

JAMILE FERNANDA SILVA COSSOLIN

**MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES E DO INTESTINO MÉDIO
DE *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C836m
2019 Cossolin, Jamile Fernanda Silva, 1989-
Morfologia das glândulas salivares e do intestino médio de
Scaptocoris castanea Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae) /
Jamile Fernanda Silva Cossolin. – Viçosa, MG, 2019.
v, 66f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Percevejo (Inseto). 2. Glândulas salivares. 3. Intestino
médio. 4. Estruturas celulares. 5. Microscopia eletrônica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.


CDD 22 ed. 595.754


JAMILE FERNANDA SILVA COSSOLIN

MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES E DO INTESTINO MÉDIO
DE *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae)


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.


Carolina Gonçalves Santos


Conceição Aparecida dos Santos


Luciane Cristina de Oliveira Lisboa


Verônica Saraiva Fialho


José Eduardo Serrão
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador José Eduardo Serrão por todo suporte e orientação.

Gostaria de agradecer as agências de fomento CAPES e FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e pela oportunidade de fazer pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de crescimento profissional.

Agradeço a todos os meus professores.

Agradeço à Beth, secretária do programa por sua eficiência e competência.

Agradeço ao Monteiro pelo suporte técnico e pelos cafezinhos que nunca faltavam.

Agradeço aos MSc. José Carlos Gomes de Araújo, MSc Gabriel dos Santos Carvalho e Fabiano Gonçalves Schimmer pela ajuda nas coletas dos insetos nas lavouras de soja.

Agradeço à Dra. Lucia M. Vivan pela identificação dos insetos.

Agradeço à Dra. Luanda M. Santana, à Dra. Helen C. P. Santos e à Dra. Daniela S. M. Silva pela revisão crítica dos manuscritos.

Agradeço à equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise pelo suporte na pesquisa.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural pela convivência inesquecível

Agradeço à minha mãe e minhas duas irmãs.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	7
Histology, ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of burrower bug, <i>Scaptocoris castanea</i> (Hemiptera: Cydnidae).....	7
CAPÍTULO 2	34
Morfologia do intestino médio e seus simbiosites em <i>Scaptocoris castanea</i> Perty, 1830 (Insecta: Hemiptera: Cydnidae)	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

RESUMO

COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Morfologia das glândulas salivares e do intestino médio de *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão.

O percevejo castanho *Scaptocoris castanea* tem status praga de hábito subterrâneo sugador de raízes afetando a produtividade de diversas culturas, como soja, algodão e pastagem. Esta espécie causa amarelecimento das folhas e definhamento das plantas, podendo levar a morte. Sua população é de difícil controle e os estudos sobre esta espécie se limitam a formas de controle químico e levantamento de percevejos no perfil do solo. O objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia das glândulas salivares e intestino médio desta espécie, contribuindo para o conhecimento da biologia alimentar destes insetos. Este estudo descreveu a anatomia, histologia e ultraestrutura das glândulas salivares e intestino médio de *S. castanea* e sua microbiota intestinal. As glândulas salivares são formadas por um par de glândulas principais bilobadas com as porções anterior e posterior unidas por um ducto com a glândula acessória na região do hilo. A ultraestrutura mostrou que as glândulas principais e acessória são formadas por uma camada de células secretoras, com núcleo central com cromatina descondensada e grumos de cromatina condensada, muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. O epitélio da glândula acessória foi descrito pela primeira vez células basais que não alcançam o lúmen da glândula. O intestino médio de *S. castanea* apresenta cinco regiões (ventrículos), formadas por uma camada de células. A ultraestrutura mostrou células com microvilosidades apicais, citoplasma rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e esferocristais, sugerindo função na síntese de substâncias, absorção de nutrientes, transporte de água e a regulação da homeostase. A partir de análises metagenômicas, mostramos que as fêmeas apresentam um ventrículo cinco diferenciado contendo uma variedade de bactérias intracelulares caracterizando bacteriócitos, enquanto no macho, esta região foi menor e com ausência de bactérias. As bactérias mais abundantes foram gammaproteobactérias que fornecem aminoácidos essenciais e vitaminas para o hospedeiro. A morfologia das glândulas salivares e do intestino médio de *S. castanea*, descrita pela primeira vez na literatura, contribui com dados fundamentais para o conhecimento da biologia e da digestão desta importante praga agrícola.

ABSTRACT

COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Morphology of the salivary glands and midgut of *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae)**. Adviser: José Eduardo Serrão.

The burrower bug *Scaptocoris castanea* is a subterranean pest sucking roots of many crops, such as soybean, cotton and pasture. The massive attack can cause death to the plant. Since studies with this species are limited to chemical control and presence on soil profile, studies of the salivary glands and midgut morphology of this species contribute to the knowledge of the feeding biology of these insects. This study described the anatomy, histology and ultrastructure of the salivary glands and midgut of *S. castanea* and their intestinal microbiota. The salivary glands were formed by a pair of principal bilobed glands with the anterior and posterior portions showing a hilus where the excretory duct arises and duct of the tubular accessory gland opens. The principal and accessory glands were formed by a single layer of secretory cells, with a central nucleus rich in decondensed chromatin and some condensed chromatin clusters, many mitochondria and rough endoplasmic reticulum. In the accessory salivary gland epithelium occurred some basal cells that do not reach the gland lumen. The midgut of *S. castanea* had five regions (ventriculus), formed by a single layer of cells. The digestive cells had apical microvilli, cytoplasm rich in mitochondria, rough endoplasmic reticulum and spherocrystals, suggesting functions in the compounds synthesis, absorption, water transport and regulation of homeostasis. The ventriculus five is different in females with many intracellular bacteria characterizing bacteriocytes, while in the male, this region is poorly developed without intracellular bacteria. The most abundant bacteria in the bacteriocytes is gammaproteobacteria that provide essential amino acids and vitamins to the host. The morphology of the salivary glands and the midgut of *S. castanea*, is described by the first time and contributes with fundamental data of biology and digestion of this important agricultural pest.

INTRODUÇÃO

O percevejo *Scaptocoris castanea* (Perty, 1830), também conhecido como percevejo castanho é um inseto praga polífago que se alimenta de uma grande variedade de plantas hospedeiras como soja, algodão, milho, cana de açúcar e arroz (Silva et al. 2013). Também é observado a ocorrência desse inseto nas culturas do amendoim, fumo, feijão, pastagens, etc. (Sousa e Fernandes 2002). Esse organismo apresenta adaptações no corpo e nas pernas para a escavação (Becker 1967), possui todo o ciclo de vida subterrâneo e se alimentando da seiva das plantas pelas raízes.

O ciclo de vida de *S. castanea* compreende duas gerações por ano com período de ovo a adulto variando de 5 a 6 meses e a fase adulta dura em média cinco meses (Oliveira e Malaguido 2004). Nos meses chuvosos, de dezembro a março, os percevejos são encontrados nos estratos mais superficiais do solo (10 a 30 cm) (Silva et al. 2013) mas em períodos de seca podem chegar até a 1,20 m de profundidade (Oliveira e Malaguido 2004; Pessa et al. 2013). O ataque destes insetos é em reboleiras (focos de infestação) que podem variar de poucos metros até vários hectares (Oliveira e Malaguido 2004), causando descoloração e amarelamento das plantas, morte de touceiras e subdesenvolvimento das culturas (Oliveira et al. 2002; Picanço et al. 1999; Angelis 2002; Silva et al 2013). Ainda, os surtos de infestação podem ocorrer de forma descontínua ao longo dos anos (Angelis 2002; Oliveira e Malaguido 2004).

No Brasil estes percevejos foram relatados nos estados do Mato Grosso, Pará, Goiás, São Paulo, Minas Gerais (Oliveira e Malaguido 2004) e o controle dos percevejos castanho geralmente utilizado é químico (Angelis 2002) com inseticidas no sulco do plantio e rotação de culturas (Picanço et al. 1999), porém o hábito de vida subterrâneo torna o controle dificultado. Além disso este inseto possui dois mecanismos de defesa contra patógenos e outros insetos. O primeiro é a produção de um cheiro forte, produzido pelas glândulas metatorácicas e usado na defesa contra predadores (Roth 1961). O segundo é a estridulação, ruído resultado da fricção da veia estridulatória na asa posterior com o plecto estridulatório localizado no primeiro e segundo tergitos, e que tem a função de comunicação entre os indivíduos e que pode ter função defensiva (Cokl et al. 2006). Neste trabalho buscaremos compreender a morfologia das glândulas salivares e do intestino médio de *S. castanea*.

Os órgãos da digestão nos insetos compreendem as glândulas salivares e o tubo digestivo. O tubo digestivo é formado pelo intestino anterior, médio e posterior, sendo que apenas o intestino médio tem função de digestão (Chapman 2013). Nos Hemiptera o processo de digestão se inicia na planta com a liberação de enzimas digestivas pelas

glândulas salivares para posterior sucção do alimento pré-digerido. Este processo é conhecido por digestão extra-oral (Chapman 2013). As glândulas salivares dos percevejos são órgãos pares localizados no tórax. Os ductos são longos e se abrem para dois tipos de glândulas, as glândulas principais e as glândulas acessórias. As glândulas salivares principais geralmente são lobadas; dependendo da subordem podem ter dois, três, ou vários lobos enquanto que as glândulas salivares acessórias são um tubo fino e de fundo cego (Baptist 1941; Lacombe 1999). As glândulas salivares são formadas por um epitélio simples que se deita sobre uma lamina basal (Chapman 2013). Na ultraestrutura, é possível observar a membrana apical provida de microvilosidades e a membrana basal com dobras associadas com mitocôndrias e canais que se abrem para a hemocele. A célula possui núcleo central com cromatina descondensada e grumos de cromatina condensada, muitas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, caracterizando alta atividade metabólica (Azevedo et al. 2007; Martínez et al. 2014).

A principal função das glândulas salivares é a produção de saliva com alta atividade enzimática (Ambrose Maran 2000; Ghanin et al. 2001; Bell et al. 2005; Fialho et al. 2012), que permite que grandes polímeros de carboidratos, como pectina e celulose e proteínas sejam clivados em moléculas de tamanho menor para que sejam sugados para o intestino médio, local onde ocorre a digestão final.

Nos Heteroptera o intestino médio é formado por uma camada de células secretoras, rica em mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, ápice com microvilosidades e base com muitos canais abertos para a hemocele (Santos et al. 2017). Além de secretar enzimas digestivas, este órgão secreta a membrana perimicrovilar que tem a função de compartimentalizar a digestão e proteger contra patógenos (Terra et al 2006; Albuquerque-Cunha et al. 2009). O intestino nos insetos ainda pode abrigar microorganismos simbiotes com associações benéficas. A microbiota intestinal dos insetos é menos diversa do que encontrada para os mamíferos ou outros organismos vertebrados. No caso dos insetos que se alimentam a partir de dietas pobres em nutrientes ou difíceis de digerir, como os que se alimentam de madeira, sangue de vertebrados e seiva, geralmente mantêm relações com microrganismos simbiotes (Takeshita e Kikuchi 2017). Tais microrganismos produzem aminoácidos essenciais, vitaminas (Silva et al. 1995), sintetizam feromônios, protegem contra inimigos e podem atuar na detoxificação (Genta et al. 2006) ou afetar a fecundidade positivamente (Toh et al. 2006).

Esta tese investigou a morfologia e a ultraestrutura das glândulas salivares e intestino médio do percevejo *S. castanea* e caracterizou a microbiota intestinal desta espécie.. Mostramos que as glândulas salivares de *S. castanea* possuem organelas para

produção de enzimas digestivas além de células basais que não alcançam o lúmen, que foram registradas pela primeira vez em Heteroptera. Mostramos também que o intestino médio deste inseto é complexo, possui diversos compartimentos especializados na absorção de nutrientes e regulação da homeostase. Além disso descrevemos que somente nas fêmeas há um ventrículo especializado em abrigar uma variedade de bactérias simbiotes que podem auxiliar na produção de aminoácidos essenciais e vitaminas que possivelmente atuam no fitness reprodutivo das fêmeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque-Cunha JM, Gonzalez MS, Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Almeida JCA, Souza W, Nogueira NFS. 2009. Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Athropod Struct Dev* 38: 31-44.
- Ambrose DP, Maran PM; 2000. Polymorphic diversity in salivary and haemolymph proteins and digestive physiology of assassin bug *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Het.; Reduviidae). *J Appl Ent* 124: 315-317.
- Angelis S. 2002. Controle do percevejo castanho (*Scaptocoris castanea*, Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae) na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Dissertação de mestrado. Faculdade de ciências agronômicas da UNESP- Campus Botucatu.
- Azevedo DO, Zanuncio JC, Zanuncio Jr JS, Martins GF, Marques-Silva S, Sossai MF, Serrão JE. 2007. Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Braz Arch Biol Technol* 50: 469–477.
- Baptist BA. 1941. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Homoptera. *Q J Microsc Sci* 83: 91–139.
- Becker M. 1967. Estudos sobre a subfamília Scaptocorinae na região neotropical (Hemiptera: Cydnidae). *Arq zool* 15: 291-325.
- Bell HA, Down RD, Edwards JP, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. 2005. Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae); effect of proteinase inhibitors. *Eur J Entomol* 102: 139-145.
- Chapman RF. 2013. *The insects: Structure and function*. 5th edition. Cambridge University Press. New York.
- Cokl A, Nardi C, Bento, JMS, Hirose E, Panizzi AR. 2006. Transmission of stridulatory signals of the burrower bugs, *Scaptocoris castanea* and *Scaptocoris carvalhoi* (Heteroptera: Cydnidae) through the soil and soybean. *Physiol entomol* 31: 371-381.
- Ghanim M, Rosell RC, Campell LR, Czosnek H, Brown J, Ullman D. 2001. Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodae) B type. *J Morphol* 248: 22-40.
- Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C. 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *J insect physiol* 52: 593-601.

- Fialho MCQ, Moreira NR, Zanuncio JC, Ribeiro AF, Terra WR, Serrão JE. 2012. Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol* 58: 850-856.
- Lacombe D. 1999. Anatomia e Histologia das glândulas salivares nos Triatomíneos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 557-564.
- Martínez LC, Fialho MCQ, Zanuncio JC, Serrão JE. 2014. Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535-543.
- Oliveira LJ, Malaguido AB. 2004. Flutuação e distribuição vertical da população do percevejo castanho da raiz, *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae), no perfil do solo em áreas produtoras de soja nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. *Neotrop Entomol.* 33: 283-291.
- Oliveira EDM, Pasini A, Fonseca ICB. 2002. Abundancia estacional do percevejo-castanho-das-raizes *Atarsocoris* sp. (Hemiptera: Cydnidae), em pastagens degradadas de Jaguapitã-PR. *Semina: Ciências agrárias.* 23: 203-210.
- Pessa LFC, Oliveira E, Nogueira RP. 2013. *Scaptocoris castanea* (Perty, 1830) (Hemiptera, Cydnidae) em área produtora de *Glycine max* (L.) no município de Primavera do Leste, Mato Grosso. *Estud biol.* 35: 25-33.
- Picanço M, Leite GLD, Mendes MC, Borges VE. 1999. Ataque de *Atarsocoris brachiariae* Becker, uma nova praga das pastagens em Mato Grosso Brasil. *Rev Agropec Bras.* 34: 885-890.
- Roth LM. 1961. A study of the odoriferous glands of *Scaptocoris divergens* (Hemiptera: Cydnidae). *Ann Entomol Soc Am.* 54: 900-911.
- Santos HP, Rost-Roszkowska M, Vilimova J, Serrão JE. 2017. Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits. *Protoplasma* 254: 1743-1753.
- Silva CP, Ribeiro AF, Gulbenkian S, Terra WR. 1995. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J Insect Physiol* 41: 1093-1103.
- Silva AL, Silva AJ, Soares WRO, Fernandes PM, Garcia RM. 2013. Ação de inseticidas sobre o percevejo-castanho-da-raiz *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) e seu efeito no desenvolvimento e na produtividade da cultura do milho. *Bioassay* 8: 1-7.
- Takehita K, Kikuchi Y. 2017. *Riptortus pedestris* and *Burkholderia* symbiont: an ideal model system for insect–microbe symbiotic associations. *Res Microbiol* 168: 175-187.

- Sousa CR, Fernandes PM. 2002. Composição populacional e mobilidade no solo do percevejo castanho *Atarsocoris brachiariae* (Hemiptera: Cydnidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás.
- Terra WR, Costa RH, Ferreira C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais Acad Bras Cienc* 78: 255-269.
- Toh H, Weiss BL, Perkin SAH, Yamashita A, Oshima K, Hattori M, Aksoy S. 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in tse tse host. *Gen Res* 16: 149-156.

CAPÍTULO 1

Submetido para Microscopy and Microanalysis

Histology, ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of burrower bug,

***Scaptocoris castanea* (Hemiptera: Cydnidae)**

Abstract

Burrower bug *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae) is an agricultural pest feeding on roots of several crops. The histology, ultrastructure and cytochemistry of the salivary glands of *S. castanea* were described. Salivary system has a pair of principal salivary glands and a pair of accessory salivary glands. The principal salivary gland is bilobed with anterior and posterior lobes joined by a hilus where excretory duct occurs. The accessory salivary gland is tubular with a narrow lumen that opens into the hilus near the excretory duct, suggesting that its secretion is stored in the lumen of the principal gland. The cytoplasm of the secretory cells is rich in rough endoplasmic reticulum, secretory vesicles with different electron-densities and mitochondria. At the basal of accessory gland epithelium, there were scattered cells that do not reach the gland lumen, with the cytoplasm rich in rough endoplasmic reticulum, indicating a role in protein production. Data show that principal and accessory salivary glands of *S. castanea* produce lipoprotein saliva. This is the first morphological description of *S. castanea* salivary system that is similar to other Hemiptera Pentatomomorpha, but with occurrence of basal cells in the accessory salivary gland.

Keywords: Secretory cells, extra-oral digestion, accessory salivary gland, principal salivary gland, phytophagous bug, insect glands anatomy.

Introduction

The burrower bugs (Hemiptera: Cydnidae) are generalist phytophagous with some agricultural pest species (Becker, 1996, Riis et al., 2005, Chapin et al., 2006). *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Cydnidae) is pest of cotton, corn, soybean and pastures (Oliveira & Malaguido 2004, Pereira et al., 2012), that feeds on roots (JFSC personal observation). Since salivary glands are the main source of saliva production responsible for damage the plants (Oliveira & Malaguido, 2004, Matias et al., 2011, Peiffer & Felton, 2014), more detailed information on this organ have yet to be explored.

The salivary complex of Hemiptera has salivary and accessory glands that produce watery saliva, rich in lipids, carbohydrates and enzymes, contributing to extra oral digestion and food intake (Miles & Slowiak, 1976, Terra & Ferreira, 1994, Zeng & Cohen, 2000). Due to having sucking mouth parts, hemipterans ingest liquified food by the phenomenon called extra oral digestion. In addition to amylase and proteinases, the salivary glands of phytophagous insects produce an enzyme called pectinase, to rupture the cell wall. Most of phytophagous insects produce an enzyme called pectinase to facilitate ingestion (Cohen, 1990, 1998, Chapman, 2013).

Extra oral digestion onset with saliva injection into plant, is followed by suction of liquefied food, which will undergo final digestion in midgut (Boyd, 2003, Silva et al., 2012, Peiffer & Felton, 2014).

The salivary glands in Hemiptera have been morphologically studied in a limited number of representatives of Auchenorrhyncha (Ammar, 1986, Nunes & Camargo-Mathias, 2006) and Heteroptera suborders (Reis et al., 2003, Azevedo et al, 2007, Serrão et al., 2008, Castro et al., 2013, Martínez et al., 2014, Castellanos et al., 2017), up to this there is no date on description of these glands in Cydnidae family.

This study describes the anatomy, histology, cytochemistry and ultrastructure of *S. castanea* salivary glands.

Materials and Methods

Insects

Adults, males and females, of *S. castanea* were collected in soybean crops in the municipality Tangará da Serra (14°18'S and 57°45'W) and Rondonópolis (17°10'S and 54°71'W), state of Mato Grosso, Brazil and transported to Laboratory of Cell Ultrastructure from Federal University of Viçosa, state of Minas Gerais, Brazil. Insects were kept in plastic containers with soil (10 cm high), moistened with water every three days and fed on soybean roots *ad libitum* at 27 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 14:10 h (light: dark) photoperiod

Scanning electron microscopy

Five females and five males of *S. castanea* were cryoanesthetized at 4 °C for 3 minutes, the salivary glands were dissected in insect saline solution (NaCl 0,1 M + KH_2PO_4 0,1 M + Na_2HPO_4 0,1 M) and transferred to Zamboni fixative solution (Stefanini et al., 1967) for 12 h at 5 °C. Then, the samples were dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90 and 98°), transferred to hexamethyldisilazane for 5 minutes and air dried. The samples were gold covered (20 nm thick) and analyzed with a LEO VP1430 scanning electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Light microscopy

Adults (n = 10) of *S. castanea* from both sexes were cryoanesthetized at -4 °C and the salivary glands were dissected in insect saline solution and transferred to the Zamboni fixative solution for 24 h at 5 °C. Then, the pieces were dehydrated a graded ethanol series (70, 80, 90 and 95°) and embedded in historesin JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Sections 2 µm thick were stained with hematoxylin and eosin and analyzed with an Olympus BX-60 light microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Transmission electron microscopy

Salivary glands of *S. castanea* (males and females) (n = 6) were dissected and transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate (C₂H₆AsNaO₂) buffer pH 7.2 containing 0.2 M sucrose for 4 h at room temperature. After washed in the same buffer, the salivary glands were divided into anterior lobe, posterior lobe and accessory gland, and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, following washing in the buffer and dehydration in ethanol series (70, 80, 90 and 99°). The samples were embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd.) and ultra-thin sections (60-80 nm thick) were obtained with PowerTomes PT-X ultramicrotome glass razor (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA). Sections were loaded onto copper grids and stained with 3% aqueous uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963) and examined with Zeiss EM 109 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Cytochemistry

Lipids

Four salivary glands were dissected and transferred to 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer for 4 hours. Subsequently the samples were washed in the buffer for 10 minutes and transferred to 0.1M imidazole buffer pH 7.5 for 10 minutes. Samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide in imidazole buffer in the dark (Angermuller & Fahimi, 1982). Then the samples were washed in imidazole buffer, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in LR White resin. Unstained ultrathin sections were analyzed with transmission electron microscope Zeiss EM 109

Proteins

Four Salivary glands were transferred to 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer for 4 h, washed in distilled water and incubated in 10% ammoniacal silver solution for 5 minutes in the dark. Then the samples were washed in distilled water, transferred to 3% formaldehyde for 5 minutes (MacRae & Meetz, 1970), washed in distilled water, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in LR White resin.

Ultra-thin sections were stained with lead citrate (Reynolds, 1963) and analyzed with transmission electron microscope Zeiss EM 109.

Results

The morphological features of salivary glands of *S. castanea* were similar in males and females, so the results described here refer to both sexes.

Anatomy

The salivary glands of *S. castanea* were found in the thorax of the insect with a pair of principals and a pair of accessory glands, both translucent in saline solution. The principal gland had two lobes, with the anterior lobe smaller and partially spherical, and the posterior one larger and oval shaped (Figs. 1A-B). The principal salivary gland was attached to the oral cavity by an excretory duct arisen at the hilus between the two lobes (Figs. 1D). The accessory salivary gland was long and tubular (Fig 1C) connected to the hilus of the principal gland by a narrow, long and folded duct (Fig. 1D).

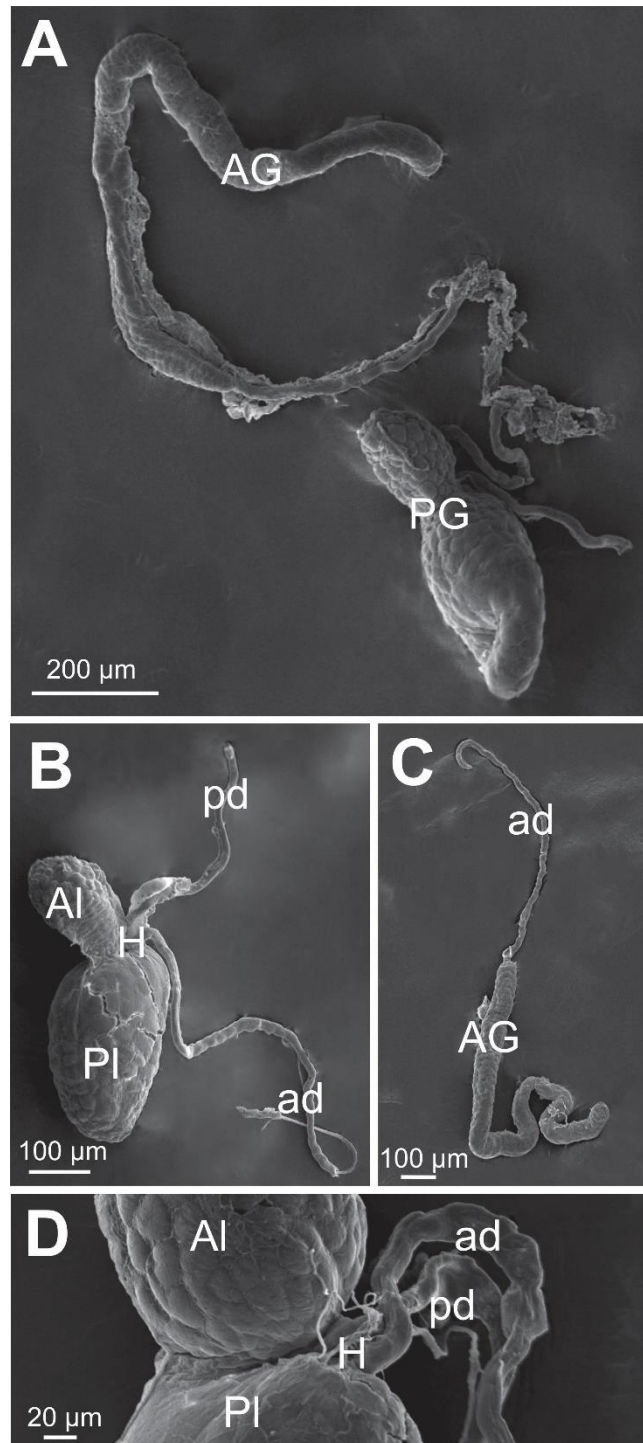


Figure 1. Scanning electron micrographs of *S. castanea* salivary glands. **A.** General aspect of the principal (PG) and accessory salivary glands (AG). **B.** Principal salivary gland with the anterior (Al), posterior (Pl) lobes, hilus (H) with the excretory ducts from principal (pd) and accessory ducts (ad). **C.** Secretory portion of the accessory salivary gland (AG) with a narrow and long duct (ad). **D.** Detail of the hilus region (H)

between the anterior (Al) and posterior (Pl) lobes showing the ducts insertion of the principal (pd) and accessory duct (ad).

Histology

The anterior and posterior lobes of the principal salivary gland had a single layered epithelium of cubic cells with a central nucleus rich in decondensed chromatin with clusters of condensed chromatin and nucleolus (Fig. 2A). The cytoplasm of these cells was basophilic with few secretory vesicles (Figs. 2B-C). The anterior lobe lumen was filled with weakly stained granular contents (Fig. 2B), whereas the lumen had strongly basophilic content (Fig. 2C) in the posterior lobe. Both excretory ducts of the principal and accessory salivary glands were narrow with a single layer of cubic cells with flattened nucleus. The apical surface of epithelia in the principal and accessory ducts were basophilic and acidophilic, respectively (Fig. 2D).

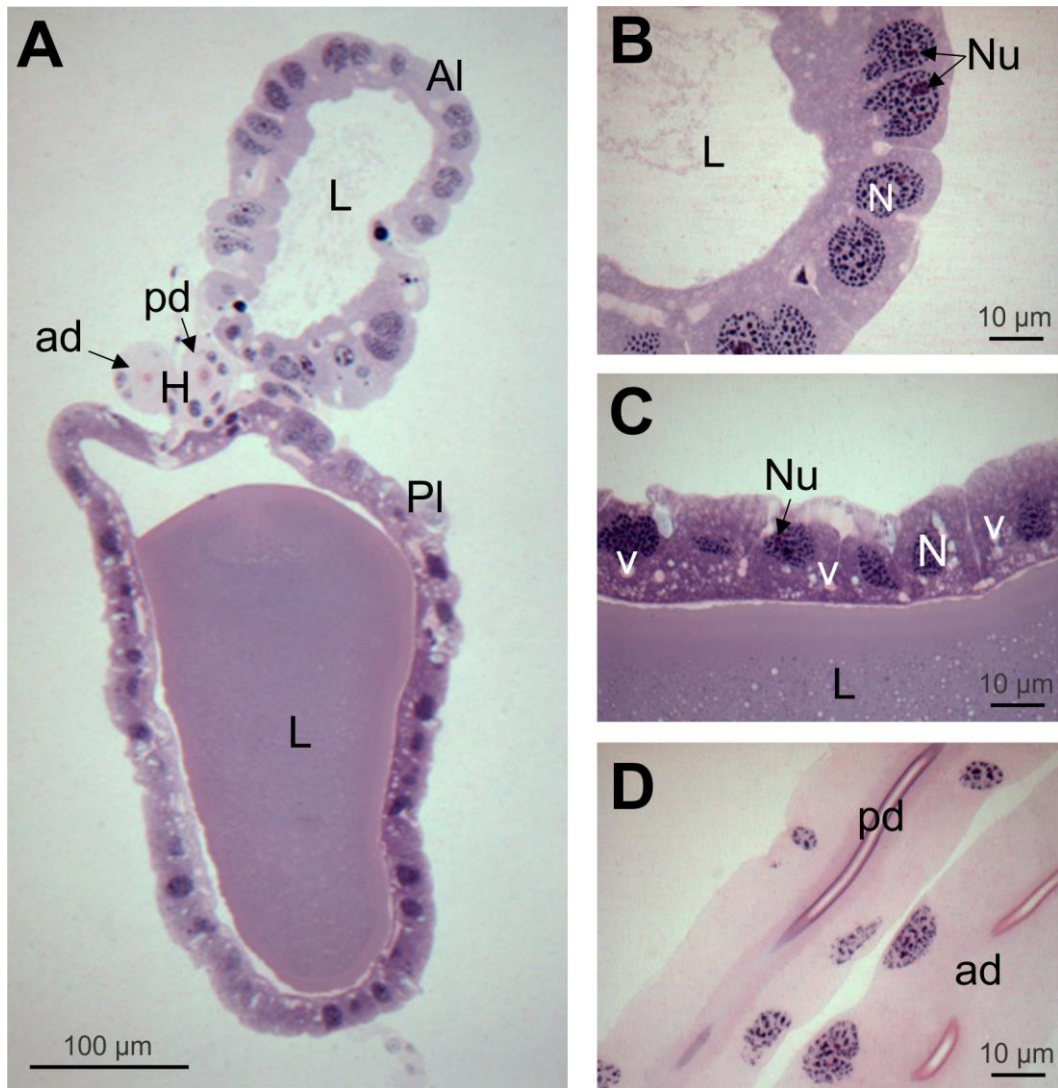


Figure 2. Light micrographs of *S. castanea* principal salivary gland. **A.** Longitudinal section of the anterior (Al) and posterior (Pl) lobes and the hilus (H) with ducts of the principal (pd) and accessory (ad) glands. **B-C.** Secretory cells of the anterior (**B**) and posterior lobe (**C**), showing a layer of cubic cells with one nuclei (N) with clusters of condensed chromatin and nucleolus (Nu). Note the cytoplasm of the posterior lobe cells with vesicles (V). **D.** Longitudinal section of the ducts of the principal (pd) and accessory (ad) salivary glands showing a layer of cells lining the narrow lumen. Note the apical surface of the duct of the principal salivary gland basophilic (Pd) and those of the accessory salivary gland were acidophile (Ad).

The accessory salivary gland had a single layer of columnar cells lining a narrow lumen (Fig. 3A). Secretory cells had a central nucleus with clusters of condensed chromatin and nucleolus (Figs 3B-C) and acidophilic cytoplasm rich in secretory vesicles (Figs 3A-B). Scattered among the basement of the columnar secretory cells there was some club-shaped cells with homogeneous cytoplasm and flattened nucleus (Figs 3C-D). These cells never reached the gland lumen.

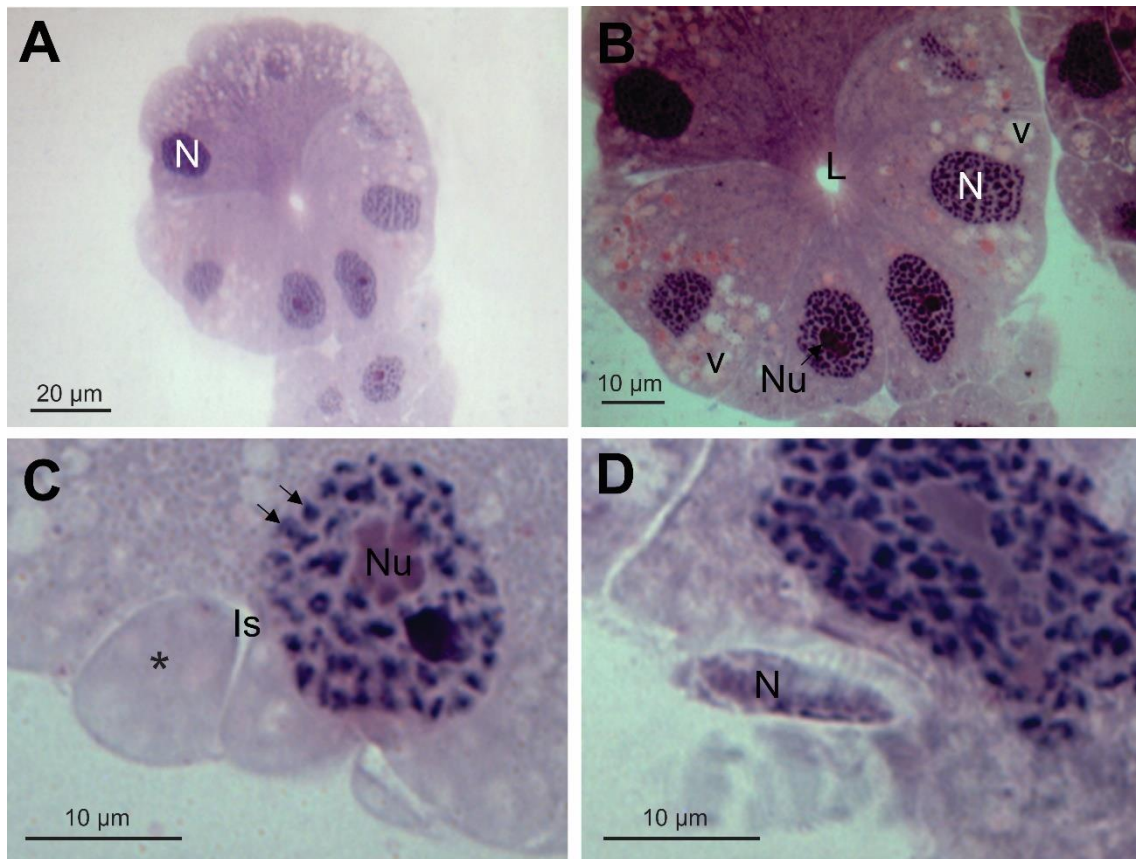


Figure 3. Light micrographs of *S. castanea* accessory salivary gland. **A.** Cross section, showing a layer of columnar cells lining a narrow lumen (L). Note well-developed nucleus (N). **B.** Cross section showing cells with cytoplasm rich in secretory vesicles (V) and nucleus (N) containing clusters of condensed chromatin and nucleolus (Nu). **C.** Basal region of the gland epithelium showing club-shaped cell (*) separated from the secretory cell by enlarged intercellular space (Is). Note the nucleus of the secretory cell with clusters of condensed chromatin (arrows) and nucleolus (Nu) **D.** Flat nucleus of club-shaped cells.

Ultrastructure

Anterior lobe of the principal salivary gland

The epithelial cells of the anterior lobe of the principal salivary gland had a large nucleus, with some condensed chromatin clusters (Fig. 4A). The apical surface of the cells had short microvilli, cytoplasm rich in mitochondria (Fig. 4B) and vesicles with granular contents released to the lumen (Fig. 4C), which characterizes secretion by exocytosis. The basal portion of the cells had electron-lucent vesicles with electron-dense core and basal plasma membrane without folds (Fig 4D). The perinuclear cytoplasm was rich in rough endoplasmic reticulum, formed by flattened and vesicular cisterns, mitochondria (Fig. 5A-B) and granules positive for proteins (Fig. 5C).

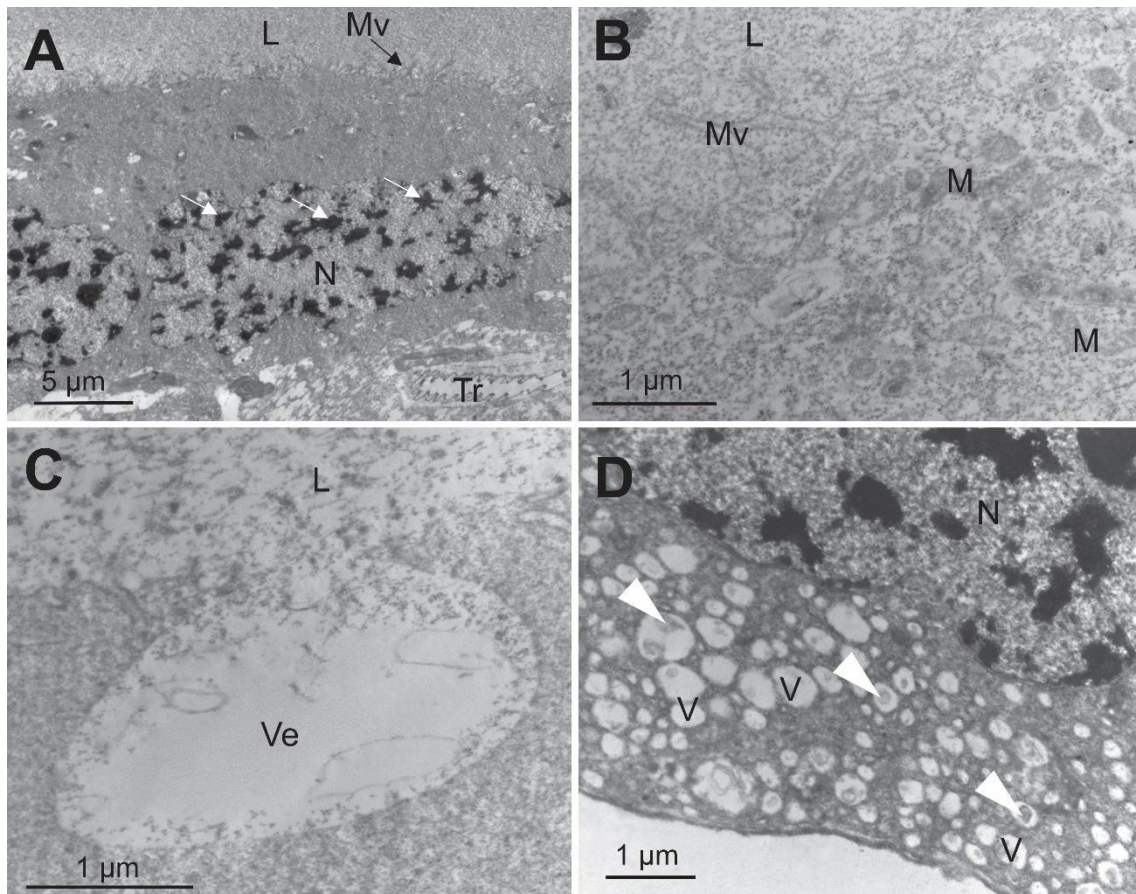


Figure 4. Transmission electron micrographs of the anterior lobe of principal salivary gland from *S. castanea*. **A.** General aspect of cell with well-developed nucleus (N) containing condensed chromatin clusters (arrows). L-lumen, Tr-tracheoles. **B.** Apical

region of the cell showing short microvilli (Mv) and mitochondria (M). **C.** Vesicles (Ve) containing granular secretion released into the gland lumen (L). **D.** Basal cytoplasm rich in vesicles (V) containing electron-lucent content with electron-dense core (arrowheads).

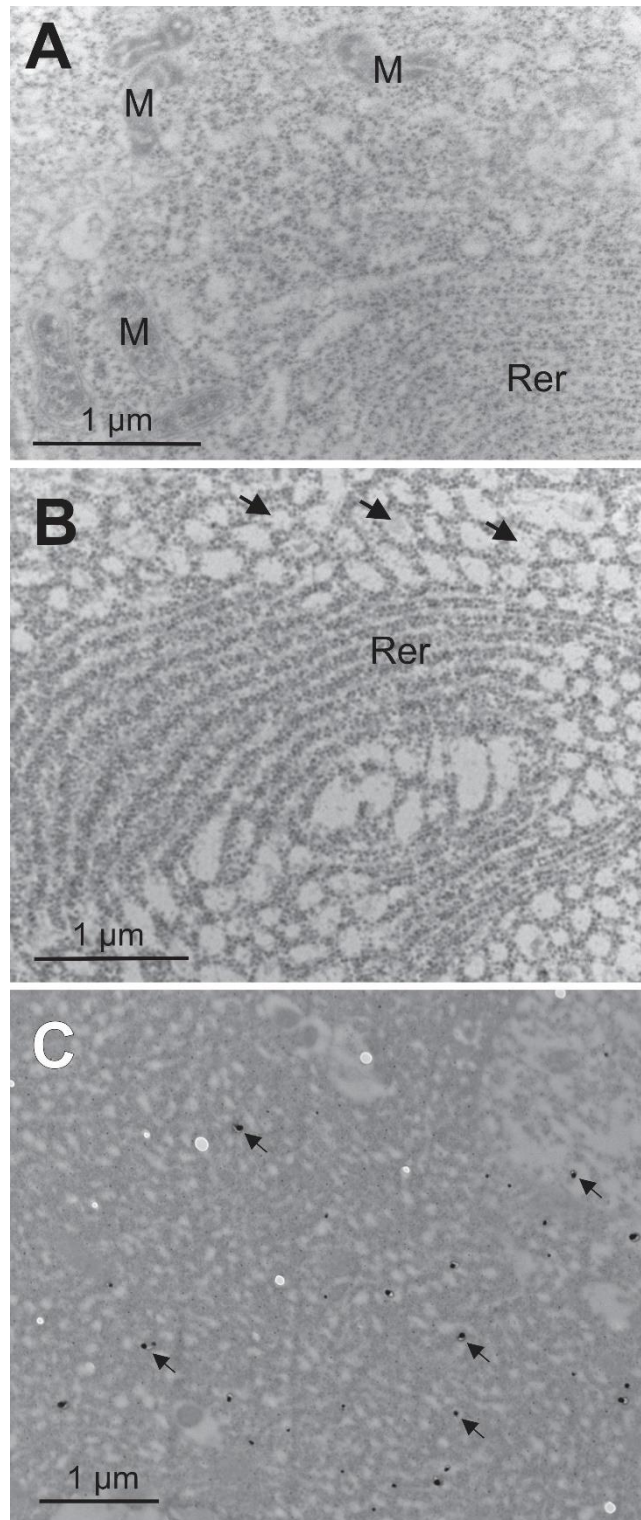


Figure 5. Transmission electron micrographs of anterior lobe of the principal salivary gland from *S. castanea*. **A.** Perinuclear cytoplasm rich in rough endoplasmic reticulum (Rer) and elongated mitochondria (M). **B.** Detail of rough endoplasmic reticulum cisternae (Rer) showing some vesicular rough endoplasmic reticulum (arrows). **C.** Cytoplasm with protein granules (arrows) detected by silver reaction.

Posterior lobe of the principal salivary gland

The posterior lobe of the principal salivary gland of *S. castanea* had cells with spherical central nucleus. The apical surface of the cells was irregular and the cytosol rich in autophagosomes (Fig. 6A). In the perinuclear region there were mitochondria, electron-lucent vesicles (Fig. 6B), well-developed vesicular rough endoplasmic reticulum (Fig. 6C) and some autophagosomes (Fig. 7A). The basal plasma membrane was rich in short infoldings forming enlarged channels with many openings to the hemocoel (Figs. 7B). Cytochemical tests showed the presence of lipid droplets throughout the cytoplasm (Fig. 7C).

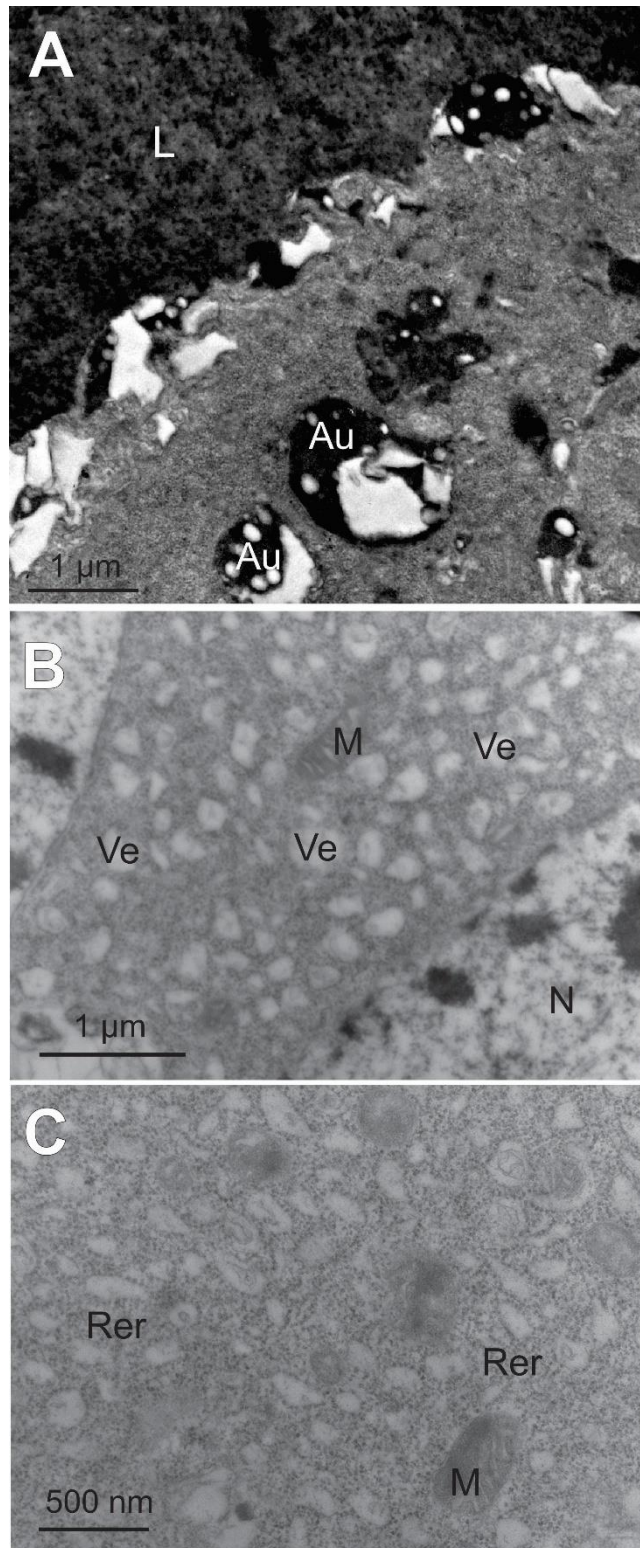


Figure 6. Transmission electron micrographs of the posterior lobe of the principal salivary gland of *Scaptocoris castanea*. **A.** Apical region of the cell showing irregular apical surface and autophagosomes (Au). Note lumen (L) with granular content. **B.** Perinuclear region showing mitochondria (M) and electron-lucent vesicles (Ve). **C.**

Detail of extensive vesicular rough endoplasmic reticulum (Rer) and mitochondria (M).

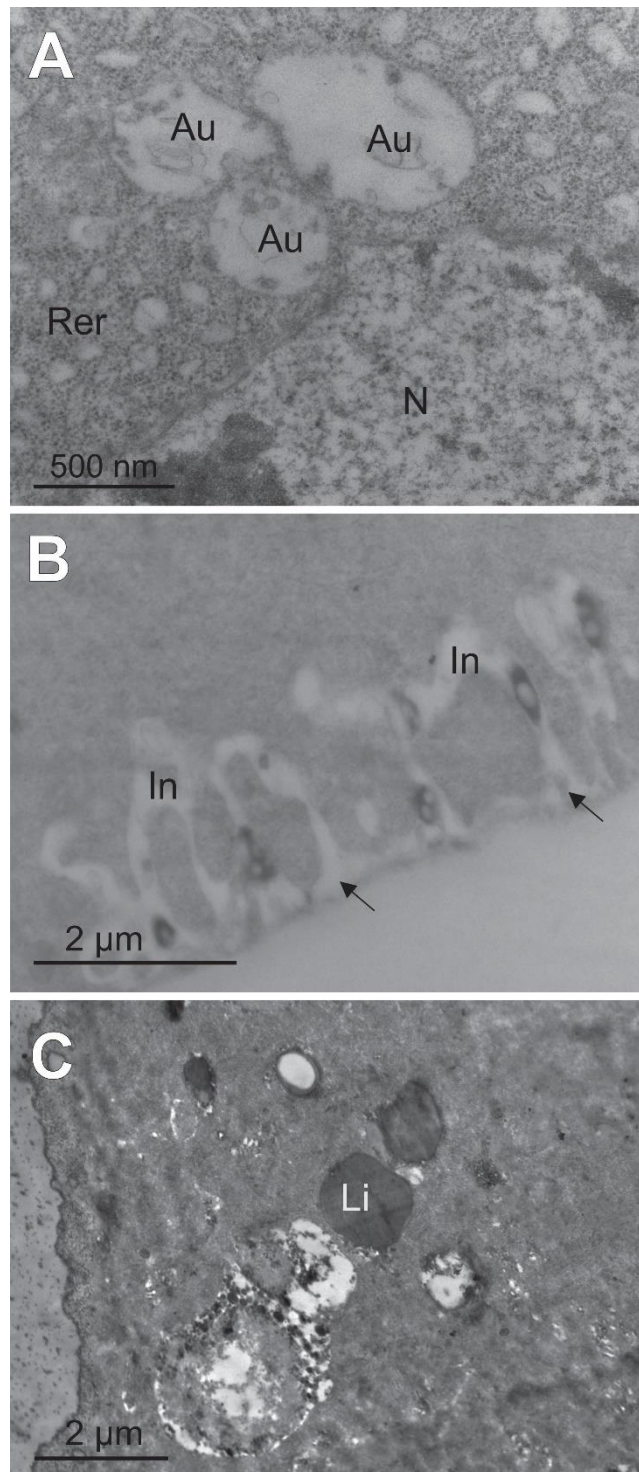


Figure 7. Transmission electron micrographs of the posterior lobe of the principal salivary gland of *S. castanea*. **A.** Perinuclear region with autophagosomes containing membranous debris (Au). (N) Nucleus. (Rer) Rough endoplasmic reticulum. **B.** Basal cell region showing plasma membrane infolding forming short and enlarged canals

(In) with many openings for hemocoele (arrows). C. Cytochemistry for lipids (Li) showing positive droplets in the cytoplasm.

Accessory salivary gland

The accessory salivary gland had a narrow lumen with electron-lucent content, lined by secretory cells with long apical microvilli (Fig. 8A). These cells showed central and spherical nucleus with clusters of condensed chromatin and well-developed nucleolus (Fig. 8B). The cytoplasm was rich in mitochondria and vesicular rough endoplasmic reticulum (Figs. 8C-D). Secretory cells showed cytoplasm with lipid droplets (Fig. 8E) and protein granules (Fig. 8F). At the basement of the epithelium, the club-shaped cell had enlarged intercellular space with adjacent secretory cells (Fig. 9A). These cells were rich in mitochondria and rough endoplasmic reticulum organized in stacked cisterns and with paracrystalline aspect (Fig. 9B). Some cytoplasmic bridges connect the club-shaped cell to secretory cells (Fig 9C).

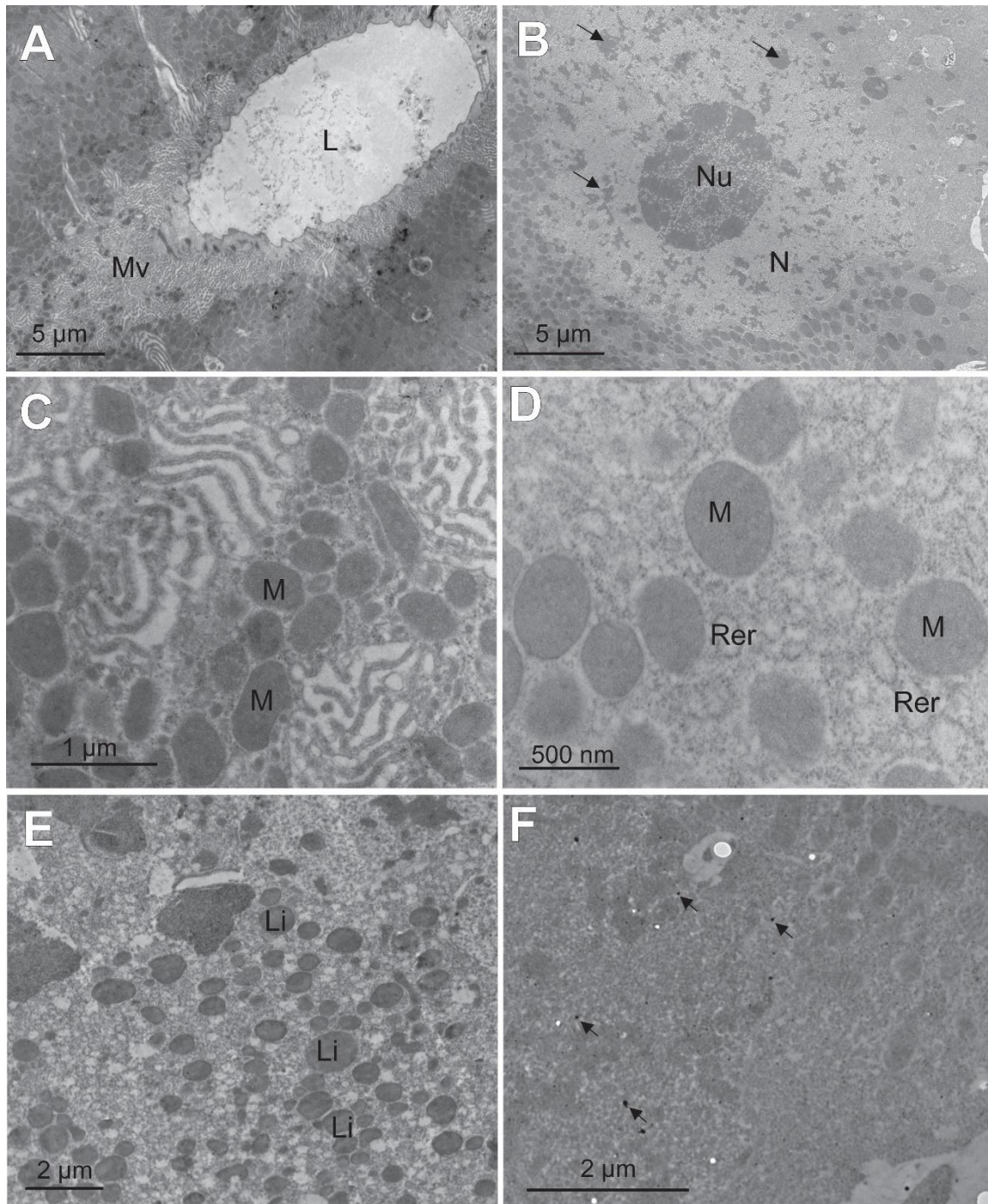


Figure 8. Transmission electron micrographs of the accessory salivary gland of *Scaptocoris castanea*. **A.** Apical region of the cell with long microvilli (Mv). Note lumen (L) with electron-lucent content. **B.** Nucleus (N) of the secretory cell with evident nucleolus (Nu) and clusters of condensed chromatin (arrows). **C.** Apical cytoplasm with mitochondria (M). **D.** Perinuclear cytoplasm rich in mitochondria (M) and vesicular rough endoplasmic reticulum (Rer). **E.** Cytochemistry showing secretory cell with lipid droplets (Li) and **F.** proteins in the granules (arrows).

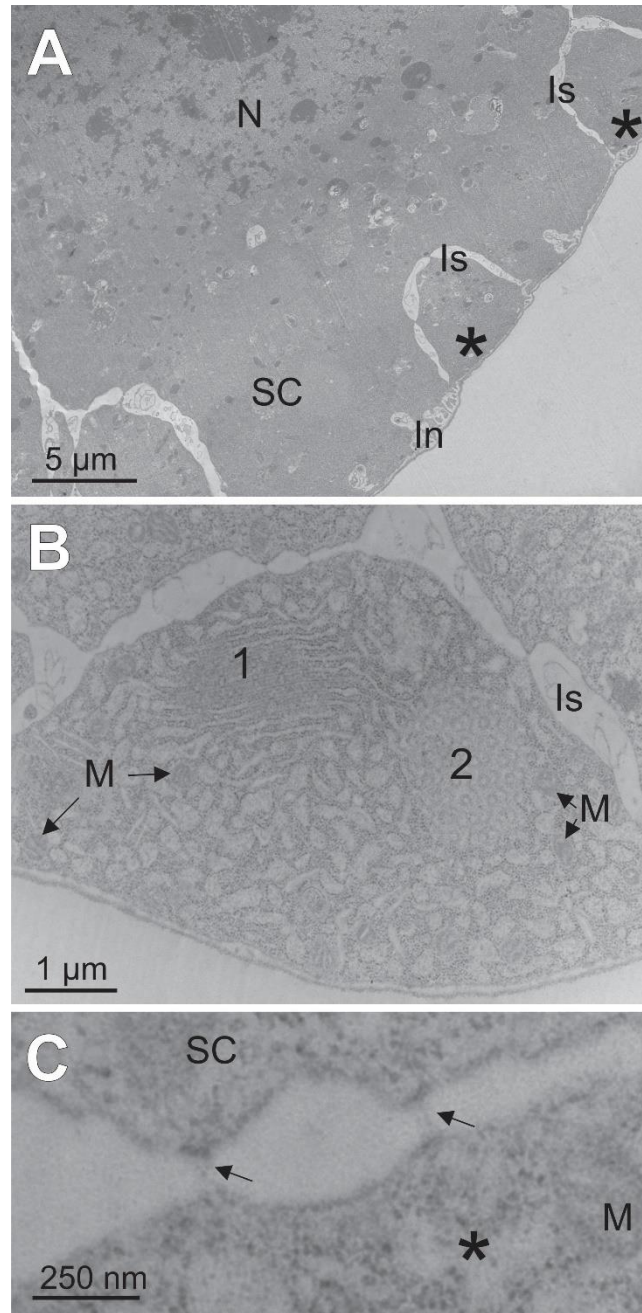


Figure 9. Transmission electron micrographs of the accessory salivary gland of *Scaptocoris castanea*. **A.** Base of secretory cells (SC) with short basal plasma membrane infoldings (In) and presence of club-shaped cells (*) separated from the secretory cells by enlarged intercellular space (Is). **B.** Detail of club-shaped cell with cytoplasm rich in rough endoplasmic reticulum with stacked cisterns (1) and paracrystalline aspect (2). Note, mitochondria (M) and enlarged intercellular space (Is). **C.** Detail of intercellular

space, showing cytoplasmatic bridges (arrows) between secretory cells (SC) and club-shaped cells (*). Mitochondria (M).

Discussion

In *S. castanea* the principal salivary gland is bilobate and the accessory salivary gland is tubular likely found in other Pentatomomorpha, suggesting that the anatomy of the salivary glands in this infraorder may be phylogenetically biased other than by feeding habits. The salivary glands in Hemiptera vary in shape, size and number of lobes (Baptist, 1941, Lacombe, 1999, Kumar & Sahayaraj, 2012; Zhong et al., 2014). Within Cimicomorpha, *Triatoma vitticeps* Stal, 1859 (Reduviidae) has three types of principal salivary glands (Lacombe, 1999).

Pentatomomorpha has the principal salivary gland with two lobes and the accessory salivary gland narrow and long in the predators *Brontocoris tabidus* Signoret, 1863 (Azevedo et al., 2007), *Supputius cincticeps* Stal, 1860 (Castro et al., 2013) and *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Martínez et al., 2014); and in the phytophagous *Platyscytus decempunctata* Carvalho, 1945 (Pires et al., 2007), *Euschitus heros* Fabricius, 1798 (Castellanos et al., 2017) and *Piezodorus lituratus* Fabricius, 1794 (Amutkan et al., 2017).

The histology of the salivary glands of *S. castanea* suggests that there are three regions responsible for saliva production: the anterior and posterior lobes of the principal salivary gland and the accessory salivary gland, because they have columnar secretory epithelium as reported for other Hemiptera (Azevedo et al., 2007; Serrão et al., 2008; Martínez et al., 2014, 2015).

The anterior and posterior lobes of principal salivary gland have cells with secretory vacuoles, rough endoplasmic reticulum, few basal plasma membrane infoldings and many protein granules, suggesting the occurrence of protein secretion in this region.

Protein synthesis by the principal salivary gland has been reported for predatory (Azevedo et al., 2007, Martínez et al., 2014), phytophagous (Nunes and Camargo-Mathias 2006) and hematophagous (Serrão et al., 2008) Hemiptera. Although the function of those proteins are unknown in these species, the occurrence of digestive enzymes (Ambrose et al., 2000, Ghanin et al., 2001, Bell et al., 2005, Fialho et al., 2012) and toxins (Martinez et al., 2015) have been reported in the saliva of these insects. Since *S. castanea* is phytophagous, we suggest that many of the proteins released by salivary glands are enzymes as found in phytophagous Hemiptera (Habibi et al., 2001, Zhu et al., 2003, Liu et al., 2016, Ji et al., 2017, Li et al., 2017).

Different electron-densities of the cytoplasm granules and secretory vesicles in the anterior and posterior lobes of the principal salivary gland of *S. castanea* indicate that different compounds are synthesized as reported in the salivary glands of *Peregrinus maidis* Ashmead, 1890 (Delphacidae) (Ammar, 1986), *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Cercopidae) (Nunes & Camargo-Mathias, 2006) and *Karenia caelatata* Distant, 1890 (Cicadidae) (Zhong et al., 2013). Moreover, the presence of well-developed nucleus with decondensed chromatin containing few clusters of condensed chromatin and nucleolus in the glandular cells suggests a high metabolic activity in *S. castanea*, mainly for protein synthesis. Cells with high metabolic rate have large nucleus containing many proteins involved in RNA synthesis (Roma et al. 2003).

The presence of narrow and short basal plasma infoldings associated with some mitochondria in the secretory cells of the posterior lobe and absence of them in the anterior lobe of the principal salivary gland of *S. castanea* are features of cells with low activity in the transport of substances of the hemolymph (Ferreira et al., 1981, Marana et al., 1997, Fialho et al., 2009), as well as occur in the salivary glands of *P. distinctus* (Martínez et al., 2015).

The accessory salivary gland of *S. castanea* is a narrow tube that opens into the hilus between the lobes of the principal salivary glands. This gland has cells similar to those described in the accessory salivary glands of *B. tabidus* (Azevedo et al., 2007), *P. nigrispinus* (Martínez et al., 2014), *P. distinctus* (Martínez et al., 2015), *Supputius cincticeps* (Castro et al., 2013) and *L. coleopterata* (Zhong et al., 2014). However, *S. castanea* is the first Hemiptera with club-shaped cells at the basement of the epithelium of the accessory salivary gland. The occurrence of rough endoplasmic reticulum in stacked cisterns and paracrystalline aspect in the club-shaped cells suggest high protein synthesis. Paracrystalline rough endoplasmic reticulum has a high surface/volume ratio enhancing the function of this organelle (Baumann & Walz, 2001).

The narrow lumen and the duct opening in the hilus between the lobes of the principal salivary gland, indicates that the secretion of the accessory salivary gland is stored in the lumen of the principal glands. The presence of extensive rough endoplasmic reticulum and mitochondria in the secretory cells of the accessory salivary gland of *S. castanea* suggests high protein synthesis, as reported for *P. nigrispinus* (Martínez et al., 2014). Moreover, the absence of infolds in the basal plasma membrane in the epithelial cells of this gland suggests that few compounds are absorbed from the hemolymph, contrasting with reported for other non-Pentatomomorpha Hemiptera such as *L. coleopterata* (Zhong et al., 2014) and *Rhynocoris marginatus* Fabricius (Reduviidae) (Kumar & Sahayaraj, 2011).

The positive cytochemical tests for lipids and proteins in the secretory cells of the accessory salivary gland of *S. castanea* show the production of lipids and proteins such as in the salivary glands of *C. hemipterus* (Serrão et al., 2008) and *T. infestans* (Reis et al., 2003). Lipids may be used to emulsify the secretion produced by the principal salivary glands (Reis et al., 2003). These results, together with those reported for predator *B. tabidus* (Azevedo et al., 2007) and *P. nigrispinus* (Martínez et al., 2014), suggest that in

Pentatomomorpha, the accessory salivary gland synthesizes lipids and proteins that are released in the lumen of the principal salivary gland to compose the saliva of these insects.

This is the first morphological description of the salivary system for a Cydnidae representative, showing ultrastructural differences in the lobes of principal salivary gland and accessory salivary gland, indicating that they produce different secretions in each region in *S. castanea*, with a final saliva probably lipoprotein. Moreover, that is the first report of basal club-shaped cells in the accessory salivary gland of Hemiptera.

Acknowledgements

This research was supported by Brazilian research agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Brazil). The authors thank to José Carlos Gomes de Araújo, Gabriel dos Santos Carvalho and Fabiano Gonçalves Schimmer for helping to collect the burrower bugs on soybean crops. We are grateful for Núcleo de Microscopia e Microanálise from Federal University of Viçosa for technical assistance.

Declaration of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- Amutkan, D., Ozyurt, N., Polat, I., Suludere, Z., Candan, S. (2017). Morphology and ultrastructure of the salivary glands of *Piezodorus lituratus* (Fabricius, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae). *Acta Zool Bulg* **69**, 193-200.
- Azevedo, D. O., Zanuncio, J. C., Zanuncio, Jr. J. S., Martins, G. F., Marques-Silva, S., Sossai, M. F., Serrão, J. E. (2007). Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Braz Arch Biol Technol* **50**, 469–477.
- Ambrose, D. P., Maran, P. M. (2000). Polymorphic diversity in salivary and haemolymph proteins and digestive physiology of assassin bug *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Het.; Reduviidae). *J Appl Ent* **124**, 315-317.
- Ammar, E. D. (1986). Ultrastructure of the salivary glands of the planthopper, *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Homoptera : Delphacidae). *Int J Ins Morphol Embryol* **15**, 417–428.
- Angermüller, S., Fahimi, D. H. (1982). Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J* **14**, 823–825.
- Baptist, B. A. (1941). The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Homoptera. *Q J Microsc Sci* **83**, 91–139.
- Baumann, O., Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* **205**, 149–214.
- Becker, M. (1996). Uma nova espécie de percevejo-castanho (Heteroptera: Cydnidae: Scaptocorinae). *An Soc Ent Bra* **25**, 95–102.
- Bell, H. A., Down, R. D., Edwards, J. P., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R. (2005). Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug

- Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae); effect of proteinase inhibitors. *Eur J Ent* **102**, 139-145.
- Boyd, D.W. (2003). Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigritulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. *Ann Ent Soc Am* **96**, 667–671.
- Castellanos, N., Martínez, L.C., Silva, E.H., Teodoro, A.V., Serrão, J.E., Oliveira, E.E. (2017) Ultrastructural analysis of salivary glands in a phytophagous stink bug revealed the presence of unexpected muscles. *PLoS One* **12**, e0179478.
- Castro, A.A., Canevari, G.C., Pikart, T.G., Ribeiro, R.C., Serrão, J.E., Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C. (2013). Salivary gland histology of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann Ent Soc Am* **106**, 273–277.
- Chapin, J.W., Sanders, T.H., Dean, L.O., Hendrix, K.W., Thomas, J.S. (2006). Effect of feeding by a burrower bug, *Pangaeus bilineatus* (Say) (Heteroptera: Cydnidae), on peanut flavor and oil quality. *J Ent Sci* **41**, 33–39.
- Chapman RF. 2013. The insects: Structure and function. 5th edition. Cambridge University Press. New York.
- Cohen, A.C. (1990) Feeding adaptations of some predaceous Heteroptera. *Ann Ent Soc Am* **83**:1215–1223
- Cohen, A.C. (1998) Solid-to-liquid feeding: the inside story of extra-oral digestion in predaceous Heteroptera. *Am Entomol* **44**:103–117
- Ghanim, M., Rosell, R.C., Campell, L.R., Czosnek, H., Brown, J., Ullman, D. (2001). Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. *J Morphol* **248**, 22-40.
- Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. (2009) Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann Entomol Soc Am* **102**:119–127

- Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R. (1981). Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *J Ins Physiol* **27**, 559-570.
- Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. (2009). Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann Ent Soc Am* **102**, 119–127.
- Fialho, M.C.Q., Moreira, N.R., Zanuncio, J.C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Serrão, J.E. (2012). Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Ins Physiol* **58**, 850-856.
- Habibi, J., Backus, E.A., Croudon, T.A., Brandt, S.L. (2001). Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. *Ent Exp Appl* **98**, 369-375.
- Ji, R., Ye, W., Chen, H., Zeng, J., Li, H., Yu, H., Li, J., Lou, Y. (2017). A salivary Endo-beta-1,4-glucanase acts as an effector that enables the brown planthopper to feed on rice (1 [OPEN]). *Plant Physiol* **173**, 1920-1932.
- Kumar, S.M., Sahayaraj, K. (2012). Gross morphology and histology of head and salivary apparatus of the predatory bug *Rhynocoris marginatus*. *J Ins Sci* **12**, 1–12.
- Lacombe, D. (1999). Anatomia e Histologia das glândulas salivares nos Triatomíneos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**, 557–564.
- Li, W., Zhao, X., Yuan, W., Wu, K. (2017). Activities of digestive enzymes in the omnivorous pest *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *J Econ Ent* **110**, 101-110.
- Liu, X., Zhou, H., Zhao, J., Hua, H. He, Y. (2016). Identification of the secreted watery saliva proteins of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) by transcriptome and shotgun LC-MS/MS approach. *J Ins Physiol* **89**, 60-69.
- Marana, S.R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C. (1997). Ultrastructure and secretory activity of *Abracis flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midguts. *J Ins Physiol* **43**, 465-473.

- Martínez, L.C., Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. (2014). Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* **251**, 535–543.
- Martínez, L.C., Zanuncio, J.C., Morais, W.C.C., Plata-Rueda, A., Cedeño-Loja, P.E., Serrão, J.E. (2015). Ultrastructure of the salivary glands of the stink bug predator *Podisus distinctus*. *Microsc Microanal* **21**, 1514–1522.
- Matias, F.I., Sampaio, M.V., Coelho, L., Grazia, J. (2011) Occurrence of *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) damaging *Azadirachta indica* (Meliaceae) seedlings in Brazil. *Neotrop Ent* **40**, 288–289.
- McRae, E.K., Meetz, G.D. (1970). Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. *J Cell Biol* **45**, 235–245.
- Miles, P.W., Slowiak, D. (1976). The accessory salivary gland as the source of water in the saliva of Hemiptera. *Heteroptera. Experientia* **15**, 1011–1012.
- Nunes, P.H., Camargo-Mathias, M.I. (2006). Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae). *Micron* **37**, 57–66.
- Oliveira, L.J., Malaguido, A.B. (2004). Fluctuation and vertical distribution of population of the brown root stink bug, *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae), within soil profile, in soybean fields in Mid Western and Southeastern Brazil. *Neotrop Ent* **33**, 283–291.
- Peiffer, M., Felton, G.W. (2014). Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *PloS One* **9**, e88483.
- Pereira, M.F.A., Peres, R.M., Borges, R.S. (2012). Population of *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) in a crop–livestock integration system. *Neotrop Ent* **41**, 409–413.

- Pires, E.M., Ferreira, P.S.F., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E. (2007). Morphology of the phytophagous bug *Platyscytus decempunctatus* (Carvalho) (Heteroptera: Miridae). *Neotrop Ent* **36**, 510–513.
- Reis, M.M., Meirelles, R.M., Soares, M.J. (2003). Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tiss Cell* **35**, 393–400.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208–212.
- Riis, L., Belotti, A.C., Arias, B. (2005). Bionomics and population growth statistics of *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) on different host plants. *Flo Entomol* **88**, 1–10.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Arrigoni, E.B., Marin-Morales, M.A. (2003). Little cicada of sugarcane *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae). A Brazilian agricultural pest. morpho-histological study of salivary glands. *Cytologia* **68**, 101–114.
- Serrão, J.E., Castrillon, M.I., Santos-Mallet, J.R., Zanuncio, J.C., Gonçalves, T.C.M. (2008). Ultrastructure of the salivary glands in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Ent* **45**, 991–999.
- Silva, F., Silva, J., Depieri, R., Panizzi, A.R. (2012). Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop Ent* **41**, 386–390.
- Terra, W.R., Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol* **109**, 1–62.
- Zeng, F., Cohen, A.C. (2000). Comparison of α -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. *Comp Biochem Physiol* **126**, 101–106.

- Zhong, H., Wei, C., Zhang, Y. (2013). Gross morphology and ultrastructure of salivary glands of the mute cicada *Karenia caelata* Distant (Hemiptera: Cicadoidea). *Micron* **45**, 83–91.
- Zhong, H., Zhang, Y., Wei, C. (2014). Morphology and ultrastructure of the salivary glands of the spittlebug *Lepyronia coleoptera* (L.) (Hemiptera: Aphrophoridae). *Zool Sci* **31**, 213–222.
- Zhu, Y.C., Zeng, F., Oppert, B. (2003). Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarsi-dred plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Ins Biochem Mol Biol* **33**, 889-899.

CAPÍTULO 2

Morfologia do intestino médio e seus simbiosites em *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Insecta: Hemiptera: Cydnidae)

RESUMO

O percevejo castanho *Scaptocoris castanea* é uma importante praga da soja e da pastagem no Brasil. Ele possui adaptações para o hábito subterrâneo e se alimenta diretamente da seiva das raízes. Esse inseto possui hábito subterrâneo o que dificulta seu controle e o estudo de sua biologia e fisiologia, portanto há poucas informações na literatura sobre esta espécie. Este estudo descreve a anatomia, a histologia e a ultraestrutura do intestino de *S. castanea*. O intestino médio de *S. castanea* é complexo e possui cinco regiões (ventrículos), identificados como v1-v5. Os ventrículos v1-v4 são semelhantes entre machos e fêmeas, com ultraestrutura especializada em digestão e absorção de nutrientes, transporte de água e regulação da homeostase. O v5 dos machos é pequeno com células contendo microvilosidades apicais e largas dobras basais com muitas aberturas para hemocele, enquanto nas fêmeas o v5 tem as células com uma rica comunidade bacteriana, caracterizando bacteriócito, composto principalmente por gammaproteobactérias identificadas por sequenciamento de rRNA 16S. Os resultados mostram que ocorre um dimorfismo sexual no ventrículo v5 do intestino médio de *S. castanea*, com formação de bacteriócitos nas fêmeas, enquanto as demais regiões estão envolvidas em processos digestivos.

Palavras chave: percevejos, microbiota, ventrículos, simbiosites

INTRODUÇÃO

O percevejo *Scaptocoris castanea* tem status de praga de plantas (Grazia et al 2004), especialmente soja (Pessa et al 2013) e pastagem (Costa e Forti 1993, Lima et al 2013). Esta espécie, assim como todos Cephaloctestinae possuem morfologia corporal adaptada para o hábito subterrâneo: corpo convexo, tíbias desenvolvidas e adaptadas para cavar, tarsos anteriores e médios reduzidos ou ausentes e posteriores ausentes (Grazia et al 2004). Esses insetos podem ser encontrados enterrados a uma profundidade de 1,20 metros (Oliveira e Malaguido 2004, Pessa et al 2013), o que torna difícil seu controle. Alimentam-se por sucção da seiva presente nas raízes, levando ao retardo do crescimento das plantas, ao amarelecimento das folhas, podendo acarretar na morte da planta (Matias et al 2011). Apesar de existirem alguns trabalhos sobre a distribuição e controle químico do percevejo *S. castanea*, pouco se sabe sobre a morfologia interna, especialmente o intestino médio, órgão responsável pela digestão e absorção de nutrientes.

Nos insetos o canal alimentar é dividido em três principais regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. As regiões anterior e posterior do intestino têm origem ectodérmica e, portanto, possuem um revestimento de cutícula e o intestino médio possui origem endodérmica (Chapman 2013). No intestino médio dos Hemiptera há uma membrana perimicrovilar de natureza lipoprotéica que reveste o lúmen, sintetizada pelas células digestivas, e que tem função na compartimentalização da digestão (Silva et al 1995, Lehane e Billingsley 1996, Chapman 2013)

O processo de digestão nos insetos consiste na quebra de componentes macromoleculares em componentes menores antes que ocorra a absorção. O processo digestivo ocorre em três fases: (1) inicial (2) intermediária e (3) final. A fase inicial (1) consiste na redução da forma polimérica dos nutrientes por hidrolases e proteases em oligômeros no espaço perimicrovilar. Os oligômeros são hidrolisados em dímeros e pequenos oligômeros (2), que tem seu processo de digestão final nos lisossomos (3) (Terra e Ferreira 1994). Ainda, a digestão pode ser facilitada por microorganismos no

intestino para compensar uma dieta pobre em nutrientes, como no caso dos percevejos (Chapman 2013).

O estudo sobre a morfologia e ultraestrutura do intestino médio de Heteroptera é conhecida, porém os estudos não comparam os sexos (Guedes et al 2007, Azevedo et al 2009, Santos et al 2017), ou ainda padronizam o estudo apenas para machos (Fialho et al 2012) ou fêmeas (Silva et al 1995). Levando em consideração que o intestino dos Heteroptera possui muitas similaridades ultraestruturais independente do hábito alimentar (Santos et al 2017), nós hipotetizamos que o intestino médio de *S. castanea* possui ultraestrutura semelhante a outros Heteroptera fitófagos. Assim este trabalho tem como objetivo estudar a anatomia, histologia e ultraestrutura intestino médio de machos e fêmeas de *S. castanea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Adultos de *S. castanea* foram coletados em culturas de soja nos municípios de Tangará da Serra (14°18'S e 57°45'W) e Rondonópolis (17°10'S e 54°71'W), estado de Mato Grosso, Brasil e transportados para o Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. Esses insetos foram mantidos em potes plásticos contendo solo (10 cm de altura), umedecido com água a cada três dias e alimentados com raízes de soja *Glycine max* L. (Fabaceae) *ad libitum* a 27 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro).

Microscopia de luz

Machos (n = 10) e fêmeas (n = 10) adultos de *S. castanea* foram crioanestesiados a -4 °C e os intestinos médios dissecados em solução salina para insetos (0,1M NaCl + 0,1M KH₂PO₄ + 0,1M Na₂HPO₄) e transferidos para a solução fixadora de Zamboni

(1967) por 24 h à 5 °C. A seguir, as amostras foram desidratadas em série crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 95°) e embebidas em historesina JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Secções com 2 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Microscopia eletrônica de transmissão

Intestino médio de *S. castanea* machos (n = 10) e fêmeas (n = 10) foram transferidos para solução fixadora glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo sacarose 0,2 M por 4 h a temperatura ambiente. A seguir, o intestino médio foi dividido em ventrículos de 1 a 5 e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 2 h, seguindo-se lavagem no tampão cacodilato de sódio e desidratação em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99°). As amostras foram embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.) e as seções ultrafinas (60-80 nm de espessura), obtidas com navalha de vidro em ultramicrotomo PowerTomes PT-X (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA), foram contrastadas com acetato de uranila aquosa 3% e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e examinadas nos microscópios eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 e Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Histoquímica para proteínas

Lâminas histológicas sem coloração prévia foram incubadas em solução Mercurio-Bromofenol por 2:15h. Após este período foram encubadas em ácido acético 0.5% por 10 min seguida da lavagem com água corrente por 5 min (Pearse 1960). Depois de secas em temperatura ambiente foram analisadas em microscópio de luz.

Caracterização da comunidade bacteriana associada ao ventrículo cinco de *S. castanea*.

Inicialmente os insetos foram lavados com água destilada e posteriormente em etanol 70% para esterilização prévia à dissecação, desta forma evitamos a contaminação das amostras. A extração de DNA total das amostras do ventrículo cinco de fêmeas (n=5) e machos (n=5) de *S. castanea* foi realizada utilizando FastDNA[®] Spin Kit de acordo com as recomendações do fabricante (MP Biomedicals, USA). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram mensuradas utilizando gel de agarose 0,8 % e espectrofotômetro Nano Drop[™] Plate (Thermo Scientific Multiskan GO, Wilmington, DE), sendo armazenados a -20°C. Somente a amostra de DNA das fêmeas, que apresentou quantidade e qualidade suficiente para análise, foi enviada, em triplicata, para sequenciamento na Argonne National Laboratory (Chicago, USA). Para o preparo das bibliotecas a região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada com o conjunto de primers 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') propostos originalmente por Caporaso et al (2011, 2012) e modificados por Apprill et al (2015) e Parada et al (2016). Os produtos de PCR foram sequenciados na plataforma MiSeq utilizando o kit v2 (*paired-end*, 2 x 150 pb) (Illumina Inc, USA).

O processamento e a análise dos dados foram realizados no programa Mothur v.1.39.0 (Schloss et al 2009). Inicialmente, as sequências obtidas foram atribuídas às amostras de origem a partir da sequência *index* dos oligonucleotídeos utilizados na PCR. Os *contigs* das sequências R1 e R2 geradas a partir do sequenciamento *paired-end* (Illumina, San Diego, CA) foram montados. As sequências de tamanhos menores que 150 pb e maiores que 300 pb foram eliminadas, assim como homopolímeros de tamanho acima de 8 pb e sequências com pares de bases ambíguos. Após a remoção de quimeras usando o algoritmo Uchime (Edgar et al 2011), as sequências foram alinhadas com sequências do gene rRNA 16S do banco de dados SILVA (Quast et al 2012). Sequências

com mais de 97 % de similaridade foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – OTU) utilizando o método *furthest neighbor* (Schloss e Handelsman 2005). As OTUs foram classificadas taxonomicamente a partir do banco de dados Silva (Quast et al 2012) e foram normalizadas para 20.202 (menor número de sequências obtidas entre as amostras). A cobertura das amostras foi avaliada a partir do índice de Good's, bem como representação gráfica em curva de rarefação. A abundância relativa dos grupos taxonômicos foi obtida partir da tabela de OTUs normalizada. ♀♂

RESULTADOS

O intestino médio de *S. castanea* é constituído de cinco regiões (ventrículos) denominados v1, v2, v3, v4 e v5. (Fig 1A-B). A anatomia comparada entre machos e fêmeas mostrou que o v5 é dilatado e ovalado nas fêmeas (Fig 1A-v5), enquanto nos machos apresenta-se pouco desenvolvido (Fig 1B-v5). Assim como na anatomia, a histologia e ultraestrutura das regiões v1-v4 foram semelhantes entre machos e fêmeas. Portanto, a descrição destes ventrículos será em conjunto.

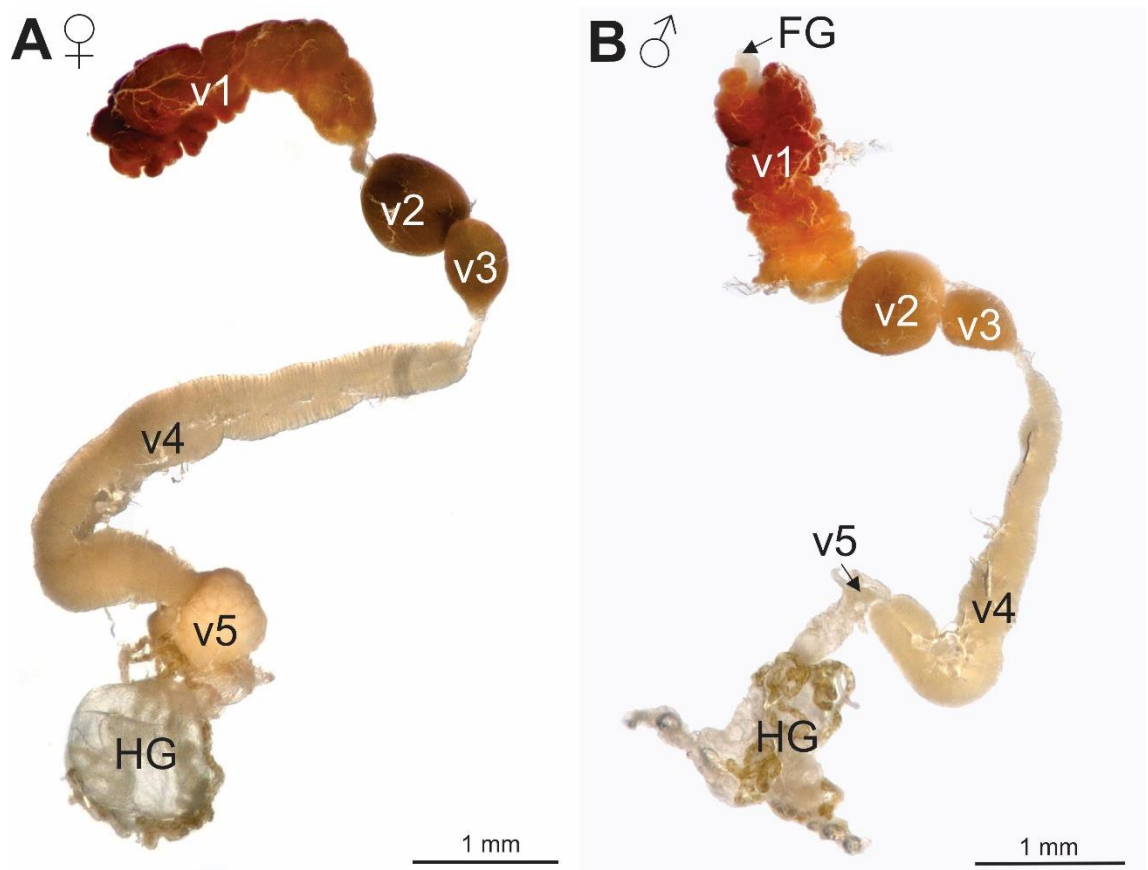


Figura 1: Anatomia do intestino médio de *Scaptocoris castanea*. A. Intestino de fêmeas mostrando os cinco ventrículos do intestino médio (v1-v5) e o intestino posterior (HG). B. Intestino de machos mostrando os cinco ventrículos (v1-v5), parte do intestino anterior (FG) e o intestino posterior (HG).

O v1 é formado por um epitélio colunar simples, com núcleo volumoso e esférico com predomínio de cromatina descondensada (Fig 2). O citoplasma é rico em grânulos escuros (Fig. 2). As células digestivas colunares do v1 mostraram núcleo rico em cromatina descondensada com grumos de cromatina condensada (Fig 3A). A superfície apical das células digestivas é associada à membrana perimicrovilar bem desenvolvida (Fig. 3A) e com microvilosidades longas contendo mitocôndrias próximas à base (Fig 3B). Os grânulos acidófilos no citoplasma foram formados por autofagossomos e lisossomos com conteúdo elétron-denso (Fig 3A, 3C). A superfície basal estava sobre

uma fina lâmina basal e apresentou muitas invaginações da membrana plasmática formando canais extracelulares curtos e alargados (Fig 3D).

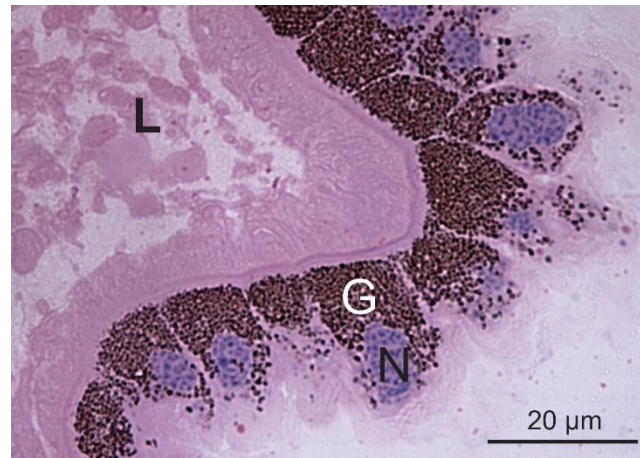


Figura 2: Secção histológica do ventrículo 1 do intestino médio de *Scaptocoris castanea*. Epitélio colunar envolvendo o lúmen (L) com núcleos esféricos (N) com grumos de cromatina condensada. O citoplasma é preenchido por grânulos de coloração escura (G).

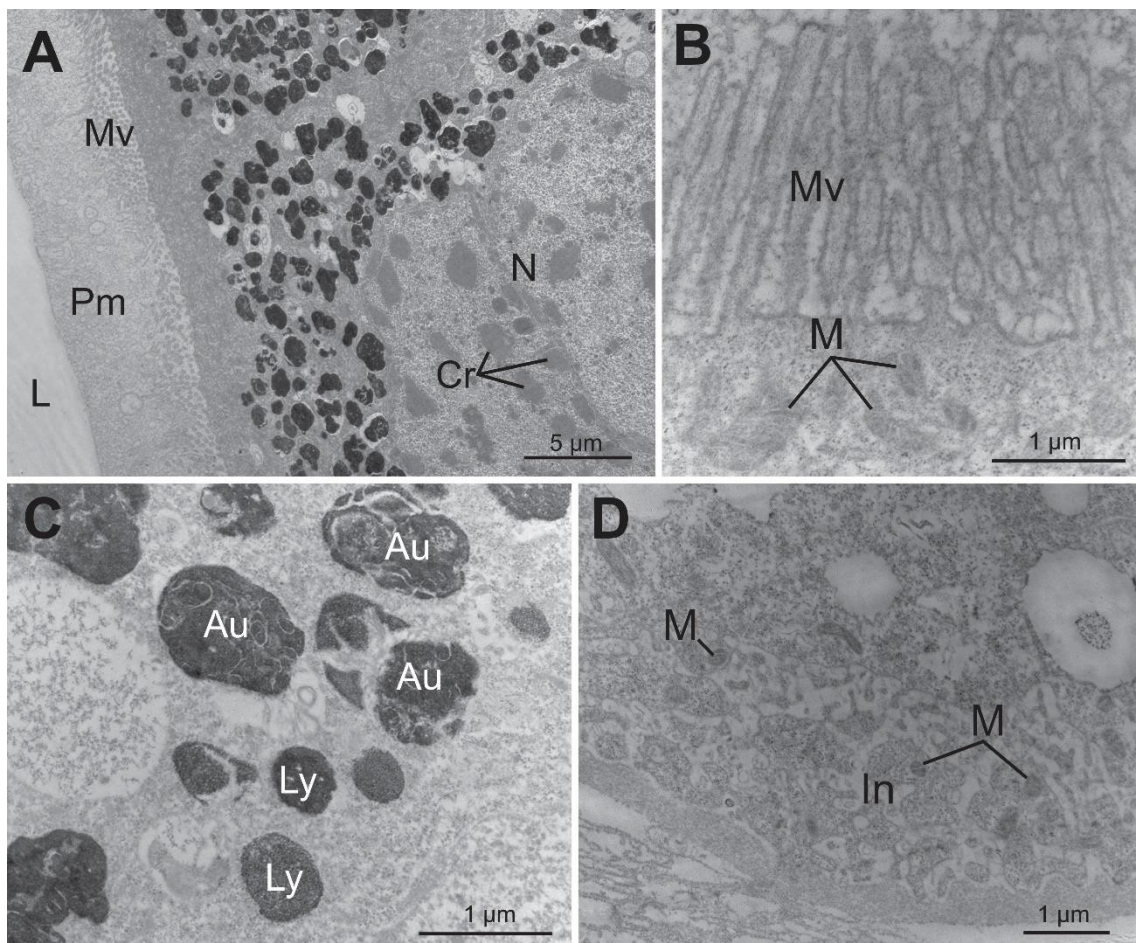


Figura 3: Ultraestrutura do ventrículo 1 de *Scaptocoris castanea*. A. Visão geral mostrando núcleo (N) contendo grumos de cromatina condensada (Cr). Porção apical caracterizada pela presença de microvilosidades (Mv). Nota-se uma camada de membrana perimicrovilar (Pm) revestindo o lúmen (L). B. Detalhe da porção apical mostrando longas microvilosidades (Mv) e logo abaixo uma camada de mitocôndrias (M). C. Citoplasma contendo autofagossomos (Au) e lisossomos (Ly). D. Porção basal mostrando longas dobras da membrana basal (In) contendo pequenas mitocôndrias (M).

No v2 o epitélio é cúbico simples, com núcleo esférico e citoplasma com muitos grânulos mais acidófilos do que em v3 (Fig 4). As células digestivas cúbicas do v2 tiveram a superfície apical com microvilosidades longas e mitocôndrias alongadas no citoplasma adjacente (Fig 5A). Os grânulos fracamente acidófilos observados nas análises histológicas foram caracterizadas por esferocristais de diferentes elétrons-densidades (Fig 5B-C). Alguns autofagossomos foram encontrados entre os esferocristais (Fig. 5C). A porção basal das células foi caracterizada por dobras da membrana plasmática basal (Fig 5D) com aberturas para a hemocele.

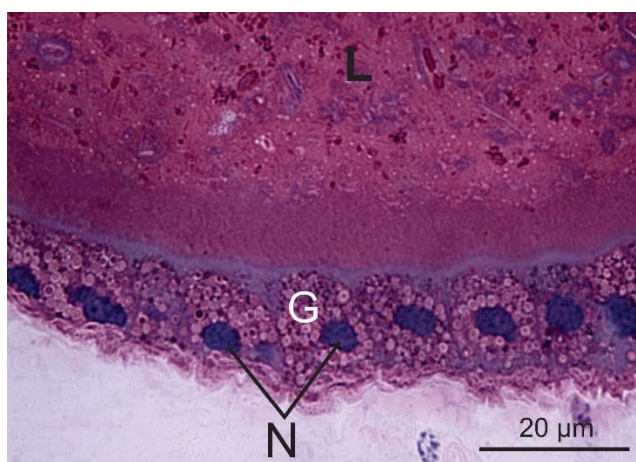


Figura 4: Secção histológica do ventrículo 2 do intestino médio de *Scaptocoris castanea*. Epitélio cúbico simples e delimita o lúmen (L), com núcleos esféricos (N) e citoplasma contém grânulos de coloração acidófila (G).

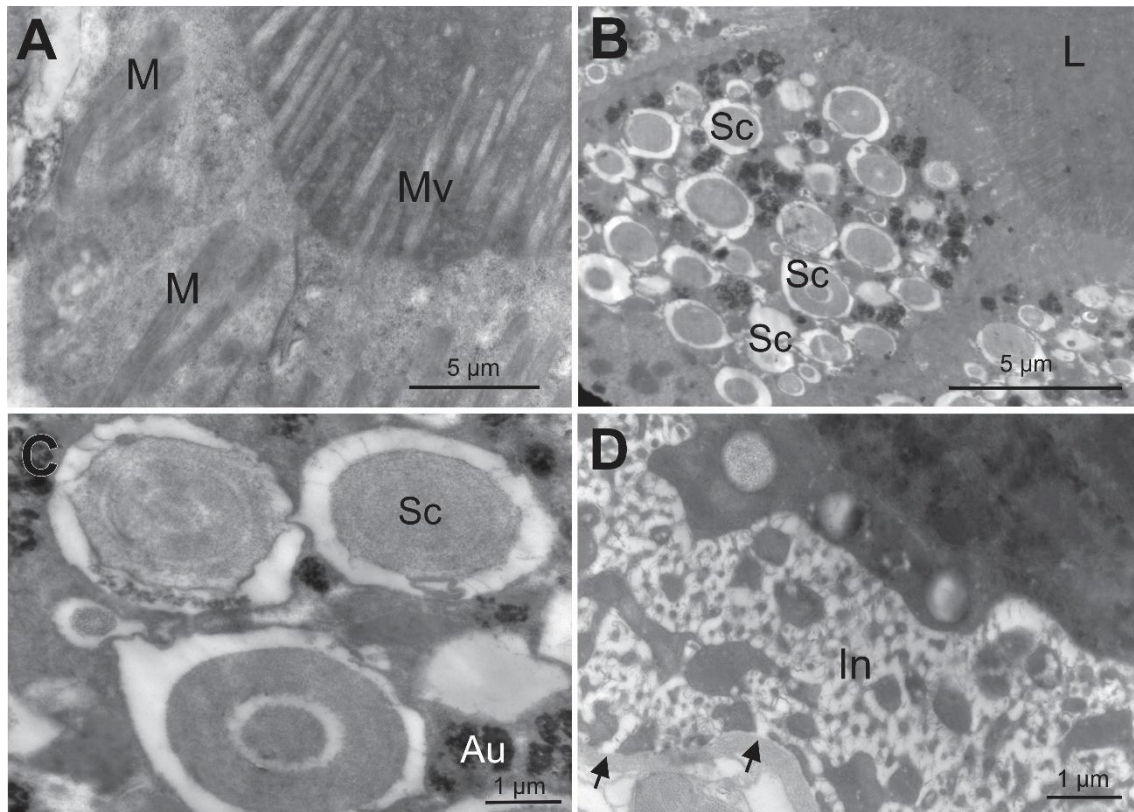


Figura 5: Ultraestrutura do ventrículo 2 de *Scaptocoris castanea*. A. Porção apical caracterizada por longas microvilosidades (Mv), e logo abaixo estão presentes mitocôndrias alongadas (M). B. Visão geral. Uma camada de células revestem o lúmen (L). Cada célula contém um núcleo com grumos de cromatina condensada (N) e muitos esferocristais (Sc). C. O citoplasma é composto por esferocristais de diferentes eletrondensidades (Sc) e autofagossomos (Au). D. Detalhe da porção basal contendo dobras de membrana (In) com aberturas para a hemocele (setas).

O v3 foi caracterizado por epitélio cúbico simples com citoplasma fracamente acidófilo com núcleo volumoso com alguns grumos de cromatina condensada (Fig 6A e 7A). A superfície apical tem microvilosidades bem desenvolvidas e o citoplasma adjacente com muitas mitocôndrias (Fig 7B). No citoplasma ocorreram grânulos com diferentes elétrondensidades (Fig 7A) formados por lisossomos e esferocristais (Fig 7C). Na região basal da célula digestiva, as invaginações da membrana plasmática formaram canais amplos e longos (Fig 7D).

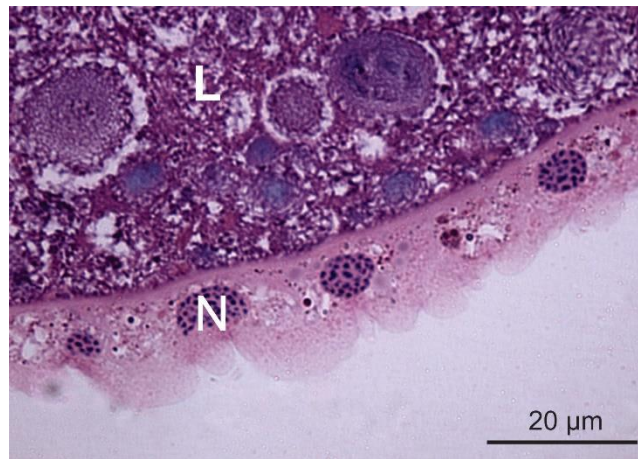


Figura 6: Secção histológica do ventrículo 3 do intestino médio de *Scaptocoris castanea*. Epitélio simples e alongado com núcleos esféricos contendo grumos de cromatina condensada (N). Citoplasma fracamente acidófilo. Lumen (L).

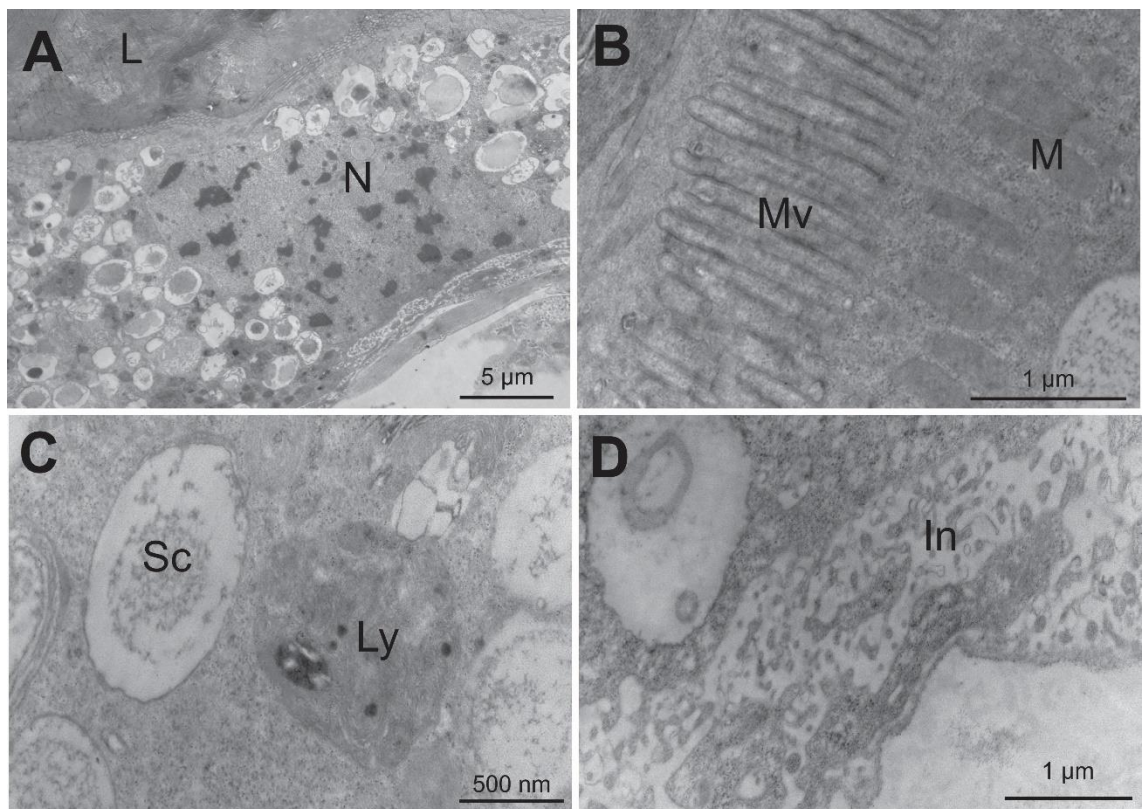


Figura 7: Ultraestrutura do ventrículo 3 de *Scaptocoris castanea*. A. Visão geral mostrando núcleo volumoso (N). B. A porção apical contém microvilosidades (Mv) com mitocôndrias associadas (M). C. Citoplasma preenchido por muitos esferocristais (Sc) e lisossomos (Ly). D. Dobras de membrana (In) encontradas na porção basal.

O v4 do intestino médio foi formado por um sincício alongado contendo um lúmen estreito, membrana basal pregueada, com células altas mostrando citoplasma homogeneamente acidófilo, enquanto os núcleos foram periféricos e achatados (Fig 8). O citoplasma teve pequenas estruturas acidófilas caracterizadas como sendo autofagossomos (Fig 8B) e mitocôndrias (Fig 8C) quase que totalmente preenchendo o citoplasma destas células (Fig 9A-B). O núcleo é volumoso e um restrito citoplasma perinuclear contendo algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Fig 9C).

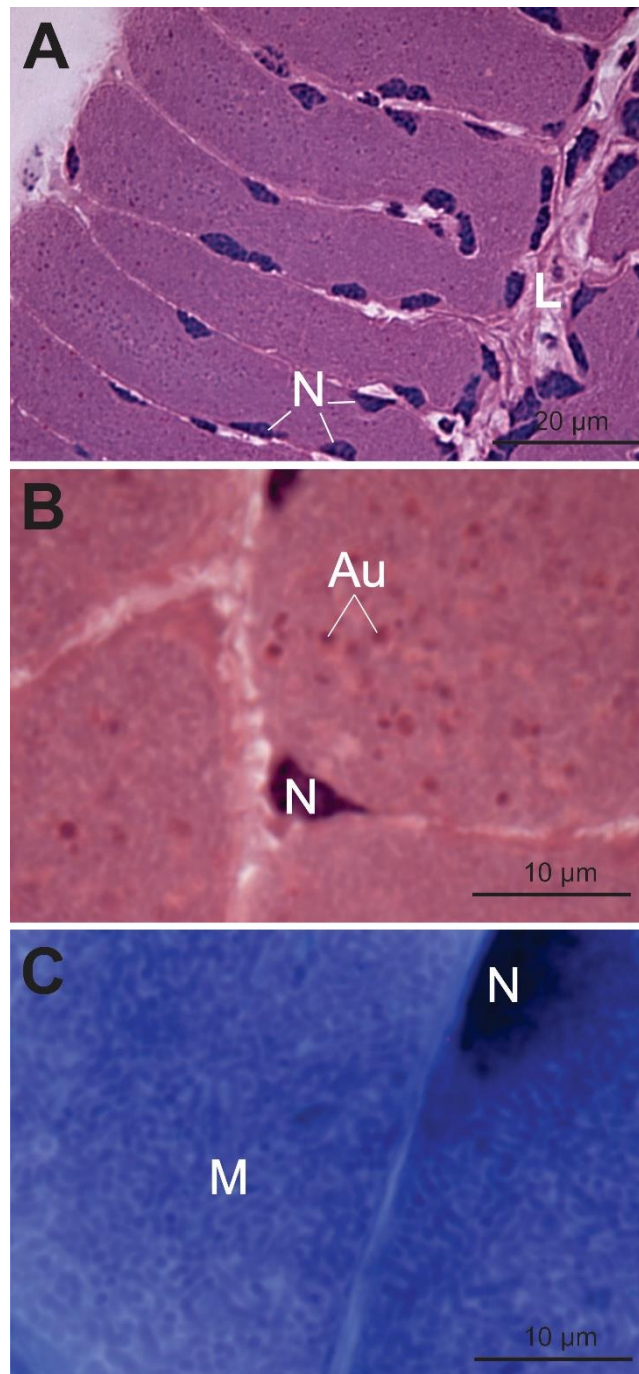


Figura 8: A. Secção histológica do ventrículo 4 do intestino médio de *Scaptocoris castanea*. Sincício alongado com muitas dobras da membrana basal contendo núcleos periféricos (N) e citoplasma intensamente acidófilo. O lúmen é estreito (L). B-C O citoplasma possui muitos autofagossomos acidófilos (Au) e mitocôndrias (M).

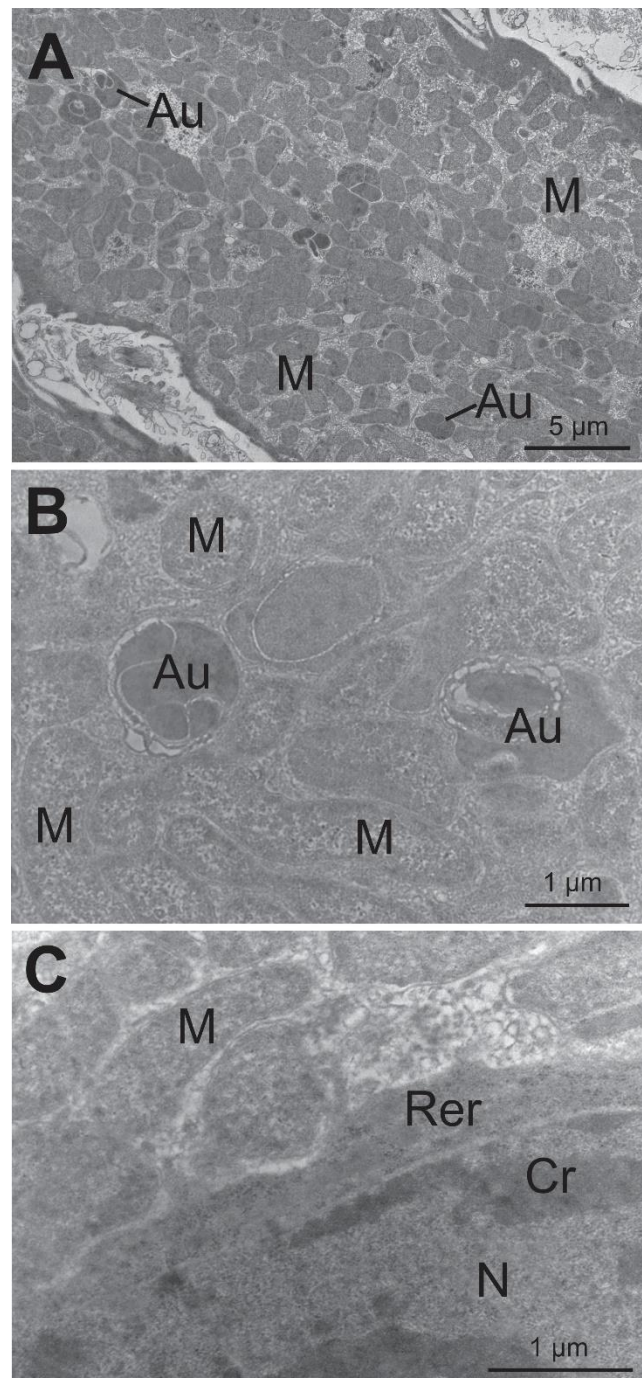


Figura 9: Ultraestrutura do ventrículo 4 de *Scaptocoris castanea*. A. Visão geral. O citoplasma contém muitas mitocôndrias e autofagossomos (Au). B. Citoplasma

preenchido por mitocôndrias (M) e autofagossomos (Au) C. Detalhe da região perinuclear. O núcleo (N) contém grumos de cromatina condensada (Cr) e é envolto por retículo endoplasmático rugoso (Rer). Nota-se mitocôndrias em seções longitudinais (M). A e B Coloração por HE. C. Coloração por Azul de toluidina.

Apesar dos ventrículos 1 a 4 em machos e fêmeas terem ultraestrutura semelhantes, o v5 mostrou uma diferença singular em *S. castanea*. O v5 nos machos foi pequeno e tubular, formado por células cúbicas com núcleo central com grumos de cromatina condensada e o citoplasma foi fracamente acidófilo (Fig 10A). Nas fêmeas, o v5 foi bem desenvolvido com formato ovalado (Fig 10B). As células desta região nas fêmeas eram grandes e alongadas delimitando um estreito lúmen (Fig 10B), o citoplasma foi preenchido por grânulos fortemente basófilos (Fig 10C) de natureza protéica (Fig 10D) conectados por filamentos finos. Os núcleos deslocados para a periferia tiveram predomínio de cromatina descondensada (Fig 10C-D).

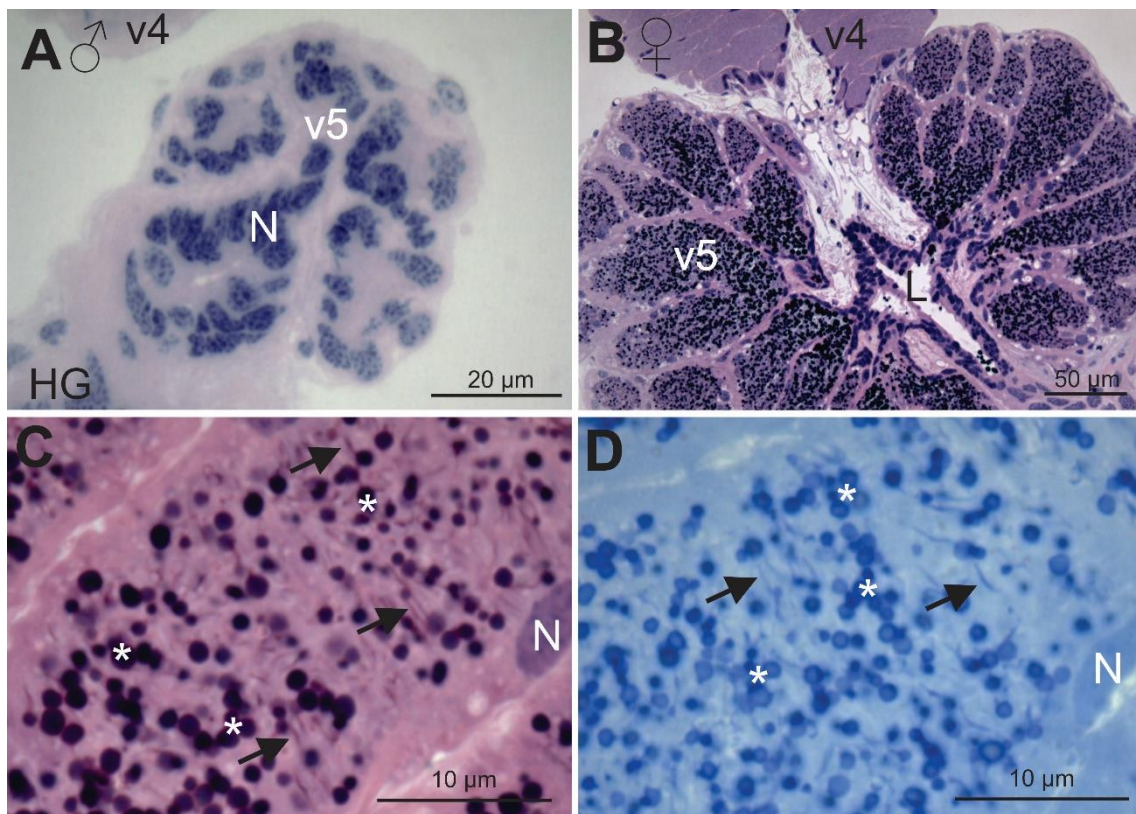


Figura 10: Secções histológicas do quinto ventrículo intestinal de *Scaptocoris castanea*. A. Ventrículo 5 de machos. O ventrículo 5 fica entre o v4 e o intestino posterior (HG) caracterizado por um pequeno grupo de células com núcleos centrais contendo grumos de cromatina condensada e citoplasma fracamente corado. B-D. O ventrículo 5 de fêmeas é um bacteriócito, estrutura adaptada para abrigar microrganismos simbiotes. B. Visão geral mostrando a transição entre os ventrículos 4 (v4) e 5. Lúmen (L) é estreito e circundado por células epiteliais alongadas. C-D. Detalhe de uma célula de v5 contendo grânulos basófilos e de natureza protéica (*), conectados por finos filamentos (setas). O núcleo é periférico (N).

A ultraestrutura do v5 dos machos de *S. castanea* mostrou que as células tinham microvilosidades apicais curtas e citoplasma com mitocôndrias associadas às dobras basais (Fig 11 A). A região basal teve largas dobras da membrana plasmática formando canais extra-celulares longos e dilatados, associados à mitocôndrias e núcleo com cromatina condensada (Fig 11B).

Nas fêmeas, as células do v5 do intestino médio foram quase que totalmente preenchidas por bactérias intracelulares com diferentes elétrons-densidades (Fig 12A) e a presença de algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Fig 12B).

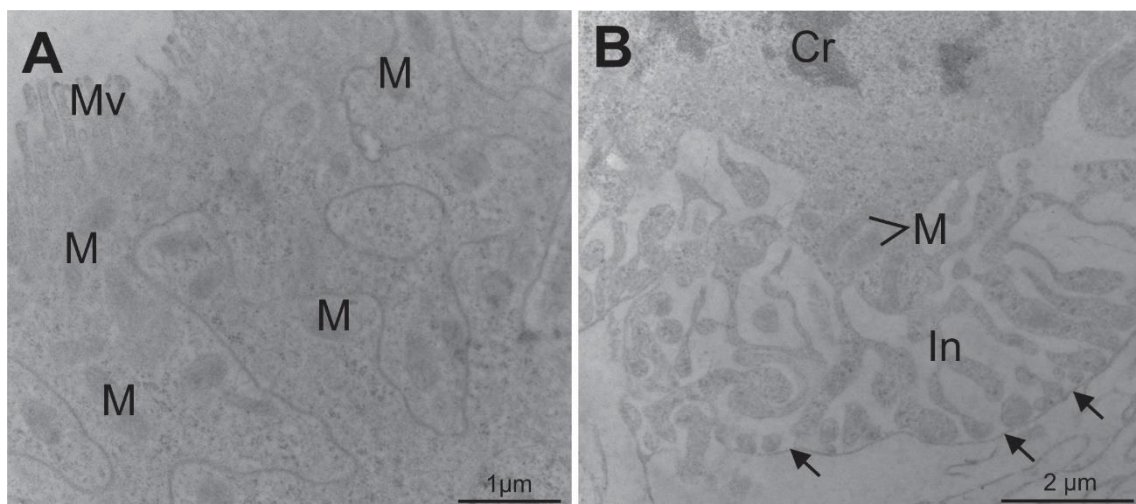


Figura 11: Ultraestrutura do ventrículo 5 de machos de *Scaptocoris castanea*. A. Corte transversal da superfície apical mostrando pequenas microvilosidades (Mv) e mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma (M). B. A base destas células possuem largas dobras basais (In) com canais extracelulares (setas). Mitocôndrias (M). Núcleo com grânulos de cromatina condensada (Cr).

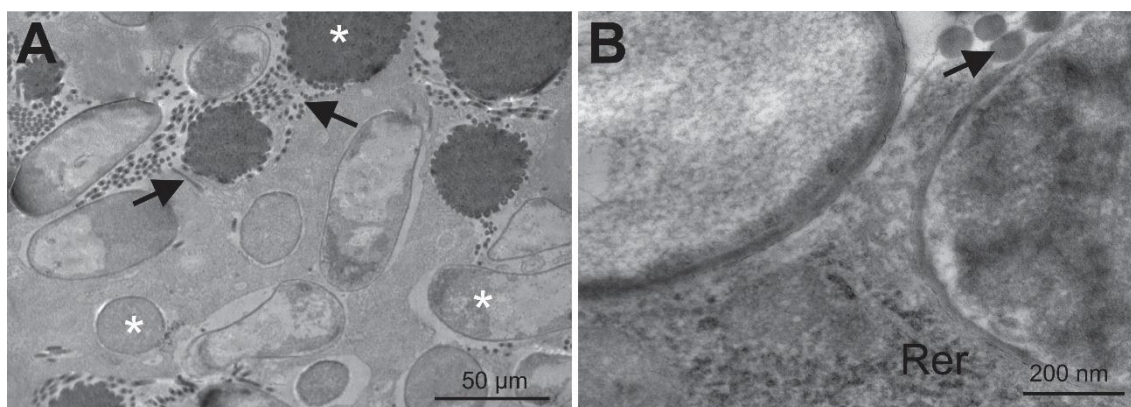


Figura 12: Ultraestrutura do bacteriócito (ventrículo 5) de fêmeas de *Scaptocoris castanea*. A. Citoplasma do epitélio do ventrículo 5 mostrando variedade de bactérias intracelulares (*) e pilli sexual em seção transversal e longitudinal (setas). B. Detalhe de duas bactérias e do retículo endoplasmático rugoso (Rer) e pilli sexual em corte transversal (seta).

Uma vez identificada a ocorrência de bactérias nas células do v5 de fêmeas de *S. castanea*, estas foram submetidas ao sequenciamento do rRNA 16S. No total, foram obtidas 85.761 sequências brutas com comprimento mínimo de 152 pb, máximo de 300 pb e média de comprimento 253 pb em todas as amostras. Após o ajuste, filtro de qualidade e remoção de quimeras, 72.026 (média 24.009 ± 6.503 das amostras) sequências foram obtidas (Tabela 1).

O índice de Good's foi $> 99\%$ para todas as amostras e a curva de rarefação demonstrou que todas as amostras atingiram o platô, indicando que o esforço de sequenciamento foi suficiente para cobrir a diversidade bacteriana (Tabela 1 e Figura 13).

Tabela 1: Dados do sequenciamento do gene 16S rRNA para caracterização da comunidade bacteriana do ventrículo 5 de fêmeas de *Scaptocoris castanea*.

	Índice de Good's	Depois da trimagem		Depois da normalização	
		Sequências	OTUs	Sequências	OTUs
Amostra 1	$> 0,99$	31.517	69	20.202	69
Amostra 2	$> 0,99$	20.202	44	20.202	44
Amostra 3	$> 0,99$	20.307	50	20.204	50

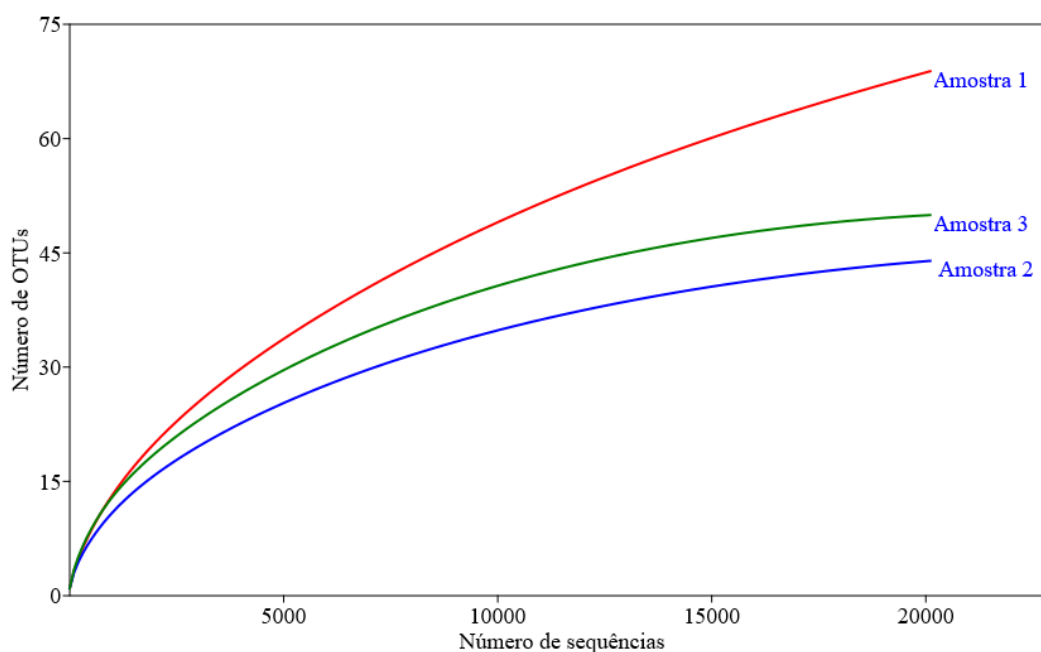


Figura 13: Curva de rarefação do sequenciamento do gene 16S rRNA para caracterização da comunidade bacteriana do ventrículo 5 de fêmeas de *Scaptocoris castanea*.

A análise taxonômica da comunidade bacteriana revelou 94 OTUs (Média 54 ± 13 por amostra após normalização) que foram identificados em cinco filos, nove classes, 15 ordens, 28 famílias e 47 gêneros (Fig 14). Aproximadamente $24,45 (\pm 1,64 \%)$, $24,45$

($\pm 1,64$ %), 55,23 ($\pm 3,73$ %) das OTUs não foram classificadas para nenhuma ordem, família e gênero, respectivamente.

Proteobacteria representou o filo predominante com abundância relativa de 56,33 ($\pm 3,94$ %), seguido de Firmicutes (33,28 $\pm 6,75$ %) e Bacteroidetes (8,96 $\pm 4,10$ %). A classe Gammaproteobacteria foi a mais representativa com 50,88 $\pm 4,00$ % das amostras, com 20,22 $\pm 3,73$ % na família Enterobacteriaceae (Tabela 1).

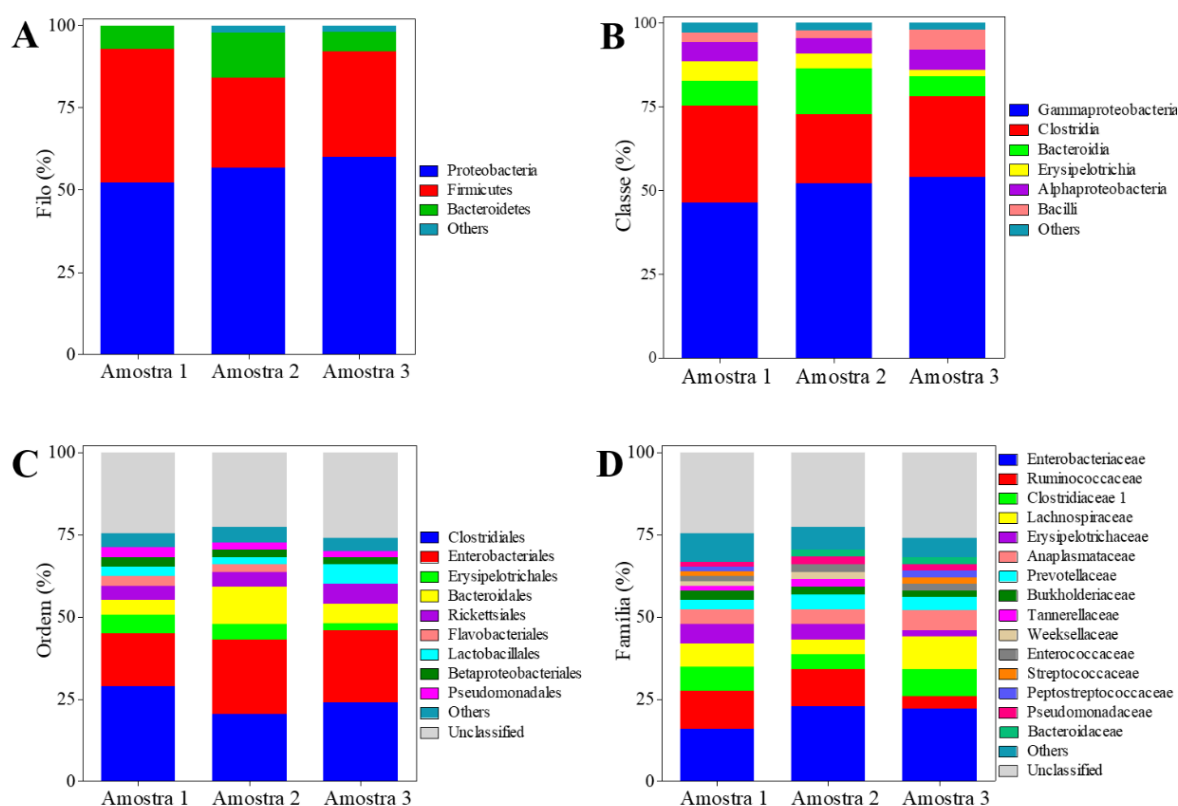


Figura 14: Composição bacteriana em nível de filo (A), classe (B), ordem (C) e família (D) nas amostras sequenciadas do ventrículo 5 das fêmeas de *S. castanea*.

Tabela 2: Composição taxonômica da comunidade bacteriana do ventrículo 5 de fêmeas de *Scaptocoris castanea*. “Outros” correspondem a soma dos taxa que foram observados em apenas uma das amostras.

Nível Hierárquico	Taxa	Abundância relativa (%)
Filo	Proteobacteria	56,33 ± 3,94
	Firmicutes	33,28 ± 6,75
	Bacteroidetes	8,96 ± 4,10
	Outros	1,42 ± 1,24
Classe	Gammaproteobacteria	50,88 ± 4,00
	Clostridia	24,48 ± 4,29
	Bacteroidia	8,96 ± 4,10
	Alphaproteobacteria	5,45 ± 0,79
	Erysipelotrichia	4,11 ± 1,93
	Bacilli	3,72 ± 2,00
	Outros	2,39 ± 0,46
Ordem	Clostridiales	24,48 ± 4,29
	Enterobacteriales	20,22 ± 3,73
	Bacteroidales	7,24 ± 3,67
	Rickettsiales	4,96 ± 0,90
	Erysipelotrichales	4,11 ± 1,93
	Lactobacillales	3,72 ± 2,00
	Betaproteobacteriales	2,39 ± 0,46
	Pseudomonadales	2,39 ± 0,46
	Flavobacteriales	1,72 ± 1,53
	Outros	4,30 ± 0,28
	Não classificados	24,45 ± 1,64
Família	Enterobacteriaceae	20,22 ± 3,73
	Ruminococcaceae	8,99 ± 4,32
	Lachnospiraceae	7,26 ± 2,73
	Clostridiaceae 1	6,60 ± 1,82
	Anaplasmataceae	4,96 ± 0,90
	Erysipelotrichaceae	4,11 ± 1,93
	Prevotellaceae	3,81 ± 0,84
	Burkholderiaceae	2,39 ± 0,46
	Enterococcaceae	1,91 ± 0,42
	Pseudomonadaceae	1,91 ± 0,42
	Bacteroidaceae	1,42 ± 1,24
	Tannerellaceae	1,24 ± 1,15
	Weeksellaceae	1,24 ± 1,15
	Streptococcaceae	1,15 ± 1,03
	Peptostreptococcaceae	1,15 ± 1,03
	Outros	7,17 ± 1,38
	Não classificados	24,45 ± 1,64
Gênero	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	4,96 ± 0,90
	<i>Wolbachia</i>	4,96 ± 0,90
	<i>Prevotella 9</i>	3,06 ± 0,87

<i>Enterococcus</i>	1,97 ± 0,42
<i>Ruminococcus 2</i>	1,91 ± 0,42
<i>Ralstonia</i>	1,91 ± 0,42
<i>Escherichia-Shigella</i>	1,91 ± 0,42
<i>Pseudomonas</i>	1,91 ± 0,42
<i>Bacteroides</i>	1,42 ± 1,24
<i>Parabacteroides</i>	1,24 ± 1,15
<i>Chryseobacterium</i>	1,24 ± 1,15
<i>Faecalibacterium</i>	1,24 ± 1,15
<i>Catenibacterium</i>	1,24 ± 1,15
<i>Romboutsia</i>	1,15 ± 1,03
<i>Turicibacter</i>	1,15 ± 1,03
Outros	13,56 ± 0,48
Não classificados	55,23 ± 3,73

DISCUSSÃO

O intestino médio dos insetos fitófagos sugadores é adaptado à sua dieta líquida com o alimento levando pouco tempo para atravessar o intestino. Em *S. castanea* o intestino médio é longo e dividido em cinco ventrículos bem definidos, provavelmente para otimizar a digestão, tornando fácil a diferenciação de cada um dos ventrículos. Em *Triatoma infestans* Klug, 1835 o intestino médio possui quatro ventrículos (Burgos e Gutiérrez 1976), assim como em *Dysdercus peruvianus* (Silva et al 1995) e três ventrículos em *Cimex hemipterus* Fabricius, 1803 (Azevedo et al 2009).

Os cinco ventrículos de *S. castanea* tem diferenças ultraestruturais, sugerindo diferentes funções/especializações entre eles. No v1 as células são ricas em autofagossomos, tendo o ápice com microvilosidades longas e a membrana plasmática basal com dobras largas a com mitocôndrias associadas, morfologia semelhante à do intestino médio de *Coptosoma scutellatum* Geoffroy, 1785 (fitófago), *Nabis rugosus* Linnaeus, 1758 e *Himacerus apterus* Fabricius, 1789 (zoófagos) mostrando que a ultraestrutura pode aparentar similaridades estruturais dentro do mesmo grupo independente do hábito alimentar (Santos et al 2017). A presença dos muitos autofagossomos indica que há alta atividade de reciclagem de componentes celulares (Couch e Mills 1967) o que caracteriza um órgão com metabolismo intenso.

O v1 parece ainda ter função no transporte de água e íons e absorção de nutrientes, indicada pelas largas dobras basais e pelas microvilosidades apicais (Silva et al 1995, Azevedo et al 2009, Santos et al 2017). A absorção de água nos Hemiptera depende da transferência da água do lúmen para as células do intestino médio gerando um gradiente osmótico usado como força motriz para o transporte transmembrana de compostos e íons através de simportes apropriados na membrana apical e na membrana perimicrovilar. A absorção de água ocorre quando Mg^{2+} -ATPase e Na^+K^+ -ATPase associadas com as membranas perimicrovillares e microvillares estão envolvidas com o transporte ativo de íons do lúmen e espaço perimicrovilar para as células do intestino médio (Albuquerque-Cunha et al 2009). Com isso ocorre também a absorção de compostos orgânicos, como açúcares e aminoácidos através de carreadores uniportes ou ácido-cátion simportes proteicos presentes na membrana perimicrovilar (Terra et al 2006).

Para a entrada da água nas células do intestino médio, as dobras basais que estão em contato direto com a hemolinfa constituem um compartimento extracelular que tem acesso restrito à hemolinfa, permitindo a concentração de solutos nesta área gerando um gradiente osmótico em relação ao lúmen, o que promove a absorção de água (Cavalcante e Cruz-Landim 1999, Terra et al 2006). A associação das dobras basais com mitocôndrias, como observado no v1 de *S. castanea*, permite transporte ativo de água intracelular para a hemolinfa (Burgos e Gutiérrez 1976). Em *D. peruvianos* o v1 é responsável pela digestão de carboidratos e pela absorção de água (Silva et al 1995).

Os ventrículos v2 e v3 de *S. castanea* tem ultraestrutura similar, com longas microvilosidades apicais com muitas mitocôndrias enfileiradas no citoplasma apical, citoplasma com muitos esferocristais e alguns lisossomos e região basal com dobras da membrana plasmática formando compartimentos largos. Esta ultraestrutura foi similar ao intestino médio anterior do percevejo *C. hemipterus* (Azevedo et al 2009). A organização

enfileirada das mitocôndrias abaixo da borda estriada apical indica troca metabólica com transporte ativo (Burgos e Gutiérrez 1976).

Os esferocristais são grânulos citoplasmáticos esféricos no qual o conteúdo mineral assume a forma de laminação concêntrica e são encontrados em células de diferentes órgãos de invertebrados (Pinheiro et al 2008). Nos insetos, eles são comumente encontrados no intestino médio (Azevedo et al 2009, Guedes et al 2007, Del Bene et al 1991, Santos et al 2017) e nos túbulos de Malpighi (Gonçalves et al 2018). Eles ocorrem em Heteroptera com hábitos alimentares fitófagos, zoófagos (Santos et al 2017) e hematófagos (Azevedo et al 2009). Pinheiro e colaboradores (2008) mostraram a prevalência dos esferocristais na porção anterior do intestino médio de *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794, assim como ocorre em *S. castanea*. Apesar da função dos esferocristais não estar completamente esclarecida, estudos sugerem que tenham função de absorção e estoque de substância como íons fosfato de cálcio, magnésio e potássio, ácido úrico, ferro, cádmio, proteínas e polissacarídeos (Lehane e Billingley 1996, Guedes et al 2007) tendo papel importante na homeostase iônica (Terra et al 2006). Também podem estar relacionados à excreção de íons e detoxificação, principalmente de metais pesados (Gonçalves et al 2018); servem como indicativo de ingestão de comida e podem ser decorrentes da idade dos insetos (Sohal et al 1977).

A presença de membrana perimicrovilar em v3 pode indicar que há digestão de proteínas e carboidratos nesta região, pois na maioria dos Hemiptera existem enzimas digestivas integrais na membrana perimicrovilar, como aminopeptidase, fosfatase alcalina, carboxipeptidase, dipeptidase e α -glucosidase (Terra et al 2006). Todo intestino médio pode apresentar atividade enzimática envolvida na digestão; estas atividades variam de acordo com a espécie e com a região do intestino. Em *Brontocoris tabidus* Signoret 1863, a atividade de tripsina está presente em todas as regiões, amilase nas regiões anterior e posterior com baixa atividade na porção média do intestino médio, e a

atividade de lipase foi significativa apenas na região anterior (Guedes et al 2007). A similaridade na ultraestrutura de v2 e v3 de *S. castanea* indicam que estas regiões compartilham as funções de absorção de nutrientes e homeostase iônica.

No v4 de *S. castanea*, não foram observados limites entre células adjacentes caracterizando esta região como um sincício, descrito pela primeira vez no intestino de Hemiptera, cuja ultraestrutura sugere função na absorção de nutrientes por transporte ativo, absorção de íons e produção de proteínas, visto que foi rico em mitocôndrias, e presença de núcleos desenvolvidos circundados por cisternas de retículo endoplasmático rugoso. A formação de sincícios ricos em mitocôndrias é comum nas papilas anais de mosquitos com a função de osmorregulação (Edwards e Harrison 1983), o que poderia estar acontecendo no v4 de *S. castanea*, pois por se alimentar de seiva que é composta por pequenas quantidades de aminoácidos, açúcares e íons, as mitocôndrias seriam as responsáveis por fornecer energia na forma de ATP para o transporte ativo destas substâncias. A intensa atividade metabólica das mitocôndrias pode resultar na formação de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo no órgão, o que induz o processo de autofagia como uma via de reciclagem de compostos celulares (Scherz-Shouval et al 2007, Chen et al 2009) e de sobrevivência das células (Madeo et al. 2015).

O v5 apresentou diferenças marcantes na morfologia celular entre machos e fêmeas, o que indica diferentes funções dessa região intestinal para esses insetos. Nos machos, as células possuem superfície apical com microvilosidades, citoplasma com mitocôndrias e membrana plasmática basal com dobras longas e com muitas aberturas para hemocele. A presença destas longas dobras na membrana basal das células de v5 de machos, assim como nas regiões posteriores do intestino médio de insetos, indicam função o transporte de água da hemolinfa para a célula, fluxo contrário do que observado nas regiões anteriores do intestino médio (Fialho et al 2013). Enquanto nas fêmeas, o v5 é formado por um grande bacteriócito, capaz de abrigar muitas bactérias intracelulares.

Desta forma, este é o primeiro relato de dimorfismo sexual no intestino médio de Hemiptera.

A ocorrência de bacteriócitos no v5 de fêmeas de *S. castanea*, indica uma possível necessidade de complementação nutritiva nestes insetos. A seiva tem em sua composição mais carboidratos do que aminoácidos, sendo que a proporção de aminoácidos essenciais para os não essenciais chegam a 1:20 (Douglas 2006). E esta proporção não é suficiente para o desenvolvimento do fitófago. Para compensar uma dieta pobre em nutrientes estima-se que 10% dos insetos se beneficiam de associações com microorganismos que geram para os mesmos nutrientes para o crescimento e na reprodução (Chapman 2013).

Nos Hemiptera, os microrganismos associados no intestino dos afídeos são os mais estudados. A bactéria simbiote *Buchnera aphidicola*, uma gammaproteobactéria, que ao longo da evolução perdeu a capacidade de sintetizar aminoácidos não essenciais e apesar do seu pequeno genoma, tem genes que codificam a maioria das enzimas da via biossintética para aminoácidos essenciais (Douglas 2006, Moran 2007). Dentro de Heteroptera bactérias simbiotes são encontradas no intestino de Cimicomorpha e Pentatomomorpha, principalmente em criptas da região posterior do intestino médio (revisão em Kikuchi 2009).

No v5 de fêmeas de *S. castanaea*, o gênero *Wolbachia* foi o segundo mais abundante. Essas bactérias são comumente encontradas nos Arthropoda, sendo intracelulares obrigatórios e herdadas matematicamente, conhecidos por influenciar o fitness do hospedeiro, incluindo longevidade, fertilidade e fecundidade (Clark 2007). Elas estão presentes nos ovários da cigarrinha *Laodelphax striatellus* Fallén, 1826, contribuindo para o aumento da fecundidade (Guo et al 2018). *Wolbachia* pode atuar como parasita reprodutivo, manipulando a biologia reprodutiva do hospedeiro para aumentar sua própria transmissão, através da feminização, partenogênese, na morte dos machos ou impossibilitar os machos infectados de fertilizar ovos (Ambika e Rajagopal 2018).

Outra bactéria presente no v5 de *S. castanea* é *Ralstonia* sp, que tem sido reportada como agente causador da doença murcha bacteriana em mais de 200 famílias de plantas (Chen et al 2019), incluindo as culturas de batata, arroz, trigo, (Elazouni et al 2019) e amendoim (Wang et al 2018), sugerindo que o percevejo castanho pode ser um potencial vetor desta doença, o que torna esta praga um importante alvo para pesquisas sobre seu controle populacional e reprodução.

Apesar da microbiota em Hemiptera ser bem estudada, este é o primeiro trabalho que mostra um dimorfismo sexual em intestino de insetos desta ordem, evidenciado pela presença de um bacteriócito em fêmeas de *S. castanea*. Essa região intestinal foi capaz de abrigar diversos tipos de bactérias. Identificamos que além das gammaproteobactérias, o bacteriócito abriga membros da família Enterobacteriaceae, e os gêneros *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clotridium*. Tais microrganismos são conhecidos pelo papel de fixação simbiótica do nitrogênio gasoso e que podem ser importantes para a nutrição dos Arthropoda (Nardi et al 2002). Como a produção de ovos envolve alocação de muita energia e proteína (Fowler e Partridge 1989, Yanagi e Miyatake 2003, Toh et al 2006), a associação com simbiontes por parte das fêmeas pode ter sido favorável, no sentido de garantir a produção de ovos, e como consequência manter o *fitness* reprodutivo. Assim sugerimos que os microrganismos encontrados em *S. castanea* podem estar associados na produção de vitaminas e aminoácidos essenciais, sendo esses utilizados para viabilizar a reprodução.

Nos bacteriócitos de *S. castanea* ocorrem filamentos ligando as bactérias, estruturas denominadas pili sexuais. Estas estruturas nas bactérias têm função de possibilitar a transferência genica entre os indivíduos, aumentando assim a variabilidade das bactérias. Além disso, os pili sexuais podem atuar na transferência direta de aminoácidos entre a comunidade bacteriana em ambiente pobre em nutrientes (Pande et al 2014), como é o caso da seiva que tem poucos aminoácidos essenciais em sua

composição. Supomos que as bactérias são transmitidas para a prole através de uma transferência vertical dos microrganismos, as fêmeas colocam os ovos e os contaminam com um pouco de bactérias e quando a ninfa eclode, os ovos são sua primeira fonte de alimento, como sugerido para ocorrer em outros insetos (Toh et al 2006, Moran 2007, Kikuchi 2009).

Os resultados aqui obtidos indicam que *S. castanea* assim como outros Hemiptera fitófagos está adaptado a uma dieta de seiva pobre em nutrientes e muito diluída com o intestino médio especializado na absorção de nutrientes e no transporte de água com a finalidade de concentrar o alimento diluído. Além disso, é demonstrado pela primeira vez dimorfismo sexual no intestino médio de Heteroptera. Por fim, o ventrículo 5 de *S. castanea* pode ser foco de novas pesquisas como alvo de estratégias no controle biológico dessas fêmeas de hábito subterrâneo que atacam lavouras de soja, algodão e pastagem.

AGRADECIMENTOS: Esta pesquisa foi fomentada pelas agências brasileiras de pesquisa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Brazil). Os autores agradecem Ms. José Carlos Gomes de Araújo, Ms. Gabriel dos Santos Carvalho and Fabiano Gonçalves Schimmer pela ajuda nas coletas dos insetos nas lavouras de soja e à Dra. Lucia M. Vivan pela identificação dos insetos e ao Dr. André Rodrigues pelas fotografias da anatomia do intestino. Nós agradecemos à Dra. Luanda M. Santana pela revisão do manuscrito. Nós somos gratos ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque-Cunha JM, Gonzalez MS, Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Almeida JCA, Souza W, Nogueira NFS. 2009. Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Arthropod structure & development*. 38:31-44.
- Ambika S, Rajagopal R. 2018. Lumen anatomy and localization of *Wolbachia* sp. in the thrips, *Plicothrips apicalis* (Bagnall). *Current science*. 115: 1297-1304.
- Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L. (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic microbial ecology* 75: 129–137
- Azevedo DO, Neves CA, Mallet JRS, Gonçalves TCM, Zanuncio JC, Serrão JE. 2009. Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology*. 46 (3): 435- 441.
- Burgos MH, Gutiérrez LS. 1976. The intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut. *Journal of ultrastructure research*. 57 (1): 1-9.
- Cavalcante VM, Cruz-Landim C. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: A review. *Naturalia*. 24: 19-40.
- Chapman RF. 2013. *Insects: structure and function*, 5. Edn. Cambridge University Press, New York.
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB. 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differentiation*, 16: 1040-1052
- Chen J, Mao S, Xu Z, Ding W. 2019. Various antibacterial mechanisms of biosynthesized copper oxide nanoparticles against soilborne *Ralstonia solanacearum*. *Royal society of chemistry advances*. 9: 3788-3799.
- Clark ME. 2007. *Wolbachia* symbionts in Arthropods. *Wolbachia: a bug's life in another bug*. Karger, Basel (Switzerland).

- Couch EF, Mills RR. 1967. The midgut epithelium of the american cockroach: acid phosphomonoesterase activity during the formation of autophagic vacuoles. *Journal of insect physiology*. 14: 55-62.
- Costa C, Forti LC. 1993. Ocorrência de *Scaptocoris castanea*, Perty 1830 em pastagens cultivadas no Brasil. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 28(8): 977-979.
- Del Bene G, Dallai R, Marchini D. 1991. Ultrastructure of the midgut and the adhering tubular salivary glands of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *International journal of insect morphology. and embryology*. 20(12): 15-24.
- Douglas AE. 2006. Phloem sap feeding by animals: problems and solutions. *Journal of experimental botany*. 57(4): 747-754.
- Edgar RC, et al. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194-2200.
- Edwards HA, Harrison JB. An osmoregulatory syncytium and associated cells in a freshwater mosquito. 1983. *Tissue & cell*. 15: 271-280.
- Elazouni I, Abdel-Aziz S, Rabea A. 2019. Microbial efficacy as biological agents for potato enrichment as well as bio-controls against wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *World journal of microbiology and biotechnology*. 35: 1-13.
- Fialho MCQ, Moreira NR, Zanuncio JC, Ribeiro AF, Terra WR, Serrão JE. 2012. Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of insect physiology*. 58: 850-856.
- Fialho MCQ, Terra WR, Moreira NR, Zanuncio JC, Serrão JE. 2013. Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Arthropod structure and development*. 42:277-285.
- Fowler K, Partridge L. 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature*. 338: 760-761.

- Gonçalves WG, Fernandes KM, Santana WC, Martins GF, Zanuncio JC, Serrão JE. 2018. Post-embryonic development of the Malpighian tubules in *Apis mellifera* (Hymenoptera) workers: morphology, remodeling, apoptosis, and cell proliferation. *Protoplasma*. 255: 585-599.
- Grazia J, Schwertner CF, Silva EJE. 2004. Arranjos taxonômicos e nomenclaturiais em Scaptocorini (Hemiptera: Cydnidae, Cephalocteinae). *Neotropical entomology*. 33(4): 511-512.
- Guedes BAM, Zanuncio JC, Ramalho FS, Serrão JE. 2007. Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Heteroptera: Pentatomidae). *The pan-pacific entomologist*. 83(1):66-74.
- Guo Y, Hoffmann AA, Xu XQ, Huang HJ, Ju JF, Gong JT, Hong XY. 2018. Wolbachia-induced Apoptosis Associated with Increased Fecundity in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect molecular biology*. 27: 796-807.
- Kikuchi Y. 2009. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and environments*. 24(3): 195-204.
- Lima AR, Colle AC, Santos FAS. 2013. Percevejo castanho I (Hemiptera: Cydnidae) como praga potencial em áreas de pastagens. *Cascavel*, 6(4): 1-12
- Lehane MJ, Billingsley PF. 1996. *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London.
- Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. 2015. Essential role for autophagy in the lifespan extension. *Journal of Clinical Investigation*, 125: 85-93.
- Matias FI, Sampaio MV, Coelho L, Grazia J. 2011. Occurrence of *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) damaging *Azadirachta indica* (Meliaceae) seedlings in Brazil. *Neotropical entomology*. 40(2): 288-289.
- Moran NA. 2007. Symbiosis as na adaptative process and source of phenotypic complexity. *PNAS*. 104(1):8627-8633.

- Nardi JB, Mackie RI, Dawson JO. 2002. Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? *Journal of insect physiology*. 48: 751-763.
- Oliveira LJ, Malaguido AB. 2004. Flutuação e distribuição vertical da população do percevejo castanho da raiz, *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae), no perfil do solo em áreas produtoras de soja nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. *Neotropical entomology*. 33(3): 283-291.
- Pande S, Shitut S, Freund L, Westermann M, Bertels F, Colesie C, Bischofs IB, Kost C. 2014. Metabolic cross feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature communications*. 6: 6238.
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. (2016) Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology* 18: 1403–1414
- Pearse AGE. 1960. *Histochemistry Theoretical and Applied*. London, J. & A. Churchill Ltd. 998 p.
- Pessa LFC, Oliveira E, Nogueira RP. 2013. *Scaptocoris castanea* (Perty, 1830) (Hemiptera, Cydnidae) em área produtora de *Glycine max* (L.) no município de Primavera do Leste, Mato Grosso. *Estudos de biologia*. 35(84): 25-33.
- Pinheiro D O, Conte H, Gregório E A. 2008. Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *Biocell* 31 (1): 61-67.
- Quast C, et al. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(1): D590-D596.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology*. 17: 208-212.

- Santos HP, Rost-Roszkowska M, Vilimova J, Serrão JE. 2017. Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with diferente feeding habits. *Protoplasma*. 254: 1743-1753.
- Silva CP, Ribeiro AF, Gulbenkian S, Terra WR. 1995. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of insect physiology*. 41(12): 1093-1103.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*. 26: 1749-1760.
- Schloss PD, Handelsman J. 2005. Introducing MOTHUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3): 1501-6 10.1128/AEM.71.3.1501-1506.
- Schloss PD, et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 75(23): 7537-7541.
- Sohal RS, Peters PD, Hall TA. 1977. Origin, structure, composition and age-dependence of mineralized dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly, *Musca domestica*. *Tissue & cell* 9: 87–102.
- Stefanini M, Demartino C, Zamboni L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*. 216: 173–174
- Terra WR, Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative and biochemistry physiology*. 109(1): 1-62.
- Terra WR, Costa RH, Ferreira C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais da academia brasileira de ciências*. 78(2): 255-269.
- Toh H, Weiss BL, Perkin SAH, Yamashita A, Oshima K, Hattori M, Aksoy S. 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the

symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in tse tse host. Genome research. 16: 149-156.

Wang GF, Li H, Zhou Y, Yang LY, Ding ZJ, Huang JS, Pan BZ. 2018. Bacterial wilt of *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*) caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype I in southern China. Plant disease. 103: 364-365.

Yanagi S, Miyatake T. 2003. Costs of mating and egg production in female *Callosobruchus chinensis*. Journal of insect physiology. 49: 823-827.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo morfológico das glândulas salivares e do intestino médio de um representante da família Cydnidae *Scaptocoris castanea*, mostrou que as glândulas salivares deste inseto possuem função secretora com saliva de natureza lipoprotéica. A glândula salivar acessória tem pequenas células na base do epitélio com formato cônico, uma estrutura inédita para a os Hemiptera e que está envolvida na síntese protéica. Já o intestino médio mostrou inédito dimorfismo sexual com ventrículo 5 das fêmeas adaptado em um bacteriócito, estrutura que abrigou uma diversidade de bactérias simbiontes, que apresentam função de fixação do nitrogênio, e fornecem ao hospedeiro aminoácidos essenciais e vitaminas. A organização de um sincício nos ventrículo 4 também foi descrita pela primeira vez em Hemiptera. As demais quatro regiões do intestino médio são similares entre os sexos, e apresentam função de absorção de nutrientes, digestão, transporte de água e estoque íons.