encontrar nichos que le permitan reproducirse y diseminarse.

La chinche verde es un insecto polifitófago, expuesto a un sinnúmero de especies de la flora epífita y endófito de sus hospederos. La composición y estabilidad de la flora intestinal no sólo debería estar condicionada por la estructura y fisiología del intestino, sino también influida por cambios en la ingesta de nutrientes y compuestos antihervíboro. Se considera que la diversidad de bacterias en el intestino de la chinche no es alta, teniendo en cuenta los registros ya mencionados. Además, se considera que las condiciones de cautiverio con una dieta homogénea podrían afectar su biodiversidad intestinal.

Tras 40 años de interacción entre el cultivo de soja y la chinche, el insecto podría estar recurriendo a un sistema simbiótico intestinal, que le permite tolerar los factores anti nutricionales de la soja, como los inhibidores de proteasas. Las bacterias que habitan el tracto gastrointestinal de la chinche presentarían propiedades funcionales como la sobreproducción de proteasas digestivas o la degradación de inhibidores e isoflavonoides. Por otro lado, teniendo en cuenta que se tienen datos sobre la capacidad bacteriostática de algunos isoflavonoides e inhibidores de proteasa de la soja, como la genisteína o el inhibidor de tipo Kunitz⁸⁶, estas defensas químicas podrían afectar la composición o el metabolismo de la comunidad microbiana intestinal de la chinche verde.

El conocimiento de cómo funciona la interacción entre la chinche verde y la soja nos permitirá desarrollar nuevas alternativas de manejo de la plaga en un cultivo con alta incidencia económica y ambiental en nuestro país.

10. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las comunidades microbianas de la chinche verde en zonas productoras de soja, y analizar la biodiversidad y la función biológica de la comunidad bacteriana en el intestino de la chinche verde, *Nezara viridula*.

Objetivos Específicos:

Objetivo 1)

Caracterizar la comunidad microbiana de la chinche verde mediante técnicas moleculares, en especímenes colectados en cultivos de soja y hospedadores alternativos, y compararla con la comunidad microbiana de los especímenes mantenidos en cautiverio.

Objetivo 2)

Aislar e identificar cepas cultivables, y determinar las propiedades funcionales que otorguen beneficio a la chinche para alimentarse en soja a pesar de las defensas

químicas de las plantas contra herbívoros, tales como los inhibidores de proteasas e isoflavonoides.

Objetivo 3)

Analizar el efecto de los isoflavonoides e inhibidores de proteasas sobre la alimentación de las chinches, e identificar las respuestas de la comunidad microbiana frente a cambios en la dieta, utilizando genotipos de soja que varían en la expresión de sus defensas químicas, como inhibidores de proteasas o isoflavonoides.

Objetivo 4)

Determinar si existe una relación simbiótica bacteria/hospedador de tipo obligada o facultativa, caracterizar la bacteria simbiote, su ubicación en el tracto digestivo y su función en la adaptación de la chinche verde al consumo de soja.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

1. Caracterización de la flora microbiana y aislamientos microbianos

Para estudiar la biodiversidad de las comunidades microbianas se analizaron los contenidos intestinales de chinches colectadas en zonas de producción agrícola comprendidas en las provincias de Buenos Aires, Santa Fé y Córdoba. Se utilizaron técnicas de cultivo microbiano y técnicas moleculares con el objetivo de identificar bacterias cultivables y no cultivables. Los intestinos se trataron individualmente para obtener datos de recuento microbiano y riqueza de especies. Para los análisis moleculares de comunidades microbianas (ARISA), se juntaron todos los individuos muestreados en la colecta y se obtuvo un solo dato por colecta.

Muestreo

Se realizaron 25 colectas en 13 sitios en diferentes momentos del año con un diseño de muestreo aleatorio (Tabla 1). Se registró la ubicación geográfica (latitud y longitud) sobre mapas obtenidos de GoogleMaps. Se registró el día del año siendo 1er de enero el día 1, sin tomar en cuenta el año. Los datos de temperatura media máxima, precipitaciones del mes previo a la colecta y la superficie sembrada de soja para cada departamento se obtuvieron del Sistema Integrado de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. El índice de agriculturización correspondiente al sitio de colecta se calculó como la relación entre la superficie sembrada de soja de la campaña 2013/2014 del departamento y su superficie total.

Tabla 1 Caracterización de las colectas

Nº Colecta	Sitio	Latitud¹	Longitud¹	Fecha²	Día³	SupSoja⁴	Precip⁵ (mm)	T max⁶ (°C)
1	Lujan	-34,569906	-59,118805	18/01/2012	36	0,18	99	30,3
2	Lujan	-34,569906	-59,118805	24/01/2012	42	0,18	99	30,3
3	La Plata	-35,014814	-58,069611	12/03/2013	72	0,005	78	20,3
4	Lujan	-34,569906	-59,118805	06/02/2013	38	0,18	108	30,6
5	Carabelas	-34,037867	-60,871811	19/03/2012	97	0,64	159	25,9
6	Pila	-35,980229	-57,994852	24/03/2012	102	0,03	139	22,3
7	Marcos J	-32,699489	-62,100220	07/04/2014	98	0,63	108	26,4
8	Chacabuco	-34,642247	-60,852295	11/04/2014	102	0,65	163	24,6
9	Villegas	-35,056980	-63,006592	18/04/2014	109	0,39	205	22,2
10	Pila	-35,980229	-57,994852	24/04/2012	133	0,03	46	15,2
11	Rafaela	-31,269161	-61,484985	29/04/2015	120	0,64	17	31,3
12	CABA	-34,590259	-58,457565	13/06/2012	183	0,01	9	14,8
13	Rojas	-34,198173	-60,731049	25/05/2014	146	0,64	121	17,2
14	Pila	-35,980229	-57,994852	24/06/2013	176	0,03	8	14,5
15	Carabelas	-34,037867	-60,871811	24/06/2013	176	0,64	25	15,9
16	Pergamino	-33,897777	-60,571060	05/07/2014	187	0,65	77	15,2
17	Carabelas	-34,037867	-60,871811	17/07/2012	199	0,64	18	16,2
18	Oliveros	-32,578063	-60,853958	19/07/2014	201	0,65	47	18,2
19	Pincen	-34,834096	-63,923950	04/08/2013	217	0,33	2	17,9
20	Pincen	-34,834096	-63,923950	21/08/2014	234	0,33	17	18,1
21	Pila	-35,980229	-57,994852	03/09/2014	247	0,03	71	17,9
22	Carabelas	-34,037867	-60,871811	30/09/2012	292	0,64	111	20,1
23	Carabelas	-34,037867	-60,871811	30/09/2014	274	0,64	98	20,9
24	Rafaela	-31,269161	-61,484985	13/10/2015	287	0,43	83	25,1
25	Areco	-34,265161	-59,449768	25/10/2012	317	0,6	212	23,3

*1 Latitud y Longitud: indicador del Sitio de colecta, *2 Fecha: indicador del hospedero (HS, Soja o Diapausa), *3 Día: día del año de la colecta *4 SupSoja: superficie sembrada de soja/superficie total del departamento (índice de agriculturización); *5 Tmax: Temperatura máxima media el día de la colecta; *6 Precipit: mm de lluvias en los últimos 30 días previos a la colecta;

Dissección y obtención del homogenato intestinal

Los insectos fueron diseccionados en esterilidad dentro de las 5 horas posteriores a la colecta. Para evitar la contaminación externa, el protocolo de disección fue el siguiente:

- Con tijera de microcirugía estéril se decapitó el adulto y se cortaron las patas. Se esterilizaron pinzas y tijeras nuevamente.
- Se roció alcohol 70% sobre el individuo y se cortó el borde del abdomen en su totalidad, para extirpar completamente el intestino sin perder fragmentos ni contenido, con pinza de microcirugía estéril.
- El intestino se colocó en tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml con un volumen de 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.5.
- Los intestinos se disgregaron con potter de polipropileno (Sigma), estéril hasta obtener un homogenato.

Nota: Para la obtener los ventrículos individuales, el procedimiento se realizó con una lupa binocular esterescópica (Nikon, Japon).

Extracción de ADN total de intestino

La extracción de ADN total del intestino se realizó con el kit de extracción UltraClean Fecal ADN kit (MOBIO) a partir de 900 μ l del homogenato de intestino. Cada intestino individualmente homogenizado se centrifugó durante 1min a 14.000 rpm para obtener un precipitado que contenga las bacterias. El sobrenadante se descartó y los precipitados de todos los intestinos de la colecta fueron incorporados al primer tubo del kit de extracción para la etapa de ruptura celular con microperlas de sílice. Luego se continuó con el procedimiento de extracción de ADN según indicaciones del

fabricante. Para cada muestra se obtuvieron 20 μ l de ADN con una concentración adecuada para la ulterior amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis molecular de comunidades microbianas -ARISA.

Análisis molecular de la comunidad microbiana - ARISA

Se utilizó la técnica de Análisis Automático del Espaciador Intergénico Ribosomal (ARISA) para el análisis de la comunidad microbiana intestinal del insecto, según Kent y Bayne (2010). El método ARISA utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región del espaciador intergénico del operón ARNr bacteriano (ITS). Las diferencias en las longitudes de estos espaciadores son diagnósticas de diferencias en las poblaciones microbianas. La reacción de PCR ARISA incluyó Buffer 5X Go Taq Green 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 250 mM de cada dNTP 10 mM, 1 μ l de cada cebador 10 mM, 0,5 μ l de polimerasa GoTaq 5 U/ μ l (Promega, Madison, USA), y 2 μ l de ADN total en un volumen final de 25 μ l. El espaciador intergénico ribosomal fue amplificado utilizando los cebadores: 1406f, 5'-TGYACA CACCGCCCGT-3' (16S ARNr), y 23Sr, 5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3' (gen 23S ARNr). El cebador 1406f fue marcado en el extremo 5' con el colorante fosforoamidita 6-FAM. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti de Applied Biosystem (USA) con una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de 94°C – 35 seg, 55 °C - 45 seg y 72 °C - 45 seg, y una etapa final de elongación a 72° C durante 2 min. El largo de los fragmentos ITS para cada muestra se determinó por electroforesis capilar desnaturalizante usando el equipo ABI 3130 de AppliedBiosystems, con patrón interno GSLIZ1200 en la Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología del INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina). La mezcla de reacción fue 10 μ l de Formamida desionizada, 1 μ l de muestra y 0,15 μ l de GS1200LIZ por pocillo en microplaca. Se desnaturalizan las placas de genotipificación, conteniendo los fragmentos de ADN fluorescentes en formamida durante 5 min. a 95 °C en termociclador. Se sumergen en

hielo rápidamente y se mantienen al menos 2 min. a 0 °C. Se precipita el volumen por centrifugación durante al menos 30 segundos. Se inyecta en el equipo. Los resultados se analizaron con los programas informáticos PeakScanner 1.0 y GeneMapper 1.0.

Determinación de la riqueza y la abundancia de los aislamientos bacterianos

La riqueza se calculó según el número de colonias morfológicamente distintas en la comunidad microbiana de cada colecta y la abundancia como el número de unidades formadoras de colonia por miligramo de intestino (UFC/mg intestino) para cada uno de esos morfotipos. Luego se aisló un representante de cada morfotipo según el siguiente protocolo:

- A partir de 100 µl del homogenato de intestino de chinche verde obtenida en **(B)** se generaron diluciones seriadas.
- Las diluciones se inocularon, con ayuda de espátulas de Drigalsky, en placas de Agar Tripteina Soja (ATS).
- Las placas se incubaron durante 48 h a 30°C en condiciones aeróbicas y se examinaron al ojo desnudo para obtener los datos de riqueza y abundancia.

Los aislados se mantuvieron en distintas condiciones dependiendo de las necesidades del trabajo.

Mantenimiento de cepas

- Para mantenimiento a largo plazo: Las colonias puras se repicaron en 5 ml de tripteina de soja caldo (TSC) y se cultivaron durante toda la noche a 30°C en

agitación a 200 rpm. Las células crecidas se colectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS pH 7,5, se resuspendieron en caldo triptena de soja (CTS) fresco y glicerol al 10% en tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml y se guardaron en freezer -80 °C.

- Para los ensayos: Las bacterias se mantuvieron (luego de obtener crecimiento por incubación a 30 grados) en tubos pico de flauta de ATS a 4 °C con repiques cada 10 días. Los ensayos se realizaron con bacterias de no más de 3 repiques.

2. Caracterización de las bacterias aisladas de intestino de la chinche verde

Para la caracterización inicial de las bacterias aisladas se utilizaron metodologías de visualización por microscopia, pruebas bioquímicas y medios diferenciales.

Observación al microscopio de preparado con tinción de Gram

Para cada bacteria se realizaron dos preparados disgregando una punta de tip de una colonia pura crecida en ATS durante toda la noche a 25 °C en 3 µl de PBS estéril sobre un portaobjeto. Los preparados preparados fueron teñido con el colorante de Gram (Anexo 6) para identificar el grupo de pertenencia según Gerhardt y col (1994)⁸⁷ se observaron al microscopio con objetivo 100x en un microscopio Nikon y aceite de inmersión (Biopack).

Caracterización del metabolismo por batería de pruebas bioquímicas para Enterobacterias fermentadoras (API 20E)

Todos los bacilos gram negativos oxidasa negativos fueron caracterizados utilizando galerías API® 20E (Biomerieux) y test complementarios (Anexo5). Los resultados obtenidos se analizaron con el software APIWeb (Biomerieux). Se utilizaron cultivos de menos de 18 h crecidos en placas de ATS. Una colonia pura se resuspendió en solución fisiológica (NaCl 0,85%) y fueron inoculadas en las galerías como indica el fabricante. Las observaciones de los cambios de color se hicieron a las 24 y 48 h.

Caracterización del metabolismo bacteriano por batería de pruebas bioquímicas: 50 fuentes carbonadas (API 50CH)

El API 50CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API 50CH se utiliza en combinación con el API 50CHL Medium para la identificación de *Lactobacillus* y microorganismos próximos, o con API 50CHB/E Medium para la identificación de los *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Para la galería de API 50CH fue necesario utilizar además la suspensión específica para enterobacterias API 50CHE. Las galerías API 50CH están compuestas por 50 microtubos y permite el estudio de la fermentación de sustratos pertenecientes a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Para el caso de los *Enterococcus*, la suspensión API50CHL fue elaborada en el laboratorio según el protocolo ofrecido por la empresa para dicho producto (Anexo 5). Para la realización de este ensayo se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Luego de la inoculación de los pocillos con la suspensión bacteriana, se agregó aceite mineral a

cada pocillo para identificar la utilización de las fuentes carbonadas por fermentación, por un viraje de color del rojo al amarillo. Las lecturas se realizaron tras 24 y 48 h.

Caracterización del metabolismo bacteriano con medios de cultivo diferenciales: actividad proteolítica y lipolítica

Para estudiar potenciales propiedades funcionales de las bacterias aisladas relacionadas a la digestión de la dieta (proteínas y lípidos), se utilizaron medios que evidencien las actividades proteolítica y lipolítica. En ambos casos, se preparó un inóculo equivalente a una suspensión 0,5 McFarland a partir de una colonia pura de la bacteria, a partir de cultivos en placas de ATS de 18 h a 37°C. Tres microlitros de suspensión bacteriana se inocularon en discos de papel de filtro estéril de 5 mm de diámetro, colocados sobre placas de Petri con medios Agar leche 10% y Agar Aceite de oliva-Rodamina B. Por cada placa se ubicaron equidistantes tres discos de papel de filtro. Las placas se cultivaron durante 96 h a dos temperaturas: 25 °C y 37 °C en estufas de cultivo.

Un caso positivo de actividad proteolítica en un medio Agar leche al 10% se corresponde con un halo de transparencia alrededor de la colonia crecida producto de la proteólisis de la caseína. Un caso positivo de actividad lipolítica en medio Agar Rodamina B se corresponde con una colonia y halos de un color naranja o rosado fluorescente cuando se lo incide con luz UV 350 nm, producto del complejo formado por la rodamina-B catiónica y el uranil-ácido graso⁸⁸. Para observar la fluorescencia se utilizó un transiluminador (Biorad) con lámparas UV de 360 nm. Las fotografías se tomaron con una cámara Olympus C-5060 incorporada al equipo y se editaron con el programa DOC IT-LS.

3. Identificación de las bacterias aisladas de intestino de la chinche verde

Para la identificación de todos los aislados bacterianos se amplificó la secuencia V4, del rADN 16s, utilizada generalmente por su alta variabilidad y fidelidad en el proceso de secuenciación ya que es un fragmento de tamaño medio (860 pb)⁴⁸. Luego se amplificó el gen casi completo del 16S ARNr (1450pb)⁸⁹, para aumentar resolución y para la construcción de los árboles filogenéticos.

Purificación de ADN bacteriano y secuenciación

El ADN de las cepas puras se purificó con Kit UltraClean Bacterial ADN (MOBIO). Se debieron utilizar 2 pares de cebadores para la identificación de las bacterias:

- 1) Amplificación de la sección variable 4 (V4) del 16S rARN: un fragmento parcial del 16Sr rARN de aproximadamente 860 pb se amplificó con cebadores universales 530f (5'-GTGCCAGCM GCCGCGG-3') y 1392r (5'-ACGGGCG GTGTGTRC-3') según Geib y col (2009)⁴⁸. La mezcla de PCR incluyó Buffer 5X Go Taq Green 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 250 mM de cada dNTP 10 mM, 1 µl de cada cebador 10 mM, 0,5 µl de polimerasa GoTaq 5 U/µl (Promega, Madison, USA), y 1 µl de ADN total en un volumen final de 25 µl. La reacción de PCR consistió en una primer etapa de desnaturalización de 2min a 94°C, 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 55 °C - 1 min y 72 °C - 1,5min, y una etapa final de elongación a 72 °C durante 5 min.
- 2) Amplificación del gen completo del 16S rARN: Para el armado de los árboles filogenéticos fue necesario amplificar un fragmento casi completo del gen 16S rARN. Este fragmento fue de aproximadamente 1450 pb y se amplificó según Lehman y col (2009)⁸⁹ con modificaciones. Se utilizaron los cebadores

universales para eubacterias 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACYT-3'). La mezcla de PCR fue idéntica a la utilizada en el punto (1) y la reacción consistió en una primera etapa de desnaturalización de 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 55 °C – 30 seg y 72 °C - 30 seg, y una etapa final de elongación a 72 °C durante 2 min.

Visualización y purificación de los productos de PCR

La visualización de los productos de PCR en gel de agarosa permite comprobar la correcta amplificación del fragmento deseado e identificar la presencia de secuencias amplificadas inespecíficas que afectan la eficiencia de la clonación posterior. Las muestras fueron sembradas en gel de agarosa 1,5% teñido con colorante fluorescente GelRed (Biotium INC., EEUU), sin la necesidad de utilizar *buffer* de siembra ya que el *buffer* de reacción de la enzima GoTaq trae incorporado glicerol y un colorante que permite la visualización del frente de corrida. Para el armado de los geles y la corrida se utilizó Buffer TE (Anexo 8). La corrida se realizó en una cuba electroforética BioRad a 100 V y amperaje variable, durante 40 min. Los fragmentos se observaron con un transiluminador UV BioRad a 280 nm.

La metodología utilizada para la purificación de los productos de PCR, dependió de la presencia o no de amplificaciones inespecíficas. Para productos de PCR que sólo contenían el fragmento deseado, el producto de PCR se purificó directamente con el Accuprep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea). Para productos de PCR con más de una amplificación, el fragmento deseado se extrajo del gel con la ayuda de un *cutter* y se purificó con el Accuprep® Gel Purification Kit (Bioneer, Korea).

Clonación de 16S ARNr en vector pGEM-T

Para la clonación de los fragmentos se utilizó el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega). La relación inserto/vector usada en la reacción de ligación fue 3:1, con 1 U de enzima T4 ADN-ligasa e incubada toda la noche a 4°C. Los productos de reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E.coli* DH5a. Las colonias positivas para la reacción se identificaron en placas de LB Agar con Ampicilina 100 ug/ml, IPTG 0,5 mM y X-gal 40 ug/ml. Las colonias blancas se repicaron y analizaron. Para la purificación del plásmido se utilizó QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Group, Hilden, Alemania). Se sembró una punta de tip de la colonia transformada en 5 ml de LB con Ampicilina (100 ug/ml) y se cultivó durante toda la noche a 37°C en agitación. Las células crecidas se recuperaron por centrifugación y se siguió el protocolo de purificación del plásmido como lo indica el fabricante.

Secuenciación de los fragmentos de 16S ARNr

Para la secuenciación del gen 16S ARNr se utilizaron tres pares de cebadores distintos, dependiendo del fragmento de interés:

- Secuenciación de la región variable V4: se utilizaron los mismos cebadores que los indicados para la reacción de amplificación (PCR). El uso de los mismos cebadores produce la pérdida de 25 bases en cada extremo de la secuencia, por lo que el fragmento obtenido para el V4 es de 800pb.
- Secuenciación de gen completo de 16SARNr: se utilizaron los cebadores SP6 y T7 que flanquean el sitio de clonado del vector pGEM-T lo que permite amplificar toda la secuencia clonada sin perder extremos.

- Secuenciación del fragmento interno de la secuencia completa del 16S ARNr: para obtener mayor resolución en la secuenciación se diseñó un segundo par de cebadores que amplificaron un fragmento de aproximadamente 750 pb de la región interna del gen 16S ARNr. Para las enterobacterias, los cebadores fueron: Sp6L01 (5'-AGTTTATCACTGG CAGTCTCC-3') y T7H01 (5'-GTACTTTCAGCGAGGAAAG-3'). Para *Enterococcus* sp. los cebadores diseñados fueron: t7H02 (5'-TCTCGCTAGAGTACCCAACTA-3') y sp6H02 (5'-GGGAATCTTCGGCAATG GAC-3'). El diseño de los cebadores se realizó a partir de las secuencias obtenidas. Las secuencias se alinearon con el programa de alineamiento de secuencias ClustalW y se ubicaron fragmentos de 20 bases con una homología del 100% que flanquearan la secuencia interna del fragmento largo en la que se observaba baja resolución. Las propiedades fisicoquímicas de los oligos se analizaron con OligoAnalyzer 3.1 (IDT, EEUU).

Construcción de árboles filogenéticos

Todos los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo en el software MEGA versión 6.06⁹⁰. Las secuencias correspondientes al gen 16S ARNr se alinearon usando el algoritmo Muscle. Se realizó un estudio basado en los alineamientos y se eligió el modelo Kimura parámetro-2⁹¹ de sustitución con correcciones Gamma para variaciones en el rango de mutación entre sitios. Se consideraron deleciones completas para el tratamiento de los *gaps*. Se generaron árboles filogenéticos a partir de las matrices de distancias por medio del algoritmo de "neighbor-joining"⁹² y se validaron con un *bootstrap* de 1000 repeticiones. La desviación estándar de estas distancias de *bootstrap* se utilizó para estimar la robustez del árbol. Cada presencia de

un agrupamiento particular en el árbol se cuantificó como un porcentaje respecto a los 1.000 árboles. Los porcentajes sobre el 50% se anotaron como indicadores de robustez estadística de una agrupación.

4. Identificación por la técnica de MALDI-TOF

Se intentó, también, la identificación de los aislamientos estudiados mediante espectrometría de masa por MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). Los cultivos fueron desarrollados en medio de cultivo ATS (agar Tripteina de Soja, Laboratorios Britania S.A), incubados a 37 °C durante 18h. Las muestras se procesaron en un espectrómetro Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y se analizaron mediante el software acoplado FlexControl v3.0 (Bruker Daltonics). La determinación se realizó en el laboratorio de la sección "Bacteriología", del Hospital de Clínicas "José de San Martín", de la CABA. Se incluyó el estándar de proteínas N°1 (BTS, Bruker Daltonics) para la calibración del equipo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El análisis se realizó por metodología de extracción directa "on spot"⁹³. Para ello se depositó una colonia sin paso previo de extracción usando un palillo de madera sobre una placa metálica en MALDI-TOF dejando secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron fijadas con 1 µl de ácido fórmico y posteriormente con 1 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico para permitir la co-cristalización de la solución matriz con la muestra a temperatura ambiente. Los positrones se extruyeron linealmente a una aceleración de 20 kV. Los espectros obtenidos representan la suma de los iones obtenidos luego del impacto (en distintas regiones de un mismo pocillo) de 350 disparos automáticos del láser. Los espectros se analizaron en un rango de m/z (relación masa/carga iónica) de 3.500 a 20.000. La identificación se realizó utilizando el programa MALDI Biotyper™ v3.1 (Bruker Daltonics) por comparación entre los espectros de masa obtenidos para los microorganismos en estudio respecto de los que están incluidos en su base de datos.

Se consideró un error posible de una variación de +10 del valor del pico de m/z. Los resultados se interpretaron a partir del puntaje que el software le asignó a cada muestra (en el contexto del análisis que se realizó sobre los microorganismos en estudio)⁹³.

5. Evaluación del efecto de la fermentación sobre la harina de soja

Para evaluar la actividad metabólica de las cepas aisladas sobre los inhibidores de cistein proteasas (IP's) de la semilla de soja, se realizaron ensayos de fermentación *in vitro*. Primero se midió el efecto de la acidificación sobre el contenido de IP's y luego se analizó el efecto de la fermentación bacteriana.

Obtención de la suspensión de harina de soja

Las semillas de soja *Glycine max.* var Williams enteras y maduras fueron molidas con molinillo de café hasta obtener una harina fina. La harina se tamizó con malla metálica de 0,5 mm de poro y se resuspendió en agua destilada estéril hasta alcanzar una suspensión al 20%. Se realizaron alícuotas de 10 ml de la suspensión en tubos tipo Falcon de 15 ml estériles y se pasteurizó en baño líquido a 50 °C durante 1h para evitar que se degraden las proteínas, incluido los inhibidores de cistein proteasas. Una alícuota se guardó inmediatamente en freezer -20 °C, Control sin incubar. El ensayo se realizó por triplicado.

Acidificación de la harina de soja con ácido láctico

Para evaluar el efecto de la disminución del pH sobre los inhibidores de cistein proteasas en la harina de soja, se decidió acidificar la suspensión de harina de soja al 20% con una solución de ácido láctico 0,1 M (Biopack) en un rango de pH 6,6 a 4,1. Para generar una curva de concentración de inhibidores en función del pH, se tomaron alícuotas cada 4 gotas agregadas de ácido láctico y se registró el pH para cada alícuota luego de homogeneizar con ayuda un agitador magnetico. La obtención de los extractos y la medición de la concentración de inhibidores se realizaron según Zavala y col (2008)⁹⁴ con modificaciones (Anexo 3). El ensayo se realizó por triplicado.

Obtención del inóculo y fermentación

Trece cepas aisladas se sembraron por agotamiento en medio ATS y se cultivaron durante 16 h (enterobacterias) y 36 h (enterococos) a 37 °C. Una colonia pura se resuspendió en PBS hasta alcanzar 0,1 OD a 600nm., de la que 100 µl se inocularon en una alícuota de 10 ml de suspensión de soja al 20%, pasteurizada y templada a 37 °C. Los cultivos se mantuvieron por 24 h a 37 °C. Se tomaron alícuotas y se evaluó la capacidad de las bacterias para eliminar antinutrientes de la harina de soja: inhibidores de proteasas y de degradar proteínas en estas condiciones.

Cuantificación de la actividad cistein proteasa de los fermentos y del poder inhibitorio de la harina de soja tras la fermentación

Con el objetivo de identificar la actividad de cistein proteasas bacterianas o endógenas de la semilla, se enfrentó a los extractos de harina de soja fermentada y controles, al sustrato específico p-Glu-Phe-Leu-p-nitroanilida (Sigma) siguiendo el protocolo de

Curzi y col (2012)⁹⁵ mientras que el poder inhibitorio de la harina de soja sobre las cistein proteasas se evaluó según Zavala y col (2008)⁹⁴ con modificaciones (Anexo 3). Las curvas de cinética enzimática se realizaron en un espectrofotómetro de microplacas BIOTEK 808xl, con filtro de 402nm, y el programa informático asociado Gen5 de Bio Tek.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó con reactivo Bio-Rad Protein Assay (BioRad Lab, EEUU) según indicaciones del fabricante para el ensayo de microtitulación, basado en la metodología descrita por Bradford⁹⁶. Para la curva de calibración se usó una solución de albumina bovina 1 mg/ml y las diluciones comprendieron el rango de 0,05 a 0,5 mg/ml. Las muestras de extractos se diluyeron 1/10 en agua destilada. Tanto para las muestras como las soluciones de albumina bovina, se mezclaron en cada pocillo 10 µl con 200 µl de solución de reactivo Bio-Rad Protein Assay 1:4 con agua destilada. Se dejó reposar 5 min y se midió a 595nm en un espectrofotómetro de microplacas BIOTEK 808xl asociado al programa informático Gen5 de Bio Tek.

6. Funcionalidad de las bacterias intestinales in vivo

Todos los experimentos de funcionalidad in vivo se realizaron bajo las metodologías generales que se presentan en el siguiente apartado. Los detalles metodológicos de cada experimento se exponen en el capítulo de Resultados y Discusión.

Insectos: *Nezara viridula*, colecta, cría y mantenimiento.

Las chinches se colectaron en campos de cultivo de soja y alrededores, en localidades de la Prov. de Buenos Aires, Argentina, en distintos momentos del año, y se mantuvieron en el laboratorio en cajas de plástico de 50 cm x40 cm x 30 cm, alimentados con dieta a base de semillas (soja rehidratada, girasol y maní) y vainas verdes de poroto (*Phaseolus vulgaris*). Se les dio de beber una solución de ácido ascórbico 0,1% en agua destilada. Los cambios de alimentos durante la cría se realizaron cada dos o tres días. Las cajas se ubicaron en cámaras de cultivo con fotoperíodo, temperatura y humedad adecuados para el insecto (14:10 Luz:Oscuridad– 23 °C – 60% humedad relativa, respectivamente).

Determinación del índice de infección de las ninfas en cautiverio

Para determinar el índice de infección de las ninfas de chinche verde en cautiverio se seleccionaron cinco posturas y se colocaron en cajas de Petri con algodón con agua destilada. Dentro de las 12 h post eclosión, se tomaron las ninfas en 1er estadio con una punta de pipeta estéril y se homogeneizaron individualmente en pocillos de microplacas de 96 pocillos con 10µl de PBS. Luego, los 10 µl se sembraron en ATS por la técnica de la microgota. Un resultado positivo para infección en el V2-V3 se identificó como la presencia de al menos una colonia en el área de la microgota sembrada.

Eliminación de la microbiota bacteriana del V2-V3 para ensayos de funcionalidad in vivo

Con el objetivo de analizar el efecto de la presencia de las bacterias aisladas sobre el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las chinches, fue necesario el diseño de un coctel de antibióticos. Para ello se realizó un perfil de sensibilidad a antimicrobianos y un ensayo de eficacia del coctel diseñado sobre las chinches infectadas.

*7. Determinación de la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos de *Yokenella sp**

Con el objetivo de caracterizar la resistencia a antibióticos e identificar una posible resistencia de este género a los antibióticos β -lactámicos se realizó un ensayo por difusión en medios agarizado que clasifica a los microorganismos en dos grupos, sensibles o resistentes según puntos de corte predictivos de respuesta clínica preestablecidos. La susceptibilidad frente a los distintos antibióticos de las cepas de *Yokenella sp.* aisladas fue determinada de manera cualitativa por medio de esta metodología siguiendo las normas del CLSI del año 2014⁹⁷. *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control de calidad. Si bien este género no está enunciado en las tablas de interpretación, se utilizaron las correspondientes a enterobacterias y fueron interpretadas como sensibles o resistentes como se estipula para *Escherichia coli*.

Eficacia de un coctel de antibióticos sobre la eliminación de la flora microbiana de la chinche verde

Para evaluar la eficacia del coctel de antibióticos, Estreptomina 1 mg/ml (Laboratorios Richet) y Amoxicilina 0,3 mg/ml (Laboratorios Roemmers) ambos de calidad inyectable, se embebió un algodón con la solución y se lo colocó en una caja de Petri de 10 cm de diámetro, junto a una postura de huevos (n=35-60) un día previo a la eclosión. Los controles se manejaron de manera similar aunque el algodón solo contuvo agua destilada. Luego de la eclosión, las ninfas se mantuvieron sobre los huevos por un corto período para luego trasladarse hacia el algodón para beber. Allí mudaron a segundo estadio. Se evaluó la eficacia del antibiótico cuando todas las ninfas mudaron a 2do estadio. Las ninfas se colocaron en tubos para PCR (200 µl) y se homogeneizaron con punta de pipeta en 10 µl de PBS, los que se tomaron y sembraron en placa de Petri con medio ATS por la técnica de la microgota. Se tomaron como positivos aquellos en los que creció al menos una colonia.

Obtención de una suspensión bacteriana para infectar ninfas de chinche verde

Los aislados se repicaron en placas de agar Tripteina de Soja con ansa por la técnica de agotamiento o estría, para obtención de colonias puras, y se cultivaron por menos de 18h a 37°C. Luego, una colonia pura se resuspendió en PBS para obtener una suspensión 0,5 McFarland. Se realizaron las suspensiones seriadas necesarias para obtener el título deseado para cada ensayo. Una suspensión 0,5 McFarland dio un título de 10^8 UFC/ml tanto para las enterobacterias como los enterococos.

Protocolo de infección de ninfas de chinche verde con *Yokenella* sp

Los experimentos realizados con ninfas en 2do estadio, tanto en cautiverio como aquellos en plantas en el campo experimental, siguieron el mismo protocolo de infección:

1. Las ninfas nacidas de distintas posturas se trataron con el coctel de antibióticos antes definido durante tres días (período del primer estadio).
2. Tras mudar 2do estadio, las ninfas se distribuyeron entre los tratamientos de manera uniforme, con el objetivo de homogeneizar las poblaciones y evitar errores derivados de las diferencias genéticas de las posturas.
3. Tanto los tratamientos de infección como los controles se ubicaron en placas de Petri (10 cm diámetro) sobre papel de filtro estéril, algodón estéril y tres granos de soja *Glycine max* var Williams.
4. Se inocularon 500 μ l de suspensión bacteriana por goteo sobre el papel de filtro alrededor de las semillas de soja. Para los controles, se goteó el mismo volumen de agua destilada.
5. Se corroboró visualmente que las ninfas se hayan trasladado hacia las semillas de soja dentro de los 20 minutos posteriores a la inoculación de la bacteria. Las ninfas del control se mantuvieron con la solución de antibióticos en el agua de bebida todo lo que duró el experimento en cautiverio.
6. Los ensayos se realizaron por tri- o cuatuplicado.

Medición de los parámetros biológicos de la chinche verde en ensayos en condiciones de cautiverio y a campo

Supervivencia: Las curvas de supervivencia a la infección de *Yokenella* sp NvU01 y/o NvU02 se realizó por observación diaria, los primeros 5 días y cada dos días hasta terminar el ensayo. Se anotaron los vivos y muertos y el número de mudas para determinar el largo de los períodos.

Peso: para medir el peso de las ninfas se usó una balanza analítica Ohaus Discovery (EEUU). Las chinches se colectaron de las plantas o de las bandejas en cautiverio y se colocaron en placas de Petri rotuladas. En general, se peso el grupo de chinches por cada tratamiento y repetición, se anotó el número de chinches y luego se calculó el peso promedio en cada caso.

Evaluación de parámetros bioquímicos del intestino de la chinche verde: actividad proteolítica intestinal y peroxidación lipídica

Para evaluar la actividad de cistein proteasas intestinales y la peroxidación lipídica como indicador del stress oxidativo en el intestino de la chinche verde, se diseñó el siguiente protocolo:

- Las chinches se diseccionaron individualmente en esterilidad y los intestinos se homogeneizaron 1:3 con PBS pH 7, utilizando un potter plástico. El homogenato se guardó en hielo.
- Diez microlitros se sembraron por la técnica de la microgota en superficie en medio ATS en placas para evaluar la presencia/ausencia de bacterias.

- Diez microlitros del homogenato se reservaron para medir actividad enzimática digestiva de cistein proteasas. Se reservó en freezer -20º hasta su medición.
- Cinco microlitros se reservaron para cuantificar las proteínas totales por le método de Bradford.
- Entre 100 y 150 µl restantes se utilizaron para la técnica de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) un índice de la peroxidación lipídica según Seljeskog y col (2006) con modificaciones (Anexo 4).⁹⁸⁹⁹
- La actividad enzimática y TBARS se referenciaron al contenido de proteínas.

Si bien las chinches recibieron tratamientos específicos de infección, la presencia/ausencia de bacterias se evaluó también al final del ensayo. Los resultados de actividades enzimáticas y peroxidación lipídica estuvieron asociados a la presencia/ausencia de bacterias al final del ensayo.

Diseño experimental: relación bacteria insecto en condiciones de campo

- **Ubicación:** el experimento se llevó a cabo en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, entre los meses de diciembre a mayo de 2015/2016.
- **Cultivo de soja:** el diseño del experimento a campo constó de cuatro parcelas de de 1,20 m x 0,6 m con una distancia entre plantas de 20 cm. Cada parcela estuvo constituida por 28 plantas de las que se tomaron dos: una para el tratamiento de chinches infectadas con NvU02 y una para el control. Se sembró el cultivar comercial de soja cv. Williams grupo de madurez III, por la técnica de chorrillo. Se hizo raleo, desmalezado y regado manual cuando fue necesario. No se aplicaron Desde el momento de emergencia hasta que las plantas desarrollaron la primera

hoja verdadera se protegió a las plántulas el ataque de palomas usando una mediasombra.

- **Colocación de bolsas en las plantas:** Cuando las plantas alcanzaron un estado de madurez R4 (vainas completamente elongadas y principio de llenado del grano) , se colocaron las bolsas para contener a las chinches. Las bolsas fueron diseñadas de manera de poder contener 2/3 de la parte aérea de la planta. Tubos de tul blanco de 50 cm x 30 cm con cierre de tipo cinturón para ajustar la parte inferior al tallo principal de la planta. La parte superior también contó con un cierre de tipo cinturón para la colocación y extracción de las chinches, el recuento y la limpieza durante el ensayo.
- **Infección de las ninfas y ubicación en plantas:** el protocolo de infección de las ninfas se realizó de la misma manera que para los ensayos en cautiverio. Tras 48h de infección, las ninfas fueron colocadas en cajas de Petri, llevadas al campo experimental y colocadas en las bolsas.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de supervivencia, t Student, ANOVA y post test de Tukey y Dunnet se realizaron con el software estadísticos Prism 5.01 2007 (GraphPad Software Inc). El análisis de varianzas y análisis discriminante se realizó con la versión estudiantil de Infostat.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la comunidad microbiana de la chinche verde

1. Análisis de la estructura del intestino de la Chinche verde y distribución de las bacterias en cautiverio

Las comunidades microbianas de intestinos de adultos de *N. viridula* mantenidos en cautiverio fueron analizadas con la técnica ARISA. El objetivo de este estudio fue obtener información sobre la riqueza, la distribución y la abundancia de los microorganismos en el intestino de la chinche verde. Para ello adultos de chinche verde fueron diseccionados bajo lupa y en esterilidad, y se fotografió el intestino completo para observar los distintos compartimentos (**Fig 6**). El aparato digestivo de la chinche verde se encuentra conformado por cuatro secciones bien diferenciadas: intestino anterior, medio (ventrículos 1-4) y posterior.

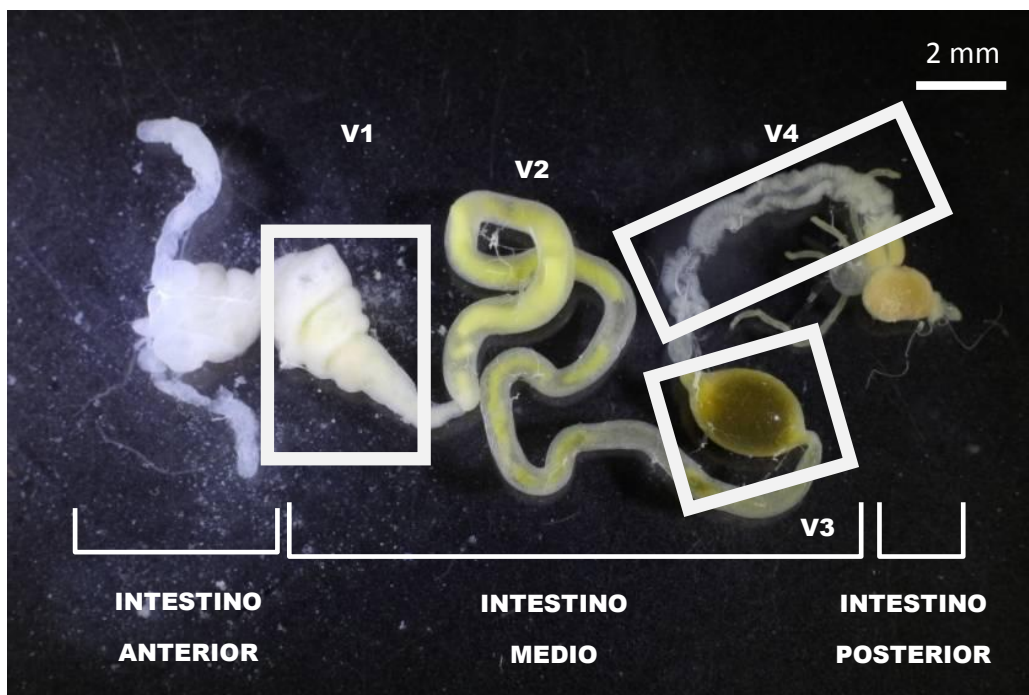


Fig 6 Intestino de la chinche verde tomada en nuestro laboratorio. Se recuadraron los ventrículos 1, 3 y 4 para facilitar la observación de la compartimentalización. Se observa también, en el V2, el empaquetado del bolo alimenticio, propio de los insectos que producen una matriz peritrófica (Engel y Moran, 2013).

Los ventrículos del intestino medio fueron separados y se analizaron individualmente. El análisis molecular de las comunidades microbianas, mostró que el intestino medio contiene bacterias en toda su extensión, pero que existe una colonización diferencial entre los ventrículos (V1-V3) y la cloaca (V4) (**Fig 7**), en concordancia con la estructura general de intestinos de hemípteros ²⁵. El análisis de la actividad proteolítica total en los ventrículos demostró que también existe una actividad digestiva diferencial que está restringida a los ventrículos V1-V3, mientras que la cloaca (V4) podría estar relacionada con la absorción o síntesis de nutrientes ³³

DISTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS EN LOS VENTRÍCULOS DEL INTESTINO MEDIO

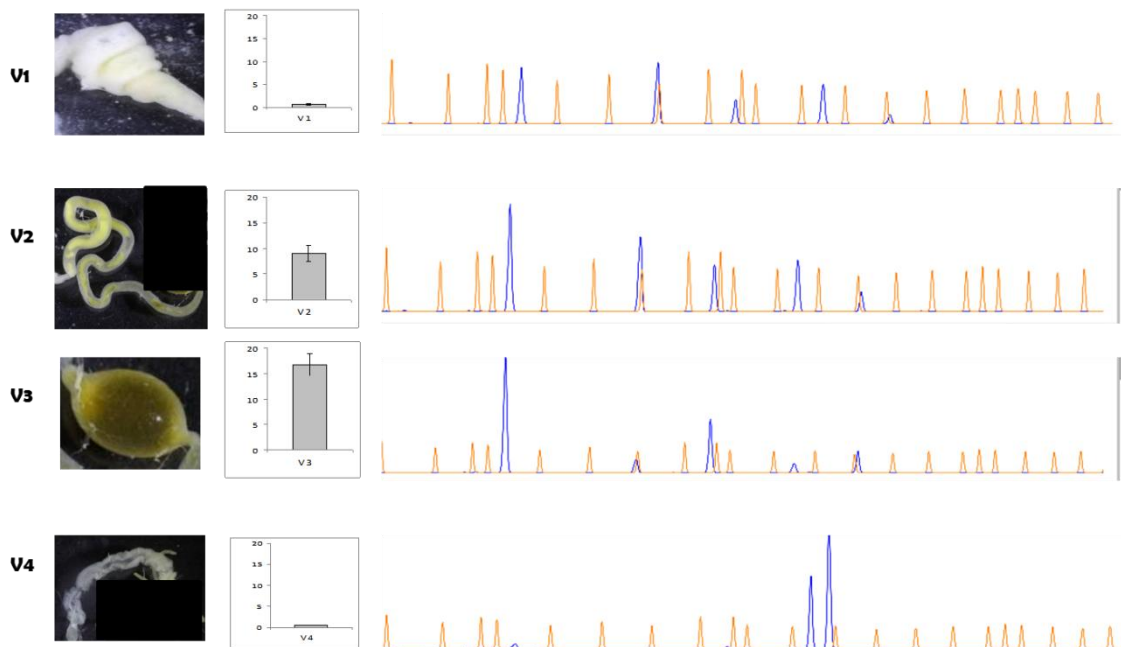


Fig 7. Distribución de las bacterias según ventrículo. De izquierda a derecha: imagen del ventrículo, actividad proteolítica total del ventrículo (Sardoy, PM 2012, comunicación personal), ARISA de para cada fragmento del intestino medio en el que se observan perfiles de picos diferenciales (comunidad bacteriana) entre los ventrículos V1-V4. Fragmentos ITS (picos azules) y patrón de pesos moleculares LIZ1200 (picos naranja).

Al analizar varios individuos en cautiverio (n=20) se obtuvieron resultados similares, concluyendo que la comunidad microbiana de la chinche verde en cautiverio es homogénea y que existen bacterias habitando el intestino medio. Los resultados obtenidos sobre el análisis de los ventrículos sugieren que las bacterias del intestino

medio (V2 y V3) podrían estar involucradas en la digestión de la dieta, y por lo tanto, podrían tener un papel fundamental en la adaptación de la chinche a alimentarse de las semillas de soja. Los fragmentos ITS de 748 y 756pb observados sólo en la cloaca (V4) corresponden al simbionte obligado de *N. viridula* previamente descrito^{70,71}. La identificación de este organismo se desarrolla al final del capítulo.

El paso siguiente fue la colecta de adultos de chinche verde habitando zonas productoras de soja con el objetivo de describir la comunidad microbiana intestinal asociada. El sitio y los hospederos de los insectos fueron tenidos en cuenta al momento de la colecta. Los resultados expuestos de aquí en más hacen referencia a la región del intestino medio con una alta capacidad degradativa según resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Sardoy, PM; comunicación personal) (**Fig 7**).

2. *Hospederos de la chinche verde en áreas de producción de soja*

Durante los años 2012-2014 se realizaron 25 colectas de adultos de *Nezara viridula* con el objetivo de caracterizar las comunidades microbianas del intestino de los insectos. Las colectas se realizaron en 14 sitios de producción de soja en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fé. Entre 4 y 10 individuos adultos fueron colectados a mano de plantas de soja (9 colectas), hospederos secundarios (6 colectas) o de corteza de *Eucalyptus* (9 colectas). Para la colecta en cultivos de soja se tuvo en cuenta que los campos no hubiesen sido fumigados con ningún pesticida. La búsqueda de los especímenes se realizó desde los bordes hacia el centro, respetando el movimiento del insecto dentro del cultivo, obteniendo entre 50-200 individuos, de los que aleatoriamente se eligieron entre 4 y 10 para analizar. Las colectas en hospederos secundarios fueron posibles en dos momentos del año: en primavera, inmediatamente después de que los adultos emergen de la diapausa (septiembre/octubre), y en verano, poco antes de que los adultos comiencen a colonizar el cultivo de soja (enero/febrero).

En los meses de noviembre y diciembre, la alta dispersión de los adultos en búsqueda de sitios adecuados para oviponer y el bajo número de individuos de la población general, hizo muy difícil ubicar a los insectos. Es por esto que durante este período no se pudieron obtener muestras representativas.

Durante el período invernal, de junio a agosto, *Nezara viridula* se encontró bajo la corteza de *Eucaliptus* presentes en los bordes y en parches internos de los cultivos de soja (**Fig8**). En primavera, como resultado del alargamiento del fotoperíodo y el aumento de la temperatura media, *N. viridula* comienza a colonizar distintos hospederos dentro de los montes. Desde mediados de septiembre hasta fines de enero las chinches fueron encontradas alimentándose de frutos de Mora (*Morus nigra* L.), Acacia negra (*Gleditsia triacanthos*) o arbustivas de los bordes como el Lampazo menor (*Arctium lappa*). También se colectaron especímenes en cultivos de maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*), trigo (*Triticum sp*) y pecán (*Carya illinoensis*). Desde principios de febrero hasta fines de abril, se colectaron chinches en Soja. El cultivo de soja se encontraba en etapa de desarrollo R5 según la escala de Fehr y Caviness (1971).

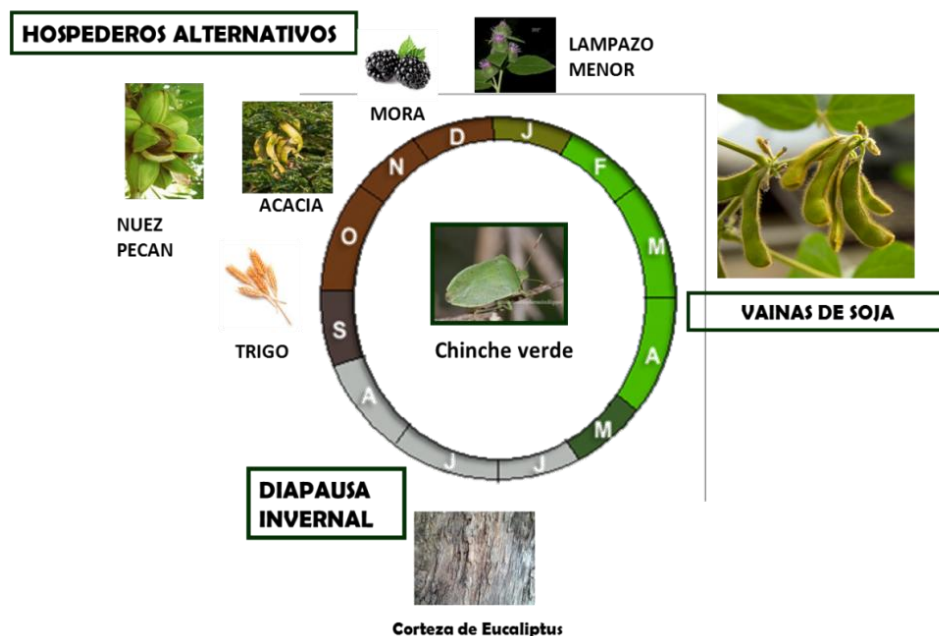


Fig8. Hospederos en los que se encontró a la chinche verde y su relación con el ciclo anual. El ciclo consta de una fase de diapausa invernal, la colonización de hospederos secundarios y por último la entrada al cultivo de soja. Durante el ciclo anual se suceden 4-5 generaciones.

La última generación anual de chinches culmina su desarrollo alimentándose de vainas y semillas de soja cuando la planta se encuentra en estado de senescencia y la temperatura comienza a bajar, momento en el que los adultos buscan refugio debajo de las cortezas de los Eucalyptus para atravesar el invierno (diapausa).

Estos resultados muestran la importancia de la presencia de la diversidad de hospederos y de los *Eucalyptus* en los bordes y montes para la supervivencia de la chinche verde en Argentina. Estos espacios les otorgan refugio durante inviernos fríos y les permiten a los adultos emergidos de la diapausa, obtener recursos para comenzar un nuevo ciclo. La práctica de fumigación de los bordes y parches para el control temprano de la chinche verde no es recomendable ya que son también refugios de una gran diversidad de insectos benéficos y controladores naturales ¹⁰⁰. Teniendo en cuenta la polifagia de este insecto y su exposición a una variada flora epi- y endófito, se decidió evaluar la comunidad microbiana de los adultos frente a las distintas dietas/hospederos.

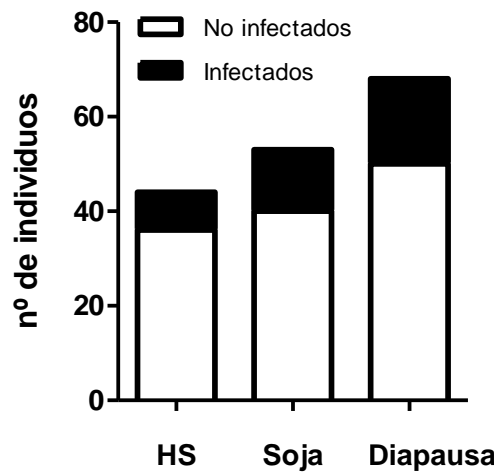
3. La incidencia del hospedero sobre el índice de infección de bacterias en el intestino de la chinche verde

Para el análisis de comunidades microbianas a través del ciclo anual de la chinche verde, se utilizaron técnicas de biología molecular (ARISA y secuenciación del 16S ARNr) suplementado con técnicas de cultivo en placas. Con el objetivo de analizar la frecuencia de infección de los intestinos y su relación con el hospedero (dieta) del insecto, se realizaron disecciones individuales de las chinches y se contaron como positivos (Infectados) aquellos casos en los que las bacterias se observaron tanto en placas de cultivo como en los perfiles ARISA (**Fig9**). Se analizaron adultos que estaban alimentándose de hospederos secundarios (HS), Soja y aquellos que se encontraban en Diapausa.

Ocho (18%), 13 (24,5%) y 18 (26%) de las chinches diseccionadas presentaron bacterias en el V1-3 cuando se encontraron en Hospederos secundarios (HS), Soja o en

Diapausa, respectivamente (**Fig 9**). Se realizó una prueba de independencia entre la probabilidad de que las chinches presenten bacterias, y el hospedero, basada en una tabla de contingencia. No se pudo probar dependencia entre las variables, lo que indicaría que no existe efecto del hospedero (dieta) al momento de la colecta, sobre la probabilidad de encontrar bacterias en las regiones V1-V3 del intestino de los adultos de chinche verde (χ^2 : 1051,2; $p=0.5912$; ns.). Por otro lado, el alto índice de intestinos (> 74%) en los que no se detectaron bacterias en los ventrículos V1-V3 sugiere que la chinche verde puede convivir con éstas, pero que no le son fundamentales para su supervivencia. Por lo tanto, cualquier relación simbiótica entre ellas es facultativa ²⁷.

DISTRIBUCIÓN DE INTESTINOS INFECTADOS Y NO INECTADOS SEGÚN HOSPEDERO



	Hospederos secundarios (HS)	Soja	Diapausa
Infectados	8 (18%)	13 (24.5%)	18 (26%)
No infectados	36	40	50
Total	44	53	68

Fig9 Distribución de individuos con presencia (negro)/ausencia (gris) de bacterias en los ventrículos v1-v3 (n: 165) que se encontraron alimentándose de hospederos secundarios (HS), Soja o que fueron colectados durante la diapausa invernal.

Como se mencionó en la sección de Antecedentes, los simbioses facultativos son aquellos que les han permitido a los insectos adaptarse a nuevos ambientes transformados recientemente por el ser humano, por lo tanto son los más importantes en este trabajo. El paso siguiente fue obtener aislamientos puros para la identificación y caracterización microbiana de estos especímenes.

4. Identificación y caracterización de bacterias aisladas del intestino medio

Los individuos fueron diseccionados dentro de las ocho horas posteriores a la colecta y los homogenatos de intestino sembrados en superficie, en medio agar Tripteina de Soja para obtener aislamientos bacterianos y recuento de colonias. Se obtuvieron 21 aislados bajo el criterio de diferencia en la morfología de la colonia (**Tabla 2**). Para la identificación de cada aislado se utilizó la denominación “Nv” que refiere a la fuente, *Nezara viridula*, seguido de una letra del alfabeto en mayúsculas, que hace referencia a la colecta, seguido de un número que hace referencia al aislado. Por ejemplo, el aislado NvU01 es el primer aislado de intestino de un adulto de *Nezara viridula* de la colecta U.

Teniendo en cuenta que las colectas fueron realizadas durante tres años, las metodologías de tratamiento de aislados se fueron optimizando. Así también la elección de aislados para futuras pruebas de funcionalidad *in vitro* e *in vivo*. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para el análisis microscópico de la tinción Gram, el recuento en placas, el análisis del fragmento V4-V6 del 16S ARNr y su detección por la técnica ARISA. Todos los aislados se observaron al microscopio para observar la forma y garantizar la pureza del cultivo, pero la tinción gram sólo se realizó a aislados con recuento mayor a 10^3 UFC/mg de intestino.

Los aislados detectados por la técnica molecular ARISA fueron NvH01, NvH02, NvM04, NvO01, NvP01, NvP02, NvR01, NvS01, NvU01, NvU02, NvW01, NvW02 y NvMJ01. Todos se presentaron en recuentos mayores a 10^3 UFC/mg de intestino. Este grupo se dividió en bacilos gram – y cocos gram +. Los bacilos gram negativos fueron sometidos a la prueba de oxidasa, que separa a los bacilos Gram – en dos grupos: *Enterobacteriaceae* y No *Enterobacteriaceae*¹⁰¹ (**Fig 10**). Todos los aislados, NvH01, NvO01, NvP01, NvR01, NvU01, NvU02, NvW01 y NvMJ01 dieron negativo para oxidasa correspondiéndose al grupo de las enterobacterias. Un análisis de homología de secuencias del fragmento V4-V6 del gen 16S ARNr con la base de datos GeneBank utilizando el sistema de alineamiento BLAST arrojó los resultados que se detallan en la Tabla 2. Los aislados NvH01, NvO01, NvP02 se emparentaron con el género *Klebsiella*. Por su parte NvP01 estuvo cercano a *Pantoea conspicua*. Para los aislados NvR01, NvU01, NvU02, NvW01 y NvMJ01, se amplificó y secuenció un fragmento casi completo del gen 16SARNr. El resultado de la homología de secuencias con la base de datos SILVA de estas secuencias y de las demás Enterobacterias se discute más adelante.

Los cocos gram + NvH02, NvM04, NvS01 y NvW02, se identificaron por secuenciación directa del fragmento V4-V6 del gen 16Sr RNA, y en todos los casos los aislados estuvieron próximos a *Enterococcus faecalis*. Los bacilos que se presentaron en recuentos menores a 10^3 UFC/mg de intestino NvJ01, NvM02 y NvO02 fueron identificados como *Bacillus* sp, por secuenciación de la región variable V4-V6 del gen 16S ARNr y NvI01 resultó ser *Streptomyces* sp. A su vez, los cocos, NvI02, NvJ01 y NvS02 se identificaron como, *Micrococcus* sp, *Staphylococcus saprofiticus* y *Micrococcus* sp., respectivamente.

Tabla 2- Análisis microscópico y molecular de los aislados.

Aislado *1	Forma	Tinción Gram *2	Detectado por ARISA de toda la comunidad*3	Recuento (log UFC/mg)	16S ARNr V4-V6 (860 pb) Taxón significativo*4	Seleccionado para caracterización y pruebas de funcionalidad*6
NvH01	Bacilo	-	SI	6	<i>Klebsiella oxytca</i>	SI
NvH02	Coco	+	SI	7	<i>Enterococcus faecalis</i>	SI
NvI01	Bacilo	ND	NO	1	<i>Streptomyces</i> sp	NO
NvI02	Coco	ND	NO	1	<i>Micrococcus</i> sp	NO
NvJ01	Coco	ND	NO	1	<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	NO
NvJ02	Bacilo	ND	NO	1	<i>Bacillus pumilus</i>	NO
NvM04	Coco	+	SI	7	<i>Enterococcus faecalis</i>	SI
NvM02	Bacilo	ND	NO	<1	<i>Bacillus</i> sp	NO
NvM01	Bacilo	ND	NO	<1	<i>Klebsiella</i> sp	NO
NvO01	Bacilo	-	SI	6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SI
NvO02	Bacilo	+	NO	1	<i>Bacillus</i> sp	NO
NvP01	Bacilo	-	SI	4	<i>Pantoea conspicua</i>	SI
NvP02	Bacilo	-	SI	6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SI
NvR01	Bacilo	-	SI	4	ND*5	SI
NvS01	Coco	+	SI	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	SI
NvS02	Coco	ND	NO	<1	<i>Micrococcus</i>	NO
NvU01	Bacilo	-	SI	6	ND*5	SI
NvU02	Bacilo	-	SI	6	ND*5	SI
NvW01	Bacilo	-	SI	4	ND*5	SI
NvW02	Coco	+	SI	5	ND*5	SI
NvMJ01	Bacilo	-	SI	5	ND*5	NO

*1: Código de denominación del aislado: NvXN^o; Nv (Nezara viridula) X (colecta) N^o (numero de aislado). *2: La tinción gram sólo se realizó a aislados con recuento mayor a 10³ UFC/mg de intestino. *3: El analisis ARISA realizado a partir del ADN total del intestino incluye o no al aislado. *4: Se indica el género o especie con mayor %ID por homología de secuencias (Blast) con base de datos de GenBank. *5: se indican los aislados seleccionados para futuros ensayos según detección por ARISA y recuentos mayores a 10³ UFC/mg de intestino. *6: Aislados identificados por secuenciación de la totalidad del gen 16S ARNr.

DIAGRAMA DE FLUJO DE UNA PRIMERA APROXIMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

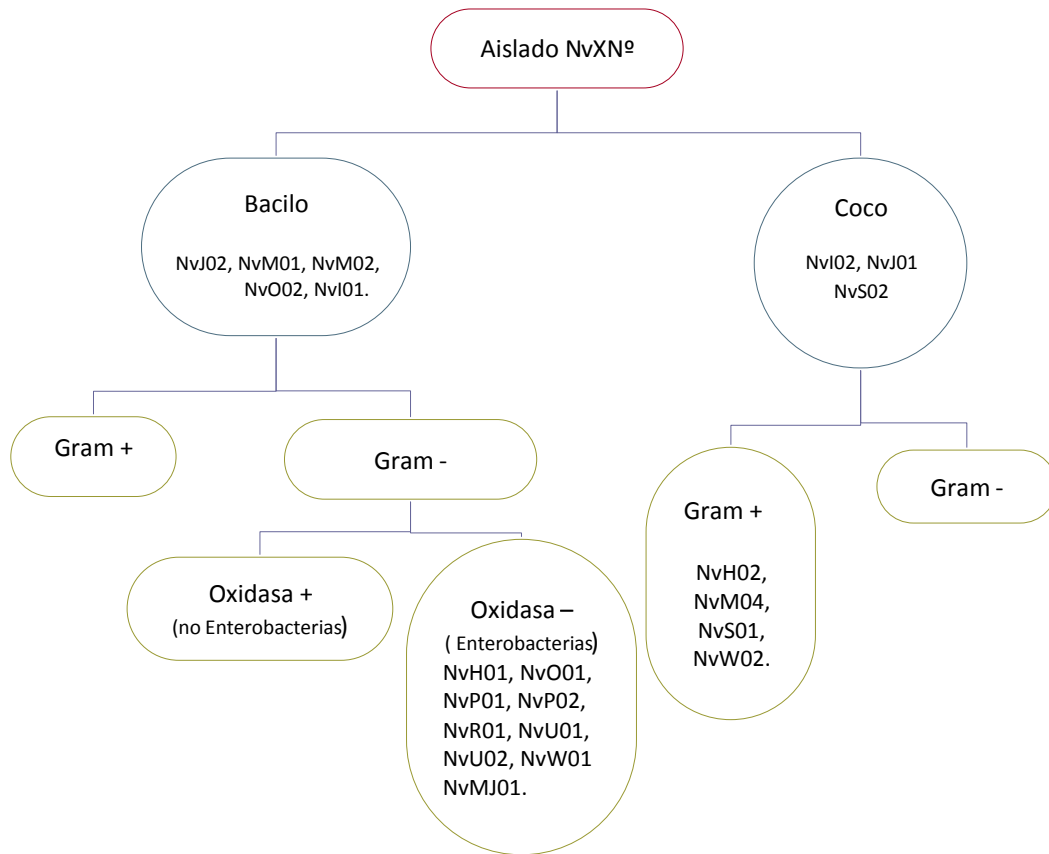


Fig 10. Diagrama de flujo de una primera aproximación de la identificación bacteriana. Código de denominación del aislado: NvXNº; Nv (Nezara viridula) X (colecta) Nº (numero de aislado).

A partir de los resultados presentados en la Tabla 2, la flora presente fue dividida en dos grupos según su abundancia. El primer grupo con una flora de abundancia alta, con un recuento entre 10^3 - 10^6 UFC/mg de intestino, con cepas pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*. El segundo grupo con una flora poco abundante aunque más diversa, con recuentos menores a 100 UFC/mg de intestino, en su mayoría bacilos, micrococos y actinobacterias. Bajo este criterio, en este trabajo se la denominará de aquí en más, *flora transitoria*.

Para evaluar la funcionalidad de los aislados *in vitro* e *in vivo*, fue necesario establecer un criterio de selección que jerarquice cada aislado, teniendo en cuenta el valor

biológico dentro de la comunidad. Para ello, se reevaluaron los conceptos de simbiosis particularmente en la interacción planta-insecto-bacteria en áreas de producción agrícola.

5. Criterios de selección de aislados para caracterización y ensayos de funcionalidad

En este estudio se reconoce como simbiosis entre una bacteria y un insecto, aquella relación en la que el microorganismo es adquirido y mantenido, y que resulta en nuevas estructuras o metabolismos (Zook, 1998). Esta relación no implica que tenga que ser positiva para ambos individuos ²⁷. De acuerdo a estos resultados se podría sugerir que los aislados de enterobacterias y *Enterococcus* que se encontraron en un recuento alto ($>10^3$ UFC/mg de intestino) podrían modificar el ambiente de digestión del intestino, por lo que su presencia afectaría al hospedero de alguna manera, positiva o negativa. Bajo este concepto, las bacterias que podrían tener una relación simbiótica con el insecto asociada a su adaptación a la soja, siguieron los siguientes criterios:

- Se encontraron habitando el intestino medio, en el que también se observó la mayor actividad digestiva de la chinche verde.
- Fueron detectadas por la técnica ARISA
- Se encontraron en recuento mayor a 10^3 UFC/mg de intestino en agar Tripteina de Soja.

Catorce aislados bacterianos fueron identificados en el intestino medio (V1-3) de la chinche verde que cumplen con este criterio. Éstos pertenecieron a dos familias: *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*.

6. Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias

Los aislados que se agruparon dentro de la familia de las Enterobacteriaceae fueron sometidas a un análisis de pruebas bioquímicas API20E y API50 CHE para su identificación y caracterización. Ocho aislados fueron analizados por API 20E de los cuales sólo uno, NvP01, dio un buen perfil para la identificación en el género (**Tabla 3**). Este aislado perteneció al género *Pantoea* con un ID 85,3% con respecto al taxón *Pantoea* spp3. Este resultado coincidió con el análisis molecular del fragmento del gen 16S ARNr. El resto de los aislados presentaron perfiles dudosos o de baja discriminación y fueron asociados a los taxones de identificación *Salmonella choleraesius* (NvH01), *Hafnia alvei* 2 (NvO01), *Pantoea* spp1 (NvP02), *Serratia fonticola* (NvR01 y W01), *Escherichia vulneris* (NvU01) y *Ewinginella americana* (NvU02).

Los resultados de la identificación de las bacterias muestran una inconsistencia entre los resultados obtenidos en la secuenciación del fragmento variable V4-V6 del 16S RNAr y los API20E, que sugieren una falta de sensibilidad y especificidad en las metodologías utilizadas. Estas bacterias aisladas no tendrían representación en la base de datos API 20E. y tampoco es posible lograr una identificación certera de las enterobacterias por secuenciación de un fragmento corto del 16S RNAr.

Si bien la secuenciación del gen 16S RNAr es muy usado para clasificación bacteriana, puede tener poco poder discriminante a nivel de especies y para algunos géneros, particularmente enterobacterias. Con el advenimiento de tecnologías que permiten la secuenciación de comunidades microbianas completas, ha aumentado notablemente la publicación de trabajos en los que se describen las comunidades microbianas de insectos con homología de secuencias de regiones parciales del 16S ARNr ^{18,40,48,74,102}. En muchos casos, la identificación lograda sólo alcanza el nivel taxonómico de Clase, lo que presenta limitaciones al intentar evaluar el papel biológico en la interacción bacteria-insecto-planta. La identificación precisa de la filogenia bacteriana es una herramienta imprescindible cuando se intenta dilucidar un

Tabla 3: Identificación de Enterobacterias por el método de galerías de pruebas bioquímicas API 20E (Biomérieux). x

Aislado ^{*1}	Código API20E	Taxón Significativo	%ID ^{*2}	Pruebas en contra	Perfil
NvH01	7 1 0 4 1 5 2 5 7	<i>Salmonella choleraesuis</i>	63,5	CIT 75% H2S 99% SOR 99%	Baja discriminación
NvO01	5 1 0 4 1 0 0 5 7	<i>Hafnia alvei 2</i>	79,0	MOB 0%	Dudoso
NvP01	1 2 0 5 3 3 3 1 7	<i>Pantoea spp3</i>	85,3	CIT 21% MOB 85%	Buena identificación en el género
NvP02	1 0 0 4 1 0 2 5 7	<i>Pantoea spp 1</i>	67,1	SAC 98%	Baja discriminación
NvR01	5 3 0 4 3 5 3 5 7	<i>Serratia fonticola</i>	98,4	SOR 100%	Dudoso
NvU01	7 1 0 4 1 5 3 5 7	<i>Escherichia vulneris</i>	94,5	ODC 0%	Dudoso
NvU02	1 0 0 4 1 0 0 5 7	<i>Ewingella americana</i>	73,0	CIT 75% VP 95%	Baja discriminación
NvR01	5 3 0 4 3 5 3 5 7	<i>Serratia fonticola</i>	98,4	Sorbitol 100%	Perfil dudoso
NvW01	1 3 0 4 3 5 3 5 7	<i>Serratia fonticola</i>	82,4	Sorbitol 100%	Dudoso

*1: Código de denominación del aislado: NvXN^o; Nv (Nezara viridula) X (colecta) N^o (numero de aislado). *2: La tinción gram sólo se realizó a aislados con recuento mayor a 103 UFC/mg de intestino. *3: El análisis ARISA realizado a partir del ADN total del intestino incluye o no al aislado. *4: Se indica el género o especie con mayor %ID por homología de secuencias (Blast) con base de datos de GenBank. *5: se indican los aislados seleccionados para futuros ensayos según detección por ARISA y recuentos mayores a 103 UFC/mg de intestino. *6: Aislados identificados por secuenciación de la totalidad del gen 16S ARNr.

mecanismo de interacción ya que da una dimensión de la incidencia de ciertos grupos o géneros en las interacciones específicas de hospederos y su relación entre ellos. Debido a la inconsistencia de los resultados entre el 16S ARNr y los API20E, se eligió proseguir con un análisis de identificación bacteriana por MALDI-TOF sólo para las enterobacterias y la secuenciación del gen completo del 16S ARNr de enterobacterias y enterococos relevantes para esta tesis.

7. Análisis filogenético de las cepas aisladas de *Enterobacterias*

En este apartado se exponen los resultados definitivos de la identificación a partir de la secuenciación de un fragmento del 16S ARNr de 1450pb y las pruebas de identificación por espectrometría de masa MALDI-TOF (**Tabla 4**). La espectrometría de masa MALDI TOF genera marcadores moleculares no genómicos que luego compara con los registrados en una base de datos. La precisión en la identificación dependerá de la robustez de la base de datos para el género o especie coincidente. Finalmente, la secuenciación del gen completo de 16S ARNr permite la utilización de bases de secuencias curadas. En este trabajo se utilizó la base de datos SILVA.

Identificación por MALDI TOF

Los siete aislados que presentaron un *perfil dudoso* con el sistema de galerías API® 20E (Biomérieux), fueron identificados como pertenecientes al género *Yokenella* a través de la técnica de espectrofotometría de masa MALDI-TOF. Se confirmó la pertenencia de los aislados NvH01 y NvO01 a la especie *Y. regensburgei* ya que los puntajes fueron de 2.04 y 2.07 respectivamente, mayores a 2. Con puntajes entre 1,5 y 2, los aislados

NvP02, NvW01, NvU01, NvU02 y NvR01, fueron identificados como *Yokenella* sp. Con puntajes 1.73, 1.96, 1.94, 1.85 y 1.96 respectivamente. Cuando los puntajes son menores a 2, un paso previo de extracción permite identificar a nivel de especie. En este trabajo no se realizó este paso debido a que el género identificado sólo presenta una especie descrita. También, es importante aclarar que existía sólo una cepa de referencia en la base de datos al momento del análisis lo que influiría en el puntaje final obtenido.

Construcción de un árbol filogenético para *Yokenella* sp.

El análisis filogenético entre cepas tipo de *Yokenella* sp, los aislados bacterianos obtenidos en este trabajo y aquellos publicados por Hirose (2006), aparecen agrupados y separados de otras especies de *Klebsiella*, sugiriendo que pertenecen todas a un mismo grupo (**Fig 11**). Hirose y col. publicaron este aislado bacteriano como perteneciente a la especie *K. pneumoniae*. Esta mala identificación no es de extrañar, ya que como bien se vio en este trabajo, las Enterobacterias son muy similares a nivel del gen 16S ARNr y la identificación debe ser exhaustiva. En este trabajo debieron hacerse varias aproximaciones, moleculares y bioquímicas, para llegar a este resultado.

La cepa tipo *Y. regensburgei* ATCC 49455 proviene de un aislamiento de bacterias intestinales de *Pyrrhocoris apterus*, otro hemíptero polifitófago plaga de los cultivos de huertas y algodón en Europa^{103,104}. La cepa M-T- MRS 67 fue incorporada al análisis por su cercanía filogenética. Según la información ofrecida por la base de datos GenBank, esta cepa fue aislada del intestino del rutilo, *Rutilus rutilus*, en un estudio que analizaba el efecto de las aguas contaminadas sobre la flora microbiana intestinal de estos peces (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JQ795833> –

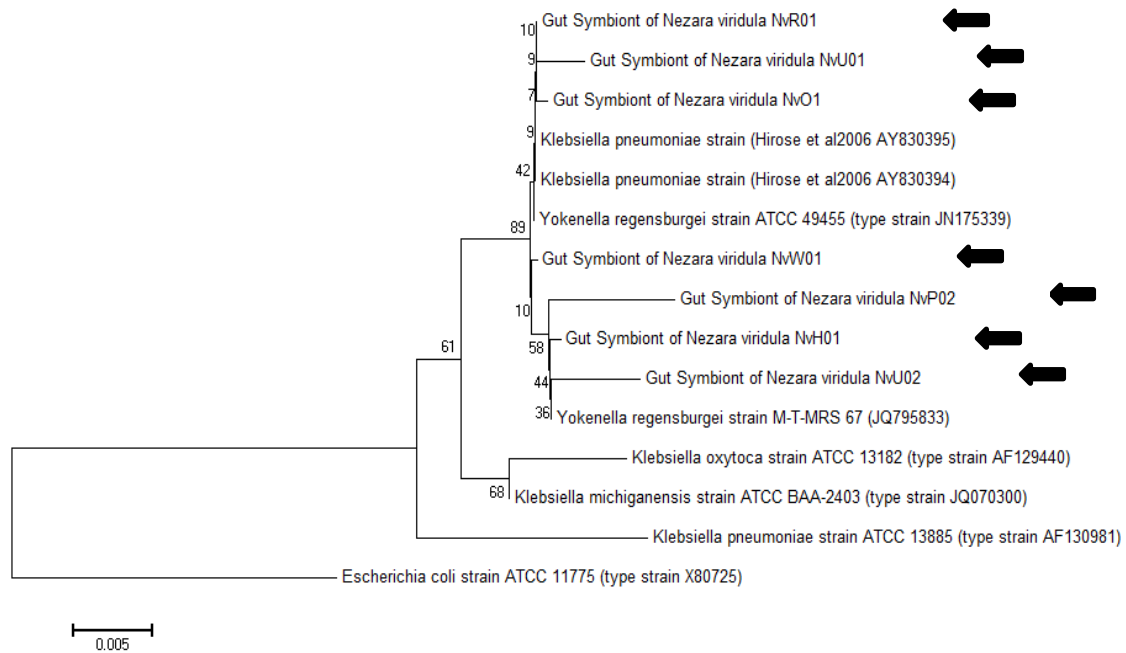


Figure 11. Posicionamiento filogenético de las siete cepas aisladas de *Yokenella* sp (Flechas negras). Se construyó un árbol filogenético que incluyó los aislados en este trabajo, aquellos que describió Hirose y col 2006 como *K. pneumoniae*, y las cepas de referencia *K. pneumoniae* ATCC 13885, *K. michiganensis* ATCC BAA-2403, *K. oxytoca* ATCC 13182, *Y. regensburgei* ATCC 49455 y una cepa no tipo adicional de *Y. regensburgei*. *Escherichia coli* ATCC 11775 se incluyó como *outgroup* para enraizar el árbol. La escala marca la distancia filogenética con el ancestro común.

Skrodenyte - Arbaciauskiene, V., 2012; No publicado). *K. michiganensis* y *K. oxytoca* se incluyeron en el análisis ya que una búsqueda blast en la base de datos RefSeq indicó que ambas especies eran cercanas a *Y. regensburgei*, y con una distancia genética más cercana que las cepas de Hirose a *K. pneumoniae*.

Construcción de un árbol filogenético de *Pantoea* sp. NvP01

El género *Pantoea* consta de al menos 22 especies¹⁰⁵. Los datos de API20E fueron suficientes para ubicar el aislado NvP01 dentro del género *Pantoea*. El análisis filogenético a partir de una secuencia de 860 pb ubicó al aislado como *Pantoea*

conspicua en un análisis de homología de secuencias con la base de datos de GenBank. Esto se confirmó con un análisis filogenético de una secuencia del gen 16S ARNr de 1450 pb, que demostró que la cepa aislada del intestino de la chinche verde fue más cercana a la especie *conspicua* (Fig12). En este análisis se incluyeron 23 secuencias de cepas tipo de 22 especies y una subespecie de *P. stewartii*.

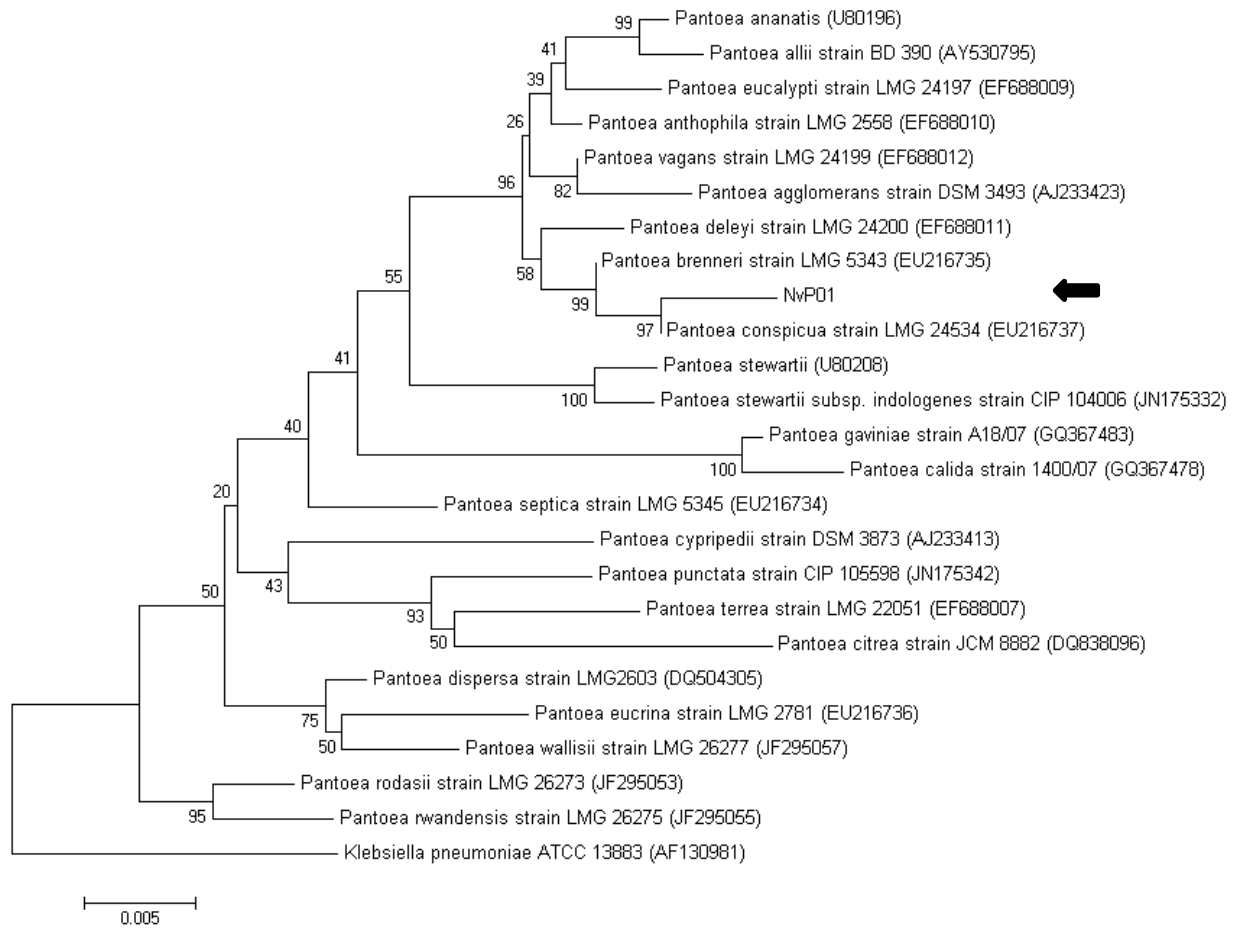


Fig 12. Ubicación filogenética de *Pantoea* sp. NvP01 (Flecha negra). El árbol se construyó a partir de 23 cepas tipo de especies. Los números de acceso de GenBank se encuentran entre paréntesis. La secuencia de la cepa tipo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (AF130981) se incluyó para enraizar el árbol. La escala indica la distancia filogenética con el ancestro común.

Tabla 4 Aislados en este trabajo y aquellas que fueron utilizadas para los análisis filogenéticos de *Yokenella*, *Pantoea* y *Enterococcus*.

Etiqueta* ¹	Especie* ²	Identificación en cepario* ³	MALDI TOF score* ⁴	Cepa tipo	GeneBank ID* ⁵	Referencia	Hospedero del insecto
NvH01	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0559	2,04	No	KJ397957	Esta tesis	<i>Morus nigra</i>
NvP02	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0559	1,73	No	KR537289	Esta tesis	<i>Glycine max.</i>
NvO01	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0557	2,07	No	KJ397958	Esta tesis	<i>Glycine max.</i>
NvW01	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0549	1,96	No	KR537290	Esta tesis	<i>Glycine max.</i>
NvU01	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0558	1,94	No	KJ397960	Esta tesis	<i>Eucalyptus</i> (Diapause)
NvU02	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0553	1,85	No	KJ397959	Esta tesis	<i>Eucalyptus</i> (Diapause)
NvR01	<i>Yokenella</i> sp	BNM 0552	1.96	No	KR537288	Esta tesis	<i>Eucalyptus</i> (Diapause)
ATCC 49455	<i>Y. resgensburgei</i>	ATCC 49455	-	Yes	JN175339	Cepario ATCC	-
M-T-MRS 67	<i>Y. resgensburgei</i>	M-T-MRS 67	-	No	JQ795833		-
NvP01	<i>Pantoea</i> sp	BNM 0554	1,9	No	KJ397962	Esta tesis	<i>Glycine max.</i>
Hirose 2006	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	No	AY830394	Hirose y col, 2006	Cría de laboratorio
Hirose 2006	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	No	AY830395	Hirose y col, 2006	Cría de laboratorio
ATCC 13182	<i>K. oxytoca</i>	ATCC 13182	-	Yes	AF129440	Cepario ATCC	-
ATCC BAA-2403	<i>K. michiganensis</i>	ATCCBAA-2403	-	Yes	JQ070300	Cepario ATCC	-
ATCC 13885	<i>K pneumoniae</i>	ATCC 13885	-	Yes	AF130981	Cepario ATCC	-
NvM04	<i>Enterococcus</i> sp.	BNM 0551	-	No	KR537287	Esta tesis	<i>Glycine max.</i>
NvS01	<i>Enterococcus</i> sp.	BNM 0550	-	No	KJ397965	Esta tesis	<i>Brassica napus</i>
NvW02	<i>Enterococcus</i> sp	BNM 0555	-	No	KJ397963	Esta tesis	<i>Glycine max</i>
NvH02	<i>Enterococcus</i> sp.	BNM 0556	-	No	KJ397964	Esta tesis	<i>Morus nigra</i>
Clone 1-1	<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	No	AY830397	Prado (2006)	--

*1: Código de denominación del aislado: NvXNº; Nv (Nezara viridula) X (colecta) Nº (numero de aislado). *2: Denominación de especie identificada por secuenciación de 16S ARNr 1450pb. *3: Identificación del cepario Banco Nacional de Microorganismos del INBA-CONICET de la Fac. de Agronomía – UBA. *4: puntajes obtenidos en la identificación de bacterias de interés clínico por espectrometría de masa MALDI-TOF. > 2: se confirma especie; 1,5 a 2: se confirma género. *5. Número de acceso de las secuencias del 16SARNr utilizadas para el armado de los árboles filogenéticos.

Análisis filogenético de los aislados de *Enterococcus* sp.

El tercer árbol filogenético se construyó con los aislados pertenecientes al género *Enterococcus* (**Fig13**). El aislado NvH02 tiene una distancia genética corta a la cepa tipo de *E. faecalis*, 0.002, con una similitud mayor al 99%, sugiriendo que el aislado es un miembro de esta especie. El otro grupo de aislados es también muy similar a *E. faecalis*, cercano al 99%, y la búsqueda en la base de datos RefSeq del NCBI reveló que el miembro más cercano es en efecto *E. faecalis*.

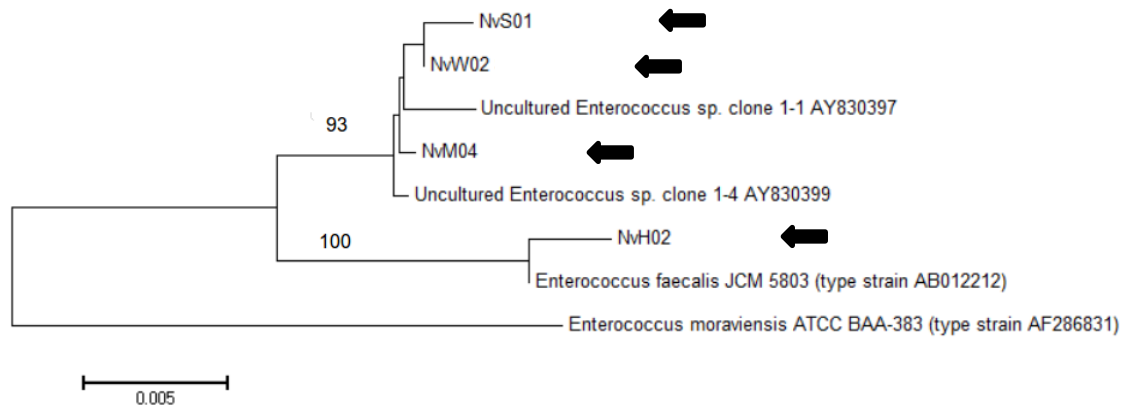


Fig 13. Posicionamiento filogenético de cepas aisladas de *Enterococcus*. Se incluyó la secuencia del gen 16S ARNr de la cepa tipo de la especie, *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (Número de acceso Genbank: AB012212). La secuencia de la cepa tipo *Enterococcus moraviensis* ATCC BAA-383 (Número de acceso de Genbank: AF286831) se incluyó como un *outgroup* para enraizar el árbol. Sólo se muestran los *bootstrap* con valores mayores a 65%. La escala indica la distancia genética con el ancestro común.

Los aislados fueron depositados en el Banco Nacional de Microorganismos del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales INBA-CONICET de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Allí se realizó un análisis rep-PCR (repetitive sequence-based PCR), que demostró que los aislados presentan diferencias genéticas y que no fueron transmitidos entre los insectos de forma horizontal en un período cercano. Las secuencias amplificadas del 16S ARNr de aproximadamente 1450

pb fueron depositadas en GenBank. Los códigos de identificación del cepario BNM-INBA-CONICET y los números de acceso de las secuencias depositadas en el GenBank se detallan en la Tabla X+4.

Simbionte obligado del intestino de *Nezara viridula*: Posicionamiento filogenético

El simbionte obligado ubicado en la cloaca (V4) de los hemípteros es especie-específico (Prado, 2009). Según lo publicado por otros grupos que estudian esta relación en *Nezara viridula*, este simbionte tendría una proximidad filogenética con los géneros *Erwinia* y *Pantoea*, ambos géneros estrechamente asociados a plantas. Para el caso de *Pantoea*, en este trabajo se vio que es un género que también puede encontrarse residiendo en los ventrículos V1-V3. Por su parte *Erwinia* sp se encuentra asociada de manera simbiótica con trips, *Frankliniella occidentalis*, y con la mosca del olivo, *Bactrocera oleae*¹⁰⁶.

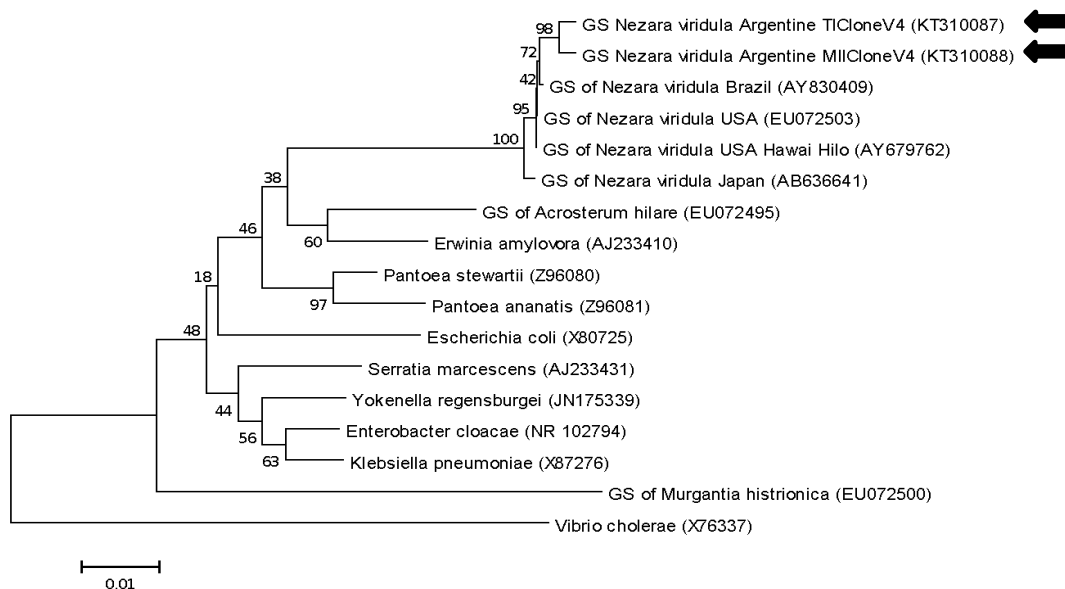


Fig 14. Posicionamiento filogenético de simbionte alojado en la cloaca de *Nezara viridula* secuenciado en este trabajo (flecha negra). Se incluyen las secuencias publicadas para simbioses obligados de *Nezara viridula*, *Nezara hilare* (*Acrosentum hilare*) y *Murgantia histrionica*; las secuencias de siete géneros de Enterobacterias con dos especies de *Pantoea*. La secuencia de la cepa tipo de *Vibrio cholerae* (X76337) se incluyó para enraizar el árbol.

Para el posicionamiento filogenético de esta secuencia, se incluyeron aquellas publicadas por Hirose (2006), Prado (2009) y Tada (2011) de adultos de *Nezara viridula* colectados en Londrinas (Brasil), California (EEUU) y Japón, respectivamente. Se incluyeron también las secuencias de un simbionte de *Acrosterum hilare*, sinónimo de *Nezara hilare* y, cepas tipo de géneros de Enterobacterias próximas a *Pantoea* y *Erwinia*. El análisis filogenético del 16S ARNr obtenido de la amplificación del ADN extraído del V4 (cloaca) de chinches colectadas en campos de producción de soja, ubica a esta bacteria cercana a las ya publicadas para este género de hemípteros. Se confirma además, la proximidad filogenética con el género *Erwinia* (Fig 14).

8. Caracterización fenotípica y bioquímica de las Enterobacterias y los Enterococos

Con el objetivo de caracterizar las cepas aisladas basándose en la morfología y el metabolismo, se analizaron las tinciones Gram para la visualización de formas y tamaños celulares y los resultados de API 20E y API 50CH (Biomerieux). Esto me permitió estudiar la variabilidad entre las cepas e identificar actividades potencialmente relevantes para la digestión de la soja.

Aislados del género *Yokenella*

Yokenella regensburgei es una bacilo móvil gram -, oxidasa negativo y fermentativo¹⁰⁴ difícil de identificar por medio de batería de pruebas bioquímicas dado que se asemeja fenotípicamente a *Hafnia alvei*, aunque es negativo para el test de Voges Proskauer, no utiliza glicerol, y sí fermenta melibiosa y mio-inositol¹⁰⁷. *Y. regensburgei* es un

patógeno oportunista y es la única especie del género *Yokenella* dentro de la familia de las Enterobacteriaceae^{103,104,108-110}. Esporádicamente se reportan casos de infecciones en humanos y las publicaciones al respecto son acotadas^{111,112}. Además, de los aislados obtenidos de muestras clínicas también se la ha identificado formando parte de la flora intestinal de insectos como *Locus migratoria*, *Eupolyphaga synensis*, *Apis mellifera*, *Lutzomyia longipalpis*, *Reticulitermis chinensis* y *Pyrrhocoris apterus*^{104,113-115}. Esta bacteria también fue encontrada como endófitos en plantas de banano y probada como potencial fertilizante biológico y promotor de crecimiento¹¹⁶.

Caracterización por batería de pruebas bioquímicas: API 20E y API 50CH

La **Tabla 5** resume los resultados de la batería de pruebas bioquímicas API 20E para Enterobacterias y sus reacciones complementarias. Estos resultados nos permiten observar una diferencia importante entre dos grupos de cepas. Dentro de la variabilidad normal del género, las cepas NvH01, NvU01 NvW01, NvO1 y NvR01 descarboxilaron la lisina y la ornitina, mientras que NvU02 y NvP02 fueron negativas en estas reacciones. NvU02 y NvP02 también obtuvieron puntajes por debajo del límite que identifica especies en la técnica de MALDI-TOF, 1,73 y 1,85, respectivamente (**Tabla 5**). Estos resultados sugieren que los aislados NvP02 y NvU02 podrían constituir una nueva especie o subespecie dentro del género *Yokenella*.

Por otro lado, NvH01 y NvU01 tuvieron actividad asparagina deshidrolasa. La variabilidad entre cepas en la descarboxilación de la lisina también fue observada por Abbot y Janda (1994). Todas las cepas fermentaron y oxidaron la glucosa y produjeron nitritos. Además, todas las cepas fueron móviles y con actividad de oxidasa negativa. Ninguna de las cepas utilizó la lactosa ni el citrato, así como tampoco produjeron sulfhídrico, no degradaron la urea ni produjeron indol ni acetoína.

Tabla 5 Prueba bioquímica de identificación de API 20E para las cepas aisladas de *Yokenella* sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr.

		<i>Yokenella</i> sp									
Reacciones		NvH01	NvJ01	NvR01	NvO1	NvW01	NvJ02	NvP02	Cepa tipo *1	Cepa tipo *2	
ONPG	B-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	
ADH	Arginina dihidrolasa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
LDC	Lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	-	-	+	V	
ODC	Ornitina decarboxilasa	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
CIT	Utiliza citrato	-	-	+	-	-	-	-	+	+	
H2S	Prod H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	
URE	Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	
TDA	Triptofano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
IND	Prod Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VP	Prod acetoina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GEL	Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	
GLU F	Ferm Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GLU O	Ox Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MOV	Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N02	Reducción de nitrato a nitrito	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N2	Red de nitrato a N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oxidasa	Citocromo oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

El género *Yokenella* no está presente en las bases de datos de APIweb. *1 Kosako y col, 1987. *2 Abbot y Janda, 1994.

La **Tabla 6** resume la información obtenida de experimentos con tiras reactivas API 50CHE (50 fuentes de carbono para *Enterobacteriaceae*). En este experimento se buscó identificar actividades metabólicas distintivas que puedan, además de caracterizar las cepas, poner en evidencia la capacidad de degradar los componentes de la dieta. El grano de soja contiene tres sacáridos solubles mayoritarios, sacarosa, rafinosa y estaquiosa, que difieren en su concentración dependiendo del estadio de maduración¹¹⁷. Cuando el cultivo se encontraba en R6, período en el que comienza el ataque de la chinche verde y momento en que realicé mis experimentos, la sacarosa de las semillas de soja tienen un pico de acumulación de 94,1 mg/g, para luego en R7

disminuir hasta 71,4 mg/g y dando lugar a la acumulación de rafinosa con valores de 9,6 mg/g, y estaquiosa con valores de 49,6 mg/g hacia el final de la maduración.

El género *Yokenella* fue identificada como la de mayor abundancia relativa en la comunidad de la chinche verde asociada al cultivo de soja, y se dividió en dos fenotipos distintos con variabilidad (v) en su capacidad de degradar el enlace glicosídico de la esculina (a través de una b-glucosidasa-esculinasa) ¹¹⁸ y de fermentar celobiosa, maltosa, melibiosa y rafinosa. Se destaca además, la imposibilidad de degradar sacarosa, el azúcar más importante de la soja. Sin embargo, esta bacteria sí tiene la capacidad de utilizar rafinosa, y en consecuencia estaquiosa, ya que difieren entre sí en que la estaquiosa tiene una galactosa más. Estos resultados indicarían que este género se ve beneficiado en el ambiente intestinal de la chinche, ya que la sacarosa es degradada por enzimas del insecto y podría ser utilizada por la bacteria para su desarrollo. Por otro lado, *Yokenella* podría estar beneficiando a la chinche al degradar compuestos más resistentes, como la rafinosa.

Tabla 6 Pruebas bioquímicas de identificación de API 50 CHE (50 fuentes de hidratos de carbono para Enterobacterias) para las cepas aisladas de *Yokenella* sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr

		<i>Yokenella</i> sp								
	Reacciones	NvH01	NvJ01	NvW01	NvR01	NvO1	NvU02	NvP02	Cepa tipo *1	Cepa tipo *2
	API50CH									
GLY	Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
ERY	Eritrol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
DARA	D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
LARA	L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIB	Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	0	0
DXYL	D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LXYL	L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-	0	0
ADO	D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	Metil BD Xilopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND

Reacciones		NvH01	NvU01	NvW01	NvR01	NvO1	NvU02	NvP02	Cepa tipo *1	Cepa tipo *2
API50CH										
GAL	D-Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
GLU	D-Glucosa	+	+	+		+	+	+	+	ND
FRU	D-Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
MNE	D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SBE	L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
RHA	L-Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DUL	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	Inositol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
SOR	D-Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MDM	Metil a-D Manopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
MDG	Metil aD-Gulcopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
NAG	N-acetil glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
AMY	Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
ARB	Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
ESC	Esculina	+	+	+	+	-	-	-	-	V
SAL	Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
CEL	D-Celobiosa	+	+	+	+	-	-	-	+	+
MAL	D- Maltosa	+	+	+	+	-	-	-	+	ND
LAC	D- Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL	D-Melibiosa	+	+	+	+	-	-	-	+	ND
SAC	D-Sacarosa	+	-	-	-	-	-	-	+	-
TRE	DTrehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
INU	Inulina	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
MLZ	D-Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
RAF	D-Rafinosa	+	+	+	+	-	-	-	-	V
ALM	Almidon	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
GLYG	Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
XLT	Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
GEN	Gentiobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
TUR	D-Turanosa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
LYX	D-Lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
TAG	D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
DFUC	D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
LFUC	L-Fucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
DARL	D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
LARL	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
GNT	Gluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
2KG	2-cetogluconato K	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
5KG	5 -cetogluconato K	-	-	-	-	-	-	-	-	ND

El género *Yokenella* no está presente en las bases de datos de APIweb. *1 Kosako y col, 1987.

*2 Abbot y Janda, 1994.

Evaluación de la actividad proteolítica y lipolítica de *Yokenella* sp in vitro

Las actividades proteolítica y lipolítica se evaluaron con medios específicos Agar leche descremada 10% y Agar Aceite de Oliva-Rodamina B, respectivamente. Además se evaluó el efecto de la temperatura sobre estas actividades. Tres microlitros de una suspensión 0,5 McFarland de la cepa pura fueron inoculadas sobre un disco de papel de filtro estéril y las placas se cultivaron a 25 °C y 37 °C.

Todas las cepas de *Yokenella* dieron negativo para la producción de proteasas extracelulares en ambas temperaturas, mientras que las cepas NvH01, NvO01, NvR01 y NvU02 dieron positivas para la producción de lipasas (colonias brillantes y halos de degradación) cuando de las cultivó a 37 °C durante 96h (Fig15). Cuando las cepas se cultivaron a 25 °C los resultados fueron similares aunque los halos de degradación fueron menores en todos los casos positivos.

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *Yokenella* sp AISLADAS



Fig 15. Actividad lipolítica de las cepas de *Yokenella* sp Aisladas. a: NvH01, b: NvO01; c: NvP02; d: NvR01; e: NvU01; f: NvU02; g: NvW01. Resultados positivos, halos rosados fluorescentes a luz UV 350nM. Las cepas fueron cultivadas por 96h a 37 °C

Aislado de *Pantoea* sp NvP01

Caracterización por batería de pruebas bioquímicas: API 20E y API 50CH

La cepa aislada NvP01 fue identificada como un miembro de la especie *Pantoea conspicua* por secuenciación del gen 16S ARNr. Esta cepa presentó actividad β -galactosidasa y utilizó citrato. Fermentó y oxidó la glucosa, sintetizó acetoina y tuvo la capacidad de reducir nitratos a nitritos. En lo que respecta a la digestión de los carbohidratos que contiene la soja, *Pantoea conspicua* NvP01 tuvo la capacidad de utilizar la sacarosa, y la trehalosa aunque no pudo fermentar la rafinosa. Además utilizó L-arabinosa, ribosa y D-xylosa, galactosa, nagatosa y manosa, ramnosa e inositol. También utilizó gluconato potásico y 2 α -cetogluturato. Por último, los resultados sobre la utilización de gentiobiosa y D-fucosa fue dudosa.

Tabla 7 Caracterización bioquímica del aislado identificado como *Pantoea conspicua* NvP01 con batería de reacciones Bioquímicas API 20E y API 50 CHE.

Batería de reacciones bioquímicas API 20E para <i>Pantoea conspicua</i> NvP01			
ONPG	+	VP	+
ADH	-	GEL	-
LDC	-	GLU F	+
ODC	-	GLU O	+
CIT	+	McC	+
H ₂ S	-	MOV	-
URE	-	N ₀₂	+
TDA	-	N ₂	-
IND	-	Oxidasa	-

Batería de reacciones bioquímicas API CHE 50 para <i>Pantoea conspicua</i> NvP01									
GLY	-	GLU	+	MDG	-	SAC	+	LYX	-
ERY	-	FRU	+	NAG	+	TRE	+	TAG	-
DARA	-	MNE	+	AMY	-	INU	-	DFUC	?
LARA	+	SBE	-	ARB	+	MLZ	-	LFUC	-
RIB	+	RHA	+	ESC	+	RAF	-	DARL	-
DXYL	+	DUL	-	SAL	+	AMD	-	LARL	-
LXYL	-	INO	+	CEL	+	GLYG	-	GNT	+
ADO	-	MAN	+	MAL	+	XLT	-	2KG	+
MDX	-	SOR	-	LAC	-	GEN	?	5KG	-
GAL	+	MDM	-	MEL	-	TUR	-		

Las actividades proteolítica y lipolítica determinada en medios específicos Agar Leche y Agar Rhodamina B- Aceite de Oliva, respectivamente, dieron negativos para todas las cepas a las dos temperaturas evaluadas (25 y 37°C).

9. Aislados del género *Enterococcus*

Caracterización por batería de pruebas bioquímicas: API 20E y API 50CH

Dentro del género *Enterococcus*, la cepa NvH02, identificada como *E. faecalis* por secuenciación de 16S ARNr, presentó actividades diferenciales en la degradación de fuentes carbonadas con respecto a las cepas relacionadas NvS01, NvM04 y NvW02. Fue incapaz de fermentar el almidón y la D-xilosa, pero tuvo actividad frente a eritrosa, ribulosa, inositol, manosa, maltosa, lactosa, D-melitosa, D-tagatoza y gluconato, luego de 48h de cultivo (Tabla 8). En lo que respecta a la digestión de la soja, todas las cepas tuvieron actividades positivas en la utilización de sacarosa y negativas para rafinosa. Además, todos los aislados fermentaron galactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, N-acetil glucosamina, amilosa, arabinosa, salicina, celobiosa, trehalosa, xilitol, gentiobiosa y 5-cetoglutarato.

Tabla 8. Prueba bioquímica de identificación de API 50 CHL (50 fuentes de hidratos de carbono para identificación de *Lactobacillus*) para las cepas aisladas de *Enterococcus* sp. identificadas por secuenciación de 16S ARNr.

<i>Enterococcus</i> sp					
Reacciones		NvH02	NvM04	NvS01	NvW02
API50CH					
GLY	Glicerol	-	-	-	-
ERY	Eritrol	+	-	-	-
DARA	D-Arabinosa	-	-	-	-
LARA	L-arabinosa	-	-	-	-
RIB	Ribosa	+	-	-	-

DXYL	D-xilosa	-	-	-	-
LXYL	L-xilosa	-	-	-	-
ADO	D-Adonitol	-	-	-	-
MDX	Metil BD Xilopiranosido	-	-	-	-
GAL	D-Galactosa	+	+	+	+
GLU	D-Glucosa	+	+	+	+
FRU	D-Fructosa	+	+	+	+
MNE	D-Manosa	+	+	+	+
SBE	L-Sorbosa	-	-	-	-
RHA	L-Ramnosa	-	-	-	-
DUL	Dulcitol	-	-	-	-
INO	Inositol	+	-	-	-
MAN	D-Manitol	+	-	-	-
SOR	D-Sorbitol	+	+	+	+
MDM	Metil a-D Manopiranosido	-	-	-	-
MDG	Metil aD- Gulcopiranosido	-	-	-	-
NAG	N-acetil glucosamina	+	+	+	+
AMY	Amigdalina	+	+	+	+
ARB	Arbutina	+	+	+	+
ESC	Esculina	+	+	+	+
SAL	Salicina	+	+	+	+
CEL	D-Celobiosa	+	+	+	+
MAL	D- Maltosa	+	-	-	-
LAC	D- Lactosa	+	-	-	-
MEL	D-Melibiosa	-	-	-	-
SAC	D-Sacarosa	+	+	+	+
TRE	DTrehalosa	+	+	+	+
INU	Inulina	-	-	-	-
MLZ	D-Melezitosa	+	-	-	-
RAF	D-Rafinosa	-	-	-	-
Almidon	Almidon	-	+	+	+
GLYG	Glicógeno	-	-	-	-
XLT	Xilitol	+	+	+	+
GEN	Gentiobiosa	+	+	+	+
TUR	D-Turanosa	-	-	-	-
LYX	D-Lixosa	-	+	+	+
TAG	D-Tagatosa	+	-	-	-
DFUC	D-Fucosa	-	-	-	-
LFUC	L-Fucosa	-	-	-	-
DARL	D-arabitol	-	-	-	-
LARL	L-Arabitol	-	-	-	-
GNT	Gluconato potásico	+	-	-	-
2KG	2-cetogluconato K	-	-	-	-
5KG	5 – cetogluconato K	+	+	+	+

A diferencia de *Yokenella*, los enterococos presentaron actividades de invertasa, celulasa, maltasa y actividad b-glucosidasa para todas sus cepas. Las actividades proteolítica y lipolítica ensayada en medios específicos Agar Leche y Agar Rhodamina B- Aceite de Oliva, respectivamente, dieron negativos para todas las cepas a las dos temperaturas evaluadas (25 y 37°C).

Estos resultados sugieren que la presencia de bacterias fermentadoras en el intestino de la chinche afecta el ambiente digestivo, y que la soja ingerida por el insecto debería ser modificada en su composición lipídica o peptídica, no ya por actividad proteolítica *per se*, pero por una disminución en la acidificación del medio.

10.Efecto de la acidificación sobre los inhibidores de cistein- proteasas de la soja

Las cistatinas son pequeñas proteínas que funcionan como inhibidores competitivos de las cistein proteasas digestivas de algunos insectos y conforman una de las defensas químicas antihervívoro más importantes de las plantas ¹¹⁹. Debido a su naturaleza peptídica, las cistatinas pueden sufrir desnaturalización por cambios en el pH del medio. Las Enterobacterias son fermentadores que en general acidifican el medio en las primeras 12 horas de cultivo por producción de HCO₃⁻. Por su parte, los Enterococos son microaerófilos fermentadores que recuperan su estado oxidado reduciendo el piruvato a ácido láctico, que liberan fuera de la célula, acidificando el medio. Para estudiar el efecto de la acidificación propia de una fermentación, sobre la actividad de los inhibidores de proteasas (IP's) de la soja, se aciduló un homogenato de soja 20% pasteurizadas con Ácido láctico 0.1N (Biopack). Se realizaron ensayos sobre tres suspensiones independientes que se acidularon de manera continua, tomando alícuotas a las que se les midió el pH y la concentración de inhibidores activos. Para cuantificar la actividad de los inhibidores de cistein-proteasas (cistatinas) de la soja se utilizó la enzima cistein-proteasa Papaina (Biopack) y el sustrato específico p-Glu-Phe-

Leu-p-nitroanilida (Sigma). Los experimento se realizaron en las condiciones óptimas de actividad de esta enzima, pH 6,0, 37 °C y un ambiente reductor (ditiotreitol).

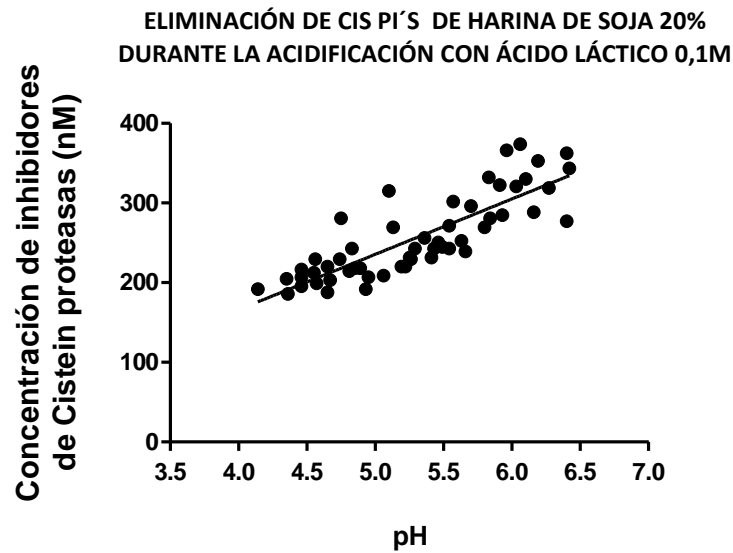


Fig 16 Acidificación de un suspensión de harina de soja al 20% y evaluación de la concentración de inhibidores de cystein proteasas activos. La reacción de actividad de papaina se mantuvo a pH 6. La relación extracto acidificado/buffer es 5µl:170µl.

Los resultados indican que los IP's activos al pH óptimo de la papaína, con concentraciones que alcanzan 353 nM a pH 6,2, van inactivándose a medida que se acidifica el medio hasta alcanzar valores de 185 nM a pH 4,4, es decir, una reducción del 53% en la actividad de los inhibidores (**Fig16**). Por otro lado, se realizó un análisis ANOVA sobre rangos de 0,3 unidades de pH, seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunnet en el que se tomó como control el rango de pH inicial de la harina de soja sin acidular (**Fig17**). Este análisis demostró que a pH fisiológico intestinal del

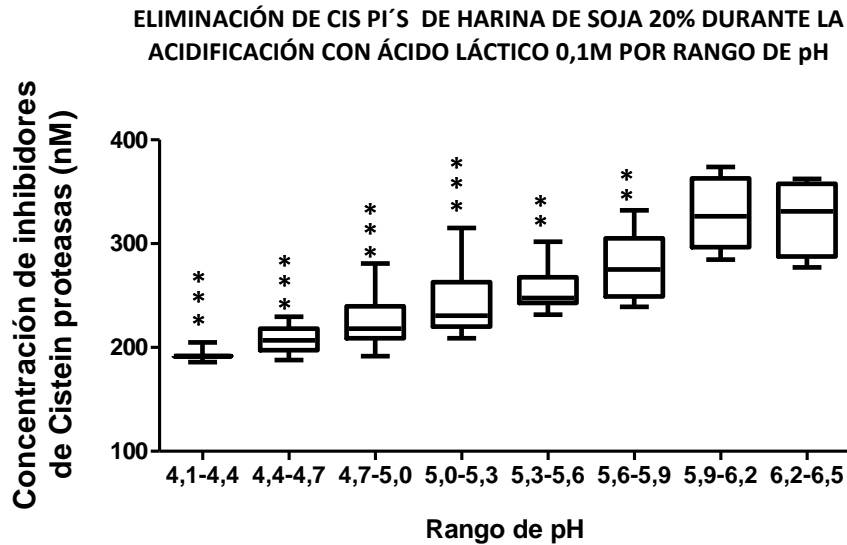


Fig 17 Acidificación de un suspensión de harina de soja al 20% y evaluación de la concentración de inhibidores de cystein proteasas activos. La reacción de actividad de papaina se mantuvo a pH 6. La relación extracto acidificado/buffer es 5 μ l:170 μ l. Las comparaciones múltiples de Dunnett se realizaron contra el control: rango de pH de la harina de soja sin acidular (6,2-6,5).

V3 (pH 5,2; Hirose y col 2006) las diferencias en la actividad de los inhibidores son significativamente menores ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la disminución del pH, como producto de la actividad fermentativa de las bacterias podría afectar positivamente la actividad de las enzimas digestivas de la chinche verde, disminuyendo la actividad de inhibidores de proteasas.

11. Fermentación de soja: evolución del pH y degradación de inhibidores de proteasas

El objetivo de este experimento fue evaluar la degradación de IPs presentes en la soja durante la actividad fermentativa de las bacterias aisladas. Para cuantificar la actividad de los inhibidores de cistein-proteasas (cistatinas) de la soja se utilizó la enzima cistein-

proteasa Papaina. Los experimento se realizaron en las condiciones óptimas de actividad de esta enzima, pH 6,0, 37°C y un ambiente reductor (ditiotreitól). Una suspensión de harina de soja 20% se cultivó durante 24h a 37°C con las bacterias aisladas y caracterizadas *Yokenella* sp. NvH01-R01, *Pantoea conspicua* NvP01, *Enterococcus faecalis* NvH02 y *Enterococcus* sp. NvM04-W02. Luego los extractos se enfrentaron a Papaina y se evaluó el poder inhibitorio de la harina de soja fermentada. Además, se evaluó la presencia de actividad cistein proteasas propias de los extractos que pudieran porvenir tanto de la actividad fermentativa bacteriana como intrínseca de la harina de soja.

La incubación del extracto a 37°C aumentó el poder inhibitorio del extracto en un 21,3% según comparaciones de las medias, debido probablemente a que la hidratación de la harina permitió la activación de los inhibidores de proteasas (**Fig18**). Estas diferencias no fueron significativas en un análisis ANOVA con Test de comparaciones múltiples de Dunnett en el que una de las columnas debe señalarse como control al que se enfrentarán los tratamientos (**Tabla9**). En este test se eligió como Control, la suspensión de harina de soja que había sido incubada, teniendo en cuenta que también pueden participar de la digestión enzimas propias de la planta. Los resultados muestran que todos los fermentos tuvieron menor capacidad inhibitoria de la actividad de la Papaina, que el extracto incubado sin fermentar, con la excepción del *Enterococcus* sp. NvM04. *Yokenella* sp NvH01, NvO01, NvR01 y NvU02, y *Enterococcus faecalis* NvH02 tuvieron mayor capacidad de eliminar la inhibición de la actividad del extracto que los demás aislados. A su vez, un análisis ANOVA con un post test de comparaciones múltiples de Tukey demostró que no hay diferencias significativas en entre distintas cepas (ANOVA-P=0.0725; ns).

EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA HARINA DE SOJA 20%

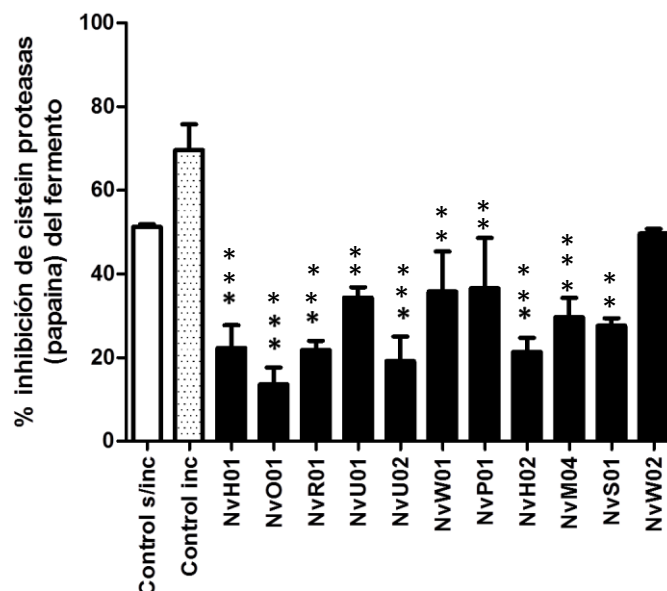


Fig 18. Porcentaje de inhibición de la enzima cistein proteasa papaina frente a extractos de inhibidores de cistein proteasas de harina de soja *Glycine max* var Williams fermentada por 24 horas con cultivos puros *overnight* de cepas aisladas de intestino de *Nezara viridula*. *Yokenella* sp: NvH01-R01, *Pantoea conspicua*: NvP01, *Enterococcus faecalis* NvH02 y *Enterococcus* sp: NvM04-W02. No pudieron obtenerse resultados para *Yokenella* sp NvP02.

No se observó actividad cistein proteasa en los extractos ensayados, tanto los fermentados como los controles, lo que indicaría una ausencia de cistein proteasas en la harina de soja o lo que es más probable, que estas enzimas se encuentran inhibidas.

Tabla 9 Salida del análisis estadístico ANOVA con el Test de comparaciones múltiples de Dunnett que compara entre las columnas del Control (Control incubado) y los tratamientos.

Test de comparaciones múltiples de Dunnett	Dif de medias	q	Signif P < 0.05?	Resumen
Control inc vs Control s/inc	18,38	2,256	No	ns
Control inc vs NvH01	47,30	5,807	Sí	***
Control inc vs NvO01	56,00	6,149	Sí	***
Control inc vs NvR01	47,79	5,867	Sí	***
Control inc vs NvU01	35,29	4,332	Sí	**
Control inc vs NvU02	50,49	5,543	Sí	***
Control inc vs NvW01	33,82	4,152	Sí	**

Control inc vs NvP01	33,09	4,062	Sí	**
Control inc vs NvH02	48,28	5,927	Sí	***
Control inc vs NvM04	39,95	4,904	Sí	***
Control inc vs NvS01	42,03	4,615	Sí	**
Control inc vs NvW02	19,98	2,193	No	ns

**Yokenella* sp: NvH01-R01, *Pantoea conspicua*: NvP01, *Enterococcus faecalis* NvH02 y *Enterococcus* sp: NvM04-W02. No pudieron obtenerse resultados para *Yokenella* sp NvP02. ns: no significativo.

También se midió el contenido de proteínas de los extractos para evaluar la capacidad de desnaturalización y precipitación de proteínas del proceso fermentativo (**Fig 19**). Se

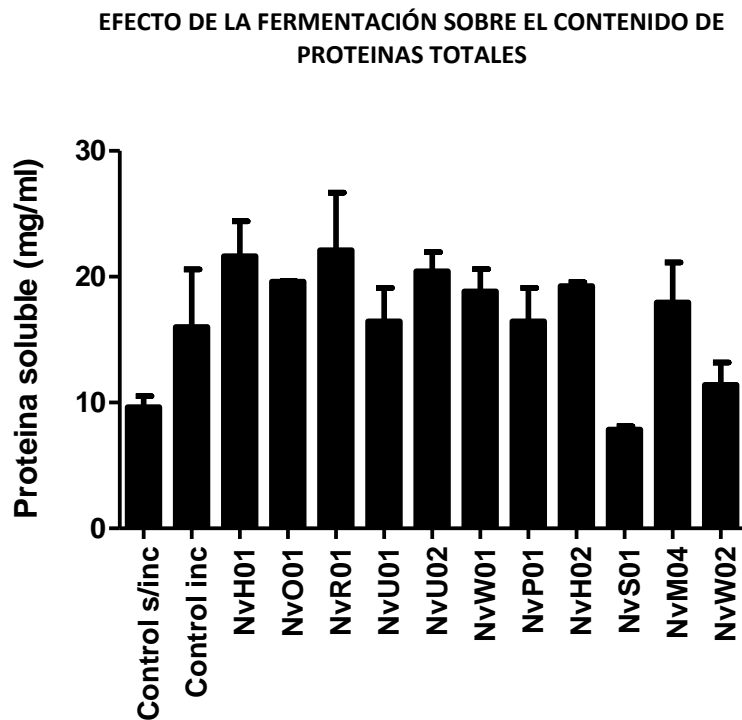


Fig 19. Proteínas solubles (mg/ml) en el extracto extractos de inhibidores de cistein proteasas de harina de soja *Glycine max* var *Williams* fermentada por 24 horas con cultivos puros *overnight* de cepas aisladas de intestino de *Nezara viridula*. *Yokenella* sp: NvH01-R01, *Pantoea conspicua*: NvP01, *Enterococcus faecalis* NvH02 y *Enterococcus* sp: NvM04-W02. Se sumaron los Controles: sin incubar (Control s/inc) e incubado (Control inc). No pudieron obtenerse resultados para *Yokenella* sp. NvP02

observó que la incubación no genera cambios significativos en el contenido de proteína soluble del extracto ($p > 0.05$). Un test de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

En la **Tabla 10** se resume el pH alcanzado tras 24h de fermentación para cada cepa probada. Se incluye también el pH inicial de la soja tras la pasteurización (Control previo a la incubación)y tras la incubación con antibióticos (Control posterior a la incubación). La actividad fermentativa de las *Yokenella* a 37°C por 24h disminuye el pH desde un valor inicial de 6,18 hasta valores de entre 4,97 y 5,93. Los enterococos por su parte, acidificaron el medio hasta valores de entre 4,65 y 4,25.

Tabla 10 pH alcanzado por los fermentos luego de 24h de incubación a 37°C.

Tratamiento		pH*
Control	Previo a la incubación	6,18
	Posterior a la incubación	6,18
<i>Yokenella</i> sp	NvH01	4,97
	NvO1	5,43
	NvP02	5,19
	NvR01	5,00
	NvU01	5,11
	NvU02	5,06
	NvW01	5,05
	<i>Pantoea</i> sp	NvP01
<i>Enterococcus</i> sp	NvH02	4,25
	NvM04	4,60
	NvS01	4,65
	NvW02	4,62

Por último se realizó un análisis de correlación entre las variables *Porcentaje de inhibición del extracto de harina de soja fermentado* y *pH final alcanzado por el fermento*, para los géneros *Yokenella* y *Enterococcus* sp (**Tabla 11**). En ambos casos las diferencias no fueron significativas sugiriendo que la pérdida de capacidad inhibitoria no ocurre exclusivamente por desnaturalización proteica producto de la disminución del pH del medio. Las enzimas endógenas de la planta podrían estar involucradas en este proceso, ya que la planta utiliza estos inhibidores de proteasas también como un control de sus propios mecanismos¹²⁰. Las enzimas proteolíticas de la planta de soja, liberadas al medio debido a la degradación de los tejidos celulares durante la fermentación, podrían estar generando la inactivación de los inhibidores de proteasas, esto incluye endo-y exoproteasas, y entre estas últimas carboxi y aminopeptidasas¹²¹.

Tabla 11 Análisis de correlación entre el pH final del fermento y su capacidad de inhibir la papaína analizado para los dos grupos principales de bacterias: *Yokenella* sp y *Enterococcus* sp. ns: no significativo

Análisis de correlación	<i>Yokenella</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp
Número de pares XY	6	4
Coefficiente de Spearman r	-0,3714	0,4000
Valor p (two-tailed)	0,4972	0,7500
Significancia	ns	ns

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Funcionalidad de las bacterias in vivo

En este cuarto capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en experimentos de funcionalidad de las bacterias en las chinches in vivo. Primero, el efecto de la eliminación del simbiote alojado en la cloaca sobre la supervivencia y el crecimiento y desarrollo del insecto. Segundo, el efecto de la infección de ninfas y adultos de chinche verde con la cepa seleccionada *Yokenella* sp NvU02 en cautiverio. Por último, se presentan los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, UBA, de ninfas infectadas con la cepa *Yokenella* sp NvU02 y su efecto sobre su supervivencia, crecimiento y desarrollo, y parámetros relacionados con el ambiente intestinal como la peroxidación lipídica y la actividad proteolítica.

*1. Efecto de la presencia del simbiote obligado de la cloaca sobre la supervivencia de las ninfas de *Nezara viridula*.*

Evaluación de la eficacia de un tratamiento para la obtención de ninfas aposimbióticas

Con el objetivo de probar el método utilizado por Prado y col (2006) para obtener ninfas aposimbióticas, se tomó una postura de chinches y se la fraccionó en dos partes de 23 y 52 huevos. Una de las mitades de la oviposición recibió el tratamiento de esterilización superficial (5 minutos en alcohol 96° y 5 minutos en lavandina 10%), mientras que la otra mitad, se utilizó como control y se sumergió en H₂O destilada estéril durante 10 minutos. Los huevos se secaron bajo un flujo de aire estéril y se colocaron en placas de Petri estériles. La porción de huevos esterilizados superficialmente fue a su vez dividida en dos. Una parte se homogeneizó en buffer fosfato salino pH 7 y se extrajo el ADN total y se evaluó la presencia del simbiote

inmediatamente posterior al tratamiento de esterilización por medio del análisis de ARISA. La segunda fracción de huevos esterilizados se utilizó para evaluar la presencia del simbionte en las ninfas de 3er estadio. Para ello, las ninfas nacidas de huevos esterilizados y del control fueron mantenidas con semillas de soja var. *Williams* y agua destilada hasta que mudaron al 3er estadio. Las ninfas del 3er estadio fueron homogeneizadas con potter en 250 µl de buffer fosfato pH 7. Se realizó un pool con los individuos tratados (esterilización superficial) (n:21) y otro pool con los no tratados (n:18), se extrajo el ADN total y se evaluó la presencia del simbionte por medio del análisis de ARISA.

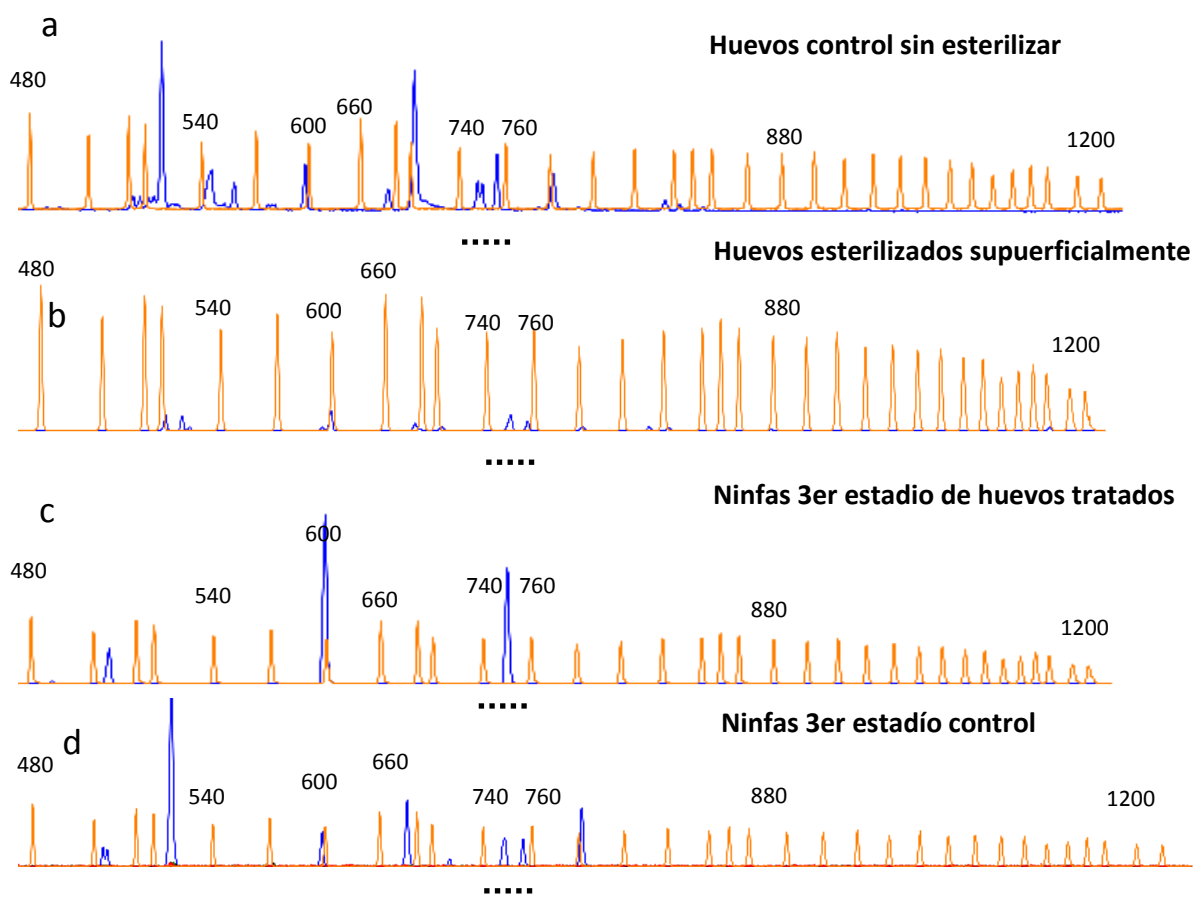


Fig 20. Perfiles ARISA. Huevos esterilizados superficialmente según la técnica de Prado y col (2006): tratamiento con alcohol 96° durante 5min seguido de hipoclorito de sodio 10% durante 5min y secados al aire estéril. Las ninfas se alimentaron con porotos de soja var Williams rehidratados. La línea punteada marca la región en la que se ubican los fragmentos del simbionte obligado.

así como tampoco en las ninfas de 3er estadio (**Fig20**). Estos resultados sugieren que el simbiote es un microorganismo que puede ser eliminado de la superficie de los huevos por el tratamiento de esterilización por debajo del límite de sensibilidad de esta técnica ($>10^3$), y/o que no logra colonizar el intestino durante el desarrollo de las ninfas.

Por otro lado, aunque la esterilización también eliminó otras bacterias presentes en el huevo, estas fueron capaces de infectar el intestino de las chinches. Estos resultados sugieren la posibilidad de que las bacterias puedan mantener una vida libre fuera del hospedero. Sin embargo, el simbiote obligado de *N. viridula* no mostró capacidad de mantener una vida libre en las condiciones de cultivo utilizadas durante el trabajo de investigación de esta tesis. La cercanía filogenética de este simbiote con *Erwinia* y *Pantoea* sugiere que este fenómeno no está relacionado con la tolerancia al oxígeno, y que podría estar asociada a una pérdida de material genético, propio de relaciones simbióticas obligadas⁷⁰.

Supervivencia de las ninfas y duración de los períodos ninfales en presencia y ausencia del simbiote obligado

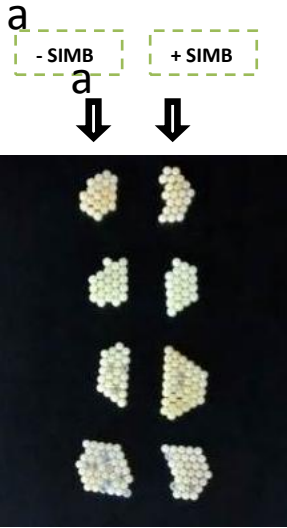
Este experimento tuvo como objetivo definir la importancia del simbiote de la cloaca de *Nezara viridula* en el desarrollo y supervivencia de las ninfas, cuando la chinche se alimenta de semillas de soja maduras rehidratadas. Prado y col (2009) y Tada y col (2010) encontraron resultados contradictorios con respecto a la importancia del simbiote obligado. Mientras que Prado sólo observó un retraso leve (1-2 días) en los estadios ninfales de los aposimbiontes, Tada observó una drástica caída de la supervivencia a partir del tercer estadio ninfal. Tada y col aclaran que estos resultados pueden deberse a diferencias en la dieta suministrada entre ambos experimentos o a diferencias genéticas de las poblaciones de chinches.

En este experimento, cinco posturas de 40-80 huevos fueron fraccionadas en dos partes, que recibieron los siguientes tratamientos: a) esterilización superficial con 5' de alcohol 96º seguido de 5' en hipoclorito de sodio 10% y b) H₂O destilada estéril. Los huevos se dejaron secar en un flujo de aire estéril y se colocaron en placas de Petri estériles, con algodón con agua estéril hasta su eclosión. Las ninfas fueron alimentadas con soja rehidratada var *Williams* y agua destilada estéril. Se evaluó la supervivencia de las ninfas durante 35 días, que fue el tiempo que necesitó la mitad de los individuos para alcanzar la adultez en ambos grupos. Las cuatro repeticiones utilizadas en el experimento fueron evaluadas en forma independiente debido a variaciones en el día de eclosión. El valor *p* se calculó con el test Gehan-Breslow-Wilcoxon que otorga más peso a los resultados obtenidos durante los primeros días del experimento. Se eligió este análisis estadístico teniendo en cuenta que los insectos demuestran mayor sensibilidad a los agentes externos durante los primeros estadios^{10,122}.

El experimento se extendió por 35 días, el tiempo necesario para que la mitad de la población de las ninfas, aquellas originadas de huevos esterilizados y control, alcanzaran el estadio adulto. No se observaron diferencias significativas en los valores de supervivencia entre las chinches control y las aposimbióticas ($p > 0,05$) (**Fig21**). Los valores de supervivencia al final del experimento oscilaron entre el 41% y el 52% para las ninfas infectadas con el simbiote, mientras que las aposimbióticas tuvieron una supervivencia de entre un 48% y 60%. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los pesos promedios de chinches al finalizar el experimento (t Student - p : 0.1866). De todas maneras, se observó una tendencia a que el peso promedio de las chinches aposimbióticas sea mayor que el de las infectadas con el simbiote.

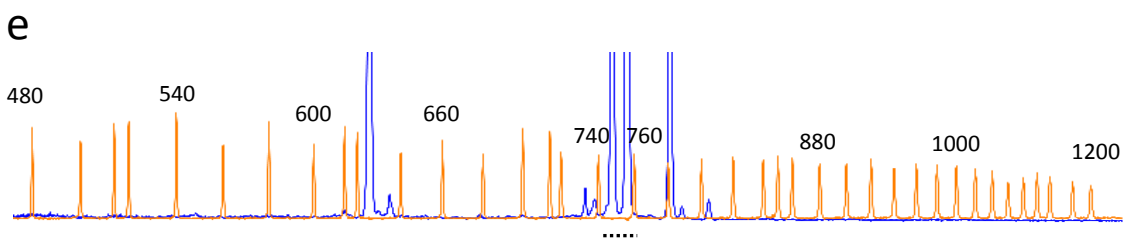
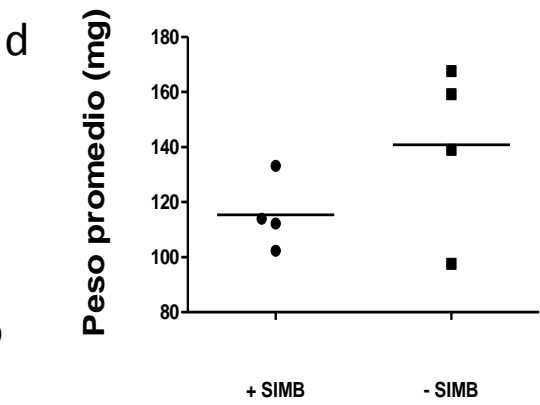
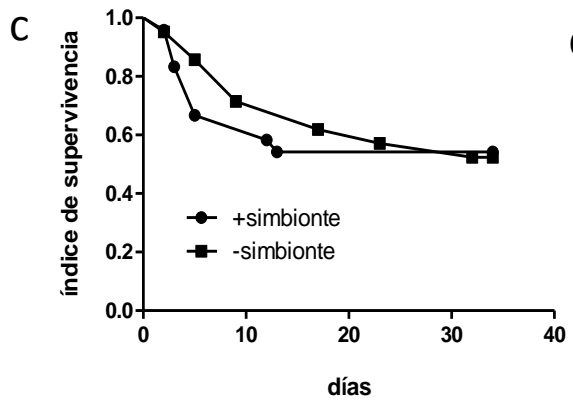
Los resultados de mis experimentos sugieren que la ausencia del simbiote no afecta a la supervivencia, ni el peso final del insecto cuando las ninfas son alimentadas con soja var. *Williams* madura rehidratada, en concordancia con Prado y col (2009). La relación simbiótica entre estos dos organismos todavía no está dilucidada. Debido a la relación cercana del simbiote con el género *Erwinia* es probable que esta bacteria esté

involucrada en la fijación de nitrógeno y/o la síntesis de vitaminas del complejo B 29,32,123–125. La importancia del metabolismo del simbiote estará, por lo tanto, directamente asociada a la dieta del insecto. La chinche verde, presenta decenas de hospederos que varían en el aporte nutricional, y el simbiote podría ser más relevante en algunos casos que otros. Un ejemplo de la relación *Erwinia*-insecto y el



b. Resultados y significancia estadística

Exp	Índice de Supervivencia			Peso Promedio (mg)	
	+simbiote	-simbiote	Valor p	+simbiote	-simbiote
1	0.41	0.45	0.8067	103	139
2	0.54	0.52	0.6046	133	159
3	0.52	0.58	0.9300	113	167
4	0.52	0.60	0.7361	112	97



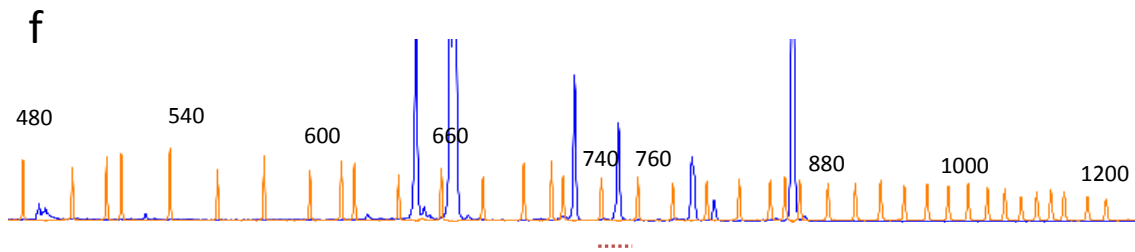


Fig 21. Supervivencia y pesos promedio de adulto simbióticos y aposimbióticos. (a) Se realizaron cuatro experimentos independientes de huevos sin esterilizar (+simb) y esterilizados superficialmente (-simb). (b) El valor p para evaluar los tratamientos sobre el índice de supervivencia se calculó con el test Gehan-Breslow-Wilcoxon y para el peso promedio se realizó un test de t-Student desapareado. (c) Curva de supervivencia para Exp 3 donde se observa el desarrollo de las curvas. (d) Gráfico de caja y bigotes para los pesos promedio alcanzados por las chinches al día 35 del ensayo. (e) ARISA de adultos de control (f) ARISA de adultos de huevos esterilizados superficialmente. La línea punteada marca la posición del simbiote eliminado durante el proceso el tratamiento de esterilización.

efecto de la dieta es el caso de los trips (*Frankliniella occidentalis*: Tisanóptera)¹²⁵. Cuando los trips se alimentan de hojas de pepino, los individuos infectados con *Erwinia* tienen un mayor índice de oviposición, mientras que cuando estos insectos se alimentan con hojas de pepino y polen, se ven beneficiados aquellos individuos que no tienen *Erwinia*. Es decir, que la bacteria beneficia o parasita al hospedero dependiendo la dieta que este consume, lo que concuerda con la teoría predictiva del *fitness* de organismos asociados a interacciones simbióticas¹²⁶. En la siguiente sección se mostrarán los resultados de la evaluación de la funcionalidad de las bacterias aisladas de los ventrículos V2-V3 del intestino de *N. viridula*.

2. Evaluación de la transferencia horizontal de bacterias del intestino medio (V2-V3) en la población de ninfas en cautiverio

Teniendo en cuenta la baja tasa de infectividad de bacterias en el V2-V3 observado a campo, se evaluó la eficiencia de la transferencia vertical de estas bacterias (Enterobacterias y Enterococos) en cautiverio durante la oviposición. Para el análisis

se utilizaron 4 posturas (n=160) de chinche verde y se monitoreó la presencia/ausencia de bacterias cultivables en los distintos estadios ninfales. Para el análisis en las ninfas de 1er, 2do y 3er estadio, los individuos fueron homogeneizados con una punta descartable de una pipeta estéril en 10µl de solución fisiológica, y la totalidad de la suspensión se sembró en agar Tripteina de Soja por la técnica de la microgota. Para el análisis en las ninfas de 4to, 5to estadio y adultos, se extrajeron los intestinos en esterilidad, y se homogeneizaron con potter y se sembró una dilución 1:1000.

La capacidad infectiva durante el 1er estadio fue menor al 25% (**Fig 22**). Las ninfas se trasladaron desde la postura hacia el algodón con agua y allí mudaron al segundo estadio. En el segundo estadio el 100% de las ninfas utilizadas en el experimento fueron infectadas con bacterias cultivables. Esta tasa de infección se mantuvo hasta el estado adulto. Estos resultados indican que la transferencia de las bacterias desde la madre a la progenie tiene una eficiencia baja, propia de simbioses facultativos^{27,28}. El

ÍNDICE DE INFECCIÓN DE *N. VIRIDULA* EN SUS ESTADIOS NINFALES EN CUATIVERIO

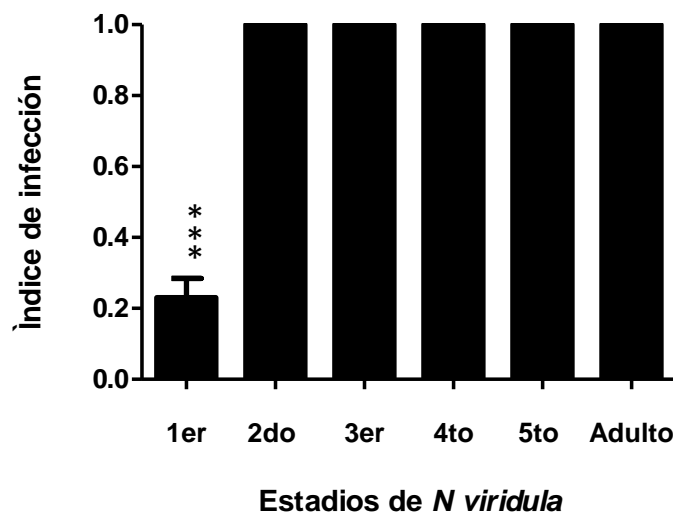


Fig 22. Índice de Infección de *N. viridula* en sus estadios ninfales en cuativerio, con bacterias cultivables en una misma postura de huevos. 1er estadio (n=40); 2do estadio (n=40), 3er estadio (n=20), 4to estadio (n=20), 5to estadio (n=20), Adultos (n=20). 1er-3er estadio, insectos enteros; 4to-Adulto: intestinos; se homogeneizó y cultivó por la técnica de la microgota en TSA a 37°C.

posterior aumento en la tasa de infección observada en este experimento estaría relacionada a una transmisión horizontal fecal-oral ^{27,28,127} propia de insectos sociales, lo que no es el caso de *Nezara viridula* en ambientes naturales.

Un análisis molecular de la comunidad microbiana de la chinche verde en cautiverio realizado por ARISA mostró que los adultos estaban infectados con alguna cepa de *Yokenella* sp, y de *Enterococcus* sp (**Fig 23**). En esa ocasión también se identificó la presencia de *Serratia* sp., un reconocido entomopatógeno de cautiverio ¹²⁸⁻¹³⁰. En este trabajo se utilizó el medio ADNse de Difco adicionado con el colorante azul de Toluidina, para confirmar la presencia de esta bacteria. El patógeno se erradicó de la cría tras a mejoramiento en las buenas prácticas de cría, que incluyó cambios en el tratamiento de la comida y en la forma de dispensarla, renovación periódica de los algodones de bebida, entre otros.

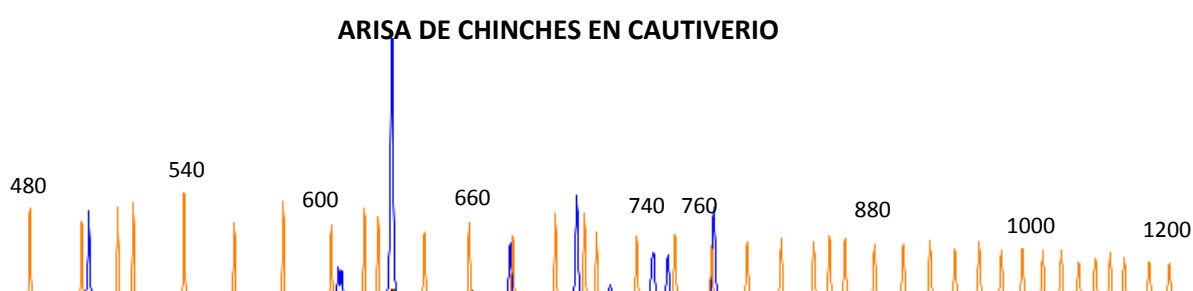


Fig 23. Perfil ARISA obtenido en cautiverio. Se identifican ocho fragmentos ITS pertenecientes a tres bacterias: simbionte obligado, *Yokenella*, *Serratia* y *Enterococcus*. Los perfiles ARISA obtenidos para las bacterias aisladas se presentan en el Apendice X.

3. Evaluación de los antibióticos estreptomycinina y amoxicilina en la eliminación de las bacterias del v2-v3 en ninfas de 2do estadio

El objetivo del siguiente experimento fue evaluar la efectividad de un coctel de antibióticos diseñado en función de los conocimientos adquiridos hasta aquí y con el

propósito de obtener ninfas libres de bacterias en el V2-V3 para ensayos de funcionalidad *in vivo*.

Análisis de resistencia a antibióticos β -lactámicos y de las cepas aisladas de *Yokenella*

Se realizó una evaluación de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos, por el medio de difusión en agar, de cinco cepas de *Yokenella* sp aisladas.

Los resultados indican que las cepas NvU02 y NvH01 fueron resistentes a Ampicilina + Ac Clavulánico (AMC) y Cefalotina (**Tabla 12**). Las cepas NvU01 y NvR01 fueron sensibles a AMC y para NvW01 no se pudo definir. Para el antibiótico Cefoxitina (FOX) todas las cepas se mostraron resistentes con excepción de NvU01. La resistencia a estos antibióticos se debe a la producción de una β -lactamasa cromosómica inducible, AmpC. Todas las cepas probadas fueron sensibles a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, CAZ y FEP, y a los β -lactámicos Imipinem y Aztreonam. Además, todas las cepas fueron sensibles a los aminoglucósidos ensayados, gentamicina y ampicacina.

Tabla 12 Sensibilidad de *Yokenella* sp a antimicrobianos

Cepas aisladas	Diámetro del halo de inhibición en mm (interpretación según CLSI)										
	AMC	CEF	FOX	CTX	CAZ	IMP	TMS	FEP	AZT	GM	AKN
Yokenella sp											
NvH01	7,2	10	12	29	24	26	27	30	28	19	18
	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
NvU01	27	24	-	42	29	28	18	24	38	20	22
	S	S	?	S	S	S	S	S	S	S	S

Cepas aisladas	Diámetro del halo de inhibición en mm (interpretación según CLSI)										
	AMC	CEF	FOX	CTX	CAZ	IMP	TMS	FEP	AZT	GM	AKN
Yokenella sp											
NvU02	18	17	-	32	17	27	30	35	32	22	23
	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
NvR01	14	14	12	36	30	29	30	38	36	24	25
	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
NvW01	20	17	13	30	31	29	34	36	34	22	20
	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S

(R) resistente; (I) intermedio; (S) sensible. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CEF: cefalotina; FOX: ceftaxima; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; IMP: imipime; TMS: Trimet. Sulfa Metoxazol FEP: cefepime; AZT: aztreonam, GM: gentamicina; AKN:amikacina. Se usó *E. coli* 25922 como control

La homogeneidad en la respuesta de las distintas cepas ante los antibióticos en este trabajo y los resultados publicados por Stock y col (2004), sugieren que el género *Yokenella* es naturalmente resistente a β -lactámicos.

- a. *Diseño de un coctel de antibióticos para la eliminación de bacterias en los ventrículos V2-V3 del intestino medio.*

Para el diseño del coctel se tuvieron en cuenta los siguientes resultados previos y antecedentes:

- a. Las chinches en cautiverio sólo presentaron bacterias correspondientes a los grupos Enterobacteriaceae y Enterococaceae, sin representantes de la flora transitoria.

b. Las ninfas tardaron 3 días en mudar a 2do estadio, y este es el tiempo máximo en el que se les puede administrar el antibiótico.

c. Estudios previos indicaron que las cepas de *Yokenella* fueron sensibles a Estreptomicina y el uso de una solución de Estreptomicina 125 mg/l para mejorar la performance de las chinches criadas en cautiverio ya fue probado en estudios previos ¹³¹.

d. La amoxicilina tiene probado efecto sobre los Enterococos ¹³²

En este trabajo se decidió utilizar una mezcla de Estreptomicina 1 mg/ml y Amoxicilina 0,3 mg/ml con el objetivo de eliminar la flora del V2-V3 de ninfas en 1er estadio y obtener ninfas de 2do estadio libre de bacterias. Esta solución se administró durante 3 días en el agua de bebida.

EFFECTIVIDAD DEL COCTEL DE ANTIBIÓTICOS ADMINISTRADO A NINFAS DE 1ER ESTADIO

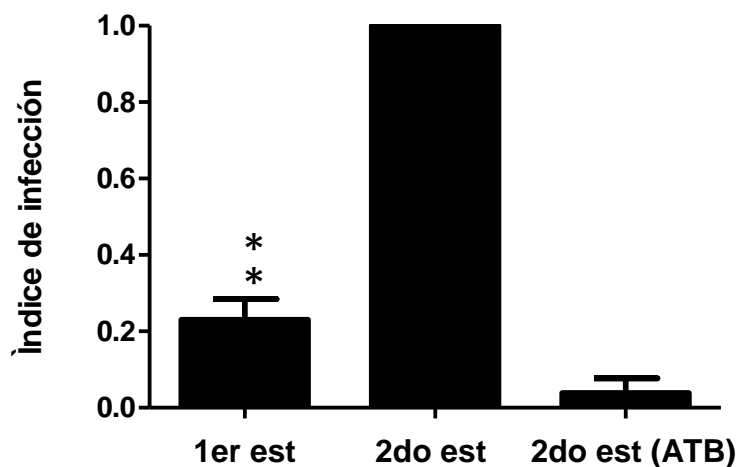


Figure 24. Efectividad del coctel de antibióticos administrado a ninfas de 1er estadio. 1er estadio: índice de infección previo al tratamiento. 2do est: ninfas no tratadas con antibióticos. 2do est (ATB): ninfas tratadas con antibióticos.

Los resultados mostraron que el coctel de antibióticos tiene una efectividad alta, no sólo al reducir significativamente el índice de infección inicial de la chinches en 1er estadio, sino también al prevenir la infección por transmisión fecal-oral ($p < 0,0001$)

(Fig24). Las ninfas de segundo estadio tratadas con antibióticos tuvieron un índice de infección seis veces menor que las ninfas en primer estadio (4% y 24% respectivamente). Además, disminuyeron 25 veces la posibilidad de contraer la bacteria en el segundo estadio, reduciendo el índice de infección de 100% para ninfas no tratadas hasta 4%, con el tratamiento con antibióticos. Las diferencias fueron significativas entre los grupos con y sin antibióticos según un análisis de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) **(Tabla 13)**. Con estos resultados, se desarrolló un protocolo de eliminación de bacterias con antibióticos seguido de

Tabla 13 Salida del análisis ANOVA y de comparación múltiple de Tukey en la evaluación de la efectividad del coctel de antibióticos administrado a ninfas de 1er estadio.

Test de Comparaciones	Mean	q	Signif	Resumen	95% CI of diff
Múltiples de Tukey	diff				
1er est vs 2do est	-0,7693	20,98	Sí	***	-0.9284 a -0.6101
1er est vs 2do est (ATB)	0,9615	0,1923	Sí	*	0.03314 a 0.3514
2do est vs 2do est (ATB)	5,243	26,22	Sí	***	0.8024 a 1.121

1er est: índice de infección previo al tratamiento. 2do est: ninfas no tratadas con antibióticos. 2do est (ATB): ninfas tratadas con antibióticos.

4. Supervivencia de ninfas en cautiverio tras una infección con *Yokenella sp*

Efecto de la infección de cepas *Yokenella sp*. NvU01 y NvU02 sobre la supervivencia de las ninfas de *N. viridula*

Las cepas de *Yokenella sp* NvU01 y NvU02 fueron seleccionadas para los ensayos de infección según el siguiente criterio: ambas correspondían a una misma colecta (sitio/fecha/hospedero), fueron identificadas y caracterizadas, y presentaban metabolismos de utilización de hidratos de carbono y de degradación de aminoácidos

diferentes. Las ninfas de 1er estadio fueron tratadas con antibióticos. Cuando las ninfas mudaron a segundo estadio, 72 se repartieron en tres grupos: control (n=24), infectadas con las cepas *Yokenella* sp NvU01 (título 10^5 UFC/ml (n=23) e infectada con la cepa *Yokenella* sp NvU02 (título 10^5 UFC/ml) (n:25). La infección se realizó por goteo de la suspensión bacteriana sobre papel de filtro y alrededor de los granos de soja var Williams rehidratada. Los controles se realizaron por administración de una solución de antibióticos (Estreptomina 1 mg/ml + Amoxicilina 0.3 mg/ml). En el marco del protocolo utilizado y posterior a las 48h de infección, se homogeneizaron individualmente 16 ninfas infectadas con *Yokenella* sp NvU02 en 10ul de PBS y se sembraron en TSA por la técnica de la microgota. Ocho ninfas fueron rociadas con alcohol 70% para descartar que el crecimiento bacteriano se deba a contaminación externa. Las ninfas analizadas estaban todas infectadas con *Yokenella* sp NvU02 y se confirmó que estas bacterias estaban dentro de la chinche y no en la superficie del insecto **(Fig 25)**.

Los resultados mostraron que a una misma dosis infectiva (aprox. 10^5 UFC/ml), las cepas de *Yokenella* analizadas tienen un efecto deletéreo sobre la supervivencia de ninfas de segundo estadio (Test de Mantel Cox - X^2 : 21,71 - $p < 0.0001$) **(Fig26)**. Además, el análisis de las curvas de supervivencia de las cepas de *Yokenella* sp NvU01 y NvU02 mostraron que NvU01 es significativamente más agresiva que NvU02 (Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon X^2 : 5,604 – $p = 0.0179$). La supervivencia de las chinches en segundo estadio fue significativamente menor que la de las chinches control a partir del primer día de infección, mientras que las diferencias entre las cepas se observaron a partir del día 5. Al final del experimento, 10 días post infección, la supervivencia de las ninfas infectadas con la cepa NvU01 fue de 16%, mientras que las infectadas con la cepa NvU02 fue del 35%. El las ninfas no infectadas (control) mostraron una supervivencia del 87%. Debido a que una de las probables causas de la alta mortalidad post infectiva, puede ser la dosis infectiva utilizada, se probó el efecto de dosis menores, en las que también se observó la capacidad de la bacteria de infectar el intestino de la chinche.

CONTROL DE INFECCIÓN TRAS 48 HS DE INOCULACIÓN

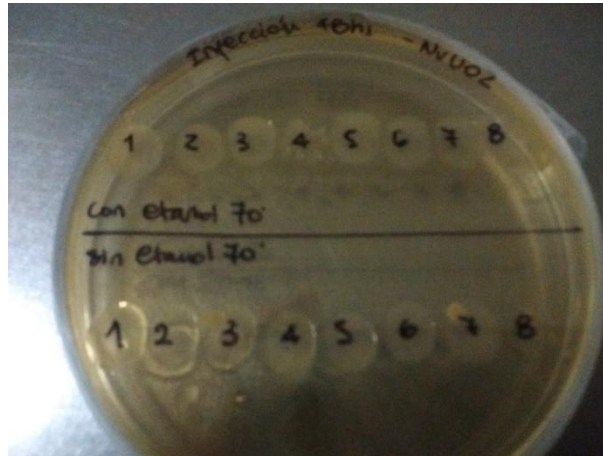


Fig 25. Foto que confirma el nivel de infección de las chinches tras 24 horas de inoculado en el papel. Se tomaron 16 ninfas mudadas a 2do estadio, se homogeneizaron 10ul se sembró por la técnica de la microgota. Ocho ninfas se rociaron con alcohol 70% superficialmente para evitar contaminación superficial.

SUPERVIVENCIA DE NINFAS DE 2do ESTADIO INFECTADAS CON

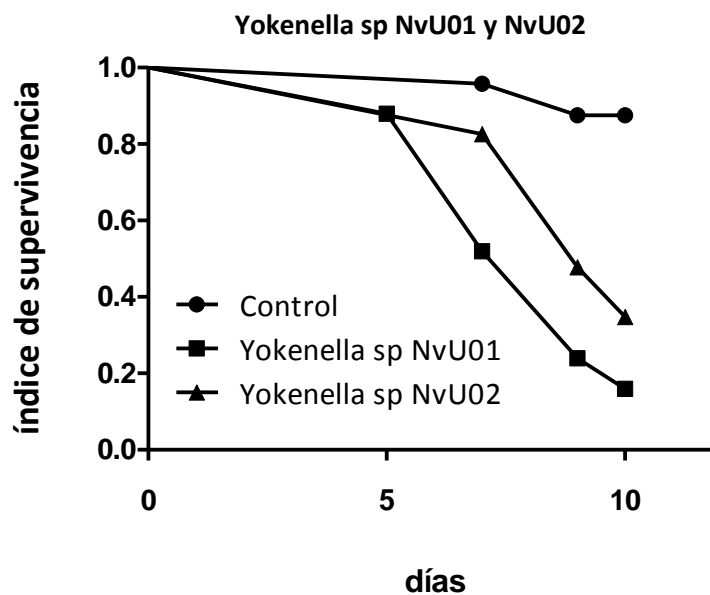


Fig 26. Supervivencia de ninfas infectadas con *Yokenella* sp NvU01 y NvU02. Ninfas en 2do estadio (n=72) fueron separadas en tres grupos: Control (n=24); Infectadas con las cepas *Yokenella* sp NvU01 (título 10^5 UFC/ml (n=23) e infectada con la cepa *Yokenella* sp NvU02 (título 10^5 UFC/ml) (n=25). Todas fueron alimentadas con poroto de soja rehidratado. Los controles se realizaron por administración de una solución de antibióticos (Estreptomicina 1 mg/ml + Amoxicilina 0.3 mg/ml).

Efecto de la dosis infectiva de la cepa NvU02 sobre la supervivencia de las chinches infectadas en 2do estadio.

En este experimento se probaron tres dosis infectivas (10^3 , 10^4 y 10^5 UFC/ml) con el objetivo de obtener una dosis que permita inocular la bacteria en la chinche sin producir alto niveles de mortalidad.

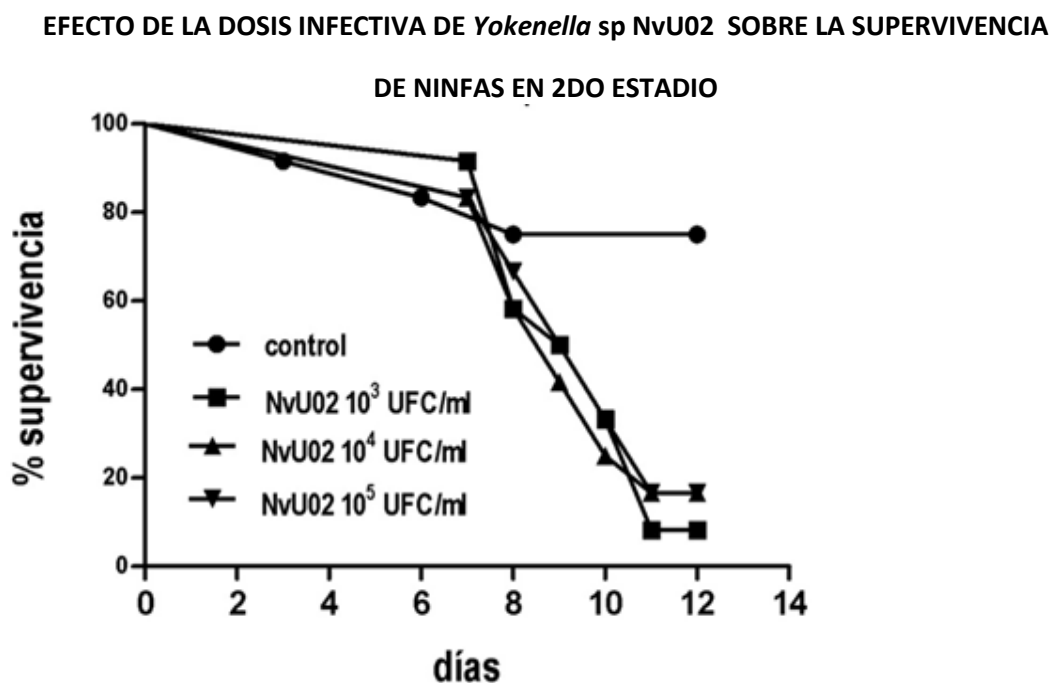


Fig 27. Supervivencia de ninfas infectadas con *Yokenella* sp NvU02. Ninfas en 2do estadio (n=24) fueron expuestas a tres dosis de suspensión bacteriana: (cuadrado) 10^3 – (triángulo) 10^4 y (triángulo invertido) 10^5 UFC/ml. Las chinches del control (●) se mantuvieron con administración de una solución de antibióticos (Estreptomicina 1mg/ml + Amoxicilina 0.3 mg/ml) durante todo el experimento.

Se realizó un experimento independiente en el que las diluciones seriadas de *Yokenella* sp NvU02 no mostraron diferencias significativas sobre la supervivencia de las ninfas ($p>0.05$), aunque sí fueron distintas al control, llegando a una mortalidad mayor al

80% tras 10 días de ensayo (Test de Mantel Cox - $p < 0.001$). Teniendo en cuenta que esta bacteria fue aislada de insectos adultos y que se desconoce en qué momento se produce la infección del intestino, es posible que la mortalidad sea dependiente del estadio madurativo del individuo. Para evaluar el efecto de la madurez de las ninfas sobre la sensibilidad a las infecciones bacterianas se realizó un experimento de infección con *Yokenella* sp NvU02 en ninfas de 4to estadio.

Efecto de la infección con Yokenella a distintas instancias de madurez de la chinche verde.

El siguiente experimento se realizó con el objetivo de evaluar la mortalidad post infección de ninfas en 4to estadio. Para poner a prueba el efecto de la presencia de la cepa *Yokenella* sp. NvU02 en el intestino sobre la mortalidad de las ninfas que habían mudado a 4to estadio, se repitió el experimento de infección en ninfas de 2do estadio, siguiendo la metodología ya descrita. Se infectaron 64 ninfas, mientras que otras 42 ninfas se mantuvieron con solución de antibiótico como Control.

Las curvas de supervivencia fueron significativamente diferentes cuando las ninfas fueron infectadas en 2do estadio (X^2 : 51,39 – $p < 0,001$) (**Fig28a**). La mortalidad de las ninfas fue de 94% a los 9 días de experimento, mientras que para el control fue del 13%.

Luego las chinches del control fueron divididas en dos grupos, uno de 20 y otro de 21 individuos. Cuando las ninfas mudaron al 4to estadio se las infectó con la suspensión de *Yokenella* sp NvU02 y se determinó su supervivencia. Las curvas de supervivencia también fueron significativamente diferentes (X^2 : 8,961 – $p = 0,0028$) (**Fig28b**). A los nueve días de infección, el porcentaje de supervivencia de las ninfas tratadas fue del 80%. De todas maneras, la supervivencia luego de 26 días fue del 30%, mientras que las chinches del control tuvieron una supervivencia del 76%. Estos resultados sugieren

que si bien las ninfas de 4to estadio tienen una mayor resistencia a la infección por *Yokenella* sp., su supervivencia se ve de todas maneras afectada negativamente.

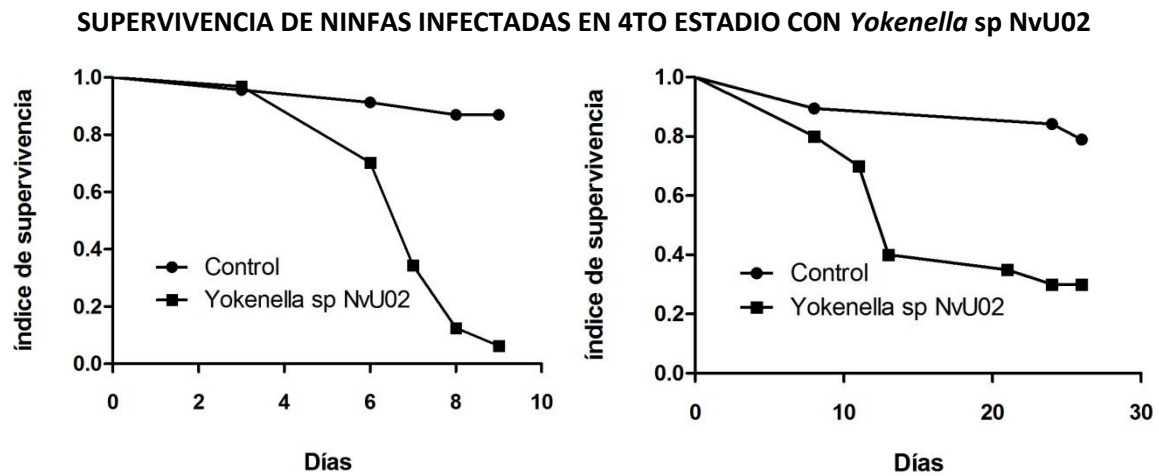


Fig 28. Supervivencia de ninfas infectadas con *Yokenella* sp NvU02. Ninfas en 2do estadio (Tratamiento n=64 y Control N=42) (a) y en 4to estadio (Tratamiento n=20 y Control n=19) (b) fueron infectadas con *Yokenella* sp NvU02 (título 10^5 UFC/ml) y alimentadas con poroto de soja rehidratado y agua destilada estéril. Los controles se realizaron por administración de una solución de antibióticos (Estreptomicina 1mg/ml + Amoxicilina 0.3 mg/ml).

Los resultados de estos experimentos mostraron que la administración de *Yokenella* a las chinches en cautiverio afecta negativamente su supervivencia y desarrollo en los períodos ninfales, siendo los primeros estadios más susceptibles a las bacterias. El género *Yokenella* está identificado como un patógeno de tipo II de moderado riesgo individual y riesgo comunitario limitado, pero que puede causar enfermedades a humanos o animales inmunocomprometidos (OMS, Manual de Bioseguridad en Laboratorios, 3era Edición, 2005). Se sabe que algunos patógenos gastrointestinales necesitan alcanzar un número mínimo en el que se detectan las moléculas relacionadas con el *quorum sensing*, que despiertan los factores de virulencia ¹³³. Alteraciones en el sistema inmune de la chinche en cautiverio, podría permitir una colonización profusa de estas bacterias alcanzando el número necesario para la infección. Además, el tratamiento con antibióticos previo a la inoculación, podría estar generando un efecto inmunosupresor y/o cambios en el pH intestinal que sensibilicen

al individuo frente a la posterior infección bacteriana. De este estudio se desprende la necesidad de ahondar en el efecto del tratamiento con antibióticos, ampliamente utilizados en los experimentos de funcionalidad de microorganismos intestinales, sobre el sistema inmune de los insectos. La infección de esta bacteria podría tener efectos sobre la formación de la matriz peritrófica posiblemente afectada por cambios en el pH, o bien sobre la supresión del sistema de *priming* que incluye la síntesis de péptidos antimicrobianos y la activación del sistema enzimático que protege al epitelio intestinal del estrés oxidativo ¹³⁴.

Efecto de la infección con *Yokenella* sp NvU02 en adultos sobre el estrés oxidativo y la actividad proteolítica del intestino medio.

El objetivo del siguiente experimento fue evaluar el efecto de la incorporación de la bacteria *Yokenella* sp NvU02 10^5 UFC/ml tras 72h de infección, sobre la peroxidación lipídica como indicador de stress oxidativo, y modificaciones en la actividad proteolítica intestinal, en adultos que no presentaban bacterias cultivables en el intestino medio. Estos adultos se obtuvieron de una colecta a campo realizada en la localidad de Rafaela. Las chinches fueron colectadas de soja (colecta Raf1) y no presentaban bacterias en el intestino (n=20 de un total de 80 adultos).

No se observaron diferencias significativas en el contenido de malondialdehído/mg proteína, lo que sugiere que la presencia de bacterias en el sistema digestivo no genera un aumento en la peroxidación lipídica asociado al estrés oxidativo, en chinches adultas en condiciones de cautiverio (t Student – $p=0,1790$) (**Fig29a**).

También se evaluó el efecto de la infección con *Yokenella* NvU02 sobre la actividad de las cisteín-proteasas del intestino. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$), aunque se observa una tendencia a una disminución de la actividad cuando adultos de chinche verde se encontraba infectada con la bacteria (**Fig 29b**).

EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Yokenella* sp. NvU02 SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y LA ACTIVIDAD CISTEIN PROTEASAS DE ADULTOS DE CHINCHE VERDE

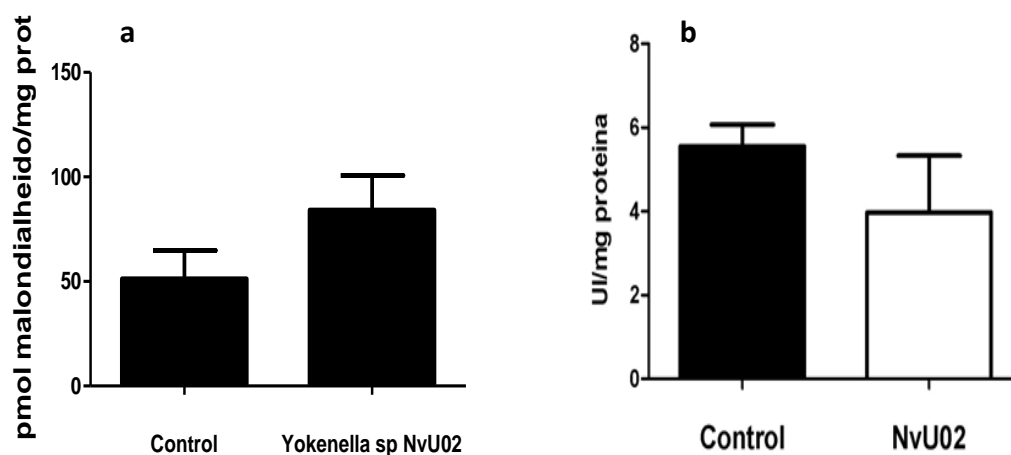


Fig 29. Peroxidación lipídica (TBARS) (a) y actividad cistein proteasa (b) en el intestino de *N. viridula* tras 72hs. Individuos adultos infectados con *Yokenella* sp NvU02 (n:8 por triplicado), y control (n:8 por triplicado)

5. Evaluación de la relación bacteria-insecto en el sistema
Nezara viridula – *Yokenella* sp NvU02 – *Glycine max.* var
Williams en condiciones de campo

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la infección con *Yokenella* sp NvU02 en chinches creciendo y desarrollándose en su ambiente natural, el cultivo de soja. Ninfas de chinche verde fueron ubicadas en plantas de un cultivo de soja durante un período de 30 días y se determinó la supervivencia, el peso final de las ninfas, así como también, el índice de infección, y los parámetros relacionados la oxidación intestinal, como la peroxidación lipídica, y además la actividad de las cistein proteasas.

Para las primeras 48 hs se utilizó el mismo protocolo de infección al realizado para los experimentos en cautiverio. Luego de 48 h, un pool de 60 ninfas infectadas fueron aleatoriamente distribuidas en cuatro plantas de soja (*Glycine max.*) var Williams, y

encerradas en bolsas de tul cilíndricas de 40 cm de largo. Las bolsas se ajustaron en las puntas para evitar la salida de las ninfas, abarcando más de la mitad de la planta. La misma metodología se utilizó para las ninfas control (n=60).

Análisis de la supervivencia y el crecimiento y desarrollo de *N. viridula* infectada con *Yokenella* sp NvU02

Ciento veinte ninfas fueron colocadas en bolsas de tul y ubicadas sobre vainas con semillas en soja cultivada a campo, y se evaluó la supervivencia frente al tratamiento de infección con *Yokenella* sp NvU02. El análisis estadístico indicó que había diferencias significativas en los primeros 5 días, con una mortalidad mayor para las chinches infectadas (**Fig30**) ($p < 0,05$). La supervivencia fue similar tanto para las ninfas infectadas como para las no infectadas, con un porcentaje de supervivencia global de un 51% para el control y un 43% para las infectadas, pero sin diferencias significativas.

El índice de mortalidad observada en los primeros cinco días del experimento coincide con los resultados obtenidos en los experimentos en cautiverio. Es decir, el efecto de la presencia de estas bacterias en el intestino disminuyó la supervivencia en ninfas de segundo estadio. De todas maneras, la estabilización en la mortandad de ninfas producida a partir del día 7, sugiere que las ninfas sobrevivientes han logrado recuperar su homeostasis intestinal y/o que han utilizado metabolitos de la planta para contrarrestar el efecto negativo de la infección.

EFFECTO DE LA SUPERVIVENCIA EN PLANTAS DE SOJA DE NINFAS
INFECTADAS CON *Yokenella* sp NvU02

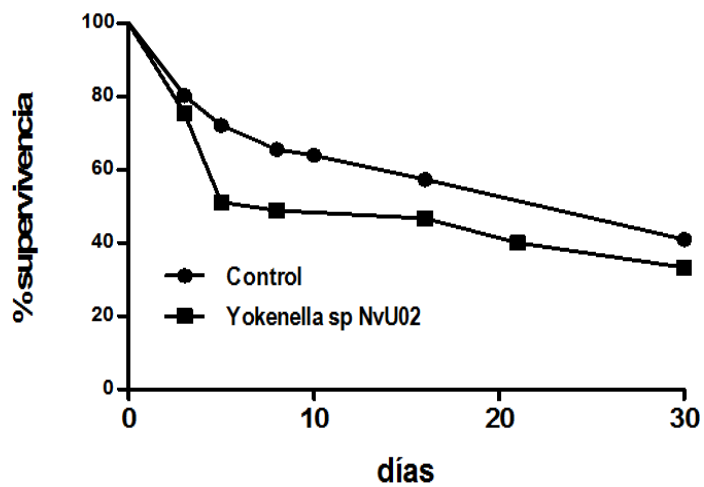


Fig 30. Curvas de supervivencia de *N. viridula* infectada con *Yokenella* sp NvU02 (cuadrado negro) y control (circulo negro). La observaciones se realizaron cada dos días los primeros diez días y luego cada 3 días hasta el final del ensayo.

Para identificar posibles cambios en la flora intestinal de las chinches, se evaluó presencia/ausencia de bacterias en el intestino al final del experimento. Veinte y ocho ninfas no infectadas (control) y 37 infectadas con *Yokenella* sp NvU02 fueron disectadas, y 10 μ l del homogenato (1 mg intestino/100 μ l) sembrado por la técnica de la microgota en agar Tripetina de Soja. La dilución elegida tiene como objetivo asegurar que la bacteria cultivada se encontraba en el intestino en un número no menor a 10^3 UFC/mg. Luego se calculó el índice de infección para cada repetición, teniendo en cuenta los controles y los infectados (**Tabla 14**). Por último se midió el peso del grupo de chinches sobrevivientes y se calculó el peso promedio para cada repetición.

No se encontraron diferencias significativas para el índice de infección ($p= 0.3$; Mann-Whitney U: 4,0; y $p= 0.9$) (**Fig 31a**). Este test se eligió teniendo en cuenta que no existe igualdad de varianzas entre los dos grupos ($p<0,05$). Los resultados obtenidos para los

pesos promedios de las chinches se analizaron por test de t Student sugiriendo que no existen diferencias entre el tratamiento y el control ($p= 0,2$) (**Fig 31b**)

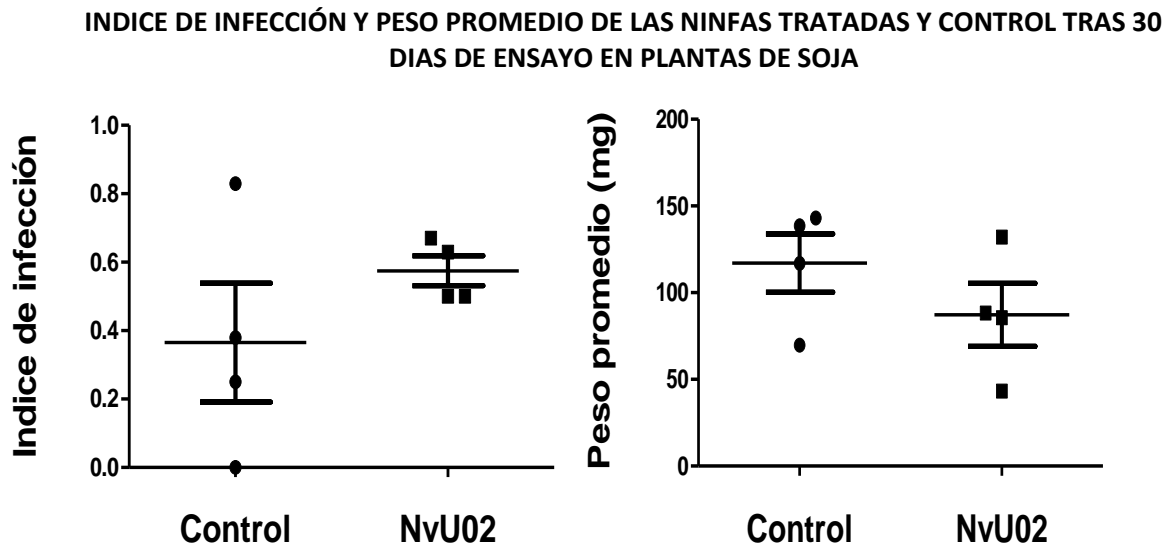


Fig 31. Índice de infección (a) y peso promedio (b) para las ninfas en el tratamiento con antibióticos (Control) e infectadas con *Yokenella* sp NvU02. Se grafica la media, el error estándar (SE).

El análisis de correlación entre el *peso promedio* de las chinches y el *índice de infección*, sugiere que la presencia de bacterias afecta negativamente el desarrollo de las chinches, ya que el peso promedio de la ninfa en 5to estadio disminuye significativamente con el aumento del índice de infección (Person $r: -0,7978$; $R^2: 0,6364$; $p= 0,01$) (**Fig32**).

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE EL PESO PROMEDIO Y EL ÍNDICE DE INFECCIÓN

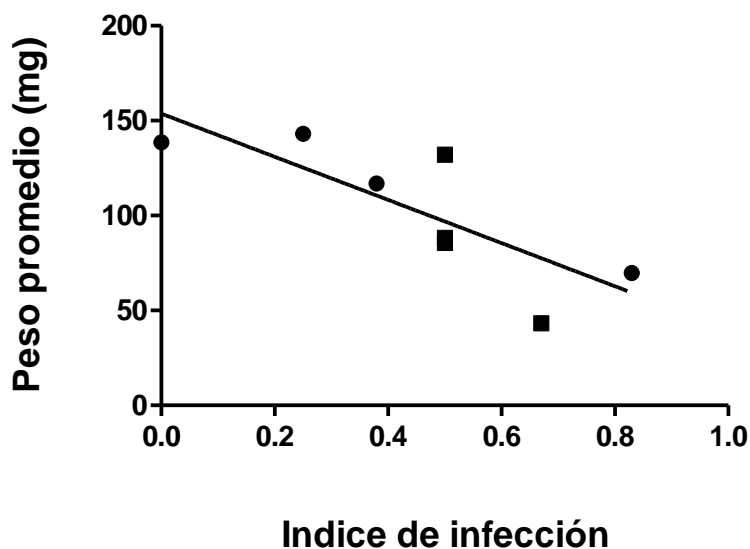


Fig 32. Análisis de correlación entre las variables peso promedio de las chinches en función del índice de infección. En círculos negros los datos de los controles y en cuadrados negros los datos de las chinches infectadas con *Yokenella* sp. NvU02 al inicio del ensayo.

Tabla 14 Peso Promedio e índice de infección de chinches en ensayos en plantas de Soja luego de 30 días de infección.

Rep	Tratamiento	N disect	N infectadas	N pesadas	Peso total (mg)	Peso Promedio (mg)	Índice de infección
1	Control	8	0	8	1108	138,5	0,00
2		8	3	7	818	116,9	0,38
3		6	5	4	278,8	69,7	0,83
4		4	1	5	715,5	143,1	0,25
1	Infección <i>Yokenella</i>	6	3	3	256,5	85,5	0,50
2		8	5	6	529,8	88,3	0,63
3		9	6	6	259,5	43,3	0,67
4	NvU02	4	2	1	132	132,0	0,50

N disect: chinches diseccionadas para análisis microbiológico, TBARS y actividad proteolítica. N infectadas: número de chinches diseccionadas que presentaron recuento $>10^3$ UFC/mg. N pesadas: Número de ninfas que fueron pesadas para calcular el peso promedio de la repetición. Peso Promedio: relación entre el peso total de la repetición y el n de chinches pesadas. Índice de infección: Relación entre el n infectadas y el n de chinches disectadas

La disminución en el peso de las chinches relacionada con la presencia de bacterias podría deberse a una relación simbiótica comensalista, en la que la bacteria no estaría aumentando la disponibilidad de nutrientes, sino utilizando la maquinaria del intestino de la chinche para abastecerse de los nutrientes necesarios para su crecimiento.

Efecto de la infección con *Yokenella* sp NvU02 en ninfas en 5to estadio sobre el estrés oxidativo y la actividad proteolítica del intestino medio

Para evaluar la peroxidación lipídica y la actividad enzimática, los intestinos de las chinches de los experimentos de campo fueron tratados individualmente, tomándose como positivos aquellos que presentaban bacterias y negativos aquellos con ausencia de bacterias sin importar el tratamiento inicial.

Los resultados obtenidos confirman la tendencia observada en cautiverio. La peroxidación lipídica (TBARS) en intestinos infectados con bacterias en recuentos $<10^3$ UFC/mg fue significativamente mayor, que en aquellos libres de infección bacteriana ($p < 0,001$) (**Fig 33a**). La respuesta de la actividad proteolítica intestinal a la infección bacteriana mostró resultados contundentes. La actividad enzimática en los intestinos con bacterias estuvo fuertemente disminuida en un 78% ($p < 0,001$) (**Fig33b**). De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Sardoy PM, comunicación personal), la actividad enzimática aumenta luego de cada ingestas del alimento y disminuye paulatinamente. Es posible que la baja actividad enzimática observada en los intestinos de las chinches infectadas con bacterias se deba a la falta de alimentación. Estos resultados concuerdan con la relación que se encontró entre el índice de infección y el bajo peso final de las chinches.

EFEECTO DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y LA ACTIVIDAD CISTEIN PROTEASAS DE LAS NINFAS TRAS 30 DÍAS DE ENSAYO

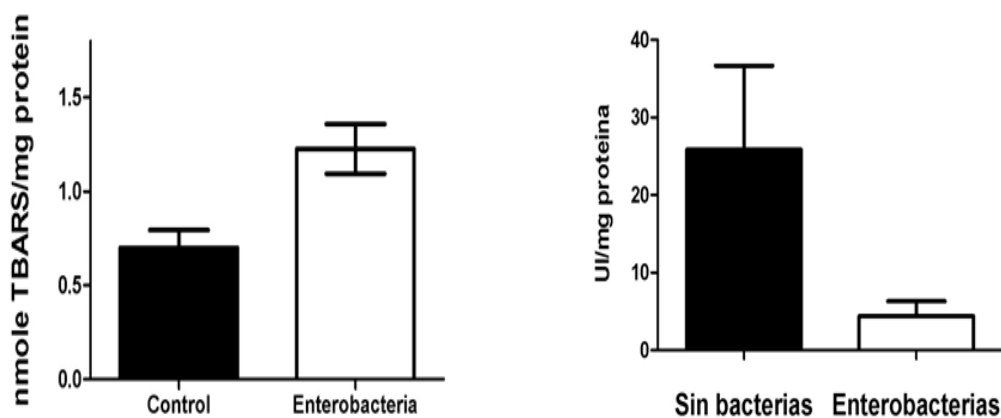


Fig 33. Peroxidación lipídica (a) y actividad cistein proteasa total (b) en el intestino de chinches tras 30 días de ensayo en plantas de *Glycine max* var Williams. Los intestinos fueron evaluados según presentaran o no bacterias en cultivo en placa de agar Tripteina de Soja en una dilución 10^3 UFC/mg de intestino.

Es interesante observar que si bien las ninfas del control fueron depositadas en soja cultivada a campo tras un tratamiento con antibióticos, una parte de estas se infectó con alguna bacteria en el transcurso del experimento, probablemente a partir de la planta hospedero. Por otro lado, aquellas chinches que habían sido infectadas con *Yokenella* sp NvU02 antes de ser colocadas en las plantas lograron deshacerse de la bacteria, alcanzando niveles de infección del 50% (Tabla 14). Esto sugiere que la comunidad microbiana de la chinche verde es dinámica, y que el insecto podría estar infectándose y eliminando las bacterias gracias a un fuerte sistema inmune o a la presencia de compuestos antimicrobianos en la dieta, como la genisteina de la soja

135,136

A partir de los resultados obtenidos se proponen tres hipótesis sobre la interacción de *Yokenella* sp NvU02 con la chinche verde:

1. La función biológica del *Yokenella* es dependiente de la dieta: de acuerdo a los resultados presentados, la bacteria podría tener un efecto positivo/negativo para el

hospedero dependiente del valor nutricional de la dieta. La chinche presenta una batería de enzimas proteolíticas y mecanismos de evasión de defensas que le permiten alimentarse de soja, que tiene un alto valor proteico y lipídico, sin la presencia de bacterias en el intestino. Por lo tanto, las bacterias no cumplen ninguna función benéfica y su mantenimiento se transforma en un costo energético para el insecto. Esto cambia cuando la chinche se alimenta de dietas menos nutritivas, en las que se encuentra limitada la disponibilidad de nitrógeno y ácidos grasos (hospederos secundarios). La presencia de *Yokenella* en el intestino podría, en estos casos, ser beneficioso para el hospedero.

2. La funcionalidad de *Yokenella* no está relacionada con la nutrición: teniendo en cuenta que los resultados presentados aquí demuestran que la presencia de bacterias en las ninfas afectan su desarrollo cuando éstas se alimentan de soja y que esto es posiblemente debido a un costo energético elevado, es importante analizar a futuro, la relación que tienen estas bacterias con un aumento en la tolerancia a los cambios en la temperatura, evasión de predadores, mayor tolerancia a la inanición durante el período de diapausa, entre otras posibilidades. Así, el gasto energético de mantenimiento de la bacteria se vería compensado por un beneficio frente a otros factores.

3. La presencia de *Yokenella* es negativa para el insecto: la bacteria tomada del ambiente infecta a la chinche cuando esta se alimenta. La baja frecuencia de *Yokenella* observada a campo sería un indicador de que la bacteria no permite a la chinche una mejora en su rendimiento.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis ecológico de la relación de N. viridula y su comunidad microbiana intestinal

1. Incidencia del paisaje sobre la comunidad microbiana de la chinche verde

Durante los años 2012-2014 se realizaron 24 colectas de adultos de *Nezara viridula* con el objetivo de caracterizar las comunidades microbianas habitantes en el intestino de los insectos. Las colectas se realizaron en 14 sitios de producción de soja en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fé (Fig34). Entre 4 y 10 individuos adultos fueron colectados a mano de cultivos de soja (9 colectas), de hospederos secundarios (6 colectas) o de corteza de Eucalyptus (9 colectas).

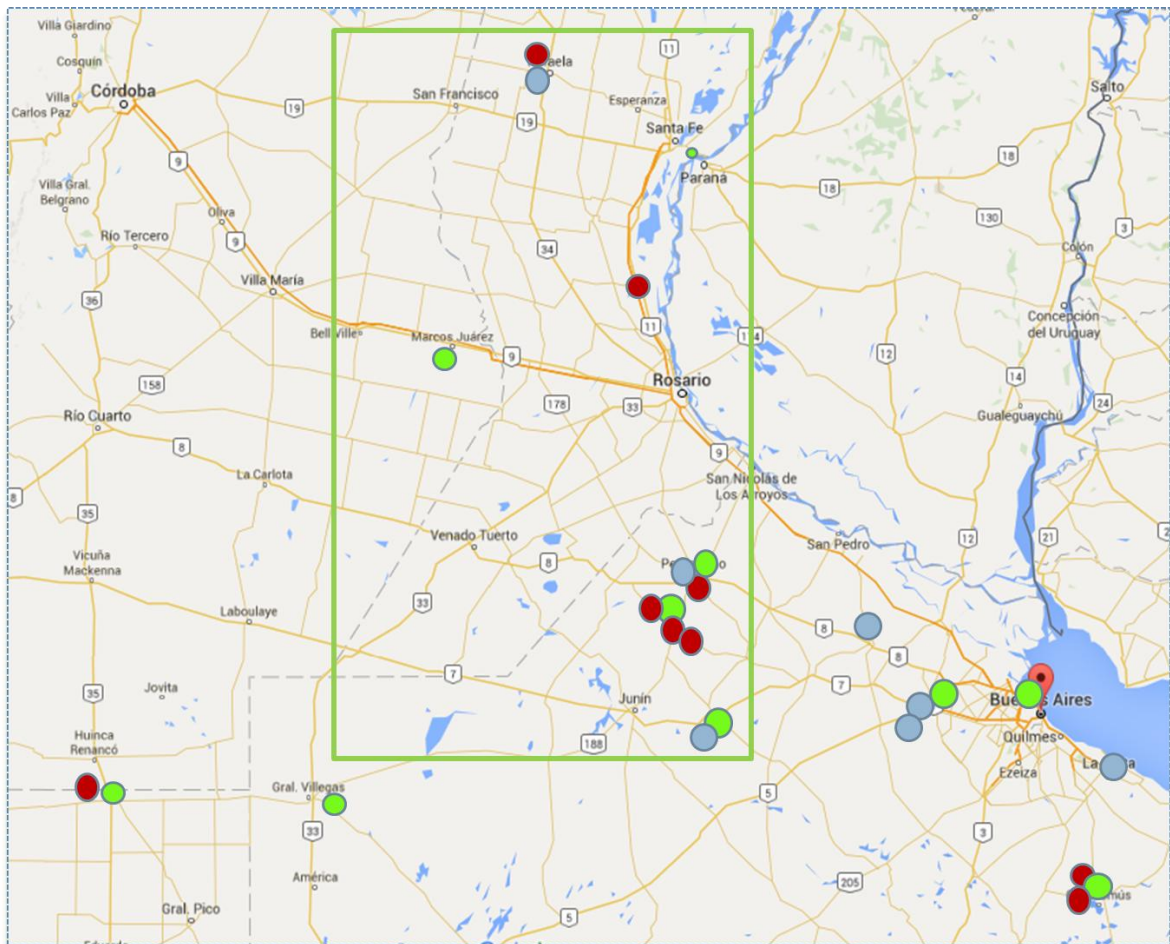


Fig 34. Mapa de las 24 colectas realizadas entre los años 2012-2014. Se eligió un diagrama de colectas aleatorio. Los círculos de colores indican si las chinches fueron colectadas de soja (verde) hospederos secundarios (azul) o diapausa (rojo). El recuadro verde indica las colectas realizadas en áreas de alta intensificación de la agricultura.

La Tabla 15 resume las comunidades microbianas encontradas en los intestinos de las chinches en cada colecta. En general, la diversidad de bacterias fue baja y con valores de riqueza de entre 0 y 5. A su vez, las especies estuvieron restringidas a tres filos principales: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacillaceae*. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Colman, Toolson and Takacs-Vesbach (2012), donde se confirma que los intestinos de los insectos tienden a estar dominados por un solo tipo de bacterias, siendo el filotipo más abundante representado en promedio un por un 54,7% dentro de la comunidad.

Los perfiles ARISA de las comunidades bacterianas (ADN total del intestino) fueron comparados con los de cultivos puros de bacterias aisladas (ADN bacteriano). Esto permitió identificar patrones de fragmentos de espacios intergénicos (ITS) para cada uno de los géneros bacterianos, y además determinar la presencia de bacterias no cultivables (Anexo 1). Así, *Yokenella* sp mostró un perfil de tres picos de 626, 710, 780 pb; *Enterococcus* sp fragmentos de 502 y 602 pb; *Pantoea* fragmentos de 651, 667 y 858 pb y *Cedecea* sp fragmentos de 659 y 815 pb. Sólo los fragmentos ITS de 748 y 756 pb no pudieron corresponderse con ninguna bacteria aislada. La secuenciación del fragmento de 748 pb confirmó que este fragmento era origen bacteriano (Anexo 2). Estos resultados indican que este fragmento ITS se corresponde con el simbionte obligado emparentado con *Erwinia* identificado por secuenciación de 16S ARNr y que no pudo ser cultivado en las condiciones de trabajo utilizadas en esta tesis.

Los resultados muestran que del grupo de Enterobacterias, *Yokenella* sp y *Enterococcus* fueron las bacterias más frecuentes en los intestinos de las chinches. *Yokenella* sp fue aislada en 10 colectas correspondientes a 4 sitios, mientras que *Pantoea* sp en 2 colectas de 2 sitios y *Cedecea* en 1 colecta/sitio. Además, *Enterococcus* sp fue aislado de 5 colectas correspondientes a 3 sitios. Por su parte, el simbionte obligado fue observado en todas las muestras de las colectas realizadas. Los recuentos de colonias en placas de Petri en medio TSA tuvieron valores de entre 10^3

Y 10^6 UFC/mg intestino para las enterobacterias y recuentos de entre 100 y 10^6 UFC/ mg de intestino para los enterococos. Es interesante observar que en los tres casos en los que *Yokenella* sp y *Enterococcus* sp se encontraron cohabitando el intestino (colectas H, M y W), *Enterococcus* presentó recuentos más altos que *Yokenella*, por ejemplo 2×10^6 contra 6×10^5 UFC/mg respectivamente. A su vez, *Yokenella* sp se encontró en recuentos del orden de 10^6 UFC/mg cuando no estaba acompañada por *Enterococcus* sp (colectas A, O, P, U, R y PA). Esto podría deberse a una competencia entre estos grupos, en la que *Enterococcus* sp. controlaría el desarrollo de *Yokenella* sp. La relación entre estos géneros no fue analizada durante el desarrollo de esta tesis.

También se observó una flora bacteriana con recuentos inferiores a 100 UFC/mg en las placas de cultivo, correspondiente a otros géneros de bacterias. Se obtuvieron seis aislados de *Bacillus* sp, seis de *Micrococcus* sp, dos de *Streptomyces* sp y dos de *Staphylococcus* sp. A partir de estos resultados, la flora presente fue dividida en dos grupos según su abundancia. Una flora con una abundancia alta, con un recuento de entre 100 y 10^6 UFC/mg de intestino, con cepas pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*; y una flora transitoria, con recuentos menores a 100 UFC/mg de intestino, en su mayoría *Bacillus*, *Micrococcus* y actinobacterias. Estas últimas no fueron observadas en chinches en diapausa y tampoco fueron recuperadas de chinches en cautiverio, por lo que se cree que no tienen la capacidad de colonizar el intestino o de reproducirse a una tasa mayor al de eliminación del contenido intestinal. Un análisis que comprendió la frecuencia y la abundancia de cada especie bacteriana en relación al hospedero del insecto permitió establecer si la dieta afecta a la composición de la comunidad microbiana del intestino de la chinche verde.

2. El consumo de soja aumenta la riqueza y abundancia de las enterobacterias y los enterococos en el intestino medio de la Chinche verde.

Con el objetivo de identificar la relación entre la dieta y la composición de la comunidad microbiana del intestino de la Chinche verde, se analizó la frecuencia de aparición y la abundancia relativa de los grupos bacterianos enterobacterias, enterococos y flora transitoria de cada colecta, siendo la variable discriminante el hospedero en el que encontró al insecto (**Fig35**).

La frecuencia de las Enterobacterias aumentó en los intestinos de las chinches alimentadas de Soja, con respecto a aquellas que se alimentaban sobre hospederos secundarios (HS), y aumentó a su vez en Diapausa (**Fig35a**). Es interesante notar que la flora transitoria estuvo ausente durante la diapausa (chinches colectadas debajo de las cortezas de los árboles). Por último, la mayor proporción de colectas en las que no se detectó ningún grupo de bacterias fue en soja, en detrimento de la flora transitoria. Esto podría deberse a una disminución de la flora endo- y epifita a la que se enfrenta el insecto en este cultivo, en comparación a la diversidad encontrada en los hospederos secundarios. En las chinches colectadas de soja se encontró una mayor riqueza de Enterobacterias, y estuvieron presentes *Yokenella sp*, *Cedecea sp*, *Pantoea sp* (**Fig35a**). La flora transitoria disminuyó su diversidad y frecuencia, ya que sólo se encontraron *Bacillus sp* y *Micrococcus sp*. Cuando las chinches se encontraban en diapausa invernal, sólo se observaron enterobacterias y enterococos en recuentos bacterianos altos $>10^4$ UFC/mg. Luego, se realizó un análisis de la abundancia relativa de cada género con el objetivo de jerarquizar la importancia biológica de cada género bacteriano (**Fig 35b**). La abundancia relativa se calculó como la proporción de UFC/mg de cada género de bacterias identificado sobre el total de las colonias contadas.

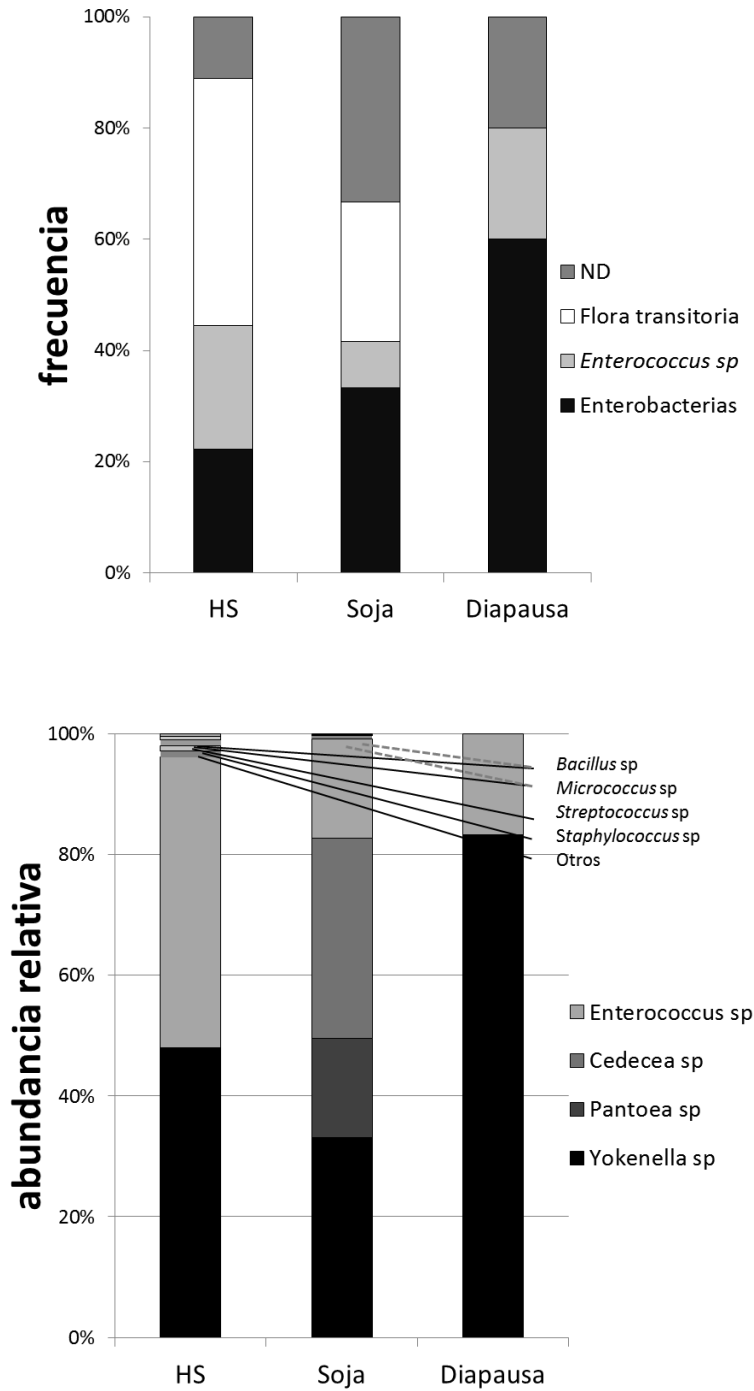


Fig 35 (a) Frecuencia en la presencia de bacterias por colecta teniendo en cuenta el hospedero en el que se encontraban los insectos. Al menos una chinche presentó bacterias en los ventrículos V1-V3. Para los casos (ND) el intestino medio no se detectó ninguna bacteria en las chinches muestreadas en esa colecta. **(b)** Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en las comunidad microbianas del intestino de la chinche verde asociadas a distintos hospederos. Hospederos secundarios (HS), soja y diapausa.

Para el caso de hospederos alternativos, la abundancia de las Enterobacterias es muy alta pero la frecuencia es baja, comparado con la flora transitoria que se comporta de manera inversa. Los insectos encontrados en HS infectados con Enterobacterias fueron colectados en los meses de septiembre y octubre (Colecta 1 y 2 – **Tabla 1**). Por lo tanto, podrían ser adultos emergidos de la diapausa. Para próximos estudios, es importante tener en cuenta que las enterobacterias y *Enterococcus* sp, tienen la capacidad de mantenerse en el intestino durante el invierno y que la inclusión de estos especímenes en el análisis puede estar enmascarando diferencias mayores en el efecto de la dieta sobre el moldeado de la comunidad microbiana.

3. Probabilidad de encontrar Enterobacterias y/o Enterococos en los sitios de colecta: análisis discriminante

Con el objetivo de identificar el efecto del sitio de colecta sobre la presencia/ausencia de los géneros más frecuentes: *Yokenella* y *Enterococcus*, se realizó un análisis discriminante en el que se incluyeron las variables discriminantes indicadas en la **Tabla 1** (Materiales y Métodos). Las variables categóricas Hospedero y Sitio se transformaron en cuantitativas para poder incluirlas dentro del análisis. Para *Hospedero* se utilizó el día del año de la colecta (día juliano) tomando como día 1 el 1ero de enero, y sin tener en cuenta el año de la colecta. Para *Sitio*, se usaron las coordenadas como variables cuantitativas: “latitud” y “longitud”. La variable “superficie sembrada de soja” se tomó como un índice de la agriculturización y se expresa como la relación entre la superficie sembrada de soja y la superficie total del departamento donde se ubica el sitio de colecta. Las variables clasificatorias fueron: presencia de *Yokenella* y/o *Enterococcus* sp, o ausencia de ambas.

La prueba de igualdad de las medias indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los centroides de los tres grupos y que es posible aplicar un análisis discriminante (λ Wilks; $p < 0.05$). A partir de los autovalores de expresión $\text{inv}(E)H$, se puede concluir que el eje canónico 1 explica el 97,17% de la variación entre grupos. Las variables “Superficie sembrada de soja” y “Latitud” son las más importantes para la discriminación entre grupos indicando que a mayor superficie de soja y a menores latitudes (hacia el norte) hay más probabilidades de encontrar *Yokenella* y/o *Enterococcus* (Fig. 36).

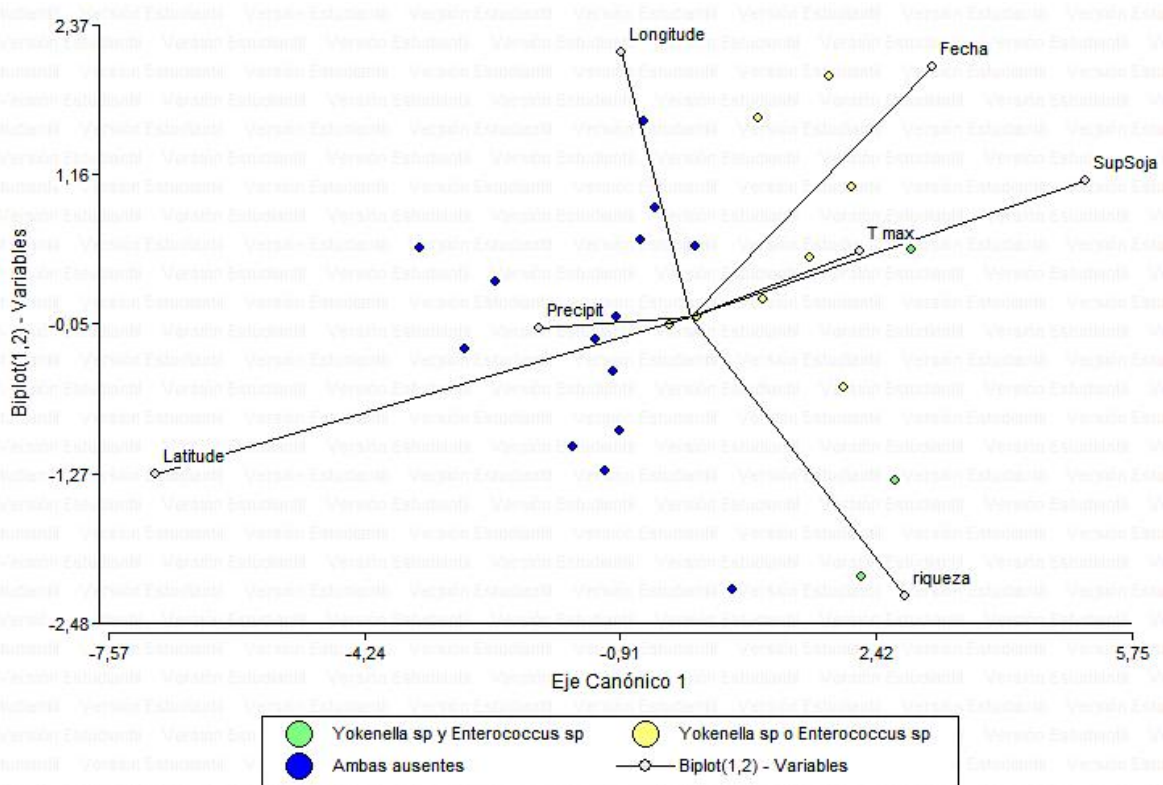


Fig36 .Análisis discriminante de los sitios de colecta para analizar el efecto de las variables discriminantes sobre la distribución de los géneros *Yokenella* y *Enterococcus* sp en el territorio muestreado. λ Wilks: $p=0.0285$. (Círculo verde) Presencia de *Yokenella* y *Enterococcus*; (Círculo amarillo) Presencia de *Yokenella* o *Enterococcus* (Círculo azul) Ausencia de estas bacterias. Las variables discriminantes utilizadas fueron: Latitud y Longitud: indicador del Sitio de colecta, Fecha: indicador del hospedero (HS, Soja o Diapausa), SupSoja: superficie sembrada de soja/superficie total del departamento (índice de agriculturización); Tmax: Temperatura máxima media el día de la colecta; Precipit: mm de lluvias en los últimos 30 días previos a la colecta; Riqueza: número total de especies identificadas en la colecta.

El efecto del índice de superficie sembrada de soja, indicador de la intensificación de la agricultura, se explica si se tiene en cuenta que la chinche verde es un insecto polifitófago. La pérdida de la biodiversidad de hospederos con la consecuente eliminación de competencia entre bacterias, consumo de compuestos antimicrobianos, etc; podrían estar influyendo sobre la homogenización de la flora microbiana. A continuación se presenta otro análisis de contingencia para desentrañar aún más el efecto de la agriculturización sobre la ocurrencia de enterobacterias y *Enterococcus* en la chinche verde.

4. La intensificación de la agricultura y su efecto en la probabilidad de encontrar chinches infectadas en el v1-v3.

Con el objetivo de identificar el efecto de la intensificación de la agricultura sobre la probabilidad de encontrar bacterias en el intestino de *N. viridula*, se realizó una prueba de independencia entre la presencia de bacterias aisladas y dos niveles agriculturización: alta y media, o baja. El criterio utilizado en este trabajo se basó en la información proporcionada por el SIIA (Sistema Integrado de Información Agrícola). Definimos una zona de alta intensificación de la agricultura cuando la superficie sembrada de soja iguala o supera el 50% del territorio departamental, mientras que una agriculturización media o baja se da en aquellos departamentos en los que la superficie sembrada es menor al 50%. Para las muestras positivas, los intestinos presentaban un recuento mayor a 10^3 UFC/mg en ATS y las bacterias que colonizaban el intestino también fueron detectadas por la técnica ARISA. El análisis de los datos se realizó sobre una tabla de contingencia de doble entrada en el que se identificaron los casos en los que la proporción de intestinos con bacterias era menor al 30%; 31-60%; o mayor a 61% de los insectos analizados.

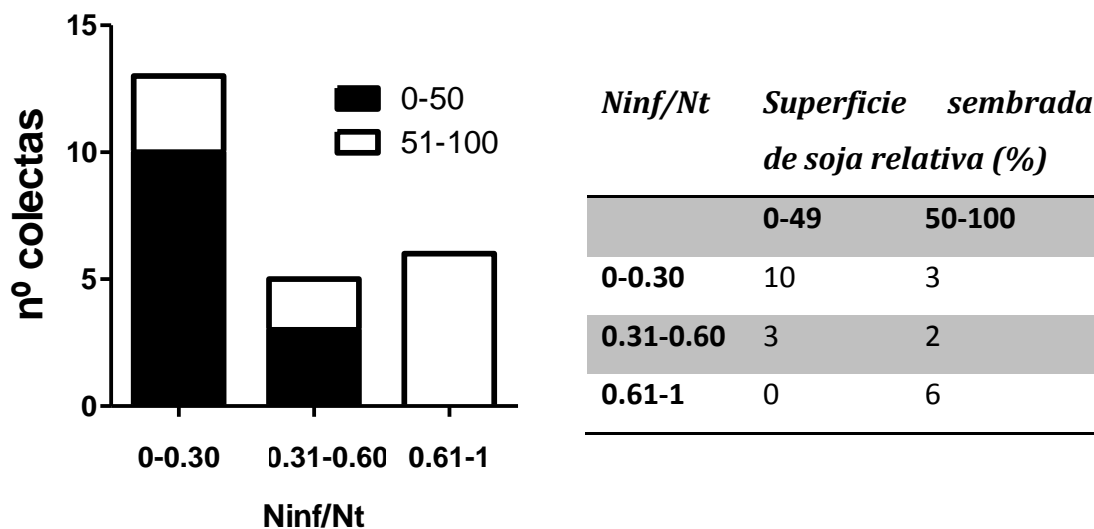


Fig 37. Distribución de las colectas según proporción de individuos infectados (*Ninf/Nt*) con Enterobacterias o Enterococos, teniendo en cuenta la superficie sembrada de soja en el departamento ($p=0.0072$).

El análisis indica que las variables son dependientes ($p<0.01$), y que hubo una menor proporción de chinches infectadas en zonas con intensificación de la agricultura media o baja, mientras que las chinches con niveles de infección de más del 61% se ubican únicamente en territorios con un índice de agriculturización alto (50-100%) (**Fig 37**). Estos resultados sugieren que un aumento en el índice de agriculturización promueve la infección de las chinches, lo cual podría ser el resultado de:

- Una mayor exposición del insecto a un sistema de cultivo maíz-soja que ha generado una flora microbiana estable de ecto- y endófitos en la planta y el suelo ^{22,138,139}.
- El cambio en la calidad de la dieta, ya que la soja es un mejor sustrato para la Enterobacterias ⁴⁹.

- Presión selectiva, en la que los insectos sometidos a una dieta con una diversidad de hospederos reducida, tienen más probabilidades de sobrevivir cuando presentan ciertas bacterias en el intestino medio ^{18,62,64-66}
-

CONCLUSION

El estudio de las interacciones entre los cultivos y los insectos plaga es de suma importancia a nivel mundial, ya que permite la generación de herramientas tecnológicas para lograr una producción agrícola sustentable sin perder rentabilidad. La soja es el principal cultivo de Argentina y el complejo de chinches es unas de sus principales plagas de este cultivo, frente a la que no se tienen tecnologías alternativas a los pesticidas químicos. Los insectos plaga han logrado desarrollar mecanismos para tolerar las defensas de las plantas y, en algunos casos esta tolerancia se ha debido a la presencia de ciertas bacterias intestinales. A pesar de la importancia de la chinche verde como plaga de soja, se conoce muy poco sobre la su flora microbiana intestinal, y las consecuencias de la presencia de estas bacterias sobre la biología de la chinche verde. En esta tesis decidí analizar la relación bacteria-chinche verde-soja, con el objetivo de estudiar el papel de las bacterias en el intestino de la chinche verde en la interacción planta-insecto. Para ello fue necesario caracterizar la comunidad microbiana del insecto en zonas productoras de soja y poner a prueba su funcionalidad *in vitro* e *in vivo*. Los aportes de esta tesis al conocimiento sobre el sistema bacteria-chinche verde-soja se detallan a continuación.

Sobre la caracterización de la flor microbiana del intestino de la chinche verde en zonas productoras de soja se concluye que:

- Lo ventrículos (V2-V3) donde se produce la digestión de la dieta pueden presentar bacterias con una variabilidad en la riqueza de entre 0 y 5 especies. La frecuencia en la presencia de bacterias en el intestino medio es baja, por lo que cualquier relación simbiótica bacteria-insecto es facultativa.
- Las bacterias presentes en el intestino presentan una mayor abundancia relativa de enterobacterias y enterococos, y una menor abundancia relativa de una flora transitoria conformada actinobacterias, bacilos y otros firmicutes. La flora transitoria es más diversa cuando los insectos se alimentan de hospederos secundarios, y

además, estas bacterias no tienen la capacidad de permanecer en el intestino durante la diapausa invernal.

- Las bacterias aisladas de intestinos de chinche verde durante esta tesis (*Yokenella* sp. y *Enterococcus* sp.) se encuentran estrechamente emparentadas con las aisladas en Brasil.
- También en Argentina, se confirma la presencia de un simbiote alojado en la cloaca (V4) de la chinche verde y filogenéticamente emparentado con *Erwinia*.
- Los microorganismos de estos géneros (*Yokenella* y *Enterococcus*) fueron encontrados con mayor frecuencia en intestinos de chinches colectadas a campo, y la probabilidad de encontrar estos géneros en la chinche verde aumenta con el índice de agriculturización.

Sobre la funcionalidad *in vitro* de las bacterias aisladas del intestino medio V2-V3 de la chinche verde se concluye que:

- Las enterobacterias no tienen la capacidad de degradar los componentes de la dieta más importantes: proteínas de reserva y sacarosa. Sólo algunas cepas pudieron degradar lípidos. Los enterococos no pueden degradar proteínas ni lípidos, aunque sí degradaron sacarosa. De todas maneras, el proceso fermentativo reduce el poder inhibitorio de la harina de soja frente a la cistein proteasa Papaína, *in vitro*.

Sobre la interacción bacteria intestinal-chinche verde en cautiverio se concluye que:

- El índice de infección de los ventrículos V2-V3 de las ninfas de 1er estadio en cautiverio es baja, lo que indica una transferencia ineficiente de estos simbioses desde la madre hacia la descendencia.
- *Yokenella* sp. NvU02 afecta negativamente el desarrollo de las ninfas en 2do estadio generando un alto índice de mortalidad en cautiverio.

- Las ninfas de 4to estadio también son afectadas por *Yokenella* sp NvU02 pero su tolerancia a la infección bacteriana es mayor que en estadio más jóvenes.
- Los adultos infectados con *Yokenella* sp NvU02 no se ven afectados en su supervivencia, ni se ven alterados los índices de peroxidación lipídica o actividad proteolítica intestinal. Enterobacterias y enterococos tienen una alta capacidad infectiva en cautiverio debido probablemente a una transmisión horizontal fecal-oral que no se corresponde las condiciones del insecto en ambientes naturales.
- La ausencia del simbiote ubicado en la cloaca (v4) no afecta la supervivencia, ni el desarrollo de las ninfas que se alimentan de soja en cautiverio.
 - Sobre la interacción bacteria intestinal-chinche verde en plantas de soja se concluye que:
 - Las bacterias tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de las chinches cuando se alimentan de plantas de soja, ya que disminuyen la actividad proteolítica del intestino y aumentan la peroxidación lipídica, disminuyendo el peso final alcanzado por las ninfas en 5to estadio.
 - La supervivencia de las ninfas infectadas con *Yokenella* sp. NvU02 sólo se ve afectada en los estadios más jóvenes. En estadios mayores, la supervivencia entre chinches infectadas y no infectadas es similar. La tolerancia a la infección bacteriana observada en cautiverio también se observa en plantas de soja.
 - Cuando la chinche verde infectada con *Yokenella* sp NvU02 se alimenta sobre plantas de soja a campo, el insecto puede eliminar estas bacterias del intestino.

Conclusión general

Los resultados de esta tesis demuestran que las bacterias encontradas en el intestino de la chinche verde en zonas productoras de soja de Argentina, no tienen un efecto positivo sobre los insectos que facilite su alimentación de la soja. Contrariamente a lo esperado, las bacterias mostraron efectos negativos sobre las chinches, disminuyendo su supervivencia, crecimiento y desarrollo. Tanto en cautiverio como en plantas de soja, los estadios ninfales jóvenes son más susceptibles a la infección bacteriana, mientras que los estadios más avanzados (adultos) toleran la infección y la presencia de bacterias en el intestino medio. La presencia de bacterias en el intestino de las chinches está relacionada con la diversidad de hospederos y el índice de agriculturización, por lo tanto las bacterias deben tenerse en cuenta cuando se estudia la interacción entre la chinche verde y la soja.

Los futuros estudios deberían focalizarse en:

- Identificar si estas bacterias están cumpliendo una función no-nutricional que permite una mayor probabilidad de supervivencia o de apareamiento y reproducción en zonas de producción agrícola, o si forman parte del grupo de factores que están disminuyendo la población de la chinche verde a nivel regional¹⁴⁰, funcionando como controladores biológicos.
- Evaluar la incidencia de metabolitos secundarios de la soja como la genisteína y el ácido ascórbico sobre la dinámica de la comunidad microbiana del intestino medio durante los distintos estadios de la chinche.
- Analizar la respuesta del sistema inmunológico de las ninfas de chinche verde frente a la invasión de patógenos y la activación del sistema inmunológico a través de bacterias no patógenas (*priming*).

BIBLIOGRAFIA

1. Muñoz, R. *Informe Quincenal Mercado de Granos. N° 435/2015*. (2015).
2. Fernandes, M. E. S. *et al.* Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* **156**, 45–55 (2016).
3. Mengoni Goñalons, C. & Farina, W. M. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
4. Balbuena, M. S. *et al.* Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* **218**, 2799–2805 (2015).
5. Camargo, C. Ecological Risks of the Conventional Insecticide / Fungicide Seed Treatment Mixture of Thiamethoxam and Mefenoxam in Soybean on Beneficial Insects. (2016).
6. Silva, G. V. *et al.* No impact of Bt soybean that express Cry1Ac protein on biological traits of *Euschistus heros* (Hemiptera , Pentatomidae) and its egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera , Platygasteridae). *Rev. Bras. Entomol.* **58**, 285–290 (2014).
7. Gamundi, J. C. & Sosa, M. A. Caracterización de daños de chinches en soja y criterios para la toma de decisiones de manejo. *Chinches fitófagas en soja. Revisión y Av. en el Estud. su Ecol. y manejo* 1–19 (2007).
8. Giacometti, R. *et al.* Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack. *Pest Manag. Sci.* **72**, 1585–94 (2016).
9. Piubelli, G. C., Hoffmann-Campo, C. B., De Arruda, I. C., Franchini, J. C. & Lara, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. *J. Chem. Ecol.* **29**, 1223–1233 (2003).
10. Zavala, J. A., Giri, A. P., Jongsma, M. A. & Baldwin, I. T. Digestive duet: midgut digestive proteinases of *Manduca sexta* ingesting *Nicotiana attenuata* with manipulated trypsin proteinase inhibitor expression. *PLoS One* **3**, e2008 (2008).
11. Lomate, P. R. & Bonning, B. C. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Sci. Rep.* **6**, 27587 (2016).
12. Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M.-C. & Michaud, D. Plant cystatins. *Biochimie* **92**, 1657–1666 (2010).
13. Samac, D. A. & Smigocki, A. C. Expression of Oryzacystatin I and II in Alfalfa Increases Resistance to the Root-Lesion Nematode. **93**, (2003).

14. Cloutier, C., Jean, C., Fournier, Yelle & Michaud. Adult Colorado Potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* Compensate for Nutritional Stress on Oryzacystatin-Transgenic Potato Plants by Hypertrophic Behavior and Over-Production of Insensitive Proteases. doi:10.1002/1520-6327(200006)44:2<69::AID-ARCH2>3.0.CO;2-6
15. Rahbé, Y. *et al.* Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Sci.* **164**, 441–450 (2003).
16. Liang, C., Brookhart, G., Feng, G., Reek, G. & Kramer, K. Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS* **278**, 139–142 (1991).
17. Hines, M. E., Osuala, C. I. & Nielsen, S. S. Isolation and Partial Characterization of a Soybean Cystatin Cysteine Proteinase Inhibitor of Coleopteran Digestive Proteolytic Activity. *J. Agric. Food Chem* **39**, 1515–1520 (1991).
18. Chu, C.-C., Spencer, J. L., Curzi, M. J., Zavala, J. A. & Seufferheld, M. J. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11917–22 (2013).
19. Todd, J. W. Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* **34**, 273–292 (1989).
20. Musolin, D. L. Surviving winter: diapause syndrome in the southern green stink bug *Nezara viridula* in the laboratory, in the field, and under climate change conditions. *Physiol. Entomol.* **37**, 309–322 (2012).
21. Panizzi, A. R. FORUM Suboptimal Nutrition and Feeding Behavior of Hemipterans on Less Preferred Plant Food Sources. *An. Soc. Entomol. Bras. Março An. Soc. Entomol. Bras.* **29**, 1–12 (2000).
22. Bredow, C., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., Mangolin, C. A. & Rhoden, S. A. In silico analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria, isolated from the aerial parts and seeds of important agricultural crops. *Genet. Mol. Res.* **14**, 9703–9721 (2015).
23. Corrêa-Ferreira, B. S. & De Azevedo, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agric. For. Entomol.* **4**, 145–150 (2002).
24. Panizzi, A. R. & Meneguim, A. M. Performance of nymphal and adult *Nezara viridula* on selected alternate host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **50**, 215–223 (1989).
25. McPherson, J. E. & McPherson, R. M. *Stink Bugs of Economic Importance in America North of Mexico.* (2000).

26. Panizzi, A. R. WILD HOSTS OF PENTATOMIDS: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops. *Annu. Rev. Entomol* **42**, 99–122 (1997).
27. Dillon, R. & Dillon, V. T HE G UT B ACTERIA OF I NSECTS: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 71–92 (2004). doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123416
28. Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 699 LP-735 (2013).
29. Sugio, A., Dubreuil, G., Giron, D. & Simon, J.-C. Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *J. Exp. Bot.* (2014). doi:10.1093/jxb/eru435
30. Ceja-Navarro, J. A. *et al.* Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nat. Commun.* **6**, 7618 (2015).
31. Baumann, P. BIOLOGY OF BACTERIOCYTE-ASSOCIATED ENDOSYMBIONTS OF PLANT SAP-SUCKING INSECTS. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 155–189 (2005).
32. Nakabachi, A. *et al.* Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, Buchnera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5477–5482 (2005).
33. Ohbayashi, T. *et al.* Insect’s intestinal organ for symbiont sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5179-88 (2015).
34. Zientz, E., Dandekar, T. & Gross, R. Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 745–770 (2004).
35. Wu, D. *et al.* Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* **4**, e188 (2006).
36. Prado, S. S., Golden, M., Follett, P. A., Daugherty, M. P. & Almeida, R. P. P. Demography of Gut Symbiotic and Aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* **38**, 103–109 (2009).
37. Fukatsu, T. & Hosokawa, T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 389–396 (2002).
38. Hirose, E., Panizzi, A. R., De Souza, J. T., Cattelan, A. J. & Aldrich, J. R. Bacteria in the Gut of Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **99**, 91–95 (2006).

39. Kwong, W. K. & Moran, N. A. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 374–384 (2016).
40. Hammer, T. J., McMillan, W. O. & Fierer, N. Metamorphosis of a Butterfly-Associated Bacterial Community. *PLoS One* **9**, e86995 (2014).
41. Chung, S. H. *et al.* Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15728–33 (2013).
42. von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T. & McManus, W. R. Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. *Nature* **412**, 433–6 (2001).
43. Matsuura, Y. *et al.* Huge symbiotic organs in giant scale insects of the genus *Drosicha* (Coccoidea: Monophlebidae) harbor flavobacterial and enterobacterial endosymbionts. *Zoolog. Sci.* **26**, 448–456 (2009).
44. Lehane, M. J. PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. *Annu. Rev. Entomol.* **42**, 525–550 (1997).
45. Shao, L., Devenport, M. & Jacobs-Lorena, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **47**, 119–25 (2001).
46. Sandoval-Mojica, A. F. & Scharf, M. E. Silencing gut genes associated with the peritrophic matrix of *Reticulitermes flavipes* (Blattodea: Rhinotermitidae) increases susceptibility to termiticides. *Insect Mol. Biol.* (2016). doi:10.1111/imb.12259
47. Shibata, T. *et al.* Crosslinking of a Peritrophic Matrix Protein Protects Gut Epithelia from Bacterial Exotoxins. *PLoS Pathog.* **11**, e1005244 (2015).
48. Geib, S. M. *et al.* Microbial community profiling to investigate transmission of bacteria between life stages of the wood-boring beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Microb. Ecol.* **58**, 199–211 (2009).
49. Lundgren, J. G. & Lehman, R. M. Bacterial Gut Symbionts Contribute to Seed Digestion in an Omnivorous Beetle. *PLoS One* **5**, (2010).
50. Wang, H., Jin, L. & Zhang, H. Comparison of the diversity of the bacterial communities in the intestinal tract of adult *Bactrocera dorsalis* from three different populations. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1390–1401 (2011).
51. Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T. & Bhatnagar, R. K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* **9**, 1–22 (2009).

52. Yun, J.-H. *et al.* Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5254–5264 (2014).
53. Colman, D. R., Toolson, E. C. & Takacs-Vesbach, C. D. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* **21**, 5124–5137 (2012).
54. Andongma, A. A. *et al.* Pyrosequencing reveals a shift in symbiotic bacteria populations across life stages of *Bactrocera dorsalis*. *Sci. Rep.* **5**, 9470 (2015).
55. Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C. & Kaltenpoth, M. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Mol. Ecol.* **21**, 6134–6151 (2012).
56. Pasti, M. B., Pometto, A. L. 3rd, Nuti, M. P. & Crawford, D. L. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2213–2218 (1990).
57. Schäfer, A. *et al.* Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 471–478 (1996).
58. Kuhnigk, T. & König, H. Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. *J. Basic Microbiol.* **37**, 205–211 (1997).
59. Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M. & Singh, R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 394–400 (2011).
60. Yang, H., Schmitt-Wagner, D., Stingl, U. & Brune, A. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environ. Microbiol.* **7**, 916–932 (2005).
61. Thongaram, T. *et al.* Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. *Extremophiles* **9**, 229–238 (2005).
62. Russell, R. J. *et al.* The evolution of new enzyme function: Lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evol. Appl.* **4**, 225–248 (2011).
63. Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M. & Fukatsu, T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol.* **4**, 1841–1851 (2006).
64. Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M. & Fukatsu, T. Obligate symbiont involved in

- pest status of host insect. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **274**, 1979–1984 (2007).
65. Kikuchi, Y. *et al.* Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8618–22 (2012).
 66. Kikuchi, Y., Hosokawa, T. & Fukatsu, T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: A stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4308–4316 (2007).
 67. Depieri, R. & Panizzi, A. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* **40**, 197–203 (2011).
 68. Colebatch, G., East, P. & Cooper, P. Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 415–423 (2001).
 69. Mochizuki, A. Characteristics of digestive proteases in the gut of some insect orders. *Appl. Entomol. Zool.* **33**, 401–407 (1998).
 70. Prado, S. S., Rubinoff, D. & Almeida, R. P. P. Vertical Transmission of a Pentatomid Caeca-Associated Symbiont. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **99**, 577–585 (2006).
 71. Tada, A. *et al.* Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl. Entomol. Zool.* **46**, 483–488 (2011).
 72. Nocker, A., Burr, M. & Camper, A. K. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microb. Ecol.* **54**, 276–289 (2007).
 73. Popa, R. *et al.* Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* **78**, 111–118 (2009).
 74. Shah, N., Tang, H., Doak, T. G. & Ye, Y. COMPARING BACTERIAL COMMUNITIES INFERRED FROM 16S rRNA GENE SEQUENCING AND SHOTGUN METAGENOMICS. *Pac. Symp. Biocomput.* 165–176 (2011). doi:10.1142/9789814335058
 75. Handelsman, J. & Handelsman, J. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004).
 76. Allen, E. E. & Banfield, J. F. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 489–98 (2005).
 77. Shi, Y., Tyson, G. W., Eppley, J. M. & DeLong, E. F. Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean.

ISME J. **5**, 999–1013 (2011).

78. Fisher, M. M. & Triplett, E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4630–4636 (1999).
79. Kent, A. D. & Bayne, Z. L. Degraded water quality influences microbial community composition and perception of health risks in the Chattooga River. *DNA Cell Biol.* **29**, 509–517 (2010).
80. Kent, A. D. *et al.* Annual Patterns in Bacterioplankton Community Variability in a Humic Lake. *Microb. Ecol.* **48**, 550–560 (2004).
81. Thakuria, D., Schmidt, O., Liliensiek, A. K., Egan, D. & Doohan, F. M. Field preservation and DNA extraction methods for intestinal microbial diversity analysis in earthworms. *J. Microbiol. Methods* **76**, 226–233 (2009).
82. Jones, S. E., Shade, A. L., McMahon, K. D. & Kent, A. D. Comparison of primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of aquatic bacterial communities: An ecological perspective. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 659–662 (2007).
83. Gr??nvold, A. M. R. *et al.* Fecal microbiota of calves in the clinical setting: Effect of penicillin treatment. *Vet. Microbiol.* **153**, 354–360 (2011).
84. Slabbert, E., Van Heerden, C. J. & Jacobs, K. Optimisation of automated ribosomal intergenic spacer analysis for the estimation of microbial diversity in fynbos soil. *S. Afr. J. Sci.* **106**, 8–11 (2010).
85. Pontes, M. H. & Dale, C. Culture and manipulation of insect facultative symbionts. *Trends Microbiol.* **14**, 406–412 (2006).
86. Ceraul, S. M. *et al.* A kunitz protease inhibitor from dermacentor variabilis, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits rickettsia montanensis invasion. *Infect. Immun.* **79**, 321–329 (2011).
87. Gerhardt, P. *Methods for General and Molecular Bacteriology.* (ASM Press, 1994).
88. Kouker, G. & Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 211–213 (1987).
89. Lehman, R. M., Lundgren, J. G. & Petzke, L. M. Bacterial Communities Associated with the Digestive Tract of the Predatory Ground Beetle, *Poecilus chalcites*, and Their Modification by Laboratory Rearing and Antibiotic Treatment. *Microb. Ecol.* **57**, 349–358 (2009).

90. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013).
91. Kimura, M. Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: Studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 522–526 (1980).
92. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–25 (1987).
93. Bizzini, A. *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 693–696 (2011).
94. Zavala, J. A., Casteel, C. L., Delucia, E. H. & Berenbaum, M. R. Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5129–33 (2008).
95. Curzi, J., Zavala, J. A., Spencer, J. L. & Seufferheld, M. J. Abnormally high digestive enzyme activity and gene expression explain the contemporary evolution of a *Diabrotica* biotype able to feed on soybeans. 2005–2017 (2012). doi:10.1002/ece3.331
96. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
97. CLSI. *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.* (2014).
98. Seljeskog, E., Hervig, T. & Mansoor, M. A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin. Biochem.* **39**, 947–954 (2006).
99. Gastell, P. L. P. *et al.* Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real. Acad. Farm* **67**, 1–17 (2001).
100. Nicholls, C. I. & Altieri, M. A. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **33**, 257–274 (2013).
101. Bergey, D. & Holt, J. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* (2000).
102. Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M. & Handelsman, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl Env. Microbiol* **70**, (2004).

103. Hickman-Brenner, F. W., Huntley-Carter, G. P., Fanning, G. R., Brenner, D. J. & Farmer, J. J. 3rd. *Koserella trabulsii*, a new genus and species of Enterobacteriaceae formerly known as Enteric Group 45. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 39–42 (1985).
104. Kosako, Y., Sakazaki, R. & Yoshizaki, E. *Yokenella regensburgei* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family Enterobacteriaceae. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **37**, 117–124 (1984).
105. Walterson, A. M. & Stavriniades, J. <div xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">Pantoea</div> insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae</div> *FEMS Microbiol. Rev.* (2015).
106. Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A. & Girolami, V. 'Candidatus *Erwinia dacicola*', a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2005). doi:10.1099/ijs.0.63653-0
107. Stock, I., Sherwood, K. J. & Wiedemann, B. Antimicrobial susceptibility patterns, beta-lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**, 5–15 (2004).
108. Abbott, S. L. & Janda, J. M. Isolation of *Yokenella regensburgei* ('*Koserella trabulsii*') from a patient with transient bacteremia and from a patient with a septic knee. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2854–2855 (1994).
109. Lo, Y.-C., Chuang, Y.-W. & Lin, Y.-H. *Yokenella regensburgei* in an immunocompromised host: a case report and review of the literature. *Infection* **39**, 485–488 (2011).
110. Stock, I., Sherwood, K. J. & Wiedemann, B. Antimicrobial susceptibility patterns, β -lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**, 5–15 (2004).
111. Jain, S. *et al.* *Yokenella regensburgei* infection in India mimicking enteric fever. *J. Med. Microbiol.* **62**, 935–939 (2013).
112. Fajardo Olivares, M., Blanco Palenciano, J., Márquez Laffón, I. & Ruiz León, J. M. [*Yokenella regensburgei* infection in a perimalleolar ulcer]. *Med. Clin. (Barc).* **125**, 358–359 (2005).
113. Oliveira, S. M. P. de *et al.* Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Diptera: Psychodidae) feeding on blood meal and saccharose plus blood meal. *Cad. Saude Publica* **17**, 229–232 (2001).
114. Liu, Y., Li, M., Liu, J. & Zheng, J. Study on the intestinal bacteria in *L. migratoria manilensis*. *Eur. PMC Plus* 34–36,39 (2007).

115. Liu, Y., YE, B., GAO, Q. & ZHENG, J. Study on the intestinal bacteria of *Eupolyphaga sinensis* Walker. *Chinese J. Microecol.* **19**, 158 (2007).
116. Ngamau, C. N., Matiru, V. N., Tani, A. & Muthuri, C. W. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African J. Microbiol. Res.* **6**, 6414–6422 (2012).
117. Min Kuo, T., Lowell, C. A. & Smith, P. T. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Sci.* **125**, 1–11 (1997).
118. MacFaddin, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. (Ed. Médica Panamericana, 2003).
119. Díaz, I. Fitocistatinas : Función Biologica Y Aplicaciones Biotecnológicas. *BioJournal* 1–11 (2006).
120. Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. & Levine, A. The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell Online* **11**, 431–443 (1999).
121. Miernyk, J. A. & Johnston, M. L. Proteomic analysis of the testa from developing soybean seeds. *J. Proteomics* **89**, 265–272 (2013).
122. Zavala, J. a & Baldwin, I. T. Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecol.* **4**, 11 (2004).
123. Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Villa-Tanaca, L. & Hernandez-Rodriguez, C. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.* **58**, 879–891 (2009).
124. Ayayee, P. *et al.* Gut microbes contribute to nitrogen provisioning in a wood-feeding cerambycid. *Environ. Entomol.* **43**, 903–12 (2014).
125. De Vries, E. J., Jacobs, G., Sabelis, M. W., Menken, S. B. J. & Breeuwer, J. A. J. Diet-Dependent Effects of Gut Bacteria on Their Insect Host: The Symbiosis of *Erwinia* sp. and Western Flower Thrips THE ROYAL SOCIETY Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp. and western flower thrips. *Source Proc. Biol. Sci.* **271**, 2171–2178 (2004).
126. Hochberg, M. E., Gomulkiewicz, R., Holt, R. D. & Thompson, J. N. Weak sinks could cradle mutualistic symbioses - strong sources should harbor parasitic symbioses. *J Evol Biol* **13**, 213–222 (2000).
127. Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E. & Sabree, Z. L. Distinctive gut microbiota of

- honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
128. Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M. & Freitak, D. Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Front. Zool.* **11**, 23 (2014).
 129. Ishii, K., Adachi, T., Hara, T., Hamamoto, H. & Sekimizu, K. Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* **117**, 61–67 (2014).
 130. Lee, D. J., Lee, J. B., Jang, H. A., Ferrandon, D. & Lee, B. L. An antimicrobial protein of the *Riptortus pedestris* salivary gland was cleaved by a virulence factor of *Serratia marcescens*. *Dev. Comp. Immunol.* (2016). doi:10.1016/j.dci.2016.08.009
 131. Hirose, E., Panizzi, A. R. & Cattelan, A. J. Potential Use of Antibiotic to Improve Performance of Laboratory-Reared *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* **35**, 279–281 (2006).
 132. Pinheiro, E. T. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int. Endod. J.* **37**, 756–763 (2004).
 133. Bassler, B. L. & Miller, M. B. in *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology* (eds. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F.) 495–509 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-30123-0_60
 134. Broderick, N. A., Welchman, D. P. & Lemaitre, B. in *Insect Infection and Immunity* 13–33 (2009).
 135. Hong, H., Landauer, M. R., Foriska, M. A. & Ledney, G. D. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *J. Basic Microbiol.* **46**, 329–335 (2006).
 136. Albert Dhayakaran, R. P., Neethirajan, S., Xue, J. & Shi, J. Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 859–865 (2015).
 137. Colman, D. R., Toolson, E. C. & Takacs-Vesbach, C. D. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* **21**, 5124–5137 (2012).
 138. Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A. & Azevedo, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* **273**, 91–99 (2005).
 139. Navarro-Noya, Y. E. *et al.* Relative impacts of tillage, residue management and crop-

rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* **65**, 86–95 (2013).

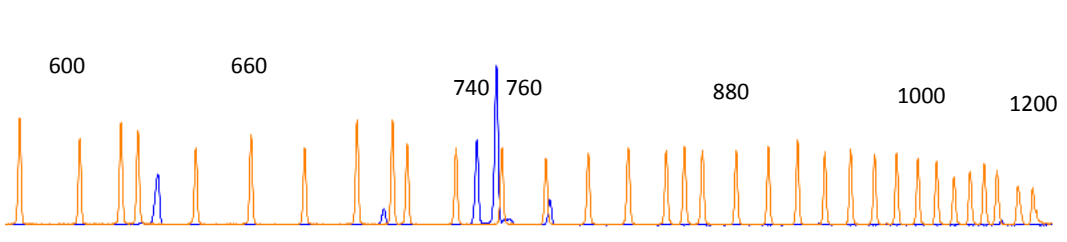
140. Panizzi, A. R. & Lucini, T. What Happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible Reasons to Explain Populations Decline. *Neotrop. Entomol.* 1–10 (2016). doi:10.1007/s13744-016-0446-2

ANEXOS

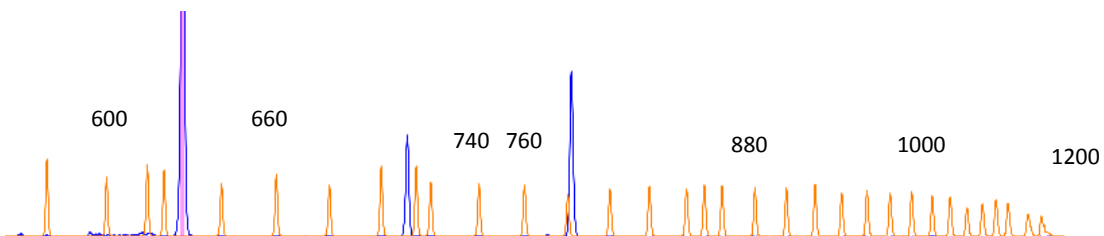
Anexo 1: Perfiles de las comunidades microbianas obtenidos de ADN total del intestino de la chinche verde por la técnica ARISA y de las bacterias aisladas asociadas

a. Perfil ARISA obtenido para la colecta U: Carabelas

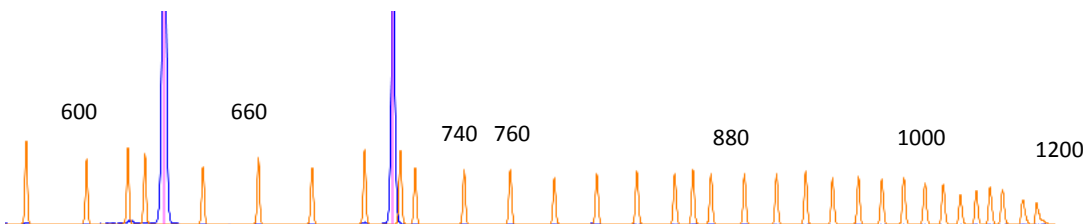
De esta colecta se aislaron dos cepas de *Yokenella* sp NvU01 y NvU02 con morfología de colonia diferentes. Los números sobre los picos indican los tamaños de los fragmentos del patrón de pesos moleculares GSLIZ1200 (naranja) en pares de bases. Los picos azules pertenecen a los fragmentos ITS bacterianos marcados con 6-FAM en el extremo 5´.



Perfil de *Yokenella* sp NvU01

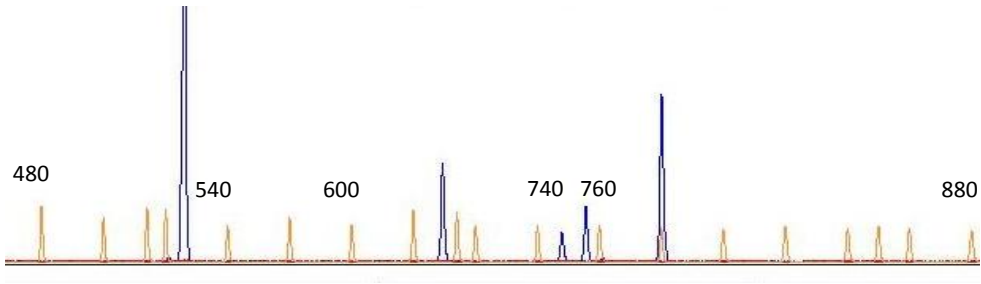


Perfil de *Yokenella* sp NvU02

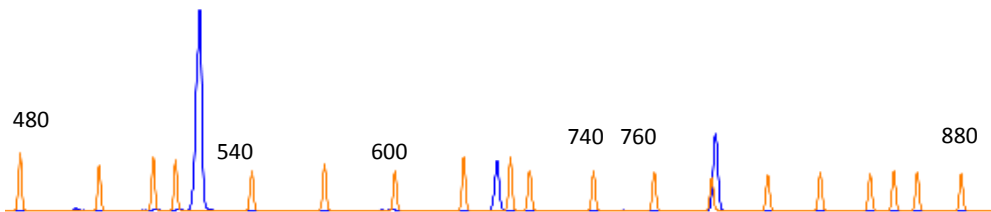


b. Perfil ARISA obtenido para la colecta PII: Pila

De esta colecta se aisló *Pantoea* sp NvP02

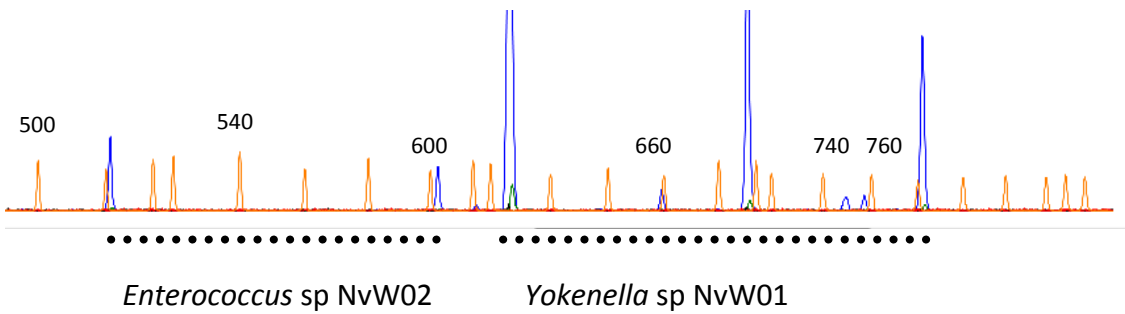


Perfil de *Pantoea* Nv P02



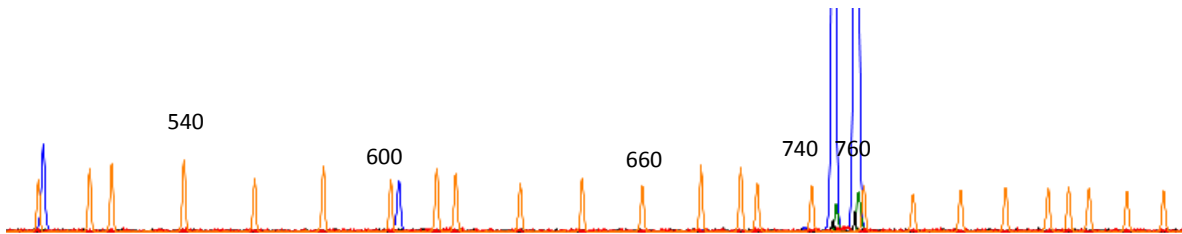
a. Perfil ARISA obtenido para la colecta W: Pincen

De esta colecta se aislaron las bacterias *Yokenella* sp. NvW01 y *Enterococcus* sp NvW02

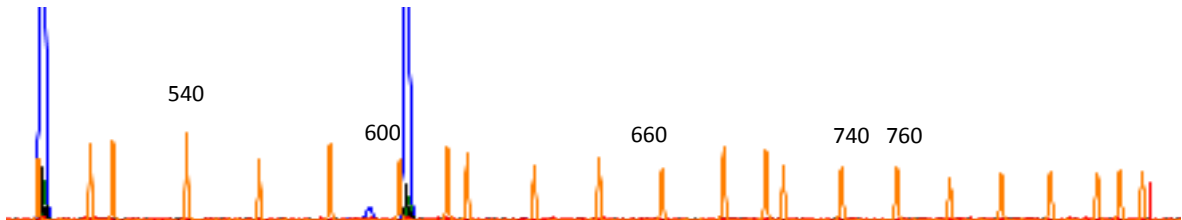


b. Perfil ARISA obtenido para la colecta S: San Antonio de Areco

De esta colecta se aisló el *Enterococcus* sp NvS01

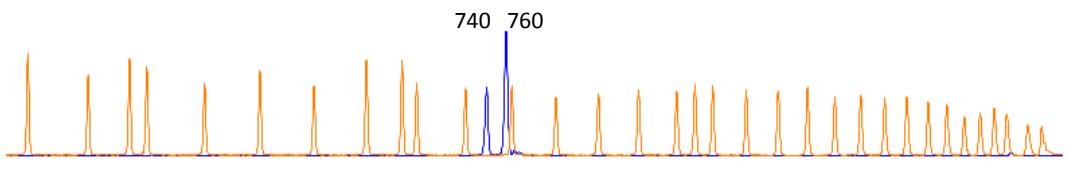


Perfil de *Enterococcus* sp NvS01



c. Perfil ARISA obtenido para las colectas en las que no se observó crecimiento bacteriano en un orden mayor a 10^3 UFC/mg intestino

Solo se observa el doble pico del simbiote. La secuenciación de uno de los fragmentos confirma su origen bacteriano. Teniendo en cuenta que se lo observa siempre, es un buen marcador de eficiencia en la extracción total del ADN intestinal de la chinche verde.



ANEXO 2: Secuencia del espaciador intergénico (ITS) del simbiote obligado alojado en la cloaca (V4)

Fragmento de 756pb obtenido de la amplificación, clonación y secuenciación del fragmentos ITS de la bacteria presente en la cloaca V4 del intestino de la chinche verde. Las secuencias subrayadas que flanquean al ITS (negrita) corresponden a los genes 23S ARNr y 16S ARNr, respectivamente.

TGGGTTGCCCATTCGGACACCGCCGGTTATAACGGTTCATATCACCTTACCGGCGTTTTTCGCAG
ATTAGCACGTCCTTCATTGCCTCTGACTACCAAGGCATCCACCGGTACGCTTAATCACTAACCTT
ACAACCC

ACAGACGTCTTATCCACGTGTTCTCACGGCCATTAAGATATGTGCGATGATGCCTGACAGCAT
CTGTATCTTCATATCTTCTATGAAGTCAAGAAAAGACAAATATCCATAACATACCCTTAGGGAT
ATTATGAAATATTTATTAACATCAATGTTAAAGTCGATAATGGTGGAGCTAAGCGGGATCGAA
CCGCTGACCTCCTGCGTGCAAGGCAGGCGCTCTCCAGCTGAGCTATAGCCCCAATAGGCTGCAT
AAGCAAATTATCAGGCTTAATACAACATAAGAAAGAATTTGGTAGGCCTGAGTGGACTTGAACC
ACCGACCTCACCTTATCAGGGGTGCGCTCTAACCACCTGAGCTACAAGCCTGCCGGGATATGCG
TCACGACTTCACAGCCATCTTGTTACTTTTT

TATCAGACAATTTGTGTGAGCACTTCGAAGACAGCATTCTATAACAGAATAAGGAGGTGATCCAA
CCGCAGGTTCCCCTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGC
GCCCTCCAAAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGCAAA

*Anexo 3: Protocolo de extracción y cuantificación de Inhibidores de cistein proteasas en una suspensión de harina de soja fermentada*⁹⁴

A. Reactivos:

- Buffer MES 100 ml: Na₃PO₄ 0,1M, KCl 0,3M, EDTA 0,1M. Ajustar a pH 6,5 y guardar refrigerado y al abrigo de la luz.
- Papaina (10ml): 0.003g de Papaina (Biopack) disuelta en 10 ml de H₂O destilada.
- Sustrato cromogénico (5 ml): disolver 0.001g de p-Gu-Phe-Leu-pNa en 1,5 ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Anedra). Agregar 3,5 ml de buffer MES y reservar en hielo y al abrigo de la luz.

B. Metodología

Obtención del extracto de inhibidores de prteasas (IP's)

1. Tomar una alícuota de 1ml de suspensión de harina de soja fermentada o sin fermentar y colocarla en un tubo de 1,5 ml.
2. Centrifugar los tubos durante 20 minutos a 12000xg y a 4°C.
3. Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo (extracto de inhibidores de proteasas)

Preparación del ensayo

En microplaca de 96 pocillos, a cada pocillo:

1. Agregar 150µl de buffer MES con multipipeta.
2. Agregar 30µl de mezcla de Papaina.
3. Agregar 10µl de muestra de extracto de PI (por triplicado) y agregar controles sin PI.
4. Incubar 10 minutos a 37°C.
5. Agregar 20µl de mezcla de sustrato.
6. Iniciar inmediatamente una cinética enzimática con un espectrofotómetro de microplacas durante 10 minutos a 37°C, 410nm.

Anexo 4: Protocolo de medición por HPLC de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) en el intestino de la chinche verde, Nezara viridula.

A. Fundamento: Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por receptores endógenos pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta dificultoso determinar la magnitud de dicha peroxidación. Es, sin embargo, más accesible determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA). Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría⁹⁹.

B. Preparación de la muestra:

- Diseccionar el individuo y extraer el intestino completamente sin perder contenido.
- Colocar en tubos tipo eppendorf de 1,5ml y pesar.
- Agrega PBS en relación 1:3 intestino-buffer.
- Homogeniza con potter de plástico.
- Se obtienen entre 100-150µl.
- Cinco µl se reservan para medir proteínas totales.

C. Reactivos:

- Ácido perclórico (PCA) 0,1125 N
- Ácido Tiobarbiturico (TBA) 40 mM → 576 mg TBA en 80 mL de agua, calentar en baño a 55°C por 45 min., enfriar a temperatura ambiente y completar a volumen (100 mL) con agua.
- Buffer fosfato monobásico de potasio KH₂PO₄ 50 mM a pH:6,8 (con KOH): 1 Litro: 6.8045 gr.
- Acido Tricloroacético (TCA) 20%

- 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TEP) (Sigma) 10 uM en metanol.
Diluciones para la curva en agua: 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,62 – 0,31 uM

D. Reacción:

1. En Eppendorf agregar 50 µl de muestra (o blanco de PBS)
2. Agregar 150 µl de PCA
3. Agregar 150 µl de TBA.
4. Vortex 10 segundos
5. Calentar a 97°C por 60 min en plancha calefactora
6. Llevar a freezer -20°C por 20 min.
7. Agregar 300 uL de metanol .
8. Agregar 100 µl de TCA.
9. Centrifugar a 13000xg por 6 min.
10. Tomar 100µl y colocar en viales para HPLC.

Curva de calibración: La curva de calibración se realiza a partir del reactivo 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TEP) (Sigma) . Diluciones para la curva en agua: 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,62 – 0,31 uM. La hidrólisis de TEP produce cantidades estequiométricas de MDA. Si las diluciones se calientan a 50°C por 60 min y luego se duran 1 semana

E. Condiciones de la corrida cromatografía (HPLC):

- Inyección: 10 µl
- Flujo: 0,8 mL/min.
- Detector: fluorescencia λ_{ex} 525 nm; λ_{em} 560 nm
- Fase móvil: 72:17:11 KH₂PO₄:MeOH:ACN (todo en la misma botella).
- Tiempo de corrida: 8 min. (7 min + 1 min post run)

F. BIBLIOGRAFÍA:

- Seljeskog, Esben; Herving, T; Monsoor, M.A. 2006. *A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit.* Clinical Biochemistry 39, 947-954.
- Gastell PLP, De Alejo JLP, Martín, M C; Estepa, V; Rodenas S *et al.* Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal Real Acad Farm* 2001;**67**:1–17.

Anexo 5: Reacciones involucradas en el sistema de Galerias API® 20E (Biomerieux) y reacciones complementarias

API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de las *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos.

1. ONPG: Prueba rápida, utilizada para diferenciar los microorganismos fermentadores lentos de lactosa, de los no fermentadores.
2. ADH: Arginina dihidrolasa: transforma la arginina en ornitina, amonio y dióxido de carbono.
3. LDC: Lisina descarboxilasa: Descarboxila la lisina para formar cadaverina.
4. OCD: Ornitina descarboxilasa: Descarboxila la ornitina para formar putrescina.
5. Citrato: capacidad de usarlo como única fuente de carbono.
(en las reacciones ADH, LDC, ODC y Citrato se libera amonio que alcaliniza el medio)
6. H₂S: evalúa la producción de sulfídrico a partir de tiosulfato.
7. Urea: determina la presencia de la enzima ureasa con desprendimiento de amonio.
8. TDA: Triptofano deaminasa: desaminación del triptófano
9. IND: Producción de Indol a partir de triptófano. Se evidencia con el agregado de Reactivo de Kovacs
10. VP: Prueba de Vogues Proskauer de producción de acetoína.
11. GEL: Gelatina. Se evalúa la actividad gelatinasa

Luego, nueve reacciones de oxidación fermentación de azúcares: glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa.

Soluciones utilizadas en esta tesis para la utilización de las galerías API® 20E y test complementarios

Reactivo de Kovaks

Utilizado en las reacciones de producción de indol y acetoína

Reactivo de Kovaks	p-dimetilaminobenzaldehido	1g
	Alcohol amílico o butílico	80 ml
	Acido clorhídrico puro	20ml

- Disolver el p-dimetilaminobenzaldehido en alcohol amílico
- Añadir el ácido clorhídrico
- Conservar en frasco ámbar en la heladera
- Nota: el reactivo debe tener un color amarillo o marrón claro.

Método O-F, Oxido Fermentativa y de Movilidad de Hugh-Leifson

Medio Hugh- Leifson 1L	Peptona	2g
	Cloruro de sodio	5g
	Fosfato dipotásico	0.3g
	Azul de Bromotimol	0.03g
	Agar	3g
<i>Autoclava. . Luego agregar solución de glucosa esteril 10g/L. Ajustar pH 7,4</i>		

Procedimiento:

- Distribuir el medio estéril en tubos de hemolisis
- Inocular por picadura dos tubos por bacteria a ensayar. Uno de los tubos se sella con parafina.
- Observar tras 24 o 48hs.
- Un resultado positivo es el resultado del viraje de verde a amarillo producto de la oxidación (tubos abiertos) o la fermentación (tubos cerrados y abiertos) de la glucosa.

Prueba de reducción de los nitratos

Evalua la capacidad de las bacterias de reducir los nitratos a nitritos y estos a su vez a N_2 .

Caldo nitrato 1L	Extracto de carne	3g
	Peptona	5g
	Nitrato de potasio	1g
<i>Ajustar a pH 7. Autoclavar</i>		

- Inocular con cultivo de 18-24h
- Incubar a 35°C durante 24-48h
- Reducción de nitrato a nitrito: añadir al medio 1ml de a-naftol 0,5% en ácido acético 5N y 1 ml de solución de ácido sulfanilico en ácido acético 5N.
- Agitar bien. Esperar 30seg y observar.
- Resultado positivo: color rosado o rojo intenso.
- Resultado negativo: no hay cambio de color.

En caso de ser negativo:

- Agregar al tubo que ya tiene los reactivos, una pizca de zinc.
- Resultado positivo: Incoloro: el organismo redujo el nitrato a nitrito y luego a N_2
- Resultado negativo: Rosado o rojo intenso: el zinc reduce el nitrato a nitrito y se colorea el reactivo.

Medio API 50 CHL:

El medio API 50CHL fue preparado en el laboratorio según las indicaciones del folleto del producto. Este medio se utilizó para resuspender colonias puras de *Enterococcus* sp. e inocular la batería de pruebas bioquímica API 50CH.

Medio API 50 CHL	Polipeptona	10g
	Extracto de levadura	5g
	Tween 80	1ml
	Fosfato dipotásico	2g
	Acetato sódico	5g
	Citrato diamónico	2g
	Sulfato de magnesio	0,20g
	Sulfato de manganeso	0,05g
	Púrpura de bromocresol	0,17g
	Agua desmineralizada	1000 ml
	pH : 6,7-7,1	

Tinción de Gram⁸⁷

- 1) Sobre un portaobjetos se distribuyó una ansada de cultivo. En el caso de que el cultivo procediera de un medio sólido, el extendido se preparó distribuyendo la ansada de cultivo con unas gotas de agua. Se dejó secar el extendido a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a fijarlo por calor utilizando un mechero.
- 2) Se agregó una solución de cristal violeta o violeta de genciana y se esperó durante 1 min. Se enjuagó con agua y se escurrió el excedente.
- 3) Se agregó una solución de lugol (el mordiente) y se dejó durante 1 min. Se enjuagó con agua y se escurrió el excedente.
- 4) Se agregó una mezcla de alcohol: acetona (70:30 v/v) y se dejó durante 10 s. Se enjuagó con agua y se escurrió el excedente.
- 5) Se agregó una solución de safranina como colorante de contraste y se esperó durante 1 min. Se enjuagó con agua y se escurrió el excedente.
- 6) Se procedió a la observación del preparado con objetivo de 40x y posteriormente con objetivo de inmersión. Las bacterias gram negativas se observaron de color rosado-rojizo, en tanto las gram positivas se observaron color violeta.

Bibliografía: Gerhardt, P., et al., *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: ASM Press (Libro), 1994.

Anexo 7: Medios de cultivo generales y específicos

Tripteina de soja Caldo:

La tripteina de soja caldo de Britania Lab. fue el medio general utilizado en esta tesis . La tripteína y la peptona de soja aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja aporta carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos.

El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El fosfato dipotásico otorga capacidad buffer y la glucosa es la fuente de energía.

Medio Tripteina de Soja Caldo	Peptona de soja	17.0g
	Cloruro de sodio	3.0g
	Fosfato dipotásico	5.0g
	Glucosa	2.5g
	Agua	2.5g

Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

Agar leche 10%:

Este medio de cultivo permite evidenciar actividad proteolítica extracelular de la bacteria inoculada. Se utilizó la receta indicada para el medio Skim Milk Agar de Difco. La leche debe ser autoclavada por separado (10X) y debe mezclarse con el agar cuando ambos se encuentren por debajo de los 50°C. Las placas de cultivo se preparan en el momento para evitar recalentar el medio.

Medio Agar leche 10% (1000ml)	Triptona	5 g
	Extracto de Levadura	2,5 g
	Dextrosa	1.0 g
	Agar	15g
	Leche descremada en polvo (10X)	10.0 g

Medio Agar Aceite de Oliva – Rodamina B

Este medio permite evidenciar la actividad de lipasas extracelulares de las bacterias inoculadas. La receta que se utilizó fue obtenida de Kouker y Haeger (1987)

Medio Aceite de Oliva- Rodhamina B	Medio base	Peptona	4.5g
		Extracto de levadura	1.255 g
		Agar	10 g
		Agua destilada	450 ml
	Suspensión	Aceite de oliva	30ml
		Tween 80	250µl
		Agua	50ml

Ajustar a pH7. Autoclavar por separado. Con los medios templados, mezclar y agregar una solución filtrada de Rodhamina B 20mg/20ml (0,02% final)

Anexo 8: Buffers utilizados en este trabajo

Buffers fosfato salino

Buffer fosfato salino (PBS): se utilizó en toda la tesis para la obtención de los homogenatos intestinales y para lavar bacterias en los ensayos de infección. Se preparó siguiendo esta receta:

Buffer fosfato salino 0,1 M (PBS)	Na ₂ HPO ₄	1.18 g
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.223 g
	NaCl	8.5 g
	Agua destilada	1000ml
	<i>Autoclavar en volúmenes chicos y mantener en el freezer -20°C</i>	

Buffer TE 1X

Utilizado para preparar y correr geles de agarosa 1,5% por electroforesis horizontal

Buffer TE 1X	TRIS 5 mM	500 µl de solución de TRIS 5 M pH 7,6
	EDTA 5 mM	5 ml de solución de EDTA 0,5 M pH 8
	Agua destilada	c.s.p. 500 ml
	<i>Refrigerar</i>	

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo de tesis ha generado la siguiente producción científica:

Artículo de libro

Medina V, Sardoy PM, Pagano EA, Zavala JA: “Caracterización y función biológica de las comunidades bacterianas en el intestino de *Nezara Viridula*” - "Aportes de la Microbiología a la Producción de Cultivos" – Edición de la Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires – 2013

Presentaciones en Congresos y Jornadas

Medina V, Sardoy P, Soria M, Vay CA, Gutkind G, Pagano EA, Zavala JA: “Importancia de la soja sobre la flora bacteriana intestinal de la chinche verde” Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental CAMAYA. 25 al 27 de noviembre de 2015, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Poster.

Medina V, Sardoy PM, Pagano EA, Zavala JA: “Caracterización y función biológica de las comunidades bacterianas en el intestino de *Nezara Viridula*” - III Jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales INBA CONICET – FAUBA -6 y 7 de Junio de 2013. Comunicación oral.

Sardoy PM, **Medina V**, Palacios NO, Zavala JA: “Feeding behavior of *Nezara viridula*: a resistance mechanism against soybean protease inhibitors?” 2° Reunión de la Asociación Latinoamericana de Ecología Química (ALAEQ). Diciembre 2012, Huerta Grande, Argentina. Poster.

Medina V, Balestrasse K, Zavala JA: “Potential protection role against soybean protease inhibitors of *Nezara viridula* gut bacteria” en la XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular 29 de octubre al 1 de noviembre de 2012, Ciudad de Mendoza, Argentina. Poster

Pagano, E.A., Tejedor, M.D., **Medina, V.**, Crelier, A.M., Barneto, J.A., Wolosiuk, R.A.*, Zavala, J.A. “Redox Regulation of the response to herbivory in Soybean plants” en el Workshop: “Plant-microbe-insect interactions: from molecular mechanisms to ecological implications”. Universidad Internacional de Andalucía, España, del 24 al 26 de Septiembre de 2012. Comunicación oral.

Medina V, Sardoy PM, Pagano EA, Miyazaki SS, Zavala JA: “The impact of captivity conditions on gut microbial community associated with the southern green stinkbug (*Nezara viridula*)” en el VIII Congreso de Microbiología General – SAMIGE, Mar del Plata, Buenos Aires, 4 al 6 de julio de 2012. Comunicación oral

Medina V, Miyazaki SS, Zavala JA: “Comunidades microbianas asociadas al intestino de la chinche verde, *Nezara viridula*: biodiversidad y función biológica.” en III Jornada Científica Institucional del INBA – CONICET, Facultad de Agronomía – UBA, el 8 de junio de 2012. Comunicación oral.

Medina V, Sardoy PM, Barneto JA, Barriga LG, Pagano EA, Zavala JA: “Proteases inhibitors of *Glycine max* seeds decrease digestive enzyme activity of *Nezara viridula*” en la XLVI Reunión Anual - Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Potrero de los Funes, San Luis, 30 de octubre al 2 de noviembre de 2011. Poster