Caracterización de la comunidad bacteriana intestinal de la chinche verde (*Nezara viridula*) en su interacción con el cultivo de soja (*Glycine max*): cambios según la dieta del insecto y efecto sobre las defensas químicas de la planta

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Bruno Emanuel Rosso

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional de Rosario - 2015

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA), CONICET - FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Jorge Zavala
Ing. Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Dr. Rerum Naturalis (Friedrich Schiller Universität)

Co-director
Marcelo Soria
Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)
Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejera de Estudios
Virginia Medina
Lic. en Biotecnología (Universidad Nacional de Tucumán)
Dra. en Microbiología (Universidad de Buenos Aires)

"Nuestra imaginación sólo se asombra por lo que es grande pero el amante de la filosofía natural debe reflexionar igualmente sobre las cosas pequeñas"

Alexander von Humboldt

Gracias a todas las personas que me bancaron,

enseñaron y acompañaron en esta gran aventura.

Son muy importantes para mí.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis:

Medina, V., **Rosso, B. E. (ex-aequo)**, Soria, M., Gutkind, G. O., Pagano, E. A., & Zavala, J. A. (2022). Feeding on soybean crops changed gut bacteria diversity of the southern green stinkbug (*Nezara viridula*) and reduced negative effects of some associated bacteria. *Pest Management Science*, 78(11), 4608-4617.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS ix
ÍNDICE DE CUADROS xi
RESUMEN xii
ABSTRACT xiv

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 1
El cultivo de soja y el complejo de chinches 2
La chinche verde: generalidades, biología y ecología de la plaga. 5
Interacción planta-insecto: defensas químicas de la soja frente al ataque de la chinche verde. 11
Interacción insecto-bacteria: importancia del sistema digestivo, la dieta y la relación con la planta. 14
Microbiota intestinal de la chinche verde: diversidad y función de *Yokenella* sp. 17
Estudio de las comunidades bacterianas en la interacción soja-chinche mediante las nuevas tecnologías de secuenciación 21
Objetivos 24
Hipótesis y predicciones 25

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS 27
1- Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde. 28
2- Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas. 34
3- Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde. 42

CAPÍTULO III: RESULTADOS 45
Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde. 46
Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas. 51
a. Colectas a campo: 51
b. Experimento de alimentación controlada: 59

Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde. 63

a. Poblaciones iniciales de chinches: 63

b. Parámetros evaluados durante el experimento: 66

c. Medición de las defensas químicas en semillas picadas: 68

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN 70

Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde. 71

Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas. 77

Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde. 84

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES 88

Contexto general y principales hallazgos de la tesis 89

Contraste de hipótesis 91

Discusión general 92

Perspectivas a futuro e investigaciones derivadas de esta tesis: 95

Consideraciones finales 96

BIBLIOGRAFÍA 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A: Fotos de adultos de chinches que conforman el complejo de chinches en soja. 3
Figura B: Mapa de la presencia del complejo de chinches en soja y uso de insecticidas para el control de la plaga en la campaña 2020-21. 4
Figura C: Ciclo de vida de *Nezara viridula.* 6
Figura D: : Ciclo fenológico del cultivo de soja (según escala de Fehr y Caviness, 1977) y período de mayor incremento poblacional y ataque de las chinches. 8
Figura E: Chinches en estadio de diapausa invernal refugiadas bajo la corteza de eucalipto. 9
Figura F: Diferentes secciones del intestino (ventrículos 1-4; V1-V4) en *N. viridula.* ..18
Figura G: Bolsas de tul utilizadas para cubrir las plantas enteras de soja……29
Figura H: Materiales utilizados para la alimentación y bebida de las chinches criadas en el laboratorio. 30
Figura I: Diagrama de flujo de los procedimientos realizados para la identificación de las bacterias de la comunidad microbiana por *metabarcoding*.....31
Figura J: Salida a campo para colecta de chinches, en lotes de soja y de maíz en Marcos Juárez, Córdoba. 35
Figura K: Placa de Petri que muestra el crecimiento de colonias de bacterias intestinales de chinches para el cálculo de infección. 37
Figura L: Plantas utilizadas para el experimento a campo de alimentación controlada de las chinches. 40

Figura 1.1: Abundancias relativas promedio de los principales órdenes bacterianos identificados según el origen de cada comunidad: suelo, planta de soja o intestino de chinches, en condiciones de cultivo a campo.....47
Figura 1.2: Abundancias relativas promedio de los principales géneros bacterianos identificados a los 10 días de alimentación de las chinches en soja cultivada a campo, según el origen de cada comunidad: intestino, hojas o semillas. 48
Figura 1.3: Abundancias relativas promedio de los principales géneros bacterianos identificados a los 20 días de alimentación de las chinches en soja cultivada a campo, según el origen de cada comunidad: intestino, hojas o semillas. 49
Figura 1.4: Análisis multivariado de los bacteriomas de semillas, hojas e intestinos de chinches según el tiempo y tratamiento. 50

Fig. 2.1: Mapa de sitios de colectas de chinches en la región sojera núcleo (2018-2020). 52
Figura 2.2: Índice de infección con bacterias intestinales de adultos de *N. viridula* colectados a campo sobre diferentes hospederos. 53
Fig. 2.3a: Peso promedio de chinches hembras colectadas a campo sobre diferentes hospederos. 54

Fig. 2.3b: Peso promedio de chinches machos colectados a campo sobre diferentes hospederos. 54
Figura 2.4: Índices de diversidad biológica de bacteriomas intestinales de chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. 56
Fig. 2.5: Abundancias relativas promedio de los géneros bacterianos identificados en intestinos de adultos de *Nezara viridula*, colectados a campo sobre diferentes hospederos. 57
Figura 2.6: Análisis de las abundancias relativas de los principales géneros bacterianos identificados en las comunidades intestinales de las chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. 58
Figura 2.7: Análisis multivariado de los bacteriomas intestinales de chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. 59
Figura 2.8: Índices de diversidad biológica de bacteriomas intestinales de chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. 60
Figura 2.9: Análisis de las abundancias relativas de los principales géneros bacterianos identificados en las comunidades intestinales de las chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. 61
Fig. 2.10: Análisis multivariado de los bacteriomas intestinales de chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. 62

Figura 3.1: Índice de infección con bacterias intestinales de adultos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones seleccionadas para el experimento. 64
Figura 3.2: Abundancias relativas promedio de géneros bacterianos identificados en intestinos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones: laboratorio y campo. 64
Fig. 3.3: Análisis multivariado de la diversidad beta de bacteriomas intestinales de chinches de diferentes poblaciones: laboratorio y campo. 65
Figura 3.4a: Peso promedio de chinches hembras de las diferentes poblaciones (laboratorio y campo), antes y después de alimentarse de soja cultivada en condiciones naturales durante 10 días. 66
Figura 3.4b: Peso promedio de chinches machos de las diferentes poblaciones (laboratorio y campo), antes y después de alimentarse de soja cultivada en condiciones naturales durante 10 días. 66
Figura 3.5: Curvas de supervivencia en el tiempo de adultos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones durante 10 días de alimentación en soja cultivada en condiciones naturales. 67
Figura 3.6: Índice de infección de adultos de *N. viridula* utilizados en el experimento durante los 3 tiempos de medición. 68
Figura 3.7: Actividad de los inhibidores de cistein-proteasas (ICisP) en semillas de soja cultivada a campo picadas por chinches infectadas y no infectadas con bacterias intestinales. 69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Descripción espacial y temporal de los eventos de colecta de insectos…....36

Cuadro 2: Hospederos seleccionados para el estudio taxonómico……...55

RESUMEN

Nezara viridula es una de las principales plagas de la soja, que produce defensas químicas para evitar el daño del insecto, como los inhibidores de proteasas digestivas. A pesar de esta importante respuesta defensiva vegetal, la chinche continúa alimentándose y su bacterioma intestinal podría estar cumpliendo un rol importante en esta adaptación. El objetivo de esta tesis fue determinar la función del bacterioma intestinal de la chinche en la modulación de las defensas químicas de la soja, estudiando la interacción múltiple planta-chinche-bacteria para conocer el origen y las variaciones del bacterioma intestinal en el tiempo y bajo diferentes dietas del insecto. En primer lugar, se realizó un estudio taxonómico basado en el análisis de secuencias del gen 16S rRNA para determinar cómo está conformada la comunidad intestinal de la chinche durante el tiempo de interacción con la soja. Descubrimos que la principal bacteria de la chinche es *Yokenella* y que se encuentra además en las semillas de soja. Luego, identificamos por *metabarcoding* la comunidad intestinal cuando se alimenta de otros hospederos alternativos, a campo y en un experimento de alimentación. Comprobamos que la diversidad del bacterioma intestinal cambia según la dieta del insecto y que la abundancia de *Yokenella* es muy alta cuando la chinche se alimenta solo de soja, y no de maíz o yuyo colorado. Por último, demostramos que habría algún tipo de interacción entre la microbiota de las chinches y la actividad de los inhibidores de cisteín-proteasas de las semillas, porque estos se inducen más cuando las chinches están infectadas con bacterias intestinales, como *Yokenella*, y esta combinación produciría un efecto perjudicial para la plaga. Por lo tanto, *N. viridula* utilizaría el cambio de hospederos de alimentación tanto para evadir las consecuencias negativas que le genera la infección con *Yokenella* en soja, como también para evitar las defensas químicas de este cultivo, que aumentan si las chinches están infectadas con

bacterias intestinales.

Palabras clave: *Nezara viridula*, bacterioma intestinal, *Yokenella*, soja, hospederos alternativos, defensas químicas.

ABSTRACT

Nezara viridula is a major pest of soybean, which produces chemical defenses to prevent insect damage, such as digestive protease inhibitors. Despite this important plant defensive response, the stinkbug continues to feed and its gut bacteriome could be playing an important role in this adaptation. The objective of this thesis was to determine the role of the gut bacteriome in modulating the chemical defenses of soybean, studying the multiple plant-stinkbug-bacteria interaction to know the origin and variations of the gut bacteriome over time and under different diets of the insect. First, a taxonomic study based on the analysis of the 16S rRNA gene sequences was performed to determine how the gut community of the stinkbug is conformed during the time of interaction with soybean. We discovered that the main stinkbug bacterium is *Yokenella* and that it is also found in soybean seeds. We then identified by metabarcoding the gut community when feeding on alternative hosts, in the field and in a feeding experiment. We found that the diversity of the gut bacteriome changes according to the insect's diet and that the abundance of *Yokenella* is very high when the stinkbug feeds only on soybean, and not on corn or weed. Finally, we demonstrate that there is a modulation by stinkbugs with different gut bacteriomes on the activity of seed cysteine-protease inhibitors, which are mostly induced when the stinkbugs are infected with gut bacteria such as *Yokenella*, and this combination would produce a totally detrimental effect on the pest. Therefore, *N. viridula* would use the change of feeding hosts both to avoid the negative consequences of infection with *Yokenella* in soybean, and also to avoid the chemical defenses of this crop, which increase if the stinkbugs are infected with intestinal bacteria.

Key words: *Nezara viridula*, gut bacteriome, *Yokenella*, soybean, alternative hosts, chemical defenses.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El cultivo de soja y el complejo de chinches

Actualmente el cultivo de soja (*Glycine max*, Linnaeus-Merrill, 1917) es una de las principales producciones agrícolas de la Argentina. Ocupa la mayor área sembrada de todo el país, con un total de 16,1 millones de ha en la campaña 2021/22, seguido con un amplio margen por los cultivos de trigo (*Triticum aestivum*, Linnaeus, 1753) y maíz (*Zea mays*, Linnaeus, 1753): 6,9 y 8,6 millones de ha respectivamente (GEA, BCR, 2022). Además, las exportaciones del complejo sojero sumaron 12,1 millones de dólares en el primer semestre del año 2022 (27,3% de las exportaciones totales del país), convirtiendo a este complejo en el mayor generador de ingresos y ubicando a la Argentina entre los principales exportadores de aceite, harinas y pellets de soja a nivel mundial, por encima de Brasil y Estados Unidos (Informes Técnicos de Comercio Exterior, INDEC, 2022).

El ataque de insectos plaga, como las chinches (Hemiptera: Pentatomidae), disminuyen el rendimiento de los cultivos de soja. Pueden provocar pérdidas directas en la productividad de 180 a 300 kg/ha según la magnitud del daño que ocasionan, registrándose en algunas campañas mermas por insectos de U$S 1,3 billones (Salamanca et al. 2014). Las especies más comunes que conforman el complejo de chinches son: la chinche verde (*Nezara viridula*, Linnaeus, 1758), chinche de la alfalfa (*Piezodorus guildinii*, Westwood, 1837), alquiche (*Edessa meditabunda*, Fabricius, 1794) y la chinche de los cuernitos (*Dichelops furcatus*, Fabricius, 1775) (Fig. A). En la región Neotropical, Argentina y Brasil, durante la última mitad del siglo XX, las especies más registradas en el cultivo de soja fueron *N. viridula* y la chinche de la alfalfa (Panizzi, 2015). Además, sólo *N. viridula* produjo pérdidas económicas millonarias en América del Norte, convirtiéndose en una de las plagas más importantes de este cultivo (McPherson y McPherson, 2000). En la actualidad en nuestro país, el complejo de chinches fue

considerado la principal plaga de la soja en el centro del territorio argentino en la campaña 2020/21 (Encuesta anual, Red de Manejo de Plagas -REM-, Aapresid, 2021), porque al alimentarse directamente de las semillas reduce su calidad y su potencial germinativo, afectando la producción (Panizzi, 2000; Depieri y Panizzi, 2011; Corrêa-Ferreira y Azevedo, 2002).

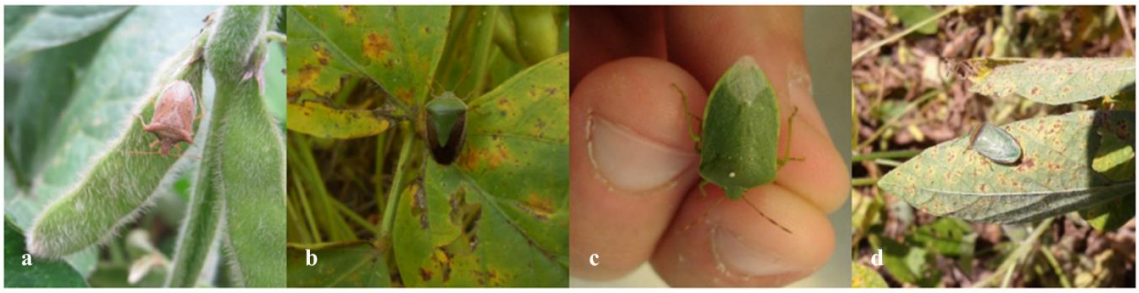

Figura A: Fotos de adultos de chinches que conforman el complejo de chinches en soja. a- chinche de los cuernitos (*Dichelops furcatus*), b- alquiche (*Edessa meditabunda*), c- chinche verde (*Nezara viridula*) y d- chinche de la alfalfa (*Piezodorus guildinii*). (G.Bioindini, REM, AAPRESID).

En Argentina, todavía no hay desarrollo de variedades de soja que posean alguna característica relacionada a la resistencia frente a chinches, como si sucede con los nuevos cultivares de soja transgénicos que expresan la toxina *cry* del *Bacillus thuringiensis* (Bt) para proteger a las plantas contra el ataque de lepidópteros (Shelton et al. 2002). Tampoco está desarrollada, a escala de cultivos extensivos, la cría y liberación de parasitoides de huevos que constituiría uno de los pilares de manejo integral de las chinches, o la técnica de franja trampa para forzar la colonización de insectos de manera más temprana en un solo sector del lote y, por lo tanto, de ser necesario, también la aplicación de insecticidas en una superficie inferior (Flores, 2020).

Por lo tanto, para el manejo de la plaga es dominante y exclusivo el control químico como técnica, que implica una grave problemática. Está muy difundido en el sector productivo el uso de mezclas de activos de insecticidas, principalmente piretroides más

neonicotinoides (REM, Aapresid, 2022. Fig. B). Pero, con la finalidad de maximizar los rendimientos, se observa que por lo general las aplicaciones se anticipan y no se respetan los umbrales de daño económicos. Además, con el argumento de aprovechar la aplicación de un herbicida o un fungicida se realizan aplicaciones "preventivas" (Trumper et al. 2008). Todas estas prácticas son desaconsejadas por muchos investigadores porque como no se realizan de forma racional, generan contaminación ambiental y resistencia a insecticidas (Stadler et al. 2006; Fenton et al. 2010; Leskey et al. 2012).

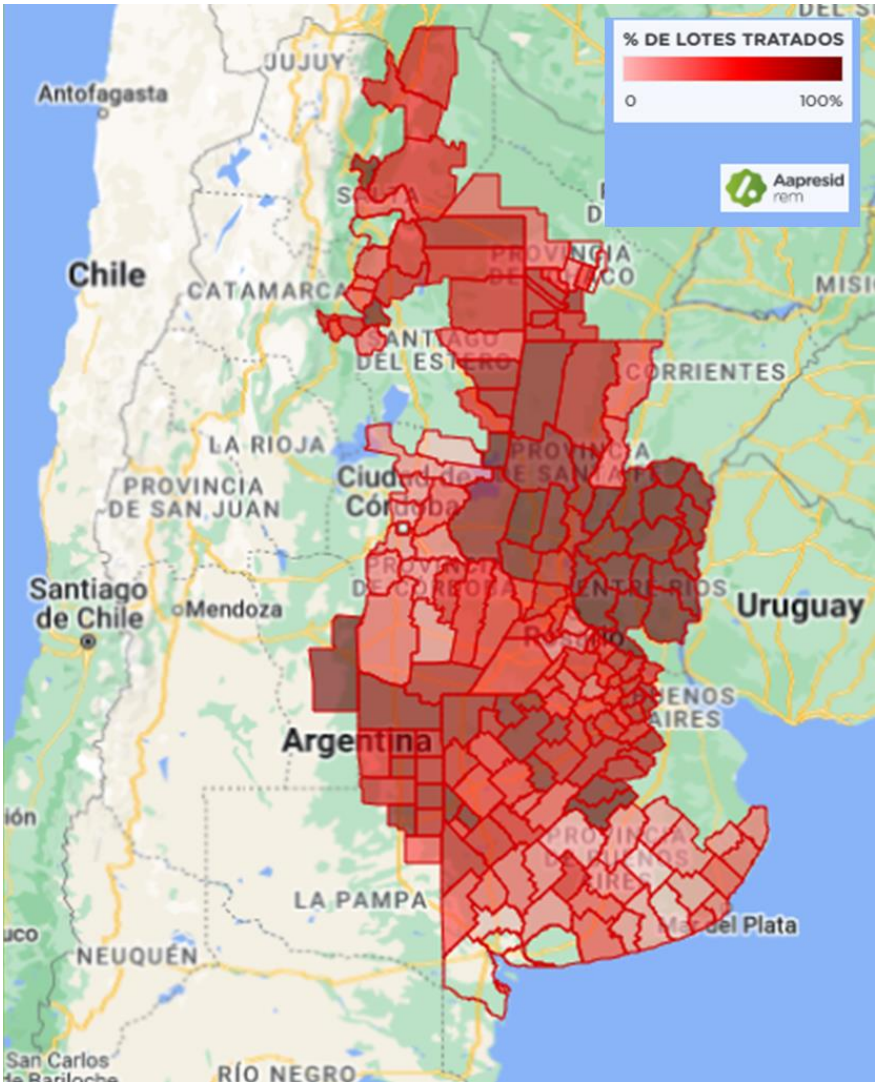

Figura B: Mapa de la presencia del complejo de chinches en soja y uso de insecticidas para el control de la plaga en la campaña 2020-21. Los diferentes tonos de color rojo indican el porcentaje de superficie tratada con insecticidas sobre el total de hectáreas agrícolas de soja por departamento de cada provincia. (REM, AAPRESID).

La chinche verde: generalidades, biología y ecología de la plaga.

La chinche verde es una especie de la familia Pentatomidae (Hemiptera, Heteroptera). Su distribución geográfica es cosmopolita, siendo muy reportada ocasionando daños en cultivos en Estados Unidos y en múltiples regiones del territorio argentino (Panizzi y Slansky, 1985). Se la puede encontrar en muchas regiones subtropicales de América, Asia, y Europa, aunque recientemente, algunos trabajos la sitúan en zonas más templadas posiblemente debido al cambio climático y la expansión del cultivo de soja, indicando que se sigue expandiendo hacia nuevas áreas (Todd, 1989; Panizzi y Lucini, 2016; Musolin, 2012).

Nezara viridula es una especie multivoltina, en la región pampeana puede alcanzar 3 o 4 generaciones anuales. La última generación en alcanzar la adultez busca refugio bajo la corteza de los árboles o en lugares resguardados de edificaciones donde comienza la diapausa invernal como estrategia para sobrevivir a las bajas temperaturas (Mareggiani y Pelicano, 2013). En primavera las hembras oviponen sobre el envés de las hojas 55-105 huevos agrupados, en dos o tres posturas (Aragón, 2002). Los huevos son cilíndricos y claros, y la disposición es ordenada y hexagonal. Luego de 5 a 10 días eclosionan las ninfas. Tiene cinco estadios ninfales, y durante los tres primeros estadios posee hábito gregario. El estado ninfal dura de 25 a 60 días según la temperatura (Massaro et al. 1983). Los adultos son de color verde, se desplazan de lote en lote mediante vuelos y viven alrededor de un mes, excepto aquellos invernantes que pueden vivir hasta cinco meses en diapausa (Musolin, 2012) (Fig. C).

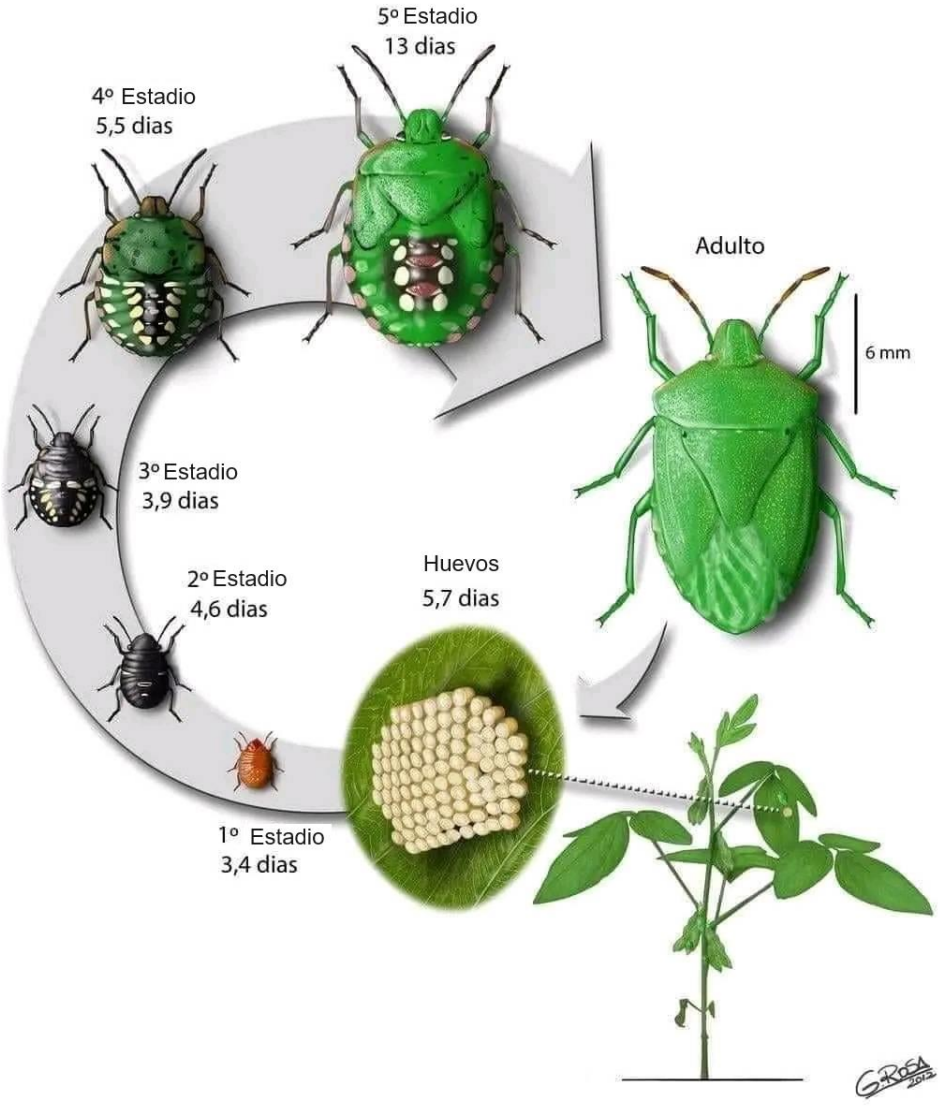

Figura C: Ciclo de vida de *Nezara viridula.* (Imagen modificada de Gabriel M. Rosa, 2015).

Es de hábito alimenticio fitosuccívoro y polifitófago (Panizzi, 1997). Se alimenta de más de cien especies diferentes de plantas pertenecientes a más de treinta familias, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, con una clara preferencia por las leguminosas, entre las cuales figura la soja (*Glycine max*) como una de las plantas hospederas preferidas de este insecto (Todd y Herzog, 1980; Panizzi y Slansky, 1991; Panizzi, 2000; Panizzi et al. 2000; Panizzi et al. 2017). También ataca cultivos hortícolas, sorgo, girasol, maíz y trigo, causando daños económicos (Knight et al. 2007). En Argentina, se han listado como

hospederas de este insecto, a plantas de las familias Fabaceae, Brassicaceae y Solanaceae (Rizzo et al. 1976). Se ha demostrado que a pesar de la polifagia de *N. viridula*, la fuente de alimentación tiene efectos variables sobre la biología del insecto, tanto en ninfas (desarrollo, supervivencia y ganancia de peso), como en adultos (oviposición, supervivencia y longevidad) (Panizzi et al. 1989, Panizzi et al. 1993, Velasco et al. 1992; Velasco et al. 1993). Las poblaciones de la chinche son más abundantes durante la primavera, disminuyendo a partir de mediados de diciembre y hasta mediados de febrero, para incrementarse nuevamente a fines de verano y comienzos del otoño cuando se encuentran invadiendo el cultivo de soja (Antonino et al. 1996).

La dinámica poblacional está sincronizada con el ciclo fenológico del cultivo de soja (Fig. D). Estas especies por lo general manifiestan un marcado crecimiento poblacional desde la floración en adelante (Todd, 1989; Gamundi et al. 1996; Gamundi et al. 2003). En general las chinches colonizan el cultivo en forma de manchones en la etapa de floración (R1) o poco antes y luego comienzan a dispersarse hacia otros sectores del cultivo, coincidiendo con la formación de vainas. A partir del estado fenológico R5 la población aumenta marcadamente hasta la madurez fisiológica. Luego, desde R5,5 la distribución comienza a ser uniforme en todo el lote y se mantiene hasta la madurez. Este comportamiento posiblemente este ligado a la dispersión de las ninfas, las que a partir del cuarto estadio pueden desplazarse aproximadamente 7-10 m desde el lugar de oviposición (Panizzi et al. 1980).

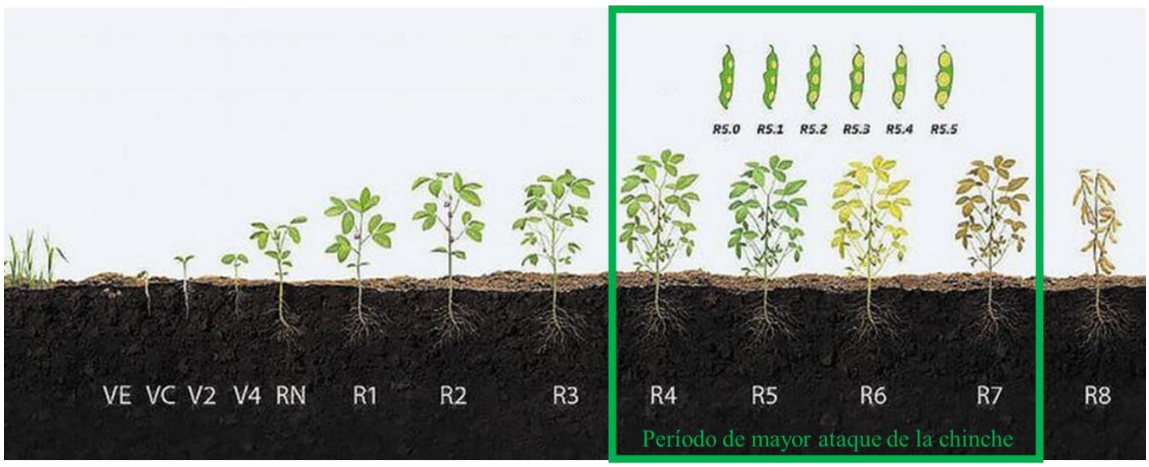

Figura D: Ciclo fenológico del cultivo de soja (según escala de Fehr y Caviness, 1977) y período de mayor incremento poblacional y ataque de las chinches (recuadro verde). V: estadios vegetativos, R: estadios reproductivos.

Pueden alimentarse de diferentes partes de la planta: tallos, follaje, flores, vainas y semillas, pero una vez iniciada la etapa reproductiva del cultivo muestran una marcada predilección por vainas y semillas (Gamundi y Sosa, 2007). Los daños ocasionados por las ninfas de cuarto y quinto estadio y los adultos varían de acuerdo con el grado de desarrollo de las semillas. Durante la fructificación (R3), producen aborto del crecimiento y caída de frutos vacíos. Si la soja se encuentra en la etapa de llenado (R5), las semillas picadas quedan pequeñas, deformadas o chuzas, en tanto que la alimentación en granos más desarrollados (R6) provoca arrugamiento, pequeñas depresiones con manchas blanquecinas o marrones (Daugherty et al. 1964; Corrêa-Ferreira y Azevedo, 2002; Gamundi et al. 2003). Altos niveles de infestación durante el período crítico del cultivo de soja frente al ataque de las chinches pueden generar retención foliar, persistencia del estado verde en tallos y hojas (Rizzo, 1972).

Mientras la soja no se encuentra disponible o no tiene fruto, las chinches se alimentan de hospederos alternativos, y su preferencia varía de acuerdo con la maduración y la fenología de estos (Panizzi, 1997), siendo más atractivas aquellas plantas con frutos y

vainas en formación (McPherson y McPherson, 2000). Durante el invierno, en la región sojera núcleo, se encontraron adultos de *N. viridula* bajo la corteza de los eucaliptos presentes en los bordes y en parches internos de lotes donde hubo soja (Fig. E). En primavera, como consecuencia del mayor fotoperíodo y aumento de la temperatura media, comienzan a colonizar diferentes especies de plantas alrededor de los árboles. Desde mediados de septiembre hasta finales de enero, se encontraron alimentándose de mora (*Morus nigra* L.), pasionaria (*Passiflora sp*.), acacia (*Acacia megaloxylon*) y lampazo (*Arctium lappa*). También se recolectaron chinches de maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*), trigo (*Triticum aestivum*) y nuez pecán (*Carya illinoinensis*) (Medina et al. 2018).

Figura E: Chinches en estadio de diapausa invernal refugiadas bajo la corteza de eucalipto.

Todo este comportamiento alimentario y la diversidad de hospederos de *N. viridula*, enfrenta al insecto a una gran variedad de dietas con diferencias en los valores nutricionales y en los contenidos de anti nutrientes, así como también a una diversidad de microorganismos endófitos y epífitos de plantas (debido también a su dispersión, cópula

u oviposición en ellas), que podrían incorporarse a la comunidad microbiana intestinal de la chinche, permitiéndole adaptarse a las diferentes condiciones (Medina, 2017).

Las posibles relaciones entre microorganismos y la chinche verde tienen una particular importancia debido a que este insecto debe tolerar muchos compuestos químicos defensivos de las plantas para poder alimentarse, y las bacterias podrían estar cumpliendo un papel importante en esta adaptación.

Interacción planta-insecto: defensas químicas de la soja frente al ataque de la chinche verde.

Las plantas inducen defensas contra el ataque de insectos que pueden disminuir o evitar el daño producido por estos. La respuesta inmunológica de la planta comienza con el reconocimiento de las secreciones bucales de los insectos y de los daños celulares que ellos producen, y continúa con la transmisión e inicio dentro de la planta de una serie de procesos que otorga cierta resistencia a los insectos. El daño producido por herbívoros aumenta la concentración de compuestos de defensa en los tejidos vegetales atacados, y sistémicamente en los no atacados (Zavala, 2010).

Nezara viridula se alimenta preferentemente de semillas de soja en desarrollo, para lo cual debe picar y atravesar la vaina con su aparato bucal picador-suctor. Durante el picado de las semillas la chinche inyecta enzimas digestivas a través de su saliva que disuelven las paredes celulares para poder succionar el contenido celular, produciendo el aborto o la deformación de las semillas y la penetración de microorganismos patógenos, que pueden provocar podredumbres (Gamundi y Sosa, 2007). Las semillas de soja en desarrollo responden al daño producido por *N. viridula* mediante una serie de procesos de reconocimiento, y amplificación y transducción de las señales, en los que intervienen las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Específicamente el daño producido por la chinche verde activa e induce la expresión de la MAPK 6 en semillas (Giacometti et al. 2016). Estas proteínas activan la síntesis de fitohormonas reguladoras de la respuesta defensiva, como el ácido jasmónico (AJ), que actúa en combinación con el etileno (ET) causando un efecto sinérgico en la producción de defensas. Por otro lado, aunque el ácido salicílico (AS) actúa antagónicamente con respecto al AJ, las chinches también pueden inducir defensas reguladas por esta fitohormona (Zavala et al. 2008;

Giacometti et al. 2016).

Las defensas químicas más importantes de la soja son los compuestos fenólicos (isoflavonoides) y los inhibidores de proteasas digestivas, que disminuyen el crecimiento y desarrollo de los insectos (Zavala et al. 2008; Zavala et al. 2015; Giacometti et al. 2016). Se han identificado defensas químicas que se producen en las vainas de soja, como los isoflavonoides diadzina y genistina, que reducen el ataque de *N. viridula* y *P. guildinii*, funcionando como repelentes para estos insectos (Zavala et al. 2015). Estos isoflavonoides reducen la capacidad proteolítica de las enzimas digestivas de los insectos, uniéndose covalentemente a las proteínas y evitando su hidrólisis, teniendo una función defensiva contra chinches debido a que disminuyen su supervivencia, crecimiento y ganancia de peso (Piubelli et al. 2003).

Los inhibidores de proteasas (IP) de las plantas afectan la digestibilidad de las proteínas ingeridas, disminuyendo la disponibilidad de aminoácidos libres requeridos por los insectos para su crecimiento y desarrollo (Zavala et al. 2008). Tanto los IP de tripsina como de cisteína se producen en las semillas y hojas de la soja, como respuesta defensiva (Giacometti et al. 2016, Zavala et al. 2008). Mientras que los IP de tripsina son una defensa importante contra las larvas de lepidópteros (con niveles elevados de pH en el intestino y la tripsina como proteasa principal), en los intestinos de insectos hemípteros y coleópteros con pH ligeramente ácido, las proteasas de cisteína son las principales enzimas digestivas y los hace vulnerables a los IP de cisteína (Curzi et al. 2012, Terra y Ferreira, 2012, Zavala et al. 2008). La principal actividad proteolítica en el intestino de *N. viridula* proviene de las proteasas de cisteína, que es inhibida totalmente cuando se alimenta de semillas de soja en desarrollo por los inhibidores de cisteín-proteasas presentes en los tejidos vegetales (Sardoy et al. 2021).

Para continuar alimentándose de plantas que expresan IP, los insectos han desarrollado múltiples estrategias de adaptación para evitar los efectos perjudiciales de la deficiencia de nutrientes. Algunos insectos presentan mecanismos que les permiten evadir la actividad de los inhibidores de proteasas: 1) aumentando la síntesis de la enzima inhibida, 2) sintetizando nuevas isoenzimas que no sean inhibidas por los inhibidores, 3) sintetizando enzimas que degraden a los inhibidores e isoflavonoides, 4) seleccionando semillas con menos niveles de anti nutrientes, ó 5) favoreciéndose de la actividad metabólica de la microbiota que coloniza el intestino (Cloutier et al. 2000; Chu C. et al. 2013).

Interacción insecto-bacteria: importancia del sistema digestivo, la dieta y la relación con la planta.

La diversificación y el éxito evolutivo de los insectos ha dependido, en parte, de gran cantidad de relaciones con microorganismos benéficos, que han sido conocidos por aumentar el valor nutricional de las dietas, permitir la digestión de compuestos recalcitrantes, protegerlos de predadores, parásitos y patógenos, contribuir en comunicaciones intra e interespecíficas, disminuir la eficiencia de vectores de enfermedad y gobernar sistemas de cópula y reproducción (Engel y Moran, 2013; Dillon y Dillon, 2004; Sugio, 2015). La contribución de los microorganismos, particularmente los microorganismos intestinales, a aumentar la tolerancia de las defensas químicas de las plantas contra los insectos es muy relevante para la agricultura. Los insectos son responsables de pérdidas agrícolas masivas y también de la polinización de muchos cultivos alimentarios, y los microorganismos asociados tanto con los herbívoros como con los polinizadores pueden afectar su impacto en las plantas de cultivo (Engel y Moran, 2013). Las relaciones simbióticas bacteria-insecto involucradas en la interacción planta-insecto están gobernadas por algunas variables como la estructura y fisiología del intestino y la dieta (Medina, 2017).

Los tractos digestivos de los insectos varían ampliamente en morfología y propiedades fisicoquímicas, factores que influyen en gran medida en la estructura de la comunidad microbiana (Engel y Moran, 2013). Además, varían de acuerdo con las especies y estadio de desarrollo, desde el tubo recto y uniforme de las larvas, hasta los complejos sistemas de células especializadas en los áfidos y cochinillas (Baumann, 2005; Nakabachi et al. 2005; Matsuura et al. 2009). El intestino de los insectos consta de tres regiones primarias: intestino anterior, intestino medio (o ventrículos) y posterior

(Chapman et al. 2013). El intestino medio es el sitio donde se produce la digestión y absorción en la mayoría de los insectos, y se divide en secciones o ventrículos. Para muchas especies, esta estratificación permite que cada ventrículo tenga funciones específicas, acompañadas de cambios de pH y concentraciones de oxígeno que promueven el crecimiento de algunas bacterias y limitan el de otras (Engel y Moran, 2013).

En cuanto a la dieta, varios estudios muestran su efecto en la relación bacteria-insecto (Geib et al. 2009; Lundgren y Lehman, 2010; Wang et al. 2011). La diversidad bacteriana es significativamente más alta en insectos omnívoros que en carnívoros o herbívoros (Yun et al. 2014). Un estudio de 62 especies de insectos, incluida *N. viridula*, demostró que la dieta afecta la relación intraespecífica cuando las bacterias y el hospedero están íntimamente relacionados, como por ejemplo aquellas que degradan lignocelulosa en el intestino de insectos xilófagos (Colman et al. 2012). De todas maneras, también se ha observado que muchas especies de insectos mantienen un *core* (núcleo) estable de especies bacterianas a pesar de los cambios ambientales. El tracto intestinal de adultos de *Bactrocera dorsalis* (Diptera, Tephritidae) contiene una comunidad bacteriana diversa a nivel de individuos, pero algunos de sus miembros son estables. Las más representativas fueron *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter, Pectobacterium y Serratia*. Luego, distintas condiciones ambientales y fuentes de alimentos influyen sobre la diversidad de la comunidad (Wang et al. 2011; Andongma et al. 2015). Las comunidades microbianas del intestino medio de individuos de *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) de cinco poblaciones y alimentándose de tres dietas diferentes revelaron que la composición de la comunidad es cuantitativa y cualitativamente bastante estable, siendo *Clostridium, Coriobacterium y Gordonibacter* los más abundantes (Sudakaran et al. 2012). Esto

demuestra que la dieta puede influir en la relación bacteria-insecto y que está fuertemente asociado a la relación simbiótica entre estos.

Uno de los casos más estudiados de adaptación de insectos a un hospedero mediada por bacteria, es la relación de los áfidos con su simbionte, *Buchnera aphidicola*, que fue originada hace más de 200 millones de años (Baumann, 2005). *Buchnera aphidicola* es un simbionte obligado que se aloja en una célula diferenciada, denominada bacteriocito y que complementa la dieta sintetizando aminoácidos esenciales. La simbiosis con *B. aphidicola* les permite a los áfidos alimentarse del floema, lo cual significa una dieta pobre en aminoácidos y principalmente constituida por agua, sales y azúcares (Nakabachi et al. 2005). Del mismo modo, las termitas xilófagas dependen de la comunidad microbiana de su intestino para degradar la lignocelulosa de la dieta. Esta comunidad incluye especies de actinomicetes, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otros (Pasti et al. 1990; Schäfer et al. 1996; Kuhnigk y König, 1997; Bugg et al. 2011; Yang et al. 2005). Otro ejemplo interesante sobre la función de las bacterias en insectos es la larva del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae), que ha logrado adaptarse al hospedero eludiendo el sistema de defensas de la planta. El insecto utiliza las bacterias que se encuentran en la saliva para disfrazar su ataque (Chung et al. 2013), ya que la planta percibe un ataque microbiano y desata su mecanismo de defensa específica para controlar esta invasión, que no afecta al insecto.

Estos son algunos ejemplos de sistemas en los que las bacterias han permitido la especialización de los insectos por nuevos hospederos y tolerar las defensas naturales de las plantas contra los herbívoros, lo que les permitiría colonizar nuevos nichos y evolucionar hacia nuevas especies. De todas maneras, es importante analizar qué ocurre

en los sistemas de producción agrícola, donde las disrupciones sobre grandes extensiones afectan la microbiota, la comunidad vegetal y la fauna autóctona (Medina, 2017).

Microbiota intestinal de la chinche verde: diversidad y función de *Yokenella* sp.

El intestino medio de *Nezara viridula* se ajusta a la estructura modelo de los hemípteros (Ohbayashi et al. 2015), y consta de cuatro secciones o ventrículos: primero (V1), segundo (V2), tercero o estómago (V3) y cuarto o cloaca (V4), con una longitud total de 5 cm (Fig. F). El pH del intestino de la chinche verde varía entre los distintos ventrículos de 5,2 a 6,6 (Hirose et al. 2006; Tada et al. 2011). Debido a que la chinche se alimenta de soja que produce inhibidores de proteasas digestivas, las cistein proteasas de la chinche que tienen un pH óptimo a 6 pueden ser inhibidas por estos péptidos de la planta (Sardoy et al. 2021; Lomate y Bonning, 2016; Giacometti et al. 2016).

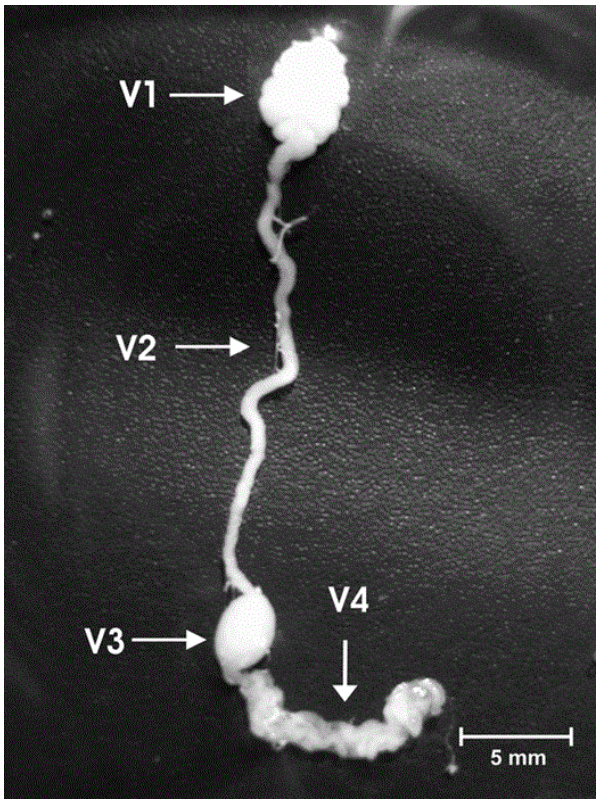

Figura F: Diferentes secciones del intestino (ventrículos 1-4; V1-V4) en *N. viridula.* V1 en el extremo anterior; V4 en el posterior (Hirose et al. 2006).

Los hemípteros han transformado a la última porción del intestino medio, la cloaca (V4), en una estructura compleja donde alojan un simbionte obligado especie-específico, transmitido verticalmente por la madre (Ohbayashi et al. 2015). Algunos estudios sobre la chinche verde se centran en su simbionte obligado, alojado en la cloaca (V4), que puede tener relevancia en la supervivencia de las ninfas y que está presente en poblaciones de origen geográfica diferente, como Hawai, California, Japón, Brasil y Argentina (Prado et al. 2009; Tada et al. 2011; Hirose et al. 2006; Medina et al. 2022). *Nezara viridula* unta la superficie de los huevos durante la oviposición y las ninfas se infectan con el simbionte al emerger o durante las primeras horas de vida (Prado et al. 2009). Sin embargo, poco se sabía sobre la función biológica de las bacterias presentes

en los ventrículos de las chinches donde se realiza la digestión (V1-V3 del intestino medio).

Estudios de nuestro laboratorio, demostraron que más del 54% de los adultos de *N. viridula* recolectados en el campo no tenían bacterias detectables por métodos de cultivo en los ventrículos del intestino medio V1-V3. Los intestinos del resto de chinches estaban colonizados por una microbiota no transitoria (MNT) y otra microbiota transitoria, no presente en chinches en diapausa. Mientras que la microbiota transitoria tuvo poca abundancia y estuvo representada por un número variable de géneros, como *Bacillus* y *Micrococcus*, la MNT estuvo compuesta por enterobacterias y enterococos, que estuvieron representadas por aislamientos de *Yokenella* sp., *Pantoea* sp., *Cedecea* sp. y *Enterococcus* sp. (Medina et al. 2018). Los resultados in vitro sugieren que MNT de las chinches pueden afectar la nutrición, la desintoxicación y la desactivación de las defensas químicas, lo que indica que las cepas aisladas de *Enterococcus* sp., *Yokenella* sp. y *Pantoea* sp. podrían ayudar a las chinches a alimentarse de semillas de soja en desarrollo a pesar de sus defensas químicas (Medina et al. 2018).

De acuerdo con algunas publicaciones el intestino medio de la chinche verde podría presentar de 0 a 5 especies distintas de bacterias, entre ellas *Yokenella* sp., *Enterococcus* sp. y *Pantoea* sp. La especie más frecuente y abundante en el intestino de *N. viridula* es *Yokenella* sp., emparentada con cepas aisladas en Brasil (Hirose et al. 2006; Medina et al.., 2018). Análisis de funcionalidad *in vitro* indican que *Yokenella* sp. tiene la capacidad de degradar los inhibidores de proteasas presentes en la soja (compuestos antiherbívoro), pero no degradan componentes de la dieta como las proteínas de reserva y la sacarosa (Medina et al.., 2018). Aunque la enterobacteria *Yokenella* sp. puede desactivar esos inhibidores de proteasas, estudios en nuestro laboratorio mostraron que la

infección tiene un impacto negativo sobre la chinche y reduce la actividad de las cistein proteasas en el intestino de *N. viridula*. En condiciones de cautiverio, *Yokenella sp*. afectó negativamente el desarrollo de las ninfas, generando un alto índice de mortalidad. Sin embargo, en condiciones de campo, *Yokenella sp*. no resultó tan agresiva y podría formar parte de la comunidad microbiana intestinal natural de la chinche verde (Medina et al.., 2022). De todas formas, se desconoce cómo interacciona *Yokenella sp*. con el intestino de la chinche verde cuando esta se alimenta de soja en condiciones de cultivo.

Por otro lado, es posible que por métodos de relevamiento que no dependan de métodos de cultivos se podrían detectar otros grupos bacterianos. Al momento se desconoce si la microbiota intestinal participa de alguna manera en la interacción chinche-soja y si presenta variaciones en el tiempo y/o bajo diferentes dietas de los insectos que tengan un efecto sobre dicha interacción.

Estudio de las comunidades bacterianas en la interacción soja-chinche mediante las nuevas tecnologías de secuenciación

Los enfoques metagenómicos nos permiten acceder a los genomas de todos o un gran número de microorganismos presentes en una comunidad, denominado metagenoma. El estudio de esas comunidades a través del análisis de sus genomas (metagenómica) o de amplicones de genes específicos (*metabarcoding*), hace posible relacionar la función potencial de los microorganismos específicos dentro de las comunidades intestinales, con el objetivo de comprender la ecología microbiana (Krishnan et al. 2014). La introducción de tecnologías de secuenciación masiva de ADN ha permitido estudiar con más detalle la composición de las comunidades microbianas, y su dinámica temporal y espacial en respuesta a factores bióticos, abióticos y cambios en los manejos agronómicos (Montecchia et al. 2015). Además, esta tecnología ha permitido analizar las comunidades bacterianas de insectos frente a cambios ambientales, como pueden ser diferentes composiciones de dieta (Dematheis et al. 2012; Ben Guerrero et al. 2016). Estas nuevas metodologías no requieren el cultivo de microorganismos, y con ciertos ajustes metodológicos permiten relevar marcadores moleculares o ADN genómico total de arqueas, bacterias, hongos y levaduras (Breakwell et al. 2014, Vos et al. 2013). Para evaluar más ampliamente la diversidad molecular y la taxonomía de las comunidades bacterianas, una herramienta poderosa es la secuenciación completa o parcial del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, que se ha convertido en uno de los métodos independientes de cultivo más populares (Roesch et al. 2007). El enfoque equivalente para estudiar microorganismos eucariotas es el análisis del gen que codifica para el ARN ribosomal 18S o de las regiones ITS (internal transcribed spacer).

El estudio de las interacciones planta-insecto o insecto-bacteria en entornos

naturales está bastante inexplorado (Shikano et al. 2017; Hardoim et al. 2015). Los experimentos de interacción trófica suelen basarse en condiciones controladas y optimizadas para el crecimiento de las plantas hospedadoras y rara vez se basan en condiciones reales de campo (Frago et al. 2012; Company et al. 2016). Las publicaciones sobre la caracterización de la comunidad del intestino medio en insectos han crecido exponencialmente en los últimos 20 años. Sin embargo, de los artículos encontrados en Scopus, publicados en los últimos 10 años y centrados en la interacción planta-insecto-bacteria, 38 se realizaron en condiciones de laboratorio, 11 utilizaron condiciones controladas en invernadero y sólo uno se realizó en condiciones ambientales más realistas (Medina et al. 2022). El bajo número de estudios sobre los bacteriomas intestinales en insectos llama la atención debido a que variables naturales, como la radiación solar ultravioleta, la desecación y/o el rango de temperatura, pueden influir en las interacciones planta-insecto-bacteria (Dillon et al. 2020; Afzal et al. 2019; Romero et al. 2020). Los experimentos en condiciones de laboratorio para estudiar las interacciones planta-insecto-bacteria pueden estar muy alejadas de la realidad (Valzania et al. 2018). Las condiciones de cría en laboratorio pueden alterar las interacciones simbióticas entre insectos y algunas bacterias por contaminación de la fuente de alimento o alteraciones de la diversidad de las comunidades intestinales (Cohen, 2018; Pérez-Cobas et al. 2015). Aunque cabe esperar diferencias en el resultado de las interacciones planta-insecto-bacteria entre las condiciones de laboratorio y las reales de campo, no está claro aún el alcance del impacto ambiental natural sobre estas interacciones.

Las plantas tienen un importante grado de control sobre los diferentes microbiomas con los que conviven. Estas relaciones se estudiaron con bastante detalle a nivel de las comunidades y las relaciones que se establecen en la rizosfera y en la endorizosfera (Sugio et al. 2015). Aunque a nivel de la filosfera el conocimiento no es

tan detallado, resultados recientes sugieren que en hojas y frutos también se desarrollan microbiomas complejos que responden al genotipo del hospedador y a las condiciones bióticas y abióticas, conformando redes de interacción que incluyen bacterias, hongos y algas (Agler et al. 2016). Algunas de las bacterias que interactúan con las raíces de los cultivos promueven el crecimiento vegetal a través de la síntesis de hormonas o sus precursores y se cree que también pueden facilitar la captación de ciertos nutrientes (Berg et al. 2016; Bulgarelli et al. 2013). Es de esperar que los cambios en la rizósfera y la filósfera tengan impacto en la relación planta-insecto.

Las posibilidades que brindan las nuevas tecnologías para el estudio de interacciones planta-insecto-bacterioma permitirán avanzar en el descubrimiento y la disección de las funciones de los microorganismos en los procesos vegetales de resistencia al ataque de insectos plaga, y en la contribución del bacterioma asociado al insecto en los procesos de virulencia.

De este modo, se podrá contar con información para diseñar estrategias que favorezcan a aquellos microorganismos clave en la potenciación de las respuestas vegetales de defensa, o alternativamente, estrategias de control de aquellos microorganismos que facilitan la actividad de herbivoría y la evasión de los mecanismos de defensa en los insectos plaga.

Objetivos

General

Determinar la función del bacterioma intestinal de la chinche verde en la modulación (positiva o negativa) de las defensas químicas de la soja frente al ataque de este insecto, estudiando la interacción múltiple planta-chinche-bacteria para conocer el origen y las variaciones del bacterioma intestinal en el tiempo y bajo diferentes dietas del insecto.

Específicos

1. Estudiar la variación en el tiempo de la estructura y composición taxonómica de las comunidades bacterianas de suelo, hojas, semillas e intestino de chinches cuando pican plantas de soja.

2. Analizar la presencia de la población de *Nezara viridula* en diferentes sitios de la región sojera, evaluando el peso y el índice de infección con bacterias intestinales según la dieta (soja u hospederos secundarios); e identificar la composición de la comunidad bacteriana de cada sitio de colecta y bajo experimentos de alimentación controlados.

3. Cuantificar la actividad de los inhibidores de proteasas, en semillas de plantas de soja, frente al ataque de chinches con diferentes microbiotas intestinales, colonizadas naturalmente con bacterias intestinales (chinches de campo) o infectadas con determinadas bacterias (chinches de cautiverio).

Hipótesis y predicciones

Se realizaron experimentos en condiciones controladas y de campo para poner a prueba las siguientes hipótesis y predicciones:

H1: Durante la interacción entre la chinche verde y la planta de soja, las comunidades de bacterias presentes varían de manera específica, principalmente entre el intestino del insecto y aquellas estructuras vegetales de las cuales se alimenta directamente:

- Los bacteriomas asociados a la interacción soja-chinche verde (suelo, planta e intestino) tienen diferente riqueza específica y abundancia entre los distintos órganos de la planta y tiempos de alimentación del insecto.
- La diversidad del bacterioma intestinal de la chinche verde es menor cuanto más tiempo de interacción tiene con la soja.
- Los géneros más abundantes del bacterioma intestinal de la chinche están presentes principalmente en las semillas de las plantas picadas.

H2: Tanto el peso corporal e índice de infección como la composición de la comunidad bacteriana intestinal de la chinche verde presenta variaciones según la dieta del insecto (dependientes de la presencia o ausencia del cultivo de soja en cada momento):

- Las chinches de campo de soja tienen un mayor índice de infección y peso que las chinches colectadas en otros hospederos, y poseen diferente diversidad del bacterioma intestinal según su hospedero.

- El bacterioma intestinal de las chinches provenientes de lotes de soja es menos diverso que el de chinches colectadas en otros hospederos, pero

comparten los géneros bacterianos más abundantes.

- Las chinches que se alimentan sólo de soja tienen mayor peso, pero tienen mayor mortandad porque aumenta su infección con bacterias intestinales perjudiciales.

- Las chinches que se alimentan solo de un hospedero alternativo a la soja tienen menor peso, pero la abundancia de bacterias perjudiciales en su bacterioma intestinal es menor.

H3: La comunidad bacteriana intestinal de la chinche verde de campo es diferente a la de las chinches de cautiverio (cría de laboratorio), mejorando su tolerancia a las defensas químicas de la soja contra el ataque de insectos y/o reduciendo esos compuestos defensivos de la planta:

- Las chinches de cautiverio tienen un mayor índice de infección y abundancia de bacterias perjudiciales en su comunidad intestinal, a diferencia de las chinches de campo cuyo bacterioma es más diverso.

- La actividad de los inhibidores de proteasas en semillas de soja aumenta diferencialmente cuando estas son picadas por chinches más infectadas con bacterias intestinales.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr cada uno de los tres objetivos específicos de esta tesis, se llevaron a cabo experimentos, en condiciones controladas y de campo. Cada uno de ellos para poner a prueba las hipótesis y predicciones correspondientes, mencionadas en el capítulo introductorio.

1- Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde.

Este primer experimento corresponde al objetivo específico 1: e*studiar la variación en el tiempo de la estructura y composición taxonómica de las comunidades bacterianas de suelo, hojas, semillas e intestino de chinches cuando pican plantas de soja.* Para lograrlo se colocaron chinches adultas de una población del laboratorio dentro de bolsas de tul sobre plantas de soja cultivada a campo, para que se alimenten durante veinte días de sus hojas y semillas en desarrollo. Luego, se muestrearon las chinches y esos órganos vegetales como así también suelo de la raíz de las plantas picadas y sin picar por las chinches. De todas esas muestras se extrajo ADN y se secuenció, para caracterizar por *metabarcoding* cómo están conformadas sus comunidades bacterianas, los cambios que se producen en el tiempo de interacción entre la soja y la chinche, definir qué tipo de bacterias tienen en común y cuál podría ser el origen de estas en el intestino del insecto.

1. <u>Materiales biológicos y condiciones generales del cultivo:</u>

Se sembraron en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la UBA, a fines de diciembre del año 2017, 4 parcelas del cultivar de soja Williams. Las parcelas

tenían un área de 1,5 m^2, se sembró a chorrillo con una distancia entre surcos de 0,25 m. Luego de emergidas y raleadas las plantas a 0,2 m de distancia entre ellas, se alcanzó una densidad final de siembra de 30 plantas/m2 (42 plantas/parcela). Desde el momento de emergencia de las plántulas hasta que desarrollaron la primera hoja verdadera se las protegió del ataque de aves, usando una cobertura de media sombra. Para lograr el correcto establecimiento de las plantas, durante los primeros meses se realizaron periódicamente labores culturales como riego, control de plagas tempranas (orugas cortadoras y hormigas), raleo y desmalezado manual.

Dentro de cada parcela se seleccionaron 8 plantas, las cuales fueron tapadas con bolsas de tul en su totalidad desde los inicios de su etapa vegetativa (para evitar que sean atacadas por insectos). Al inicio del llenado de granos (R5) se colocaron 8 chinches adultas (4 hembras y 4 machos), provenientes de la cría de laboratorio, dentro de nuevas bolsitas de tul, en 4 de las plantas seleccionadas y tapadas de cada parcela, para asegurar que sean picadas. Ese número de chinches (8) se mantuvo constante durante todo el experimento, substituyendo diariamente aquellas chinches que iban muriendo. Las otras 4 plantas seleccionadas (control) se mantuvieron tapadas y controladas (no picadas) (Fig. G).

Figura G: Bolsas de tul utilizadas para cubrir las plantas enteras de soja.

2. Cría de insectos en laboratorio:

Las chinches verdes se criaron en cámaras de crecimiento a 23º C, bajo 10:14 h de oscuridad/luz y 60% de humedad. Los huevos y las ninfas de primer y segundo estadio se colocaron en placas de Petri de 100 mm, las ninfas de tercer, cuarto y quinto estadio en bandejas de plástico de 30 x 15 x 5 cm, y los adultos se criaron en cajas de plástico de 50 x 30 x 40 cm. Las chinches se alimentaron con semillas de soja maduras, chauchas verdes de poroto (*Phaseolus vulgaris*), semillas sin cáscara de girasol (*Helianthus annuus*) y semillas crudas de maní (*Arachis hypogaea*). El agua de bebida se suministró en algodón humedecido y el suministro de comida y agua se renovó cada tres días (Fig. H).

Figura H: Materiales utilizados para la alimentación y bebida de las chinches criadas en el laboratorio.

3. Muestreo:

De cada planta (picadas y no picadas) se tomaron muestras de cinco sitios: vainas (semillas), hojas, chinches (intestinos), suelo rizosférico y suelo del entresurco; en dos tiempos, a los 10 y 20 días de iniciado el ataque de las chinches. Las 4 submuestras de cada sitio dentro de cada parcela fueron juntadas formando un *pool*, obteniéndose una

sola muestra de cada sitio de las plantas picadas y otra de las plantas no picadas, dentro de cada parcela (n = 4).

Las muestras de suelo fueron recogidas con barreno en bolsitas plásticas y conservadas en frio hasta su traslado al laboratorio, luego se tamizaron y se almacenaron las muestras en el freezer a -80 °C. Las muestras vegetales (hojas y vainas) fueron colocadas dentro de sobres de aluminio y en nitrógeno líquido, hasta ser conservadas en freezer a -80° C.

Las chinches alimentadas sobre las plantas del experimento (4 en cada tiempo de muestreo, 10 y 20 días) fueron disectadas en esterilidad dentro de las 8 h posteriores al muestreo. Esto se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, donde primero se desinfectaron superficialmente las chinches con alcohol 70%, luego se trabajó con tijeras, bisturí y pinzas de microcirugía esterilizadas a la llama y con alcohol 70%. La disección se realizó en buffer fosfato estéril (pH 7) sobre placas de Petri y los intestinos enteros extirpados de cada chinche se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml.

4. Extracción de ADN y secuenciación del ARNr 16S:

Se extrajo el ADN de todas las muestras intestinales, como así también de las muestras de suelo y de plantas (hojas y semillas) con diferentes kits comerciales (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Zymo Research Soil Microbe DNA Kit y Zymo Research Plant/Seed DNA Kit, respectivamente) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La concentración final y la pureza del ADN se determinaron con un NanoDrop 2000, y la calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se amplificó por PCR con cebadores universales (341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'

y 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') la región V3-V4 del gen bacteriano que codifica el ARN ribosomal para la subunidad 16S. Se realizó una secuenciación de los amplicones de tipo "paired-end" con fragmentos de 250 pb en un equipo Illumina NovaSeq 6000 de Novogene Corporation Inc. (California, EE. UU.) siguiendo protocolos estándar.

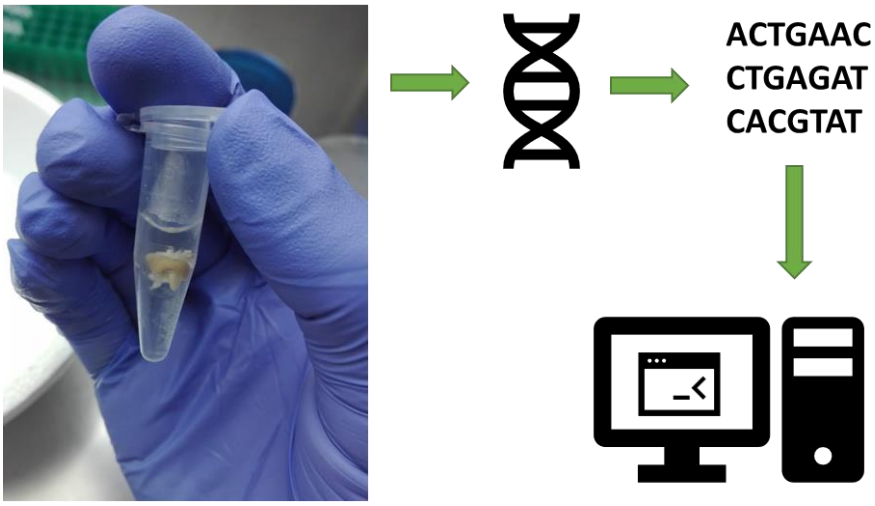

Figura I: Diagrama de flujo de los procedimientos realizados para la identificación de las bacterias de la comunidad microbiana por *metabarcoding*.

5. Procesamiento de los datos de secuenciación y análisis estadísticos

El pre-procesamiento de las secuencias y su análisis posterior se realizó con el software QIIME2 v 2019.10 (Bolyen et al. 2019). Brevemente, se analizó y se filtró la calidad de las secuencias individuales, luego se empalmaron las secuencias "paired-end" de cada amplicón. Las secuencias "paired-end" se empalmaron, obteniéndose una sola secuencia por amplicón. Los datos de secuencia sin procesar (rawdata) se demultiplexaron y se filtraron por calidad utilizando *q2-demux* seguido de *denoising*. Luego se utilizó el algoritmo DADA2 (Callahan et al. 2016) para reducir la presencia de errores de

secuenciación (ruido) y agrupar secuencias similares o idénticas en variantes de secuencias de amplicones (ASVs, derivado del inglés “amplicon sequence variants”). Las secuencias representativas filtradas de ASVs se alinearon con MAFFT (Katoh y Standley, 2013) (mediante *q2-alignment*) y se utilizaron para construir la filogenia con *fasttree2* (Price et al. 2010) (mediante *q2-phylogeny*). Se realizó la asignación taxonómica de los ASV utilizando un clasificador Naive Bayes entrenado (Pedregosa et al. 2011) y la base de datos de SILVA 132 (Quast et al. 2013). La tabla final fue curada para excluir las variantes de secuencia de amplicones no bacterianos y las muestras fueron rarefaccionadas a 4953 secuencias por muestra. Todas las secuencias representativas clasificadas por comparación con SILVA 132, fueron además comparadas por BLAST de nucleótidos contra la base de datos de nucleótidos del NCBI (nt). Se calculó la abundancia relativa entre grupos y se compararon mediante la prueba de Kruskal Wallis. La diversidad beta de las microbiotas se estimó a partir de cálculos de distancia entre muestras mediante las medidas de Bray-Curtis y Unifrac y se visualizaron mediante gráfico de PCoA (Principal Coordinate Analysis) y adicionalmente mediante un test de permutación ADONIS, calculadas en el entorno R (RStudio Team 2015) utilizando los paquetes *ape* (Paradis y Schliep, 2018) y *vegan* (Oksanen et al. 2019). Las salidas gráficas se generaron utilizando el paquete *ggplot2* (Wickham y Wickham, 2016).

2- Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas.

Para lograr el segundo objetivo específico: *analizar la presencia de la población de N. viridula en diferentes sitios de la región sojera, evaluando el peso y el índice de infección con bacterias intestinales según la dieta, e identificar la composición de la comunidad bacteriana de cada sitio de colecta y bajo experimentos de alimentación controlados*, se realizaron actividades en dos etapas.

En una primera etapa, se muestrearon ejemplares adultos de *N. viridula* en distintos sitios de la región sojera núcleo y a lo largo de todo el año. De estos grupos de insectos se calcularon y compararon el peso e índice de infección según hospedero. Inicialmente se planeaba estudiar la microbiota de cada una de esas poblaciones de chinches colectadas sobre los diferentes hospederos y en los distintos sitios de colectas, pero luego, por cuestiones de financiación del proyecto, se decidió estudiar sólo las comunidades bacterianas intestinales (CBI) de aquellas poblaciones de chinches provenientes de soja o de hospederos secundarios contemporáneos a este cultivo (como maíz y yuyo colorado - *Amaranthus quitensis*, Kunth, 1818). Se resolvió esto, principalmente, porque en algunas recorridas a campo advertimos la presencia de chinches en lotes de maíz vecinos a la soja o sobre malezas dentro y en los bordes del mismo cultivo. Nos resultó interesante ver en varias oportunidades que las chinches estaban alimentándose de otras plantas, teniendo disponible al cultivo de soja en el mismo momento y lugar. Además, porque en estas poblaciones de chinches colectadas a campo observamos diferencias en cuanto al índice de infección con bacterias intestinales.

Figura J: Salida a campo para colecta de chinches, en lotes de soja y de maíz en Marcos Juárez, Córdoba.

En una segunda etapa, se realizó un experimento a campo de alimentación controlada de las chinches sobre esos tres hospederos seleccionados (soja, maíz y yuyo colorado), colocando a chinches de una misma población inicial sobre las opciones de dietas mencionadas y evaluando los cambios en su bacterioma intestinal luego de 10 días, para poner a prueba los primeros resultados obtenidos del estudio de la comunidad bacteriana intestinal de los insectos colectados a campo de la primera etapa.

- PRIMERA ETAPA

1. <u>Colectas de insectos a campo:</u>

Se recorrieron diferentes sitios de la región sojera núcleo, en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, durante dos años (2018-2020) para la colección de ejemplares adultos de chinches verdes (Cuadro 1). Estos fueron recogidos

en bolsas de tul y trasladados al laboratorio el mismo día de la colecta, conservando también las mismas plantas sobre las cuales fueron recolectados (soja u hospederos secundarios) para no modificar su dieta y bacterioma intestinal.

Cuadro 1: Descripción espacial y temporal de los 27 eventos de colecta realizados durante el desarrollo de esta tesis. *Localidad* es la que estaba situado el campo en el que se realizó la colecta.

N° Sitio	Hospedero	Localidad	Provincia	Fecha	Latitud	Longitud
1	Vicia	Marcos Juárez 1	Córdoba	11/12/2018	-32,71999	-62,10935
2	Vicia	Loma Alta	Santa Fe	19/12/2018	-31,96016	-61,17966
3	Vicia	Gálvez	Santa Fe	19/12/2018	-32,08858	-61,04194
4	Maíz	Gálvez	Santa Fe	19/12/2018	-32,00722	-61,14086
5	Alfalfa	Zavalla	Santa Fe	19/12/2018	-33,03392	-60,88941
6	Soja	Pujato	Santa Fe	4/02/2019	-33,02317	-61,03669
7	Soja	Marcos Juárez 1	Córdoba	6/03/2019	-32,71999	-62,10935
8	Soja	CABA	Buenos Aires	20/03/2019	-34,59307	-58,48016
9	Soja	Paraná	Entre Ríos	22/03/2019	-31,84847	-60,54090
10	Soja	Villaguay	Entre Ríos	21/03/2019	-31,87204	-58,94900
11	Maíz	Marcos Juárez 2	Córdoba	26/03/2019	-32,64210	-62,15932
12	Soja	Marcos Juárez 2	Córdoba	26/03/2019	-32,64210	-62,15932
13	Soja	Inriville	Córdoba	26/03/2019	-33,02591	-62,11958
14	Yuyo colorado	Inriville	Córdoba	26/03/2019	-33,02591	-62,11958
15	Soja	Colonia Italiana	Córdoba	26/03/2019	-33,33392	-62,19868
16	Soja	Benjamín Gould	Córdoba	26/03/2019	-33,58561	-62,73839
17	Soja	Canals	Córdoba	26/03/2019	-33,53498	-62,91031
18	Soja	CABA	Buenos Aires	12/04/2019	-34,59164	-58,48695
19	Soja	Oliveros	Santa Fe	22/04/2019	-32,55994	-60,86239
20	Yuyo colorado	Marcos Juárez 2	Córdoba	14/05/2019	-32,64210	-62,15932
21	Maíz	Marcos Juárez 2	Córdoba	14/05/2019	-32,64210	-62,15932
22	Yuyo colorado	Marcos Juárez 2	Córdoba	14/05/2019	-32,64210	-62,15932
23	Eucalipto	Corral de Bustos	Córdoba	26/05/2019	-33,28426	-62,17534
24	Eucalipto	Ricardone	Santa Fe	22/06/2019	-32,80198	-60,75850
25	Eucalipto	Zavalla	Santa Fe	20/09/2019	-33,03392	-60,88941
26	Trigo	San Eugenio	Santa Fe	20/11/2019	-32,08601	-61,10819
27	Vicia	San Eugenio	Santa Fe	20/11/2019	-32,08601	-61,10819

De cada localidad y hospedero, se colectaron entre 20 y 50 chinches adultas, se sexaron y se pesaron en el laboratorio. Seguidamente, fueron seleccionadas al azar 20 chinches de cada población y disectadas en esterilidad dentro de las 8 h posteriores a ser pesadas. Los intestinos extraídos (n=20) se utilizaron primero en forma individual, para calcular el índice de infección con bacterias intestinales de cada población, y luego se

juntaron formando un *pool* por cada evento de colecta (combinación localidad x hospedero), para la posterior extracción de ADN, secuenciación de amplicones y análisis de la microbiota intestinal.

El resto de las chinches de cada colecta fue incorporado a la cría de laboratorio para renovar la población y realizar posteriores experimentos a campo de nuestro equipo de investigación. La cría se realiza en cámaras bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad; alimentadas con chauchas verdes, porotos de soja y semillas crudas de maní y girasol.

2. Determinación del índice de infección de las chinches colectadas:

Para determinar el índice de infección con bacterias, los intestinos de las 20 chinches de cada colecta y hospedero se disgregaron individualmente mediante homogeneización con un mortero de plástico estéril en 300 µl de buffer fosfato estéril con pH 7. Los homogeneizados intestinales se diluyeron en serie y se sembraron 3 de esas diluciones (10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}) en alícuotas de 10 µl con la técnica de la microgota en placas de Petri con medio de cultivo agar tripteína de soja (TSA, de Laboratorios Britania). El índice de infección se calculó como la relación entre el número de chinches adultas infectadas (con crecimiento de colonias bacterianas en el medio de cultivo) sobre el total de chinches adultas disectadas (Fig. K).

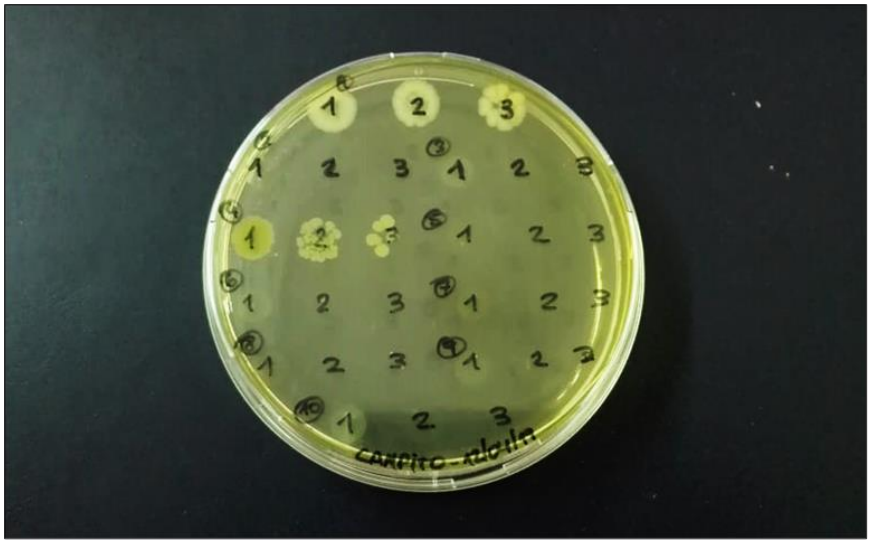

Figura K: Placa de Petri que muestra el crecimiento de colonias de bacterias intestinales de chinches para el cálculo del índice de infección. El crecimiento de las colonias se realizó en medio de cultivo TSA, donde se sembraron 3 diluciones del homogeneizado intestinal de cada una de las chinches del experimento.

3. <u>Estudio de las comunidades de bacterias intestinales de chinches de campo por *metabarcoding*</u>:

El estudio taxonómico de la microbiota intestinal de las chinches de campo se realizó sólo con las poblaciones colectadas en los lotes con soja, maíz o yuyo colorado. De cada una de esas poblaciones de chinches se obtuvo un *pool* de 20 intestinos que formaron una réplica, para la extracción de ADN y posterior secuenciación del gen 16S. Por cada sitio de colecta con esos hospederos se obtuvo una réplica, estas entonces fueron: n=5 para soja, n=3 para maíz y n=3 para yuyo colorado.

Tanto la extracción de ADN y secuenciación, como el procesamiento de las secuencias y análisis estadísticos fueron realizados de la misma forma descripta en el primer experimento de este capítulo (sección 5 y 6). Además, se calcularon los índices de diversidad alfa: riqueza observada (expresada como número de OTU's observadas por muestra) e índice de Shannon-Weaver, utilizando los paquetes *ape* (Paradis y Schliep, 2018) y *vegan* (Oksanen et al. 2019) en el entorno R (RStudio Team 2015). Las salidas

gráficas se generaron utilizando el paquete *ggplot2* (Wickham y Wickham, 2016).

- SEGUNDA ETAPA

1. Materiales biológicos y condiciones generales del cultivo:

Se sembraron en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la UBA, a fines de diciembre del año 2019, una parcela para cada opción de dieta (soja, maíz y yuyo colorado), bajo un diseño experimental en bloques al azar. Además, en el mismo lote experimental se armó un gazebo (3x3 m) que contenía una parcela de soja, una de maíz y otra de yuyo colorado. Las parcelas fueron de 1,5 m^2, la soja se sembró de igual forma que en los anteriores experimentos, el maíz se sembró con una distancia entre surcos de 50 cm y de a 3 semillas por golpe cada 50 cm para lograr una densidad de 9 plantas/m^2, mientras que el yuyo colorado se sembró al voleo en almácigos y luego fueron trasplantados a las parcelas con una densidad de 4 plantas/m^2.

Desde el momento de emergencia de las plántulas hasta que desarrollaron las primeras hojas verdaderas se las protegió del ataque de aves, usando una cobertura de media sombra. Para lograr el correcto establecimiento de las plantas, durante los primeros meses se realizaron periódicamente labores culturales como riego, control de plagas tempranas (orugas cortadoras y hormigas), raleo y desmalezado manual.

2. Diseño del experimento de alimentación controlada:

Todas las chinches utilizadas en este experimento provenían de la misma población de campo. De esta población, se tomó una muestra inicial de 6 intestinos para estudiar la

composición taxonómica de su microbiota y poder luego comparar con la microbiota de las chinches al finalizar el experimento, después de alimentarse durante 10 días de las diferentes opciones de dieta.

Dentro de cada parcela se seleccionaron 4 plantas para ser picadas por las chinches. Al inicio del llenado de granos de la soja (R5) se colocaron dentro de bolsas de tul las chinches adultas (n=8, 4 hembras y 4 machos) sobre las plantas de soja, maíz o yuyo colorado, es decir sin preferencia (*no choice*) (Fig. L, a-c). Simultáneamente, dentro del gazebo que incluía todas las opciones de dieta (soja, maíz y yuyo colorado) (Fig. L-d, preferencia o *choice*) se liberaron 20 chinches adultas (10 machos y 10 hembras), que fueron marcadas previamente con pintura acrílica para poder identificarlas entre las plantas.

Luego de 10 días, se tomaron muestras de intestinos de las chinches alimentadas sobre las distintas opciones de dietas, para caracterizar sus microbiotas y comparar los cambios en su composición en respuesta a la alimentación diferencial y con la microbiota de la población inicial. Cada intestino individual de las chinches se tomó como una réplica. Estas fueron n=6 para las dietas sin preferencia (soja, maíz o yuyo colorado) y n=8 para la dieta de preferencia o libre elección (*choice*). Esto nos permitió determinar los efectos de la dieta del insecto sobre el bacterioma intestinal.

Figura L: Plantas utilizadas para el experimento a campo de alimentación controlada de las chinches. Se colocaron dentro de bolsas de tul sobre: a- maíz, b- soja, c- yuyo colorado; o d- dentro de gazebos con las 3 opciones de dieta.

3. Estudio del bacterioma intestinal de chinches del experimento por *metabarcoding*:

Tanto la extracción de ADN y secuenciación, como el procesamiento de las secuencias y análisis estadísticos fueron realizados de la misma forma descripta en el primer experimento de este capítulo (sección 5 y 6). Además, se calcularon índices de diversidad alfa: riqueza observada (expresada como número de OTU's observadas por muestra) e índice de Shannon-Weaver, utilizando los paquetes *ape* (Paradis y Schliep, 2018) y *vegan* (Oksanen et al. 2019) en el entorno R (RStudio Team 2015). Las salidas gráficas se generaron utilizando el paquete *ggplot2* (Wickham y Wickham, 2016).

3- Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde.

Estos experimentos corresponden al tercer objetivo específico: c*uantificar la actividad de los inhibidores de proteasas, en semillas de plantas de soja, frente al ataque de chinches con diferentes microbiotas intestinales.* Para poder lograrlo, en primer lugar, se seleccionaron y caracterizaron a dos poblaciones de chinches según su índice de infección con bacterias y composición de sus comunidades intestinales. Luego se colocaron estas chinches en bolsas de tul sobre plantas de soja cultivada a campo, para que se alimenten de ellas durante diez días. Se evaluó su peso y supervivencia, y por último se midieron los inhibidores de proteasas de las semillas de soja picadas por ambas poblaciones de chinches.

1. Selección y caracterización de las poblaciones de chinches de partida:

Para determinar los efectos del bacterioma intestinal de *N. viridula* sobre las defensas químicas de la planta de soja, se buscaron dos poblaciones de chinches con bacteriomas intestinales contrastantes. Se utilizaron las chinches adultas provenientes de una población homogénea de campo, atrapadas mediante trampas de luz en lotes de soja de Marcos Juárez (Córdoba) y las chinches de la población de nuestra cría de laboratorio (Cátedra de Bioquímica, FAUBA), principalmente porque se habían observado diferencias en cuanto a la diversidad y abundancia de *Yokenella* en los resultados de los experimentos anteriores a este.

En primer lugar, se determinó el índice de infección con bacterias intestinales (tal como fue descripto en el experimento dos de este capítulo, sección 2). Y luego, se

caracterizó por *metabarcoding* la comunidad de sus bacterias intestinales (según lo descripto en el primer experimento de este capítulo, sección 5 y 6).

2. Materiales biológicos y condiciones generales del cultivo:

Se sembró en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la UBA, a fines de diciembre del año 2021, el cultivar de soja Williams en parcelas, bajo un diseño experimental en bloques al azar, contando con 4 bloques en total. El cultivo se manejó siguiendo las mismas condiciones descriptas en el primer experimento de este capítulo (sección 1).

Dentro de cada parcela se seleccionaron plantas para ser picadas por las chinches. En inicio del llenado de granos (R5), las chinches de ambas poblaciones fueron colocadas dentro de bolsitas de tul sobre las vainas de soja, tratándolas de forma individual (chinche 1 – vaina 1, chinche 2 - vaina 2, etc.).

3. Muestreo:

Para analizar las respuestas defensivas de la planta en semillas de soja, se muestrearon 20 vainas y 20 chinches en cada tiempo: luego de 24 h, 72 h y 10 días de iniciado el experimento, siempre considerando a cada una de las chinches de forma individualizada junto con la vaina que estuvo picando, para luego saber que semillas habían sido picadas por chinches infectadas con bacterias y cuáles no.

Las muestras vegetales (vainas) fueron colocadas dentro de sobres de aluminio y en nitrógeno líquido, hasta ser conservadas en freezer a -80° C. Las chinches alimentadas sobre las plantas del experimento fueron disectadas en esterilidad dentro de las 8 h

posteriores al muestreo y a partir de los intestinos se determinó el índice de infección con bacterias (tal como fue descripto en el experimento dos de este capítulo, sección 2).

4. Evaluación del peso y la supervivencia de las chinches. Análisis estadísticos:

Antes de comenzar el experimento, chinches adultas de cada población fueron diferenciadas por sexo y pesadas en una balanza analítica Ohaus Discovery (tiempo inicial). Luego de 10 días, los individuos sobrevivientes de cada población de chinches fueron colectados de las bolsitas de tul, trasladados al laboratorio, sexados y pesados (tiempo final). Se cálculo por separado el peso promedio de hembras y de machos debido a que el peso de las hembras tiende a ser mayor al de los machos por características propias de la especie. Por último, el peso de los individuos de ambas poblaciones y tiempos se analizó por medio del test ANOVA para experimentos con diseño factorial y test a posteriori Bonferroni, con el software GraphPad Prism 5.

Para la evaluación de la supervivencia de las chinches a campo, las bolsitas de tul fueron revisadas a diario durante los 10 días. En cada revisión, se registró el número de chinches vivas y muertas de las bolsitas. Con estos datos se procedió posteriormente a la realización de una curva de supervivencia, estimando ésta como el número de individuos vivos sobre el número inicial de chinches. La curva de supervivencia y el análisis estadístico de estos datos fue realizado con el software GraphPad Prism 5 mediante el test Mantel-Cox, específicos para evaluación de supervivencia.

5. Cuantificación de la actividad de los inhibidores de cisteín proteasas en semillas:

Previamente a la medición de las defensas de las semillas, se determinó la infección

con bacterias intestinales de cada una de las 20 chinches muestreadas, para cada combinación de tiempo y población. De esta forma, obtuvimos el dato de cada chinche infectada o no con bacterias intestinales y, a partir de ese dato individual, se seleccionaron las semillas sobre las cuales se estuvieron alimentando, para ser cuantificados los inhibidores de proteasas digestivas. El criterio de selección fue elegir las semillas picadas por las chinches de laboratorio con infección de bacterias intestinales (las cuales todas resultaron positivas) y las semillas picadas por las chinches de campo sin infección con bacterias (cuya población siempre tuvo un índice de infección menor a las de laboratorio), para poder comparar el efecto de la infección con bacterias de las chinches sobre la respuesta defensiva de la planta.

Para la extracción de los inhibidores de cisteín proteasas (ICisP) se adaptó el protocolo descripto en Zavala et al. (2008). Se colocaron 250 mg de las semillas de soja pulverizadas con nitrógeno líquido en 1,2 ml de buffer de extracción (pH 7,2 - NaH_2PO_4 50mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM). Luego, en una microplaca de 96 celdas se colocaron 120 µl por celda de buffer de reacción (pH 6,5 - NaH_2PO_4 0,1 mM, KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM, DTT 0,3 M), 50 µl de papaína (1 mg /ml) y 10 µl del extracto de ICisP. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 30° C y a continuación se agregaron 20 µl de sustrato sintético p-Glu-Phe-Leu-pNA (0,8 mg/ml). Se corrieron las muestras en un lector espectrofotométrico de microplacas durante 20 minutos a 30° C, con agitación lenta y continua y lecturas de absorbancia a 405 nm cada 30 segundos.

La cuantificación de proteínas se realizó con reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EEUU) según indicaciones del fabricante para el ensayo de microtitulación, basado en la metodología descripta por Bradford (1976). Para la curva de calibración se usó una solución de albumina bovina 1 mg/ml y las diluciones

comprendieron el rango de 0,05 a 0,5 ug/ul. Las muestras de extractos se diluyeron 1/30 en agua destilada. Tanto para las muestras como las soluciones de albumina bovina, se mezclaron en cada pocillo 10 ul con 200 ul de solución de reactivo Bio-Rad Protein Assay (1:4 con agua destilada). En el lector de microplacas, se agitaron durante 2 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Por último, se transformaron los datos de las lecturas de absorbancia para referenciarlos a la concentración de proteínas solubles del extracto (*nmoles de PNA/mg proteína por minuto*) utilizando la ecuación de la curva de calibración calculada previamente y se analizaron estadísticamente por medio del test ANOVA para experimentos con diseño factorial. Los factores evaluados fueron el tiempo y la población.

Esto nos permitió identificar la función potencial de la diversidad bacteriana intestinal de las chinches sobre la actividad de los inhibidores de las enzimas digestivas.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde.

En un primer experimento, analizamos la variación en el tiempo de la estructura y composición taxonómica de las comunidades bacterianas de suelo, hojas, semillas e intestino de chinches, para determinar cómo están conformadas esas comunidades, si cambian durante el tiempo de interacción entre la soja y la chinche, definir qué tipo de bacterias tienen en común y cuál podría ser el origen de estas en el intestino del insecto.

A partir de todas las secuencias de nuestro conjunto de datos, el estudio taxonómico reveló un total de 76 unidades taxonómicas operativas (del inglés Operational Taxonomic Unit, OTU), presentes en las 54 muestras analizadas, tanto de suelo, planta (hojas y semillas) e intestinos de chinches. La identificación de estas OTU's a un nivel taxonómico de orden nos mostró que la mayoría pertenecían a miembros habituales de las comunidades bacterianas del suelo, compuesta por 72 órdenes. Mientras que en las chinches fueron identificados 8 órdenes bacterianos y en las plantas sólo 4 (Fig. 1.1). Observamos que en el suelo se presentaba una comunidad de bacterias más diversa y heterogénea, con respecto a la planta y la chinche, las cuales tienen comunidades compuestas por menos órdenes y en donde predomina un orden principal sobre otros secundarios.

Las comunidades intestinales de la chinche y las del suelo tienen OTUs que fueron clasificados en los mismos cuatro órdenes: *Betaproteobacteriales*, *Sphingomonadales*, *Rhizobiales* y *Azospirillales.* Sin embargo, estos OTUs son poco relevantes en el bacterioma intestinal de la chinche, ya que son muy poco abundantes en relación con el principal orden presente, *Enterobacteriales*, que predomina con un 98,6%. Este último orden también está presente y es abundante en la comunidad bacteriana presente en los

tejidos vegetales de la soja (88,1%), con la cual además comparten otros dos órdenes: *Lactobacillales* y *Pseudomonadales* (Fig. 1.1).

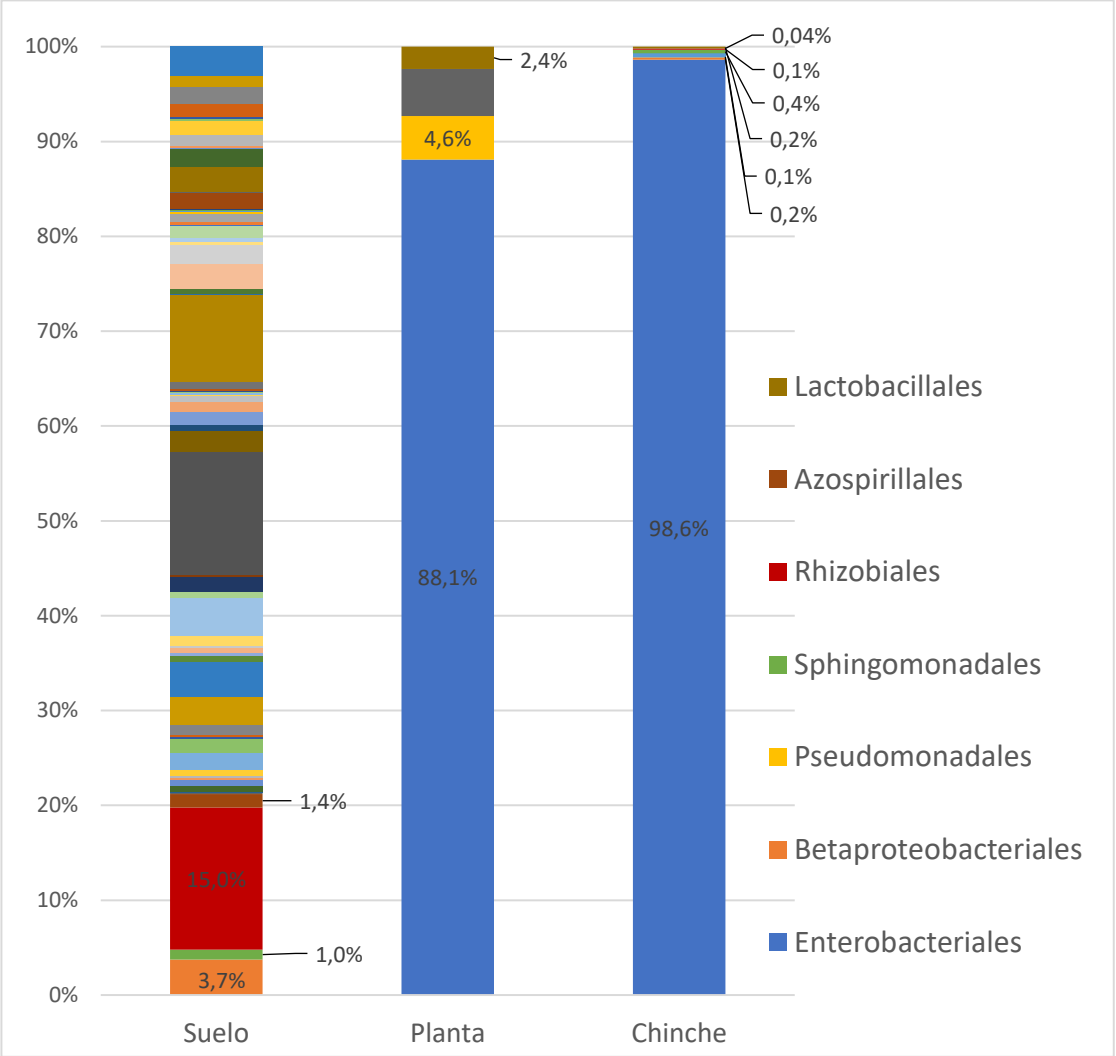

Figura 1.1: Abundancias relativas promedio de los principales órdenes bacterianos identificados según el origen de cada comunidad. Se destacan sólo aquellos ordenes en común entre el intestino de la chinche y la planta o el suelo, en condiciones de cultivo a campo.

La comunidad bacteriana del suelo de las plantas picadas por chinches, tanto del suelo rizosférico como no rizosférico, no presentó diferencias estadísticas en su perfil taxonómico (test ADONIS, P>0,05). Tampoco se observan variaciones de la diversidad del bacterioma en el tiempo o bajo el tratamiento (suelo de plantas picadas o no por chinches) (test ADONIS, P>0,05). Como se mencionó anteriormente, la comunidad del

suelo e intestinal de la chinche tienen 4 órdenes en común (*Betaproteobacteriales*, *Sphingomonadales*, *Rhizobiales* y *Azospirillales)*, pero estos son insignificantes en cuanto a su abundancia relativa en la chinche (menores a 0,5%), por lo tanto, tampoco hay géneros bacterianos dentro de estos órdenes que sean relevantes para la CBI de la chinche.

Analizando como se compone el principal orden que comparten los bacteriomas de la planta y la chinche (*Enterobacteriales*), descubrimos que está solo conformado por la familia *Enterobacteriaceae* y dentro de esta identificamos 3 géneros en común entre las chinches y las plantas: *Yokenella*, *Pantoea y Serratia*. Estos géneros bacterianos identificados por métodos moleculares coinciden con los identificados por métodos cultivables en trabajos anteriores (Medina et al. 2018). Otros géneros que comparten ambos bacteriomas son *Lactobacillus* y *Pseudomonas*, pero con abundancias muy insignificantes en la comunidad intestinal de la chinche. Todos estos géneros estuvieron presentes en la planta de soja, tanto en hojas como en semillas, a los 10 y 20 días de iniciado el ataque de la plaga (Fig. 1.2 y Fig. 1.3).

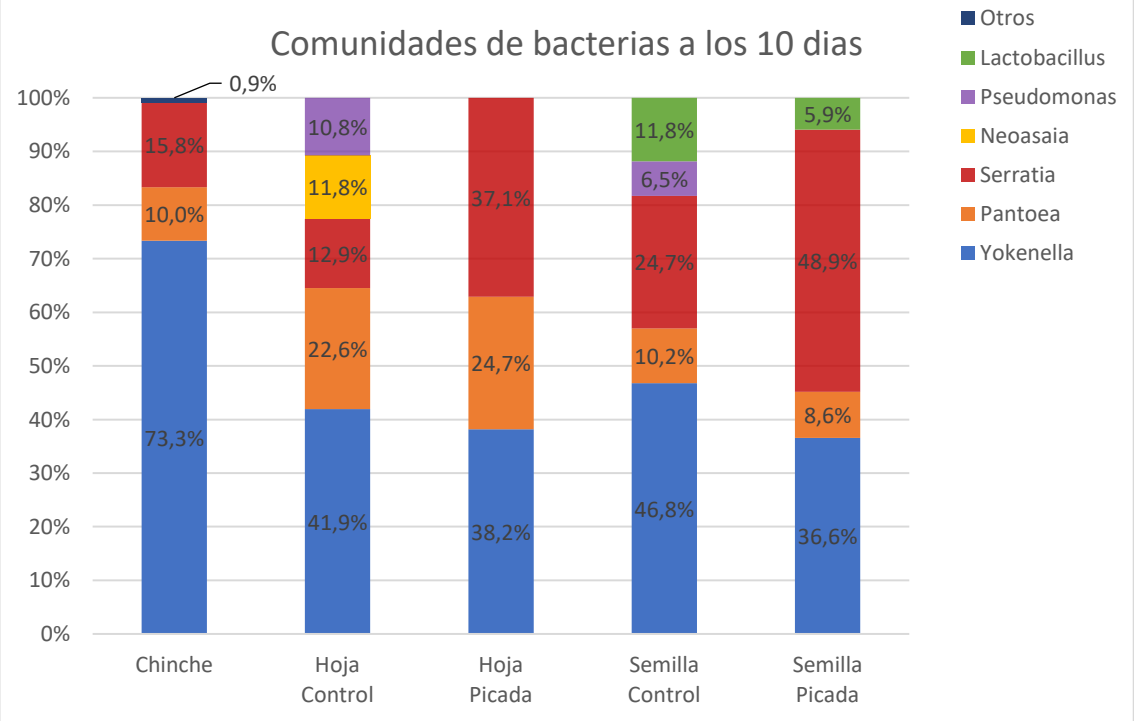

Figura 1.2: Abundancias relativas promedio de los principales géneros bacterianos identificados a

los 10 días de alimentación de las chinches en soja cultivada a campo, según el origen de cada comunidad: intestino, hojas o semillas.

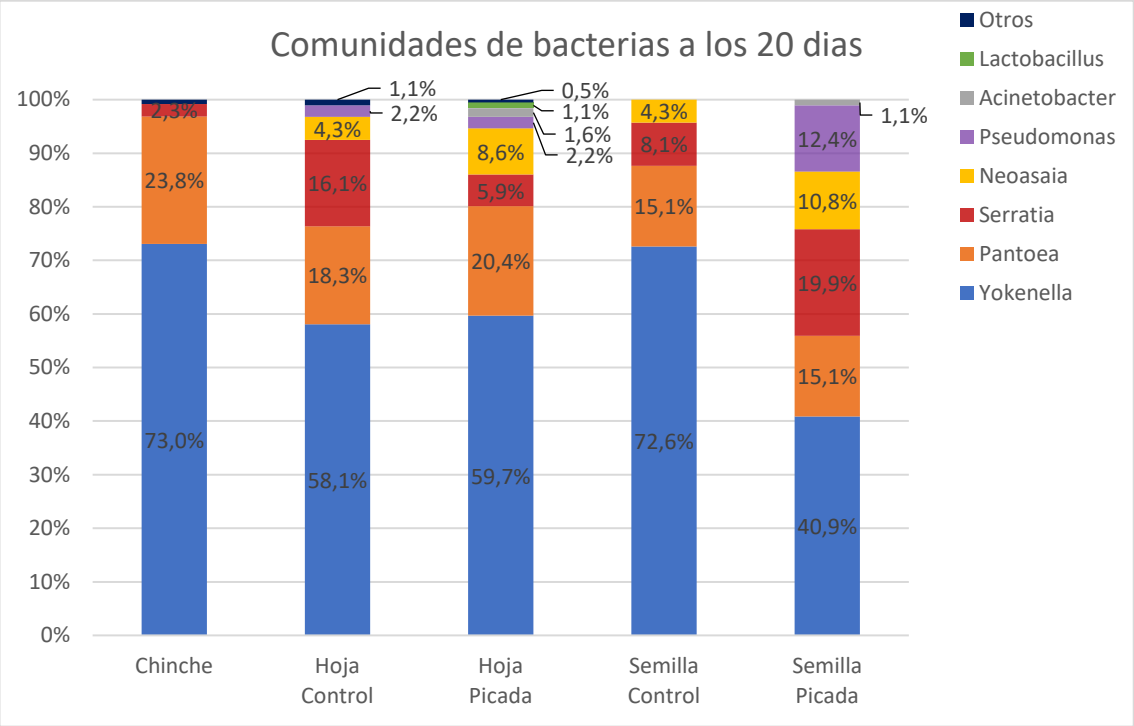

Figura 1.3: Abundancias relativas promedio de los principales géneros bacterianos identificados a los 20 días de alimentación de las chinches en soja cultivada a campo, según el origen de cada comunidad: intestino, hojas o semillas.

Estudiando las diversidades a través de un análisis multivariado (NMDS, basado en distancia de Bray-Curtis) de todas las microbiotas y comparándolos según el origen (hoja, semilla o chinche), el tratamiento (plantas picadas o control) o el tiempo (10 y 20 días), descubrimos, en primer lugar, que no hay diferencias entre las comunidades de semillas y hojas, como tampoco las de las plantas picadas y control, y por otro parte, que las comunidades bacterianas de *Nezara viridula* no presenta variaciones durante los 20 días de alimentación de las chinches en soja (n=4, test ADONIS, P>0,05, Fig. 1.4). En cambio, si existen diferencias entre las microbiotas de la planta en el tiempo (n=4, test ADONIS, P=0,014) y, además, la comunidad intestinal de la chinche se diferencia de la de la planta (n=4, test ADONIS, P=0,025), pero estas diferencias estadísticas son difíciles de observar gráficamente.

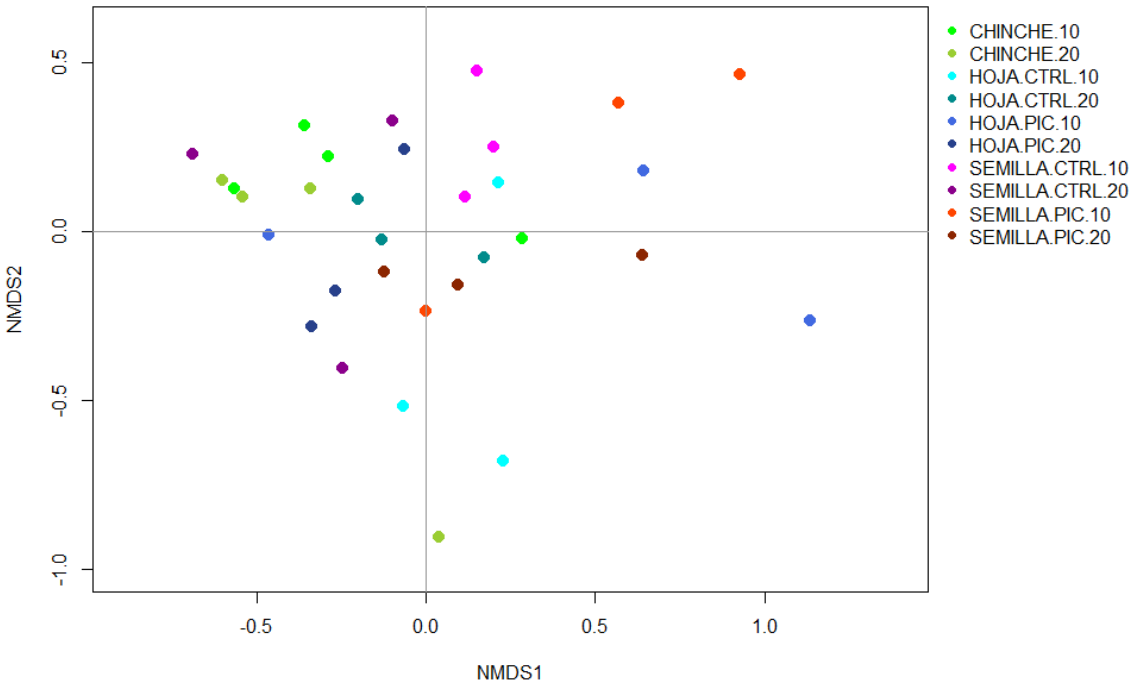

Figura 1.4: Análisis multivariado de los bacteriomas de semillas, hojas e intestinos de chinches según el tiempo y tratamiento. Tiempo: 10 y 20 días. Tratamiento: plantas picadas por chinches o plantas control, de soja cultivada a campo (n=4, *NMDS, basado en distancia de Bray-Curtis)*.

Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas.

Para comprobar si existían variaciones en la diversidad de la CBI de la chinche que dependan de la presencia del cultivo de soja, caracterizamos su composición taxonómica por *metabarcoding* cuando se alimenta de otros hospederos alternativos a la soja, a través de colectas de insectos de campo a lo largo del año y luego en un experimento de alimentación controlada.

a. Colectas a campo:

Analizamos la presencia de la población de *Nezara viridula* en la región sojera y evaluamos su comunidad bacteriana intestinal, realizando viajes de colectas de insectos adultos de chinches a lo largo de dos años (2018-2020) y por localidades de las provincias de Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. Se recolectaron más de 1000 chinches en total, sobre siete hospederos distintos, en 27 sitios de colecta y durante las cuatro estaciones del año, aunque entre los meses de septiembre y enero fue la temporada más difícil para hallarlas. Los sitios de colecta y hospederos se detallan a continuación, en la Figura 2.1.

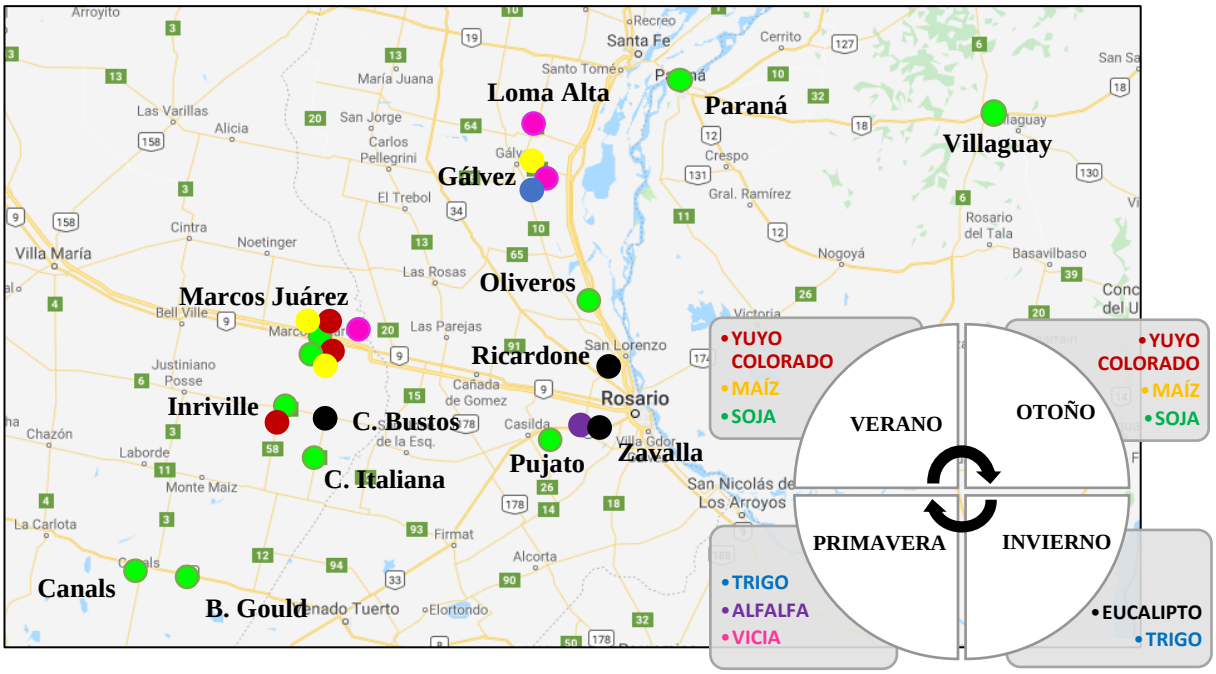

Fig. 2.1: Mapa de sitios de colectas de chinches en la región sojera núcleo (2018-2020). Cada color indica los diferentes hospederos donde fueron colectadas las chinches (verde: soja, amarillo: maíz, rojo: yuyo colorado, azul: trigo, rosa: vicia, violeta: alfalfa, y negro: eucalipto-diapausa invernal).

De todos los grupos de insectos colectados, se calcularon y compararon el peso e índice de infección con bacterias intestinales según hospedero. Las chinches colectadas en soja tuvieron uno de los mayores índices de infección (49,7 ± 8,1%) y se diferenciaron significativamente de las chinches colectadas en maíz o yuyo colorado (n=20, test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05, Fig. 2.2), las cuales presentaron índices de infección de 11,7 ± 1,7% y 15 ± 2,8%. Los índices de infección de las chinches colectadas en otros hospederos no tuvieron diferencias con respecto a la soja, siendo 35 ± 8,5% para vicia, 28,3 ± 10,9% para eucalipto y 59 ± 1 % para alfalfa y trigo (Fig.2.2).

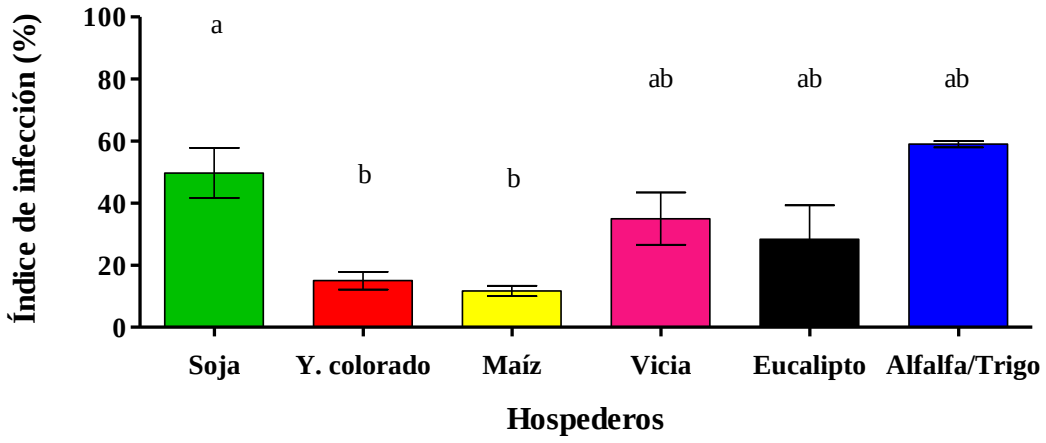

Figura 2.2: Índice de infección con bacterias intestinales de adultos de *N. viridula* colectados a campo sobre diferentes hospederos. Relación entre el n de intestinos infectados con bacterias cultivables (con recuentos $>10^3$ UFC/mg) y el n total de intestinos disectados. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras (*n=20, test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05*).

Con respecto a los pesos de las chinches de las diferentes colectas, los insectos se clasificaron previamente por sexo para analizarlos por separado ya que por propiedades intrínsecas de la especie las hembras pesan siempre más que los machos. El peso de las chinches provenientes de campos de soja fue el mayor, tanto para machos como para hembras (146,4 ± 5 mg y 210,9 ± 11,8 mg, respectivamente), seguidas por las chinches de otros hospederos como maíz (133,7 ± 15,7 mg y 166,9 ± 7,9 mg), yuyo colorado (129,9 ± 17,6 mg y 153,2 ± 23,2 mg), o eucalipto (140,1 ± 4,4 mg y 162,7 ± 9,9 mg) (n=50, test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05, Fig. 2.3a y 2.3b). Los pesos de las chinches colectadas sobre vicia y alfalfa-trigo fueron menores (machos: 84 ± 8,7 mg y 95,3 ± 5,8 mg; hembras: 97,9 ± 10,2 y 125,7 ± 13,9 mg, respectivamente) y tanto hembras como machos se diferenciaron de las demás chinches colectadas (n=50, test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05, Fig. 2.3a y 2.3b).

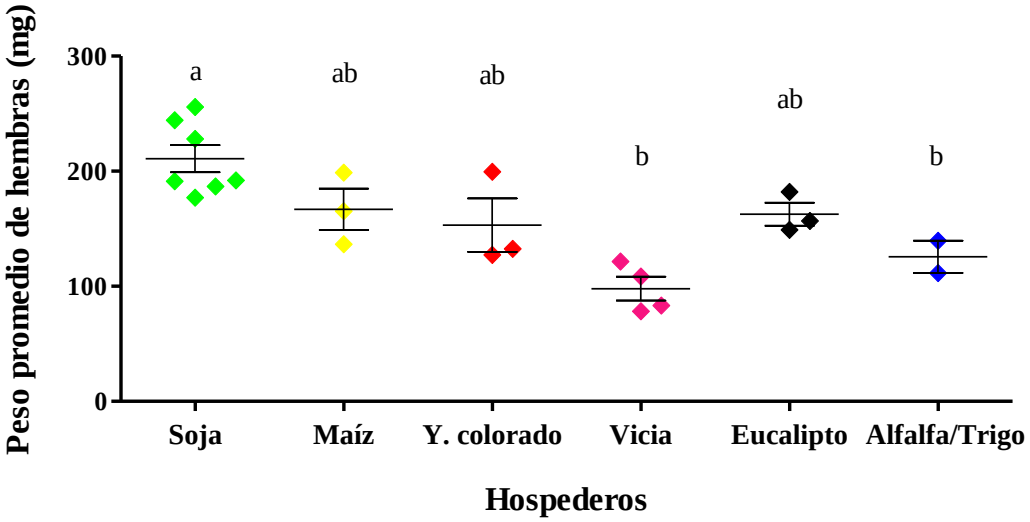

Fig. 2.3a: Peso promedio de chinches hembras colectadas a campo sobre diferentes hospederos. Cada punto de color representa el peso promedio de las chinches (n=50) de un sitio de colecta, la línea horizontal central es la media de todo el grupo de sitios del mismo hospedero y las líneas horizontales superior e inferior son el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras (test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05).

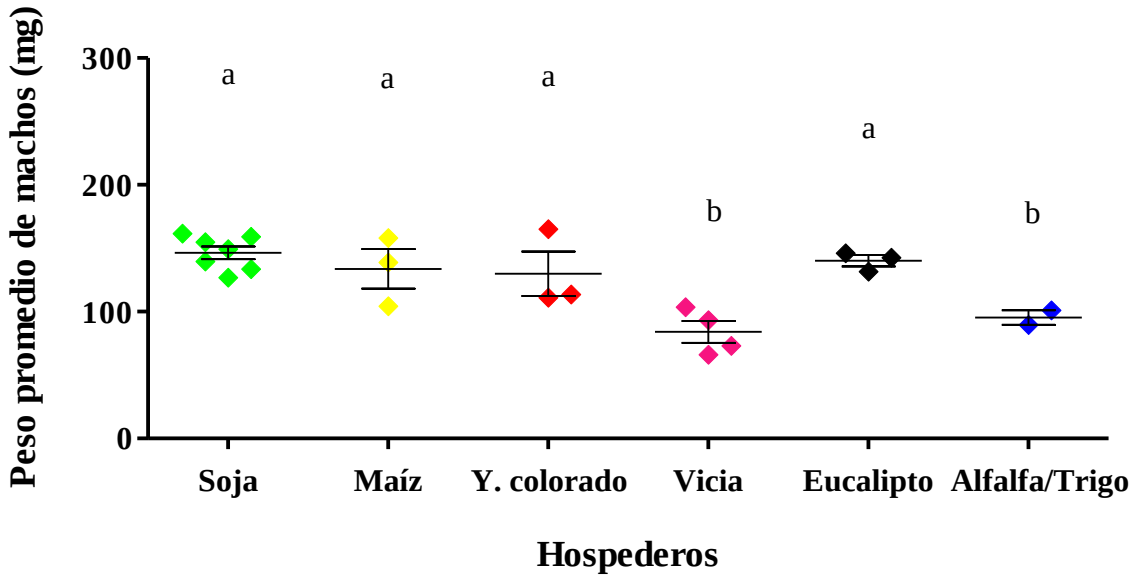

Fig. 2.3b: Peso promedio de chinches machos colectados a campo sobre diferentes hospederos. Cada punto de color representa el peso promedio de las chinches (n=50) de un sitio de colecta, la línea horizontal central es la media de todo el grupo de sitios del mismo hospedero y las líneas horizontales superior e inferior son el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras (test ANOVA y test a posteriori Tukey, P<0,05).

Para el estudio taxonómico de las comunidades bacterianas intestinales por

metabarcoding se seleccionaron aquellas poblaciones de chinches provenientes de soja o de hospederos secundarios contemporáneos a este cultivo (como maíz y yuyo colorado) (Cuadro 2). De cada una de estas poblaciones de campo se obtuvo una réplica. Cada réplica estaba conformada por un *pool* de 20 intestinos de las chinches colectadas en esos hospederos mencionados.

Cuadro 2: Hospederos seleccionados para el estudio taxonómico del bacterioma intestinal de chinches colectadas a campo. Datos de cada sitio donde fueron colectadas las chinches sobre soja u hospederos secundarios: maíz y yuyo colorado.

Hospedero	Localidad	Provincia	Fecha
Soja	Pujato	Santa Fe	04/02/19
Soja	Marcos Juárez 1	Córdoba	06/03/19
Soja	Marcos Juárez 2	Córdoba	26/03/19
Soja	Inriville	Córdoba	26/03/19
Soja	Colonia Italiana	Córdoba	26/03/19
Soja	Benjamín Gould	Córdoba	26/03/19
Soja	Canals	Córdoba	26/03/19
Maíz	Gálvez	Santa Fe	19/12/18
Maíz	Marcos Juárez 1	Córdoba	26/03/19
Maíz	Marcos Juárez 2	Córdoba	14/05/19
Yuyo colorado	Inriville	Córdoba	26/03/19
Yuyo colorado	Marcos Juárez 1	Córdoba	14/05/19
Yuyo colorado	Marcos Juárez 2	Córdoba	14/05/19

El análisis taxonómico de los bacteriomas intestinales por *metabarcoding* y los índices de diversidad biológica calculados (riqueza específica e índice de Shannon-Weaver), mostraron que la diversidad del bacterioma de las chinches colectadas en soja es significativamente menor que la de aquellas chinches que se encontraron en maíz o yuyo colorado (n=3, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, $P<0,05$, Fig. 2.4). Estas tienen una menor riqueza de especies (5,8 ± 0,4 OTU's en soja, versus 12 ± 0,6 OTU's en yuyo colorado o 14 ± 0,6 OTU's en maíz; Fig. 2.4), y un menor índice de diversidad alfa (Shannon-Weaver) (0,97 en soja, versus 1,5 en maíz o 1,6 en yuyo colorado; Fig. 2.4).

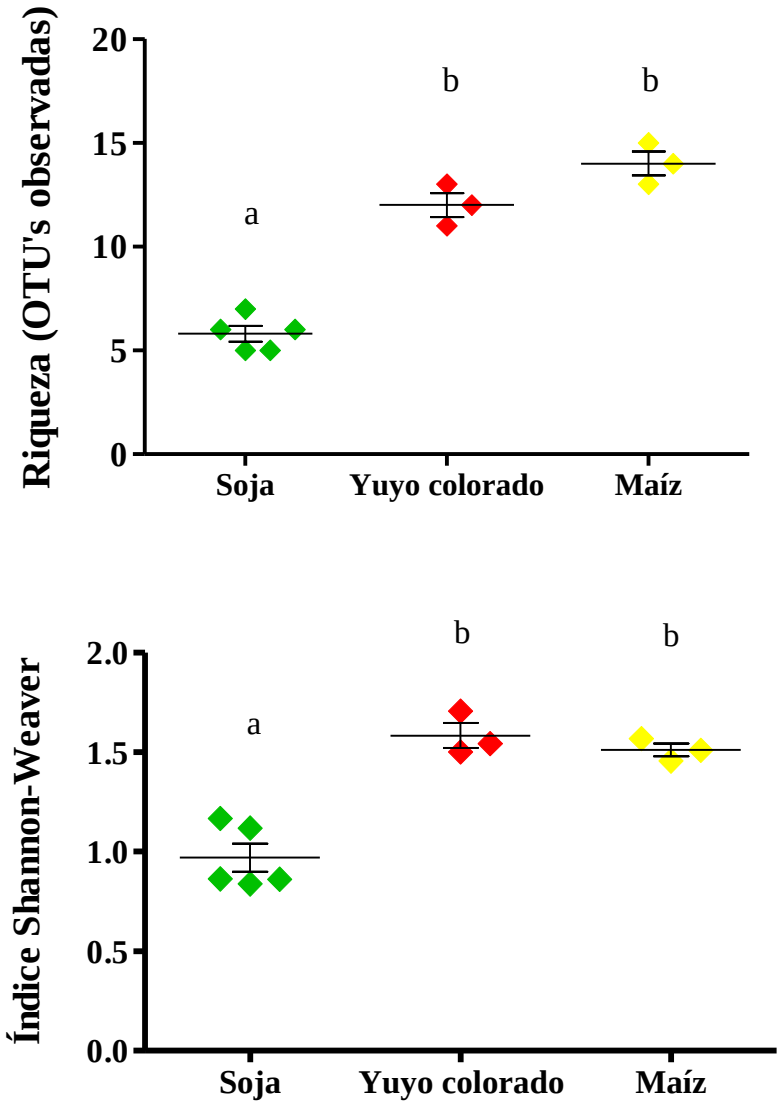

Figura 2.4: Índices de diversidad biológica de bacteriomas intestinales de chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. Riqueza especifica expresado como "OTU's observadas" e índice de Shannon-Weaver. Cada punto de color representa el valor de un sitio de colecta, la línea horizontal central es la media de todo el grupo de sitios del mismo hospedero y las líneas horizontales superior e inferior son el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras (*n=3, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05*).

Además, pudo observarse al analizar la equitatividad de la composición de los bacteriomas, según las abundancias relativas de los géneros identificados, que, en las chinches provenientes de soja, predominan los géneros *Yokenella* (45,2%) y *Pantoea* (45,4%) sobre otras bacterias como *Serratia* (1,8%), *Neoasaia* (9%) o *Acinetobacter*

(1,1%). Las comunidades bacterianas intestinales de chinches de yuyo colorado y maíz estuvieron compuestas además por *Gilliamella* (10,7 y 11,8% respectivamente), *Lactobacillus* (1,6 y 0,6%) y *Firmicutes* no definidos (2,4% en maíz) (Fig. 2.5).

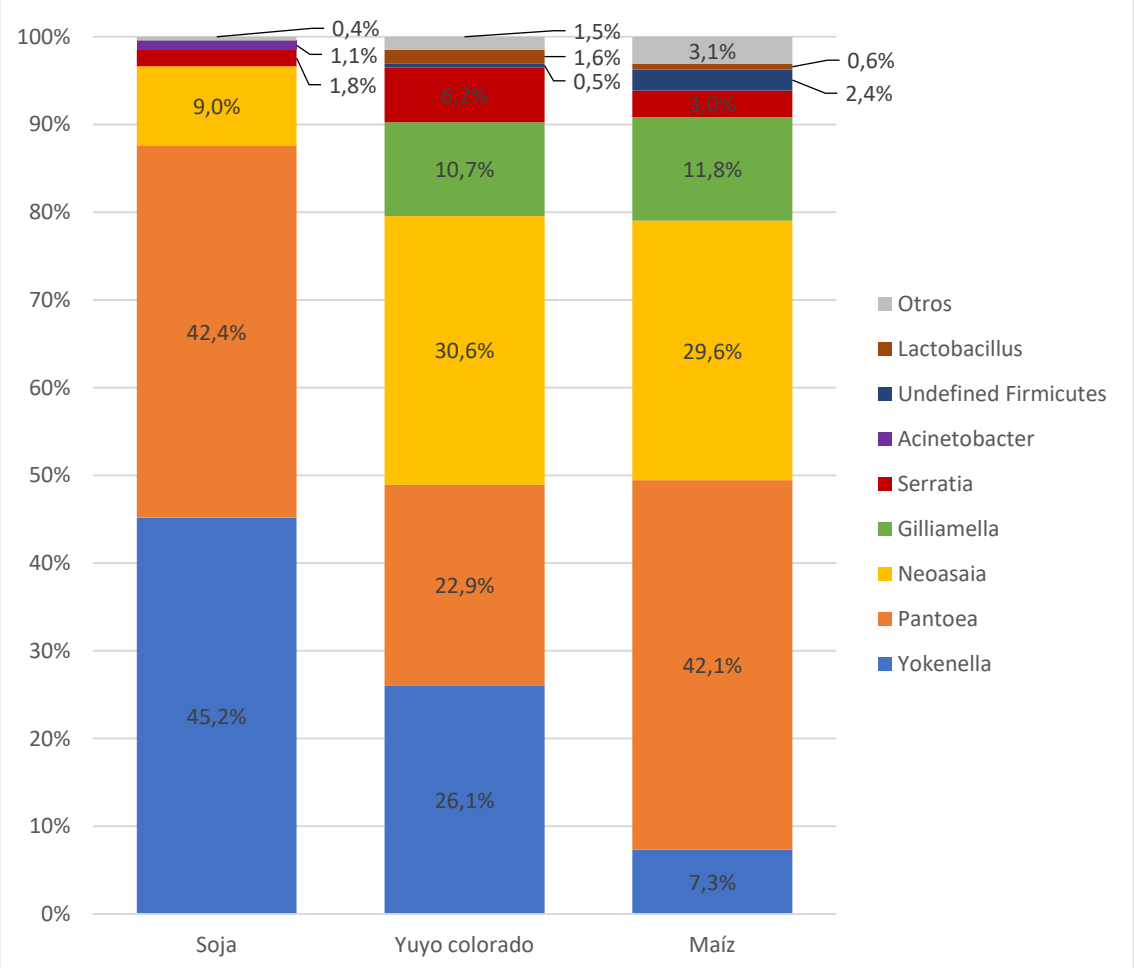

Fig. 2.5: Abundancias relativas promedio de los géneros bacterianos identificados en intestinos de adultos de *Nezara viridula*, colectados a campo sobre diferentes hospederos. "*Otros*" representa 10 géneros con abundancias < 0,5% cada uno.

Comparando de forma individual las abundancias relativas de los principales géneros bacterianos identificados en las comunidades intestinales de las chinches colectadas a campo, descubrimos diferencias significativas entre la soja y los otros dos hospederos. Por un lado, *Yokenella* tiene mayor abundancia en soja, comparada con maíz

o yuyo colorado, mientras que *Pantoea* es menos abundante en yuyo colorado con respecto a soja y maíz. *Neoasaia* y *Gilliamella* son estadísticamente más abundantes en los hospederos alternativos a la soja. *Serratia* no presentó diferencias en cuanto a su abundancia con respecto a los distintos hospederos de origen (n=3, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05, Fig. 2.6).

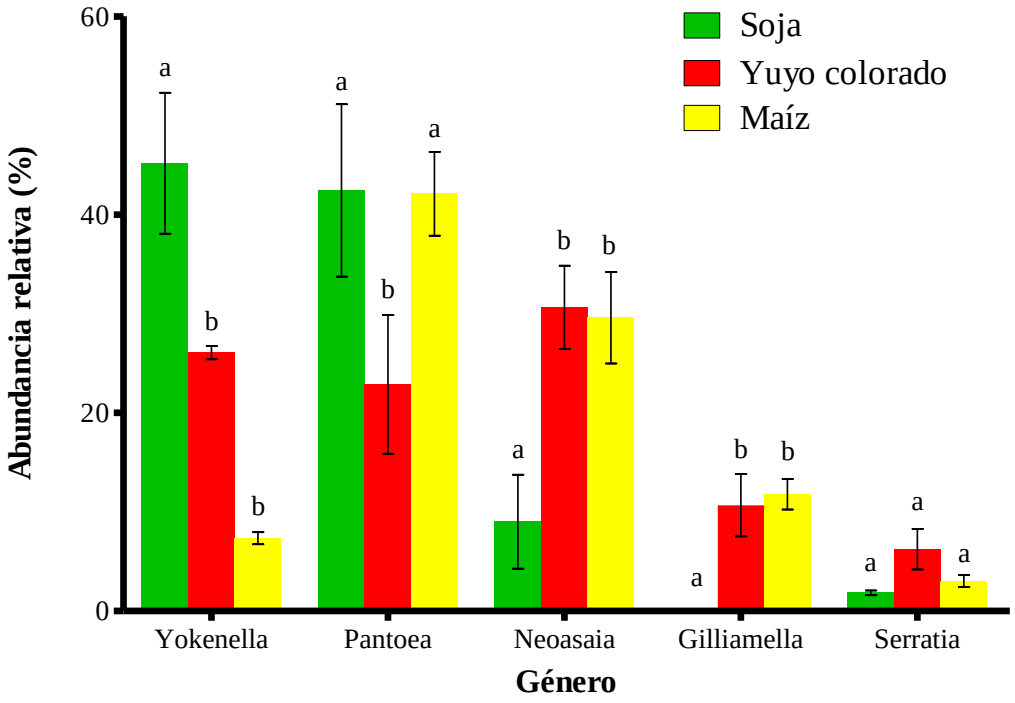

Figura 2.6: Análisis de las abundancias relativas de los principales géneros bacterianos identificados en las comunidades intestinales de las chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. *(n=3, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05). Las letras de significancia estadística son consideradas para cada bacteria y entre hospederos, diferentes letras indican diferencias significativas.*

Comparando la diversidad-beta entre microbiotas de las diferentes colectas a través de un análisis multivariado (NMDS), reafirmamos que las comunidades bacterianas de las chinches diferían notablemente entre ellas según su origen (n=3, test ADONIS, P<0,001, Fig. 2.7).

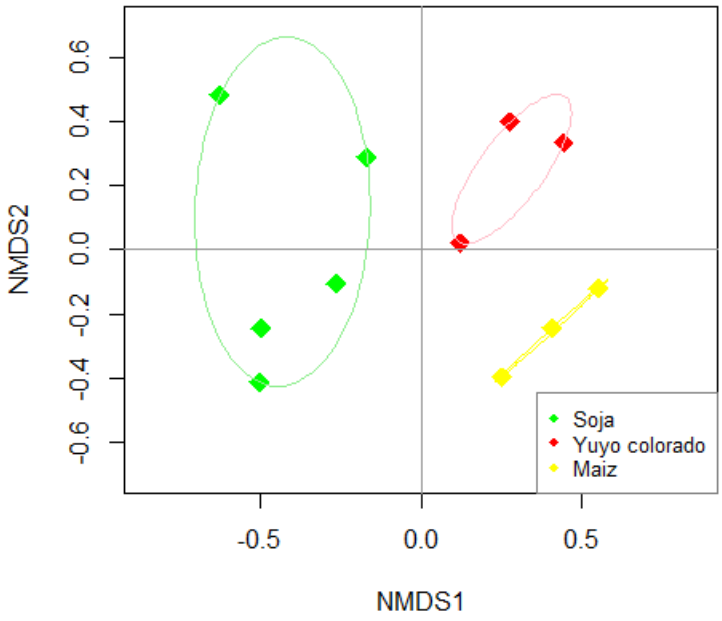

Figura 2.7: Análisis multivariado de los bacteriomas intestinales de chinches colectadas a campo sobre diferentes hospederos. (n=3, *NMDS, basado en distancia de Bray-Curtis, test ADONIS, P<0,001)*.

b. Experimento de alimentación controlada:

Para poner a prueba los primeros resultados obtenidos a partir del análisis de las chinches colectadas a campo, se realizó un experimento de alimentación controlada de las chinches en condiciones naturales de cultivo sobre los tres hospederos seleccionados como dietas: soja, maíz y yuyo colorado. Además, se sumó una cuarta opción de dieta (*choice*), es decir libre elección de cualquiera de esos 3 hospederos, para evaluar la preferencia de los insectos. Para este experimento, se partió de una misma población inicial de chinches para que se alimenten durante 10 días de cada opción de dieta y a la cual también se le estudió su microbiota inicial por *metabarcoding*.

Los índices de diversidad biológica calculados revelaron nuevamente que el bacterioma de las chinches que se alimentaron solo de soja es significativamente menos diverso que el de aquellas chinches que se alimentaron con otras dietas (n=6, test Kruskal-

Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,01, Fig. 2.8). Cuando comen soja tienen menor riqueza de especies (5,5 OTU's) y un índice de diversidad alfa (Shannon-Weaver) más bajo (0,2898), que al alimentarse de maíz o yuyo colorado.

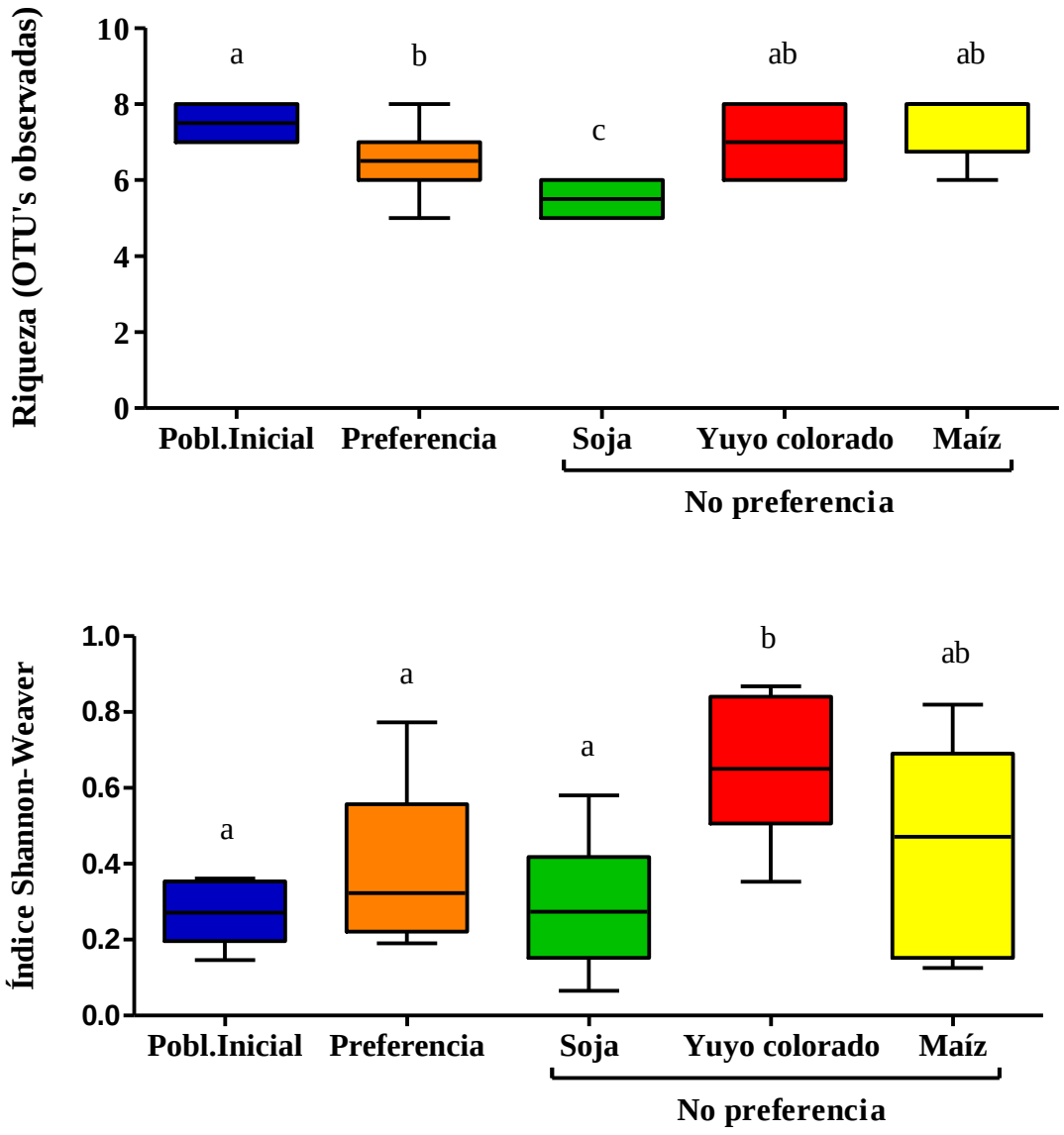

Figura 2.8: Índices de diversidad biológica de bacteriomas intestinales de chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. Riqueza especifica expresada como "OTU's observadas" e índice de Shannon-Weaver. Cada caja de color representa los valores de diversidad de los distintos bacteriomas según dieta, la línea horizontal central es la media de todo el grupo de bacteriomas según dieta y las líneas horizontales superior e inferior son el error estándar de la media. (*n=6, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05*). *Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.*

Analizando las abundancias relativas de los principales géneros identificados, observamos que las chinches alimentadas con soja tienen una comunidad de bacterias donde predomina *Yokenella* y se diferencia con respecto a las otras opciones de dieta. Lo contrario ocurre con *Pantoea*, cuya abundancia es mucho menor cuando las chinches comieron soja. Ambas bacterias modifican su abundancia notablemente con respecto al bacterioma de las chinches del inicio del experimento (n=6, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05, Fig. 2.9). El género *Neoasaia* no mostró diferencias en su abundancia entre las comunidades de las chinches con diferentes dietas, mientras que *Serratia* modificó su abundancia en el bacterioma de las chinches que consumieron yuyo colorado, siendo mayor con respecto a la población inicial de origen (n=6, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05, Fig. 2.9).

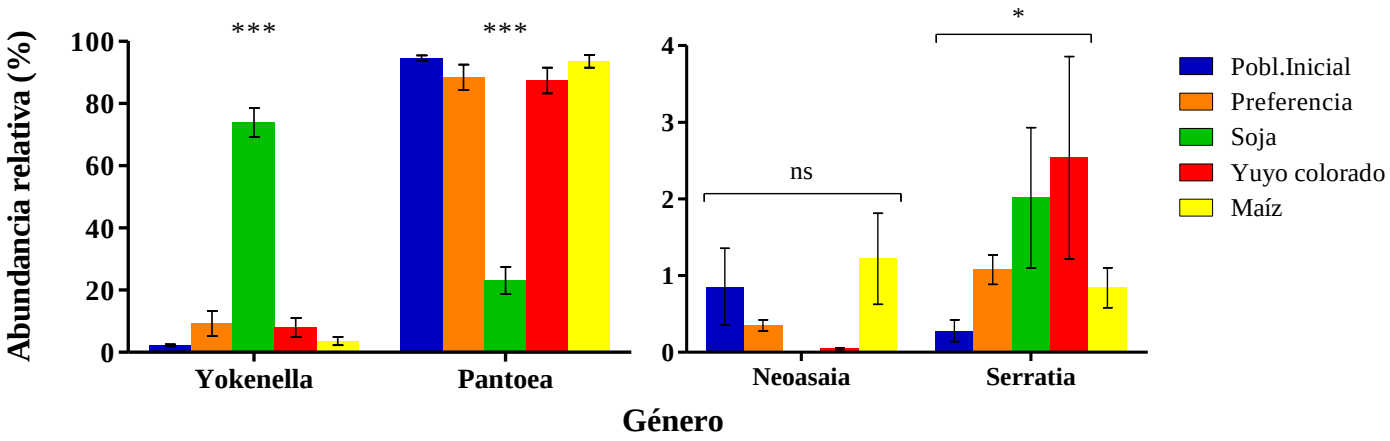

Figura 2.9: Análisis de las abundancias relativas de los principales géneros bacterianos identificados en las comunidades intestinales de las chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. *(n=6, test Kruskal-Wallis y test a posteriori Dunns, P<0,05).*

Analizando la diversidad beta a través de un análisis multivariado (NMDS) de las microbiotas de las chinches bajo diferentes dietas, distinguimos que las comunidades bacterianas de las chinches que se alimentaron solo con soja se diferenciaban de forma

notable de los demás bacteriomas de chinches con otras dietas (n=6, test ADONIS, P<0,001, Fig. 2.10). Cabe destacar también que el bacterioma de las chinches con libre opción de dieta (*choice*), presentó una situación intermedia a las demás opciones sin elección (Fig 2.10).

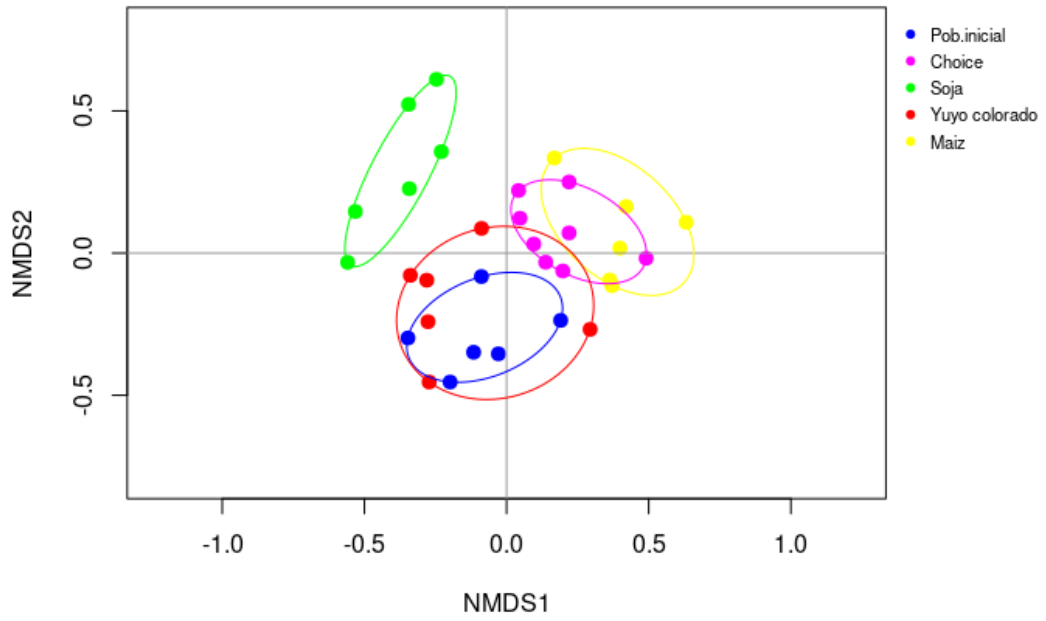

Fig. 2.10: Análisis multivariado de los bacteriomas intestinales de chinches alimentadas con diferentes dietas en condiciones naturales de cultivo. (*NMDS, basado en distancia de Bray-Curtis, ADONIS test: p<0,001)*.

Cuando las chinches fueron alimentadas solo con soja cambiaron su comunidad bacteriana intestinal, mientras que con otras dietas (maíz o yuyo colorado) las variaciones no fueron significativas. Al igual que los resultados de colectas de campo, tanto la riqueza de especies como la diversidad fueron menores en las chinches que comieron soja. También observamos que la abundancia del género *Yokenella* es la que más varía entre los bacteriomas de las chinches con diferentes dietas, siendo marcadamente mayor cuando se alimentan de soja. Todo lo contrario, ocurre con el género *Pantoea*, cuya abundancia es menor en soja.

Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde.

La chinche verde se alimenta de las semillas de soja en desarrollo a pesar de la importante respuesta defensiva de la planta y su CBI podría estar modulando esta adaptación. Para comprobar si existe interacción entre los inhibidores de cisteín-proteasas y las bacterias intestinales de la chinche, primero se identificaron poblaciones de insectos con diferentes comunidades bacterianas y luego se cuantificó la actividad de esas defensas químicas en las semillas de soja picadas por estas chinches, en condiciones naturales del cultivo.

a. Poblaciones iniciales de chinches:

Utilizamos dos poblaciones iniciales de chinches con características bien contrastantes en cuanto al índice de infección y abundancia de *Yokenella*: chinches de laboratorio y chinches de campo. Para determinar el índice de infección se utilizaron 10 chinches de cada población, mientras que para estudiar la composición taxonómica de sus microbiotas y abundancia de *Yokenella* se utilizaron otras 6 chinches, tomando el intestino de cada una de estas como réplicas.

Las chinches de laboratorio presentaron un alto índice de infección con bacterias cultivables (97±1,53 %, n=10, Fig. 3.1), y una baja diversidad de su comunidad, por la predominancia del género *Yokenella* (n=6, Fig. 3.2). Esta bacteria siempre estuvo presente en las chinches analizadas y fue la más abundante de todas, con un 81,9% de abundancia relativa promedio, seguida con un amplio margen por *Serratia* y *Pantoea* como principales bacterias identificadas, con 7,8% y 7,9% respectivamente (n=6, Fig. 3.2). En las chinches de campo que evaluamos, el índice de infección fue siempre mucho

menor (26,5±1,97 %, n=10, Fig. 3.1) y en su comunidad intestinal la abundancia de *Yokenella* estuvo por debajo del 2,5%, mientras que la abundancia de *Pantoea* fue ampliamente mayor (94,6%, n=6, Fig. 3.2).

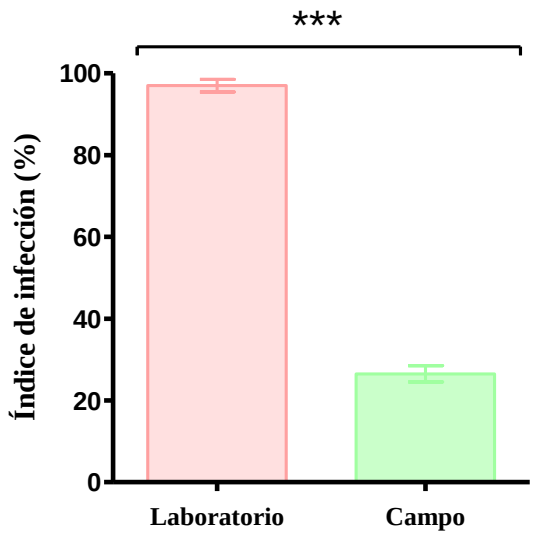

Figura 3.1: Índice de infección con bacterias intestinales de adultos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones seleccionadas para el experimento. Relación entre el n de intestinos infectados con bacterias cultivables (con recuentos $>10^3$ UFC/mg) y el n total de intestinos disectados, según población de origen: chinches de laboratorio vs. chinches de campo (*n=10, test t Student, P<0,0001*).

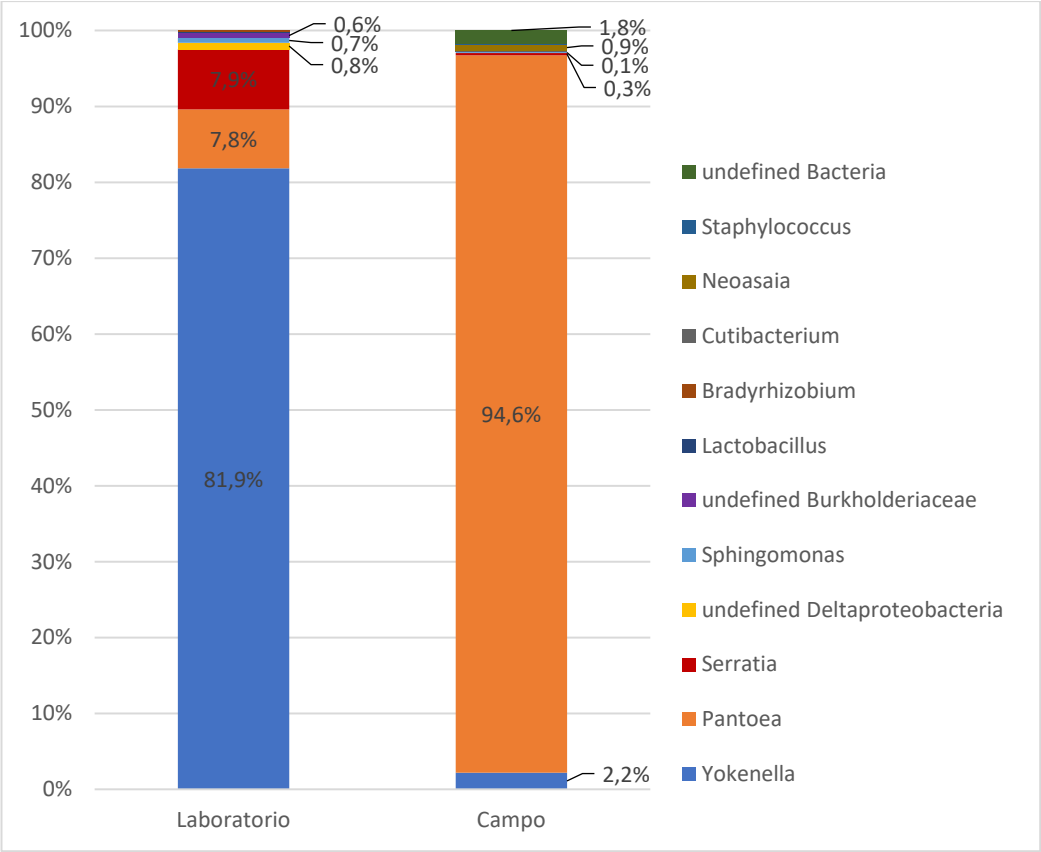

Figura 3.2: Abundancias relativas promedio de géneros bacterianos identificados en intestinos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones: laboratorio y campo.

Además, encontramos diferencias significativas al comparar la diversidad entre microbiotas de las diferentes poblaciones: las comunidades bacterianas de las chinches de campo diferían notablemente de las de las chinches criadas en laboratorio (n=6, test ADONIS, P<0,001, Fig. 3.3).

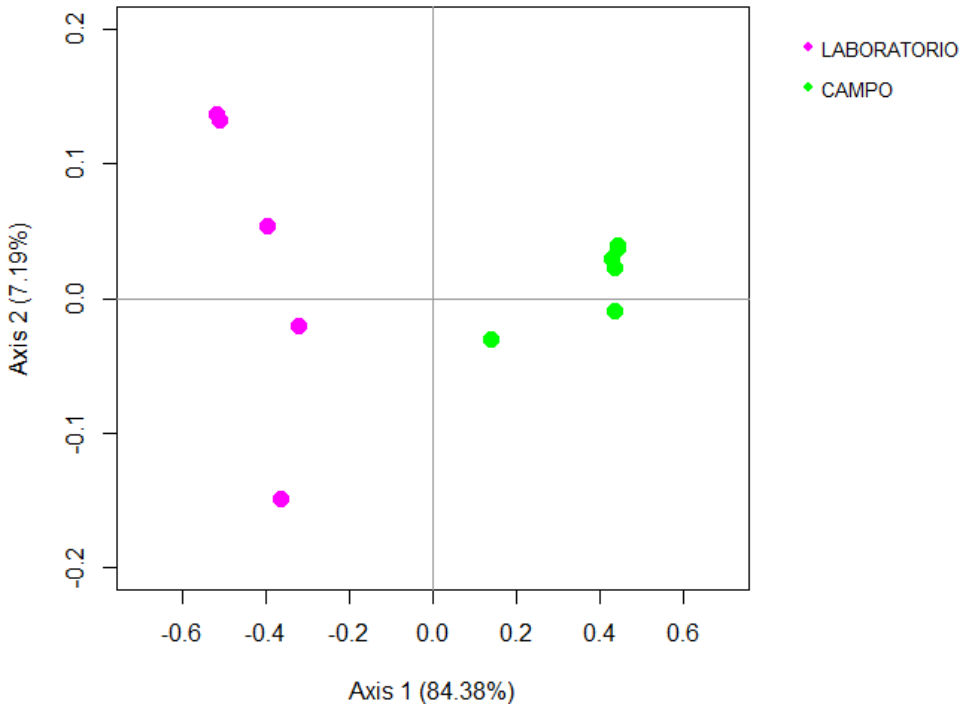

Fig. 3.3: Análisis multivariado de la diversidad beta de bacteriomas intestinales de chinches de diferentes poblaciones: laboratorio y campo. (*n=6, PCoA basado en distancia de Bray-Curtis, test ADONIS, P<0,001*).

b. Parámetros evaluados durante el experimento:

A partir de esas dos poblaciones con bacteriomas bien diferenciados llevamos a cabo el tercer experimento, en donde evaluamos, por un lado, el peso y la supervivencia de las dos poblaciones de chinches sobre las plantas de soja durante 10 días. Se analizaron chinches hembras (Fig. 3.4a) y machos (Fig. 3.4b) por separado, dado que por propiedades intrínsecas de la especie las hembras pesan siempre más que los machos. Las chinches hembras de laboratorio (más infectadas) tuvieron un mayor aumento de peso luego de alimentarse de la soja (n=12, ANOVA y test a posteriori Bonferroni, P<0,001, Fig. 3.4a), mientras que las chinches hembras de campo no presentaron diferencias entre su peso inicial y final (Fig. 3.4a). En cuanto a las chinches machos, no hubo diferencias

significativas en relación con su peso antes y después de alimentarse de soja durante los 10 días, para ninguna de las dos poblaciones de chinches (Fig. 3.4b).

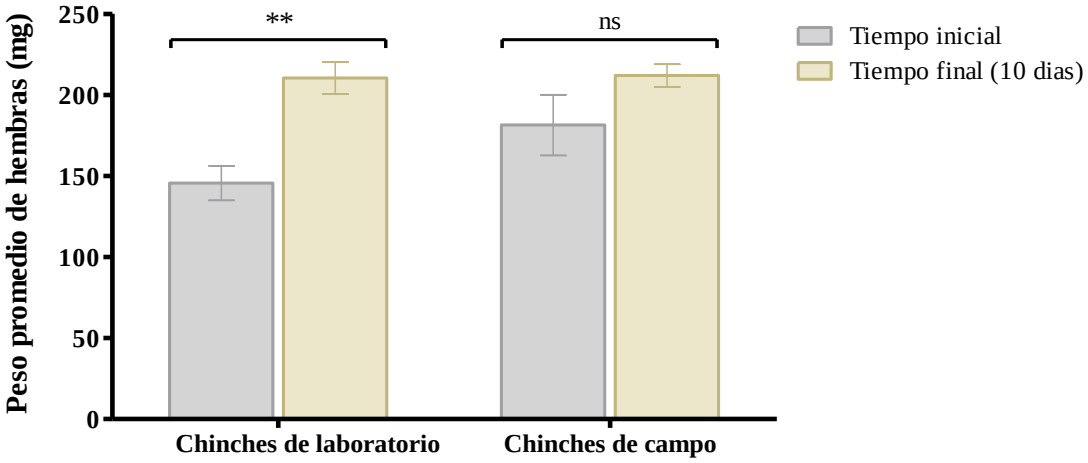

Figura 3.4a: Peso promedio de chinches hembras de las diferentes poblaciones (laboratorio y campo), antes y después de alimentarse de soja cultivada en condiciones naturales durante 10 días.

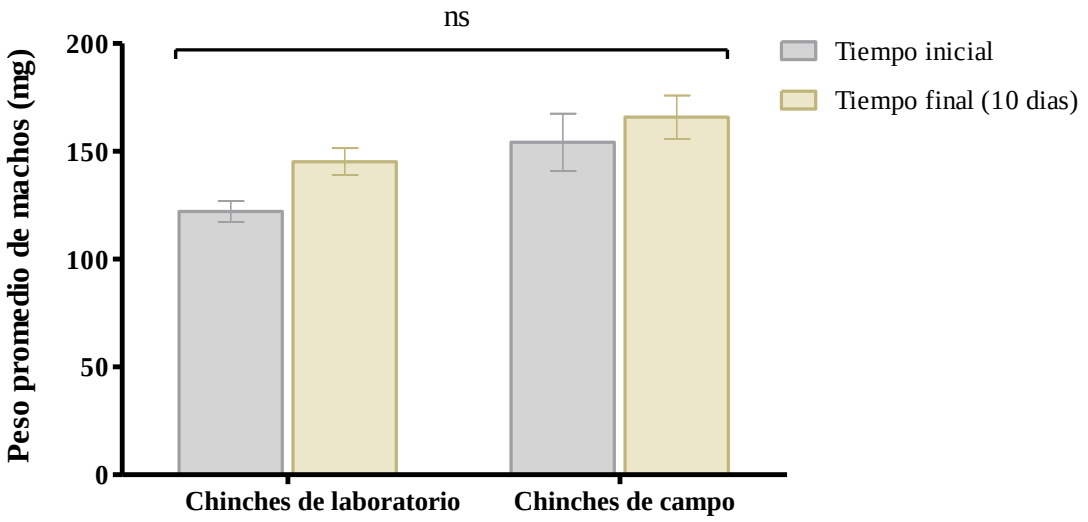

Figura 3.4b: Peso promedio de chinches machos de las diferentes poblaciones (laboratorio y campo), antes y después de alimentarse de soja cultivada en condiciones naturales durante 10 días.

En cuanto a la supervivencia de las chinches, no se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de las chinches de laboratorio y las chinches de campo (n=20, test de comparación de Mantel-Cox, P>0,05, Fig. 3.5). Los valores de supervivencia al final del experimento, luego de los 10 días, fueron de 58,1 ± 16,2 % para las chinches de laboratorio, mientras que las chinches de campo tuvieron una

supervivencia de 87,7 ± 9,5 %.

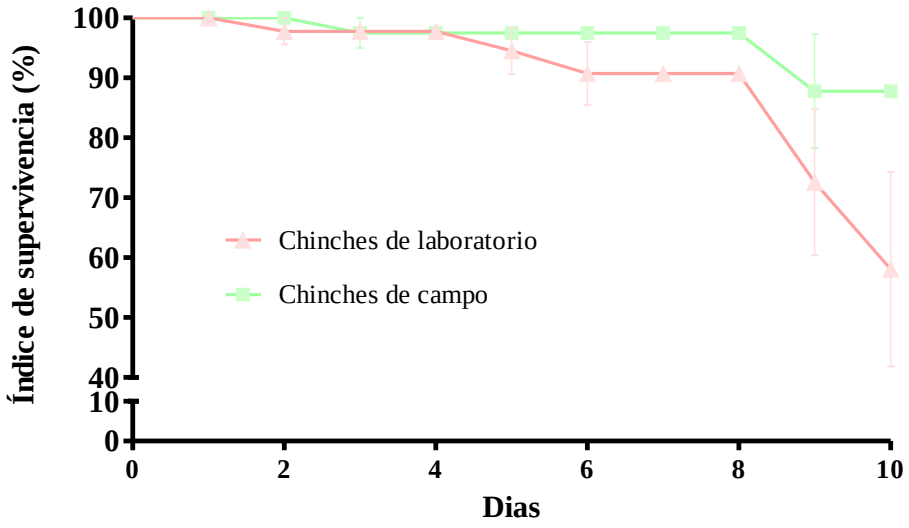

Figura 3.5: Curvas de supervivencia en el tiempo de adultos de *N. viridula* de las diferentes poblaciones durante 10 días de alimentación en soja cultivada en condiciones naturales. La supervivencia se expresó como la relación entre el número observado de individuos en las plantas al día x del experimento, sobre el total al inicio de este, para ambas poblaciones de chinches (laboratorio y campo) *(n=20, test de comparación de Mantel-Cox, P>0,05).*

c. Medición de las defensas químicas en semillas picadas:

Por último, cuantificamos la actividad de los inhibidores de cistein-proteasas en las semillas de soja donde se alimentaron las dos poblaciones de chinches, a las 24 h, 72 h y 10 días. Las mediciones se realizaron sobre aquellas semillas picadas por las chinches infectadas de laboratorio y las picadas por las chinches no infectadas de campo, luego del respectivo control de infección de cada una de las chinches muestreadas de forma individual. Así mismo, se comprobó que el índice de infección de ambos grupos de chinches utilizadas en el experimento fue diferente en los 3 tiempos de muestreo: tanto a las 24 h, 72 h y 10 días, las chinches de laboratorio seguían en su mayoría infectadas mientras que las chinches de campo tenían una infección con bacterias intestinales menor (n=20, test ANOVA y test a posteriori Bonferroni, P<0,001, Fig. 3.6).

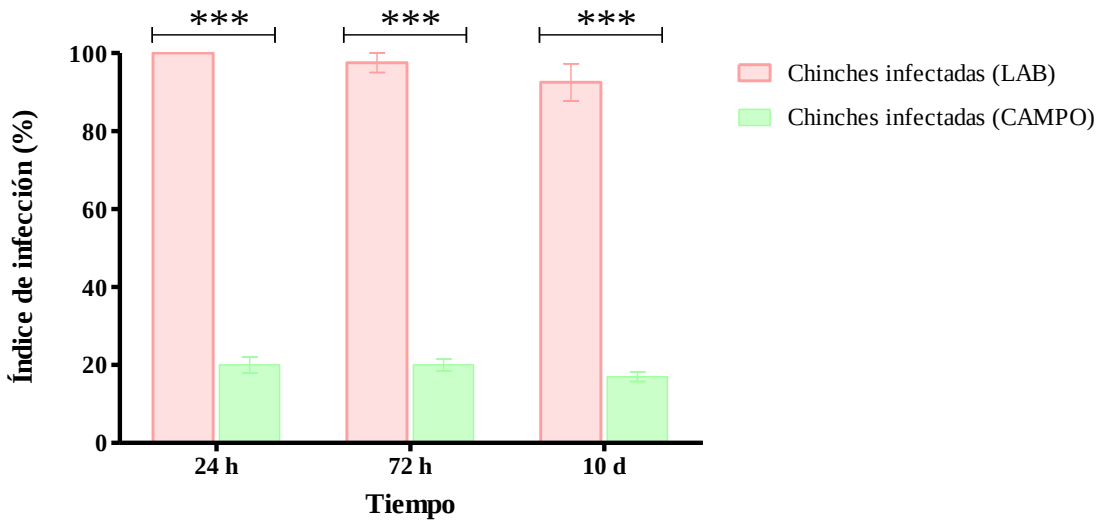

Figura 3.6: Índice de infección de adultos de *N. viridula* utilizados en el experimento durante los 3 tiempos de medición. Relación entre el n de intestinos infectados con bacterias cultivables (con recuentos $>10^3$ UFC/mg) y el n total de intestinos disectados, según población de origen y tiempo de medición *(n=20, test ANOVA y Bonferroni, P<0,001).*

La actividad de los inhibidores de proteasas a las 24 h fue significativamente mayor en las semillas picadas por las chinches infectadas de laboratorio (n=6, test ANOVA y test a posteriori Bonferroni, P<0,001, Fig. 3.7). Luego de 72 h de iniciado el ataque de las chinches, la actividad de las defensas químicas disminuyó, y continuó siendo diferente según la infección intestinal de las chinches (n=6, ANOVA y test a posteriori Bonferroni, P<0,05, Fig. 3.7). Aunque a los 10 días no hubo diferencias en la actividad de los inhibidores de proteasas de las semillas picadas por los dos grupos de insectos, la interacción entre el tiempo y la infección de las chinches a lo largo de todo el experimento tuvo un efecto significativo sobre la producción de las defensas (n=6, test ANOVA, P= 0,0086, Fig. 3.7).

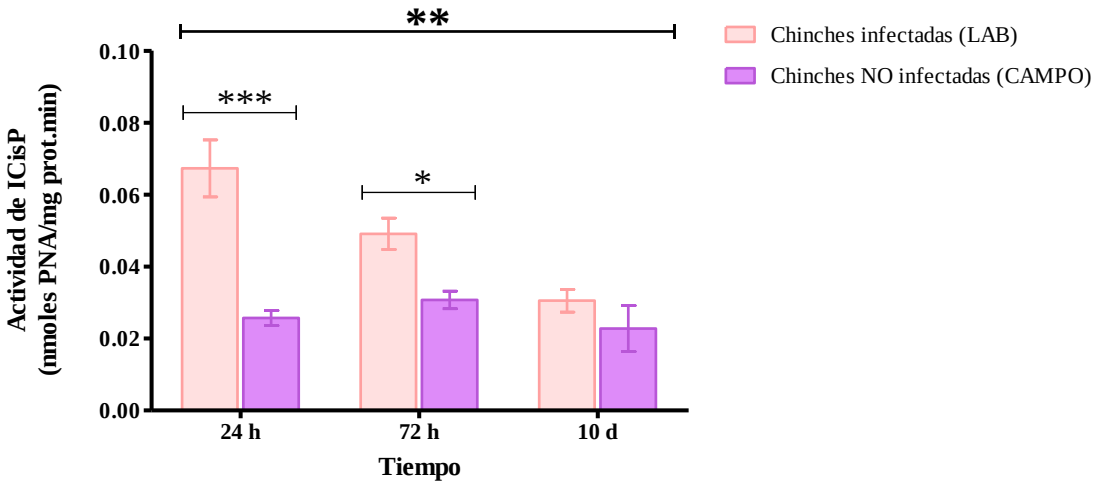

Figura 3.7: Actividad de los inhibidores de cistein-proteasas (ICisP) en semillas de soja cultivada a campo picadas por chinches infectadas y no infectadas con bacterias intestinales. Las mediciones se realizaron en 3 tiempos (24 h, 72 h y 10 días) *(n=6, test ANOVA, P=0,0086).*

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Caracterización por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde.

Para poder alimentarse de las semillas de soja, *N. viridula* debe tolerar las defensas químicas vegetales y su microbiota intestinal podría estar jugando un rol importante en esta adaptación. Como las plantas tienen un importante grado de control sobre los diferentes microbiomas con las que conviven, tanto en la rizósfera (Sugio et al. 2015) como en hojas y frutos (Agler et al. 2016), es de esperar que los cambios en esas comunidades de microorganismos tengan un impacto sobre la relación insecto-bacteria, sin embargo, se desconoce cuál es la composición y el origen de la comunidad bacteriana intestinal (CBI) de la chinche cuando ataca al cultivo de soja. Con el objetivo de estudiar la variación en el tiempo de las comunidades bacterianas de suelo, hojas, semillas e intestino de chinches cuando pican plantas de soja (*Objetivo específico 1*), se realizó un experimento en condiciones de campo para poner a prueba la hipótesis que durante la interacción entre la chinche verde y la planta de soja, las comunidades de bacterias presentes varían de manera específica, principalmente entre el intestino del insecto y aquellas estructuras vegetales de las cuales se alimenta directamente (*Hipótesis 1*).

En esta tesis, realizamos un estudio taxonómico por *metabarcoding* para determinar cómo está conformada la comunidad bacteriana intestinal (CBI) de la chinche y si cambia durante el tiempo de interacción con el cultivo de soja. La comparamos con las comunidades del suelo, hojas y semillas picadas por la plaga, a los 10 y 20 días de alimentación de los insectos en soja cultivada a campo, para definir qué tipo de bacterias tienen en común con esas comunidades y cual podría ser el origen de estas en el intestino de la chinche.

En este trabajo detectamos que la comunidad de bacterias del suelo es mucho más

diversa y muy diferente con respecto a la comunidad de la planta de soja y la de la chinche (Fig. 1.1), con las cuales no tienen bacterias en común. Las plantas son miembros de comunidades complejas, en las que interactúan con una gran abundancia de otros organismos, como insectos y microorganismos (Berendsen et al.., 2012; Stam et al.., 2014). Las respuestas de las plantas al entorno biótico o abiótico pueden afectar muchas de estas interacciones y pueden dar forma a las raíces y su microbioma asociado. Algunos insectos herbívoros alteran las comunidades bacterianas del suelo cuando se alimentan, con consecuencias sobre el crecimiento y la resistencia posterior de las plantas a la herbivoría (Howard et al.., 2020; Friman et al.., 2021) o incluso pueden afectar en gran medida el rendimiento de otros insectos a través de cambios en la química de la planta y en los bacteriomas asociados (Kostenko et al. 2012; Meiners et al. 2017). Sin embargo, nuestro resultado sugiere que no existen bacterias del suelo que lleguen a la CBI de la chinche indirectamente a través de la planta de soja, y esto se debe principalmente a que la chinche se alimenta de las estructuras vegetales aéreas de la planta.

Entre la comunidad de bacterias de la planta de soja y el intestino de la chinche si existen más similitudes, ambas comparten algunos géneros de bacterias como *Yokenella*, *Pantoea* y *Serratia* (Figs. 1.2 y 1.3). Este resultado se explicaría por la interacción directa que existe entre la planta y las chinches cuando se alimentan y sugiere que el intercambio de bacterias se produce efectivamente entre ambas comunidades. Si bien las bacterias están presentes en ambos organismos, aún se desconoce en qué dirección ocurre ese intercambio: si las chinches incorporan las bacterias presentes en la planta de soja o, viceversa, si las semillas y hojas se colonizan con las bacterias de la chinche cuando estas las pican para alimentarse. No existen trabajos previos que caractericen la comunidad bacteriana intestinal de un insecto y la comparen directamente con el bacterioma de su alimento preferencial.

Las comunidades bacterianas intestinales de *N. viridula* no cambian entre los 10 y 20 días de alimentación de las chinches (Figs. 1.2 y 1.3), pero si se diferencia su diversidad de la comunidad de endófitos de la soja (Fig. 1.4), a pesar de las bacterias en común que poseen. Los géneros bacterianos identificados por *metabarcoding* en la chinche verde son principalmente *Yokenella*, *Pantoea* y *Serratia*. Estos coinciden con los identificados en trabajos anteriores, pero por métodos cultivables (Medina et al. 2018), como así también con los aislados en el intestino de otros insectos. Este resultado sugiere que el bacterioma que se establece en el intestino de la chinche en los primeros días de iniciado el ataque al cultivo de soja no es transitorio, sino que perdura durante el tiempo de alimentación de la chinche sobre soja.

La especie más frecuente y abundante en el intestino de *N. viridula* es *Yokenella* sp., emparentada con cepas aisladas de chinches en Brasil (Hirose et al. 2006; Medina et al.., 2018). Este género bacteriano pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y la única especie es *Yokenella regensburgei*, un bacilo móvil Gram negativo, descrito como patógeno oportunista en vertebrados y habitante del intestino de insectos (Kosako et al. 1984). Se reportan numerosos casos de infecciones por *Yokenella* en humanos y animales, vinculados generalmente con afecciones respiratorias (Abbott et al. 1994; Lo et al. 2011; Stock et al. 2004; Jain et al. 2013; Balamayooran et al. 2022; Artavia-León et al. 2017). Además, de los aislamientos obtenidos de muestras clínicas también se la ha identificado formando parte de la comunidad intestinal de insectos como *Spodoptera frugiperda*, *Locus migratoria*, *Eupolyphaga synensis*, *Apis mellifera*, *Lutzomyia longipalpis*, *Reticulitermis chinensis* y *Pyrrhocoris apterus* (Sahani et al. 2023; Oliveira et al. 2001; Liu, 2007; Sudakaran et al. 2012; Liu, 2007), pero hasta el momento nunca había sido identificada como endófita.

Las bacterias del género *Pantoea* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y han sido encontradas tanto en intestinos de chinches en cultivo de soja (Medina et al. 2018) como en mosquitos, trips, abejas y otros hemípteros (Douglas, 2015; Walterson et al. 2015). Varias de estas asociaciones han sido descriptas como mutualistas, donde se ha encontrado que la bacteria vive de manera inter o intracelular (Vorwerk et al. 2007). En estos casos de mutualismo, la bacteria podría beneficiar al insecto a través de la hidrólisis de proteínas, eliminación de compuestos tóxicos (Pankaj et al. 2002), antagonismo con patógenos, fijación de nitrógeno, la nutrición y la digestión (MacCollom et al. 2009). También fueron aisladas de múltiples hábitats, de muestras de agua, suelo y material vegetal. Por ejemplo, *Pantoea ananatis*, que es una bacteria fitopatógena que causa enfermedades como la pudrición del centro en cebolla y que ha sido aislada en la superficie de malezas y en cultivos de granos, como la soja (Gitaitis et al. 2002; Zinniel et al. 2002; Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

Las bacterias del género *Serratia* son bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* que se clasifican, hasta la fecha, en veintitrés especies descritas (Abbott et al. 2011; Cho et al.. 2020). Es un grupo extremadamente diverso de bacterias capaz de ocupar muchos hábitats diferentes, como agua, suelo, plantas, vertebrados e invertebrados, que incluye especies biológica y ecológicamente diversas, desde aquellas que son beneficiosas para plantas económicamente importantes, hasta especies patógenas que son dañinas a los humanos y los insectos (Grimont y Grimont, 1978). Es sabido que varias especies del género *Serratia* son entomopatógenas, como *S. marcescens* (Ishii et al. 2014; Lee et al. 2017) que afecta a insectos de una amplia variedad de órdenes, como lepidópteros, dípteros, coleópteros y hemípteros (Bidari et al. 2018; Connick et al. 2001; Lauzon et al. 2003; Cooper et al. 2014). Por lo tanto, estos resultados sugieren que tanto la presencia de *Serratia* como de *Yokenella* en el intestino de la chinche cuando se

alimenta de soja sería perjudicial, porque se trata de bacterias patógenas que afectan al insecto en su crecimiento o supervivencia.

Las bacterias que identificamos en las plantas de soja, tanto en hojas como en semillas, durante el tiempo de interacción con la plaga, fueron *Yokenella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Neoasaia*, *Pseudomonas* y *Lactobacillus* (Figs. 1.2 y 1.3). Estos resultados no guardan mucha relación con estudios que describieron a los endófitos de la soja, porque las investigaciones se han centrado en mayor medida en bacterias de tallos, hojas, raíces y nódulos principalmente, debido a la importancia económica que tienen los patógenos vegetales en esos órganos de la planta, o en las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hung et al. 2007; Kuklinsky-Sobral et al. 2005; Ayilara et al. 2022). Además, la mayoría de estos estudios han caracterizado la comunidad de bacterias de la soja por métodos tradicionales de cultivo de microorganismos; sin embargo, los resultados de mi trabajo coinciden con aquellos que identificaron también a *Pseudomonas* spp. y *Pantoea* spp. en diferentes órganos de la planta (Zinniel et al. 2002; Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

La diversidad de la comunidad de endófitos de las plantas picadas por chinches no fue diferente a la de las plantas control, pero si se observaron cambios en la diversidad de endófitos durante el tiempo de análisis, a los 10 y 20 días (Figs. 1.2, 1.3 y 1.4). Este resultado sugiere que entre los cambios fisiológicos que sufre la planta de soja durante su etapa de madurez, coincidente con el momento de mayor ataque de la plaga, también se modifica la comunidad de bacterias endófitas de la planta. Una de las bacterias que cambió su abundancia en el tiempo y estuvo mayormente presente a los 20 días en las plantas de soja es *Neoasaia*. Este es un género bacteriano poco descripto en la literatura, que se ubica dentro de la familia *Acetobacteraceae*, con una única especie reportada, *Neoasaia chiangmaiensis*. Esta fue aislada de una planta ornamental en Tailandia y

caracterizada como bacteria del ácido acético (Yukphan et al. 2005; Yukphan et al. 2006). Otro estudio más reciente, identificó a esta bacteria como endófito de banano y destacó sus propiedades de promotora del crecimiento vegetal en un experimento de inoculación con maíz (Patil y Shinde, 2014).

Los resultados de esta sección sugieren que existe una relación estrecha entre la comunidad de bacterias de la chinche y la planta de soja, sobre todo con las semillas, que es de donde se alimenta directamente. En ambos grupos, si bien se observaron bacterias en común, las variaciones en sus abundancias relativas explican las diferencias de diversidad entre las dos comunidades, la endofítica de soja y la intestinal de *N. viridula*. Además, es importante destacar que *Yokenella* es la principal bacteria de la comunidad intestinal de la chinche verde y también está presente en la planta de soja, lo que sugiere que existe algún tipo de transferencia horizontal entre el insecto y la planta, aunque se desconoce aún donde se ubica originalmente esta bacteria y en qué dirección se produce luego la infección.

Hasta el momento, ningún estudio previo había caracterizado la comunidad bacteriana intestinal de *N. viridula* por métodos independientes de cultivo, como es la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Tampoco se habían comparado antes las microbiotas de la chinche con el de su principal alimento, la planta de soja.

Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal de *Nezara viridula* según la dieta a campo y en condiciones controladas.

La chinche verde es polifitófaga, se alimenta de más de cien especies diferentes de plantas, entre las cuales figura la soja como alimento preferencial (hospedero primario) (Todd y Herzog, 1980; Panizzi y Slansky, 1991; Panizzi, 2000; Panizzi et al. 2000). Dado que la chinche en la región pampeana desarrolla varias generaciones cada año, éstas requieren de otras especies vegetales como alimento antes de colonizar los cultivos de soja (Antonino et al. 1996), y la gran diversidad de microorganismos de todas esas plantas podrían estar formando parte de su CBI. Sin embargo, aún se desconoce si la dieta tiene algún efecto sobre la diversidad de la CBI del insecto, que le permita a la chinche adaptarse a las diferentes condiciones a lo largo del año. Con el objetivo de identificar la composición de la CBI de *N. viridula* según la dieta (soja u hospederos secundarios) (O*bjetivo específico 2*), en una primera instancia se realizaron colectas de adultos de chinches durante dos años y por diferentes sitios de la región sojera, para poner a prueba la hipótesis de que el peso, el índice de infección y la diversidad de la CBI de la chinche verde presenta variaciones según la dieta del insecto que dependen de la presencia del cultivo de soja en cada estación del año (*Hipótesis 2*).

Las diferentes plantas hospederas sobre las cuales fueron encontrados y recolectados los insectos a lo largo del año son vicia, alfalfa, soja, maíz, yuyo colorado, trigo y eucalipto (Figura 2.1). Estos resultados coinciden con estudios anteriores, que reportaron a la plaga presente en cultivos de maíz y trigo (Medina et al. 2018), como así también sobre vicia, alfalfa y yuyo colorado durante la primavera e inicios del verano (Antonino et al. 1996; Rizzo et al. 1976). A su vez, varias investigaciones destacan la preferencia de la chinche verde por la soja (Todd y Herzog, 1980; Panizzi y Slansky,

1991; Panizzi, 2000; Panizzi et al. 2000), pero en ausencia de este cultivo y cuando las temperaturas bajan, los insectos buscan refugio para entrar en su periodo de diapausa invernal bajo la corteza de árboles de eucalipto (Medina et al. 2018; Mareggiani y Pelicano, 2013). Al igual que en estos trabajos anteriores, los resultados de esta tesis muestran la relación entre los hospederos alternativos de *N. viridula* y la dinámica de la plaga a través del año.

Luego observamos que los índices de infección con bacterias intestinales son diferentes según el hospedero sobre el cual fueron colectadas las chinches (Figura 2.2), teniendo una mayor infección aquellas chinches colectadas en lotes de soja y una infección mucho menor las colectadas en hospederos secundarios, como maíz y yuyo colorado. Similares resultados fueron demostrados en estudios que identificaron la microbiota de la chinche pero por métodos tradicionales de cultivo: cuando las chinches se encontraron en soja y eucalipto (diapausa), se identificó un grupo de bacterias muy abundantes y poco diversas (microbiota no transitoria, principalmente *Yokenella* sp. y *Enterococcus* sp.), mientras que cuando las chinches se alimentaban de hospederos secundarios se identificó un grupo de bacterias de abundancia baja y alta diversidad (microbiota transitoria, *Bacillus* y *Micrococcus*) (Medina et al. 2018). Esto indica que las chinches se infectan mucho más con bacterias intestinales cuando se alimentan del cultivo de soja y luego, al entrar en diapausa, mantienen esas bacterias, mientras que, en épocas de ausencia del cultivo, al alimentarse de otros hospederos, las bacterias que colonizan su intestino disminuyen en abundancia, pero son más diversas.

En cuanto al peso corporal y la dieta de *N. viridula*, descubrimos que las chinches que tienen el menor peso promedio, provenientes de lotes de trigo, alfalfa y vicia, son aquellas colectadas en primavera, época de ausencia del cultivo de soja, y que

corresponden a las primeras generaciones en alcanzar la adultez luego de la generación de adultos que sale de la diapausa invernal (Figs. 2.3a y 2.3b). Esto coincide con estudios previos que sostienen que tanto vicia como alfalfa no son hospederas adecuadas para la alimentación, pero si para la reproducción y oviposición, ya que reúnen cualidades necesarias para asegurar la supervivencia de los estados inmaduros, permitiendo el incremento de la población, la cual luego se dispersa hacia el cultivo de soja (Antonino et al. 1996). Por otro lado, las chinches colectadas en verano/otoño, en lotes de soja y maíz o yuyo colorado, tienen un mayor peso promedio (Figs. 2.3a y 2.3b). Estas chinches más pesadas son la tercera o cuarta generación anual, las cuales ya disponen del cultivo de soja para alimentarse. Varios trabajos coinciden con que el crecimiento poblacional de la plaga está en sincronía con el desarrollo reproductivo del cultivo de soja, desde floración en adelante (Todd, 1989; Gamundi et al. 1996; Gamundi et al. 2003), y otros estudios demostraron que tanto el peso corporal en emergencia de adultos como la ganancia de peso de *N. viridula* fue mayor en plantas de soja, siendo esta fuente de alimento la mejor dieta por su calidad nutricional superior (Possebom et al. 2020). Por lo tanto, los resultados de esta tesis destacan la importancia de la soja como dieta preferencial para el desarrollo de la chinche, pero también que los hospederos alternativos contemporáneos al cultivo tendrían un rol importante en la dinámica poblacional de la plaga. En nuestras recorridas a campo nos resultó interesante ver en varias oportunidades que las chinches estaban alimentándose de plantas de maíz o yuyo colorado, teniendo disponible al cultivo de soja en el mismo momento y lugar. A partir de las diferencias en el índice de infección que detectamos en estos hospederos, se decidió entonces realizar el estudio por *metabarcoding* de las CBI de las chinches de esas colectas.

Los resultados del análisis taxonómico de la CBI de las chinches colectadas de campo indicaron que la diversidad del bacterioma de las chinches en soja era menor y

diferente a la de maíz y yuyo colorado (Fig. 2.4 y 2.7). Esto se explica si analizamos la riqueza específica y equitatividad de la composición de las comunidades: *Yokenella* y *Pantoea* predominan sobre otras bacterias como *Serratia, Neoasaia* o *Acinetobacter* en las chinches de lotes de soja, mientras que las CBI de chinches de yuyo colorado y maíz tienen mayor riqueza específica (están compuestas además por *Gilliamella, Lactobacillus* y *Firmicutes*) y la abundancia de estas bacterias es mucho más equitativa dentro de la comunidad (Figs. 2.5). Cabe destacar también que *Yokenella* alcanza la mayor abundancia relativa en soja, mientras que *Neoasaia* y *Gilliamella* son más abundantes en los hospederos alternativos (Fig. 2.6). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en el primer experimento de esta tesis, donde *Yokenella, Pantoea* y *Serratia* también fueron identificadas en las chinches de laboratorio que se alimentaron de soja, pero con diferentes abundancias relativas. En cambio, el género *Neoasaia* no había sido identificado antes en el intestino de las chinches, pero si como endófito de las plantas de soja en este trabajo y de otras especies vegetales en estudios previos (Yukphan et al. 2005; Yukphan et al. 2006; Patil y Shinde, 2014). Estos resultados coinciden con otros hallazgos que revelan que los hábitats ambientales y las dietas contribuyeron sinérgicamente a la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal de las chinches (Li et al. 2022). Todo esto sugiere que las condiciones ambientales naturales alteran la relación entre las chinches con su CBI, permitiéndoles incorporar otras bacterias que provienen posiblemente de los diferentes hospederos de los cuales se alimentan.

Uno de los principales descubrimientos de este trabajo es la identificación del género *Neoasaia* en la CBI de todas las chinches colectadas a campo, tanto las de soja como las de maíz y yuyo colorado, pero siendo mucho más abundante en los hospederos secundarios (Fig. 2.6). A pesar de que aún *Neoasaia* no ha sido reportado en insectos, existen estudios que describen otros géneros emparentados (pertenecientes a la misma

familia de Acetobacteráceas) como simbiontes intestinales de abejas, mariposas y moscas de la fruta (Siozios et al. 2019; Servín-Garcidueñas et al. 2014; Kim et al. 2012; Roh et al. 2008). Estos trabajos resaltan la importancia de la colonización del intestino con estas bacterias del ácido acético para antagonizar el dominio de bacterias potencialmente patógenas, lo que contribuye a la homeostasis intestinal y la aptitud del hospedador (Ryu et al. 2008; Crotti et al. 2010). Esto indicaría que *Neoasaia* en el intestino de la chinche verde podría favorecer a la comunidad de bacterias, cumpliendo una función benéfica para el insecto.

Gilliamella está presente en la CBI de las chinches recolectadas sobre ambos hospederos secundarios (Fig. 2.6). Este género pertenece a la familia *Orbaceae* (orden *Orbales*, clase *Gammaproteobacteria*) y está integrado por varias especies ampliamente estudiadas porque forman parte de la comunidad intestinal de insectos sociales como las abejas melíferas (*Apis* spp.) y abejorros (*Bombus* spp.) (Dong et al. 2020; Praet et al. 2017; Kwong y Moran, 2013; Engel et al. 2012; Engel et al. 2016). La especie tipo del género es *Gilliamella apicola*, que tiene un rol importante en la modulación de la nutrición en el intestino de la abeja, ya que descomponen la dieta rica en carbohidratos e incluso algunas cepas pueden metabolizar varios azúcares tóxicos para el insecto, teniendo efectos finales en la salud del hospedador (Kwong y Moran, 2013; Zheng et al. 2016). También fueron reportados otros miembros del género *Gilliamella* en flores y durante el proceso de fermentación del vino (McFrederick et al. 2017; Godálová et al. 2016), lo que sugiere que pueden transmitirse horizontalmente entre insectos y plantas. No existen trabajos previos que hayan identificado a *Gilliamela* dentro de la CBI de otros insectos distintos a las abejas y abejorros, sin embargo, los resultados de esta tesis sugieren que la mayor abundancia de este género en el intestino de la chinche verde podría deberse a un rol benéfico que está cumpliendo esta bacteria en la contribución a la

nutrición de la chinche, por el mayor contenido de azúcares cuando se alimenta de maíz o yuyo colorado.

Previamente a estos resultados, ningún estudio había realizado un análisis taxonómico por *metabarcoding* de la diversidad de la CBI de la chinche verde según la dieta a campo y su relación con la infección y el peso de los insectos.

En una segunda instancia de trabajo y con el mismo objetivo de identificar la composición de la CBI de *N. viridula* según la dieta (O*bjetivo específico 2*), se pusieron a prueba los primeros resultados obtenidos de las colectas de campo, realizando un experimento de alimentación controlada de las chinches sobre 4 dietas: soja, maíz, yuyo colorado y *choice* (libre elección de los 3 hospederos), en condiciones naturales. Se partió de una misma población inicial de insectos y se analizaron los cambios en la diversidad de la CBI luego de 10 días de alimentación sobre las diferentes opciones de dieta.

Los resultados del estudio taxonómico por *metabarcoding* de este experimento confirmaron lo observado a campo: cuando las chinches solo se alimentan de soja, su CBI es menos diversa que cuando se alimentan de otras dietas (Fig. 2.8). En el intestino de esas chinches abunda mayormente el género *Yokenella*, mientras que *Pantoea* es mucho menor. A su vez, la abundancia de ambas bacterias cambia notablemente con respecto al bacterioma de las chinches del inicio del experimento (Fig. 2.9), lo que demuestra que la alimentación con soja modifica la diversidad de la CBI de *N. viridula*, mientras que las demás dietas testeadas no generan cambios considerables sobre la diversidad (Fig 2.10). Estos resultados coinciden además con los obtenidos en el primer experimento de esta tesis, donde demostramos la presencia del género *Yokenella* en las plantas de soja, lo que sugiere que la chinche se infecta con esta bacteria de la planta al alimentarse directamente de las semillas.

A diferencia de las CBI de las chinches de campo, en el experimento de

alimentación controlada, no fue identificado el género *Gilliamella*, mientras que *Neoasaia* y *Serratia* sí estuvieron presentes, pero con abundancias relativas mucho menores. Similares resultados obtenidos en larvas de lepidópteros sugieren que las poblaciones de bacterias presentes en el intestino no son simplemente una comunidad transitoria que pasa por el sistema, sino que son un componente dinámico del intestino de la oruga. La sensibilidad de las poblaciones bacterianas al tipo de dieta suministrada sugiere que no todas las dietas son útiles para estudiar la variación de la estructura de la comunidad e interpretar las interacciones entre insectos y microorganismos (Mason et al. 2020). Los resultados de esta tesis sugieren que a pesar de haber recolectado a los insectos de campo alimentándose de las plantas hospederas, pueden haber estado consumiendo otras especies vegetales momentos antes de la captura, lo que implica que existe un gran dinamismo y sensibilidad en la comunidad bacteriana intestinal de la chinche verde como respuesta a la dieta.

Los resultados de esta sección indican que la dieta tiene un efecto marcado sobre la CBI de *N. viridula* y que cuando la chinche se alimenta de soja esa comunidad es dominada por *Yokenella*. No existían al momento trabajos científicos que hayan caracterizado por *metabarcoding* la CBI de la chinche verde y estudiado su relación frente a cambios en la dieta del insecto en condiciones experimentales naturales.

Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche verde.

La principal actividad proteolítica en el intestino de la chinche verde proviene de las proteasas de cisteína, la cual es inhibida totalmente cuando se alimenta de las semillas de soja por los IP de cisteína (Sardoy et al. 2021; Giacometti et al. 2016; Zavala et al. 2008). A pesar de esta importante respuesta defensiva de la planta, la chinche continúa alimentándose de las semillas de soja y su CBI podría estar modulando esta adaptación, al igual que ocurre con otros insectos (Cloutier et al. 2000; Chu et al. 2013). Por lo tanto, en este trabajo primero se caracterizó la CBI de la chinche y luego se puso a prueba si existe alguna relación con las defensas químicas vegetales, en condiciones naturales del cultivo. Con el objetivo de cuantificar la actividad de los IP de cisteína en semillas de soja frente al ataque de chinches con diferentes microbiotas intestinales (*Objetivo Específico 3*), se caracterizó por *metabarcoding* el bacterioma intestinal de dos poblaciones de insectos: campo y laboratorio, para probar la hipótesis de que la comunidad bacteriana intestinal de la chinche verde en condiciones naturales (a campo) es diferente a la de las chinches de cautiverio (cría de laboratorio), mejorando su tolerancia a las defensas químicas de la soja contra el ataque de insectos y/o reduciendo esos compuestos defensivos de la planta (*Hipótesis 3*).

Los resultados de esta tesis demostraron que las chinches de laboratorio tienen un alto índice de infección con bacterias cultivables (Fig. 3.1) y una baja diversidad de su comunidad intestinal, en donde predomina el género *Yokenella* (Fig. 3.2). En cambio, la población de chinches de campo presentaba una baja infección (Fig. 3.1) y un bacterioma con una abundancia de *Yokenella* mucho menor en comparación con el de las chinches de laboratorio (Fig. 3.2), revelando claras diferencias en la diversidad de sus comunidades

intestinales (Fig. 3.3), tal como se planteó en la *Hipótesis 3*. Estos resultados coinciden con estudios previos que sugieren que las condiciones de cría en laboratorio para estudiar las interacciones planta-insecto-bacteria pueden estar muy alejadas de la realidad y alterar las interacciones simbióticas entre insectos y bacterias (Valzania et al. 2018; Cohen, 2018; Pérez-Cobas et al. 2015). Si bien nuevos estudios han sugerido que algunas especies de insectos pueden no tener bacterias intestinales en su ambiente natural (Hammer et al. 2019), los resultados de esta tesis coinciden con otras investigaciones que comprobaron que, en condiciones de campo, los adultos de *N. viridula* tienen una microbiota intestinal poco diversa comparada con la de otros insectos, pero más diversa que las chinches de laboratorio, y más del 60% de los individuos carecen de bacterias cultivables por encima de 10^3 UFC/mg de intestino (Medina et al. 2018). Pero hasta el momento, ningún estudio previo había caracterizado y comparado por *metabarcoding* a la comunidad bacteriana intestinal de *N. viridula* entre poblaciones criadas en laboratorio o en condiciones naturales.

Se analizó el peso inicial y final de las chinches de ambas poblaciones luego de alimentarse de un cultivo de soja durante 10 días. El peso de las chinches de campo, tanto machos como hembras, no mostró diferencias entre ambos tiempos, en cambio, las hembras de la población de laboratorio fueron más pesadas al final del experimento, sugiriendo algún tipo de interacción entre la ganancia de peso y la infección con bacterias intestinales (Figs. 3.4a y 3.4b). Por otro lado, los resultados del análisis de supervivencia de ambas poblaciones de chinches no reflejaron diferencias estadísticas, pero el porcentaje de adultos que sobrevivieron a los 10 días del experimento claramente fue mayor en la población de campo, es decir, sobrevivieron más las chinches con menor infección con bacterias intestinales (Fig. 3.5), lo cual podría estar relacionado con una mejor tolerancia a las defensas químicas de la soja, como lo postulado en la *Hipótesis 3*.

Este último resultado se contradice en parte con lo observado en estudios con ninfas infectadas con *Yokenella* sp. que se alimentaron de soja a campo, las cuales tuvieron una mortalidad más baja que las criadas en el laboratorio (Medina et al. 2022), lo que sugiere que *Yokenella* sp. es más agresiva para el estadio adulto que para las ninfas de *N. viridula* en condiciones naturales. Además, la diferencia en la mortalidad de ambas poblaciones podría estar relacionada con el impacto que puede generar el cambio de ambiente en las chinches, al trasladarlas de las cámaras de cría al campo. La modificación del ambiente genera en las chinches elevados niveles de estrés que impactan directamente en su capacidad de supervivencia (Todd et al. 1989).

El resultado más relevante de este trabajo de investigación es el descubrimiento de la inducción diferencial en la actividad de los principales IP de la soja frente a la infección bacteriana intestinal de la chinche, que responde específicamente al *Objetivo 3* y al *Objetivo General* de la tesis de determinar la función del bacterioma intestinal de la chinche verde en la modulación de las defensas químicas de la soja. Comprobamos que la actividad de los IP de cisteína de las semillas picadas por las chinches de laboratorio (más infectadas con *Yokenella*) fue significativamente mayor a la de las semillas picadas por las chinches de campo, tanto a las 24 como a las 72 h de iniciado el ataque (Fig. 3.7), tal como se planteó en la *Hipótesis 3*. Este resultado guarda relación con el estudio que demostró que la infección con *Yokenella* sp. tiene un impacto negativo sobre la chinche verde, ya que disminuye la actividad de las proteasas de cisteína en su intestino, perjudicando el desarrollo del insecto (Medina et al. 2022). Es decir, la infección con bacterias intestinales no solo reduce la actividad proteolítica del intestino de la chinche, sino que también aumenta los compuestos defensivos de la planta, y esta combinación produciría un efecto totalmente perjudicial para la plaga. Estos resultados sugieren que las defensas químicas más importantes de las semillas de soja en desarrollo, en los

primeros días de iniciado el ataque del insecto, son inducidas diferencialmente según el nivel de infección con bacterias intestinales que tengan las chinches, pero aún se desconoce cómo es el mecanismo asociado a esta interacción entre la bacteria y la planta. En este sentido, podría hipotetizarse que *Yokenella* es una "aliada de la soja" en la defensa contra el ataque de la chinche, ya sea por un efecto sinérgico entre ambas variables (inhibidores de proteasas + infección bacteriana) o un efecto independiente de cada una, que terminan afectando al insecto. No existen estudios previos hasta el momento que describan la función biológica de *Yokenella* y su interacción directa con las defensas químicas de la planta de soja ante el ataque de la chinche verde en un entorno natural.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES

Contexto general y principales hallazgos de la tesis

Este trabajo de tesis tenía como principal objetivo determinar la función del bacterioma intestinal de la chinche verde en la modulación (positiva o negativa) de las defensas químicas de la soja frente al ataque de este insecto, estudiando la interacción múltiple planta-chinche-bacteria para conocer el origen y las variaciones del bacterioma intestinal en el tiempo y bajo diferentes dietas del insecto. Para alcanzar ese objetivo general se organizó la investigación en experimentos a campo y en condiciones controladas, cada uno de ellos en respuesta a objetivos específicos e hipótesis correspondientes.

En primer lugar, se realizó un estudio taxonómico basado en el análisis de amplicones del gen que codifica para el 16S rRNA (*metabarcoding*) para determinar cómo está conformada la comunidad bacteriana intestinal (CBI) de la chinche verde y si cambia durante el tiempo de interacción con el cultivo de soja. Además, comparamos esta CBI con las comunidades de bacterias del suelo, hojas y semillas de soja cultivada a campo, para definir qué tipo de bacterias tienen en común esas comunidades y cual podría ser el origen de estas en el intestino de la chinche. Este fue específicamente el objetivo de los primeros experimentos para la *Caracterización por metabarcoding de las comunidades bacterianas asociadas a la interacción entre la soja y la chinche verde*. Descubrimos que el principal género bacteriano de la comunidad intestinal de la chinche verde cuando se alimenta de soja es *Yokenella* y que esta bacteria se encuentra además en la planta, tanto en las hojas como en las semillas en desarrollo. Esto nos sugiere que existe una interacción directa entre las chinches con su principal alimento, que implicaría un intercambio efectivo de bacterias entre las comunidades de ambos organismos (transferencia horizontal).

En una segunda etapa, para la *Evaluación de la diversidad del bacterioma intestinal*

de N. viridula según la dieta, identificamos la composición de la CBI de la chinche cuando se alimenta de otros hospederos alternativos a la soja, a través de colectas de insectos de campo a lo largo del año y luego en un experimento de alimentación controlada, para determinar si existían variaciones en la diversidad de la CBI de la chinche que dependan de la presencia del cultivo de soja. Los principales hallazgos fueron que la diversidad del bacterioma intestinal de la chinche cambia según la dieta del insecto a campo y que la abundancia de *Yokenella* en el intestino es muy alta cuando la chinche se alimenta únicamente de soja, en comparación con maíz o yuyo colorado, donde además se identificaron otras bacterias abundantes, como *Neoasaia* y *Gilliamella*, que estarían cumpliendo un rol importante en la CBI de la chinche. Toda esta información nos indica que las condiciones ambientales naturales alteran la relación entre los insectos con su CBI, permitiéndoles incorporar otras bacterias de los diferentes hospederos de los cuales se alimentan.

Por último, ya habiendo definido a la comunidad intestinal de *N. viridula* y sus variaciones, e identificado a *Yokenella* como la bacteria más abundante cuando las chinches se alimentan de soja, realizamos un *Análisis de la interacción entre las defensas químicas de la soja con la infección bacteriana intestinal de la chinche*, para comprobar si existía una modulación por parte de las chinches infectadas con *Yokenella* sobre la actividad de los inhibidores de cisteín-proteasas de las semillas. En los experimentos de este tercer objetivo específico pudimos demostrar que las defensas químicas más importantes de las semillas de soja, los inhibidores de cisteín-proteasas, se inducen mayormente cuando las chinches están infectadas con bacterias intestinales como *Yokenella*. Esto es sumamente importante porque nos demuestra que la infección bacteriana intestinal aumenta los compuestos defensivos de la planta contra las principales enzimas digestivas de proteínas del intestino de las chinches, y esta

combinación produciría un efecto totalmente perjudicial para la plaga.

Contraste de hipótesis

La Hipótesis 1 y sus predicciones, derivadas del primer Objetivo Específico, no son rechazadas en forma completa. Los resultados obtenidos comprueban que las comunidades de bacterias asociadas a la interacción chinche-soja presentan similitudes, principalmente la CBI con el bacterioma de las semillas en desarrollo, ya que comparten la mayoría de las bacterias (Figs. 1.2 y 1.3). Sin embargo, la diversidad de la CBI de la chinche verde no cambia notablemente durante el tiempo de interacción con el cultivo de soja, pero si lo hace la comunidad de endófitos de la planta ante el ataque del insecto (Fig. 1.4). Por lo tanto, los bacteriomas asociados a la interacción soja-chinche verde tienen similares diversidades y los géneros bacterianos más abundantes de la CBI de la chinche están presentes también en las semillas de las que se alimentan.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos correspondientes al segundo objetivo específico, no se rechazan la Hipótesis 2 y sus predicciones. Comprobamos que tanto el peso corporal e índice de infección como la composición de la CBI de la chinche verde presenta variaciones según la dieta del insecto, asociadas al cultivo de soja. Las chinches de lotes de soja tienen un mayor índice de infección y peso que las chinches colectadas en otros hospederos (Figs. 2.2, 2.3a y 2.3b), y poseen una menor diversidad de su CBI (Figs. 2.4 y 2.5), principalmente debido a que abunda el género *Yokenella* dentro de ella. Si bien pudo comprobarse que esta bacteria aumenta su abundancia cuando las chinches se alimentan solo de soja (Figs. 2.6 y 2.9), y es sabido que *Yokenella* es perjudicial para el desarrollo del insecto, no pudimos demostrar las predicciones que relacionaban a esta bacteria con la mortandad de los insectos según la dieta.

Por último, los resultados de los experimentos del tercer objetivo específico no permiten rechazar en forma completa la Hipótesis 3 y sus predicciones. Por un lado, se comprobó que la CBI de las chinches de campo es diferente a la de las chinches de cautiverio (Fig. 3.3), y también que esas diferencias en la infección bacteriana intestinal modulan los compuestos defensivos de la planta contra el ataque del insecto. Demostramos que las chinches de cautiverio tienen un mayor índice de infección y abundancia de bacterias perjudiciales como *Yokenella* en su CBI (Figs. 3.1, 3.2) y que la actividad de los inhibidores de cisteín-proteasas de las semillas de soja picadas por estas chinches más infectadas aumenta diferencialmente con respecto a las picadas por chinches sin infección con bacterias intestinales, como las de campo (Fig. 3.6 y 3.7).

Discusión general

Este trabajo es la primera caracterización de la comunidad intestinal de *N. viridula* mediante *metabarcoding*. Los estudios que se habían realizado hasta este momento fueron utilizando técnicas de microbiología tradicional, aislando aquellas bacterias cultivables, o centrándose en comprender el rol del endosimbionte que habita en la parte posterior del intestino de la chinche verde. Sin embargo, en esta tesis pudimos identificar cuáles bacterias predominan en la comunidad intestinal, cuál sería su origen en la interacción chinche-soja, como cambia la diversidad del bacterioma cuando la chinche se alimenta de diferentes dietas e incluso relacionar la composición del bacterioma e infección intestinal de las chinches con las defensas químicas de la planta de soja, cumpliendo con el objetivo general de este trabajo de investigación.

Demostramos que existe una relación directa entre la comunidad de bacterias de la planta y la de la chinche, ya que ambas comparten ciertas bacterias, como *Yokenella*, *Pantoea* y *Serratia*. Esto resulta evidente por la interacción que ocurre entre la soja y la

chinche cuando esta se alimenta de ella, pero a su vez es desconocido aún en qué dirección sucede ese movimiento de las bacterias entre la planta y el insecto. El estudio de la microbiología es de suma importancia para comprender los agroecosistemas a diferentes niveles. Cada vez se reconocen más actividades funcionales del intestino de los insectos en las que hay microorganismos involucrados. Estos son un componente más de procesos complejos y forman parte de la historia evolutiva de los insectos, pero solo en los últimos años han recibido una atención creciente. Una mayor comprensión de la variación entre los huéspedes de insectos podría potencialmente revelar información sobre las causas próximas y últimas de estas asociaciones. Además, comprender ampliamente la dinámica de las relaciones entre los insectos y su microbiota puede ayudar en los esfuerzos de biocontrol de las plagas, que es un foco de estudio de gran parte de la microbiología intestinal de los insectos (Broderick et al. 2004; Vasanthakumar et al. 2006; Lundgren et al. 2007; Geib et al. 2009).

Otra contribución de este trabajo es la comprobación de que la comunidad de bacterias intestinales de la chinche se adapta a los contenidos nutricionales o anti nutricionales del alimento, variando la diversidad del bacterioma, como cuando aumenta la abundancia de *Neoasaia* o *Gilliamella* en la CBI de la chinche al alimentarse de maíz o yuyo colorado. Es muy poco lo que se conoce con respecto al papel que las hospederas alternativas juegan en la dinámica de *N. viridula*. El conocimiento de la secuencia de plantas hospederas, antes de llegar al cultivo de interés, puede permitir el desarrollo de estrategias alternativas de manejo reduciendo el uso generalizado de productos químicos aplicados directamente sobre el cultivo (Underhill, 1934; Woodside, 1947; Russell, 1952; Jones & Sullivan, 1982). Indudablemente el sincronismo entre el ciclo del insecto y la sucesión estacional de las plantas hospederas es un aspecto importante en la dinámica poblacional de la chinche, y su conocimiento permitirá el desarrollo adecuado de estrategias de manejo. Es

necesario en consecuencia profundizar los estudios relacionados con las interacciones cultivo-maleza-fitófago (Antonino et al. 1996). Estos estudios se hacen más evidentes a partir de los resultados de esta tesis, donde descubrimos que se producen cambios en la diversidad de la CBI de la chinche cuando se alimenta de otras malezas o cultivos a campo.

El mecanismo de eliminación de bacterias en condiciones de campo podría estar asociado no sólo al sistema inmunitario del insecto, sino también al comportamiento alimentario y/o a moléculas antimicrobianas ingeridas con la dieta (Shikano, 2017; Abbott, 2014; de Roode y Hunter, 2018). Por lo tanto, es de esperar que la alternancia de alimentación de la chinche entre los bordes enmalezados o lotes vecinos y los lotes de soja podría estar vinculada a los cambios en la diversidad del bacterioma intestinal, como el aumento en la abundancia de *Yokenella* que resulta perjudicial para el insecto. La alternancia de hospederos le permitiría a este insecto regular la diversidad bacteriana intestinal en condiciones naturales para lograr la homeostasis intestinal.

Por último, cabe destacar que la infección con bacterias intestinales como *Yokenella* no solo reduce la actividad proteolítica del intestino de la chinche, sino que también aumenta los principales compuestos defensivos de la planta, y esta combinación produciría un efecto totalmente perjudicial para la plaga. Las defensas químicas más importantes de las semillas de soja en desarrollo son inducidas diferencialmente según el nivel de infección con bacterias intestinales que tengan las chinches, pero aún se desconoce cómo es el mecanismo asociado a esta interacción entre la bacteria y la planta. A partir de todos estos resultados, se plantea la hipótesis que *N. viridula* utiliza el mecanismo de cambio de hospederos de alimentación tanto para evadir las consecuencias negativas que le genera la infección con *Yokenella*, que ocurre cuando la chinche se alimenta sólo de soja, como también para evitar las defensas químicas de este cultivo, que

aumentan cuando las chinches están infectadas con bacterias intestinales como *Yokenella*. Una mejor comprensión de las interacciones recíprocas entre las plantas y los microorganismos intestinales de insectos herbívoros proporcionará información sobre nuevos mecanismos por los cuales los insectos pueden eludir las defensas de las plantas y los mecanismos más amplios por los cuales los microbiomas de los insectos median en las interacciones ecológicas (Mason et al. 2020).

Perspectivas a futuro e investigaciones derivadas de esta tesis:

Si bien los resultados de esta tesis representan un gran avance en la comprensión de la interacción soja-chinche-bacteria y aportan conocimientos originales al tema de estudio, también surgen nuevos interrogantes, por ejemplo: ¿*Yokenella* es una aliada de la soja en la defensa contra el ataque de la chinche verde? ¿se complementa con las defensas químicas de la planta para repeler al insecto?, ¿*Yokenella* habita en la planta de soja y se transmite desde las semillas a las chinches cuando se alimenten de ella para infectarlas y perjudicarlas? ¿O es la chinche quien la transmite a la planta y con qué objetivo? ¿La chinche verde utiliza a los hospederos alternativos a la soja para modificar su CBI y así detoxificarse de *Yokenella* e infectarse de otras bacterias más beneficiosas para su homeóstasis intestinal?

Para responder a algunas de estas preguntas, se postulan a continuación los aspectos en los que habría que enfocar futuras investigaciones:

- Determinar el mecanismo de inducción diferencial de los inhibidores de cisteín-proteasas en semillas de soja picadas por chinches infectadas con *Yokenella*, mediante tratamientos con saliva de chinche, daño mecánico e infección con bacterias directamente en las semillas.
- Estudiar por *metabarcoding* el bacterioma intestinal de *Nezara viridula* cuando

alterna su alimentación entre hospederos (*switching host*): malezas de los bordes, soja del centro del lote y cultivos vecinos, y estudiar su efecto sobre el *fitness* del insecto.

- Comparar las diferentes cepas aisladas de intestinos de chinches y de plantas de soja (por *fingerprinting*) y estudiar el movimiento de las bacterias entre el insecto y la planta durante su interacción, mediante técnicas de microscopia de fluorescencia con bacterias a las que se les haya incorporado, por ejemplo, el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).
- Medir la actividad de isoflavonoides en vainas o semillas de soja frente al ataque de chinches con diferencias en sus bacteriomas intestinales.

Consideraciones finales

Continuar investigando la relación soja-chinche-bacterias para responder a estos nuevos interrogantes nos permitirá diseñar nuevas estrategias de manejo integrado de la plaga, diferentes a las existentes actualmente para controlarlas. Comprender más la biología y ecología de la chinche verde, como así también el impacto de las condiciones ambientales en las interacciones entre insectos y bacterias puede ayudar a controlar las poblaciones de chinches en los cultivos sin utilizar productos agroquímicos, cambiando la forma de producir y siendo más respetuosos con el medio ambiente y con los recursos naturales que se explotan a diario en los sistemas de producción agrícola de la Argentina. Por lo tanto, este estudio destaca la importancia de la manipulación de enterobacterias para los programas de gestión integrada de plagas y el control sostenible de *N. viridula*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott SL, Janda JM. 1994. Isolation of *Yokenella regensburgei* ("Koserella trabulsii") from a patient with transient bacteremia and from a patient with a septic knee. *Journal of clinical microbiology*, *32*(11), 2854-2855.
- Abbott SL. 2011. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and other enterobacteriaceae. *Manual of clinical microbiology*, 639-657.
- Abbott J. 2014. Self-medication in insects: current evidence and future. *Ecological Entomology* 39: 273–280.
- Aragón J. 2002. Insectos perjudiciales de la soja y su manejo integrado en la Región Pampeana Central. *INTA, Marcos Juarez*.
- Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research,* 221:36–49.
- Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim ST, Weigel D, Kemen EM. 2016. Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLoS Biology*, 14:e1002352.
- Andongma AA, Wan L, Dong YC, Desneux N, White JA, Niu CY. 2015. Pyrosequencing reveals a shift in symbiotic bacteria populations across life stages of *Bactrocera dorsalis*. *Scientific Reports*, *5*(1), 1-6.
- Antonino P, La Porta NC, Avalos DS. 1996. Importancia de las plantas hospederas en la dinámica poblacional de *Nezara viridula* (L.), plaga de soja. *Agriscientia*, *13*, 13-23.
- Artavia-León A, Romero-Guerrero A, Sancho-Blanco C, Rojas N, Umaña-Castro R. 2017. Diversity of aerobic bacteria isolated from oral and cloacal cavities from free-living snakes species in Costa Rica rainforest. *International Scholarly*

Research Notices, 2017.

- Ayilara MS, Adeleke BS, Babalola OO. 2022. Bioprospecting and challenges of plant microbiome research for sustainable agriculture, a review on soybean endophytic bacteria. *Microbial ecology*, 1-23.
- Balamayooran G, Cooper C, Paul NC, Ferro PJ, Rice L, Gomez G, Díaz-Delgado J. 2022. *Yokenella regensburgei*, a novel pathogen in farmed American alligators. *Veterinary Pathology*, *59*(3), 476-481.
- Baumann P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, *59*, 155-189.
- Ben Guerrero E, Soria M, Salvador R, Ceja-Navarro JA, Campos E, Brodie EL, Talia P. 2016. Effect of different lignocellulosic diets on bacterial microbiota and hydrolytic enzyme activities in the gut of the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Frontiers in Microbiology*, 7, 2093.
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, *17*(8), 478-486.
- Berg G, Rybakova D, Grube M, Köberl M. 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. Journal of Experimental Botany. 67:995-1002.
- Bidari F, Shams-Bakhh M, Mehrabadi M. 2018. Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). *Journal of Applied Entomology*, *142*(1-2), 162-172.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Caporaso JG. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. Annual Review of Plant Biology. 64:807-38.
- Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Singh R. 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current opinion in biotechnology*, *22*(3), 394-400.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Annals of Clinical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Breakwell K, Tetu SG, Elbourne LD. 2014. Next generation barcode tagged sequencing for monitoring microbial community dynamics. *Methods Mol Biol*. 1096:101-10.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(1), 293-300.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Chapman RF, Kerkut GA, Gilbert LI. 2013. Structure of the digestive system. *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*, 165-211.
- Cho GS, Stein M, Brinks E, Rathje J, Lee W, Suh SH, Franz CM. 2020. *Serratia nevei* sp. nov. and *Serratia bockelmannii* sp. nov., isolated from fresh produce in Germany and reclassification of *Serratia marcescens* subsp. *Sakuensis*

Ajithkumar et al.. 2003 as a later heterotypic synonym of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*. *Systematic and applied microbiology*, *43*(2), 126055.

- Chu CC, Spencer JL, Curzi MJ, Zavala JA, Seufferheld MJ. 2013. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 11917-11922.
- Chung SH, Rosa C, Scully ED, Peiffer M, Tooker JF, Hoover K, Felton GW. 2013. Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(39), 15728-15733.
- Cloutier C, Jean C, Fournier M, Yelle S, Michaud D. 2000. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 44(2), 69-81.
- Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular ecology*, 21(20), 5124-5137.
- Company S, Saikkonen K, Mitter B, Campisano A, Mercado-Blanco J. 2016. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant and Soil*, *405*, 1-11.
- Connick Jr WJ, Osbrink WL, Wright MS, Williams KS, Daigle DJ, Boykin DL, Lax AR. 2001. Increased mortality of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) exposed to eicosanoid biosynthesis inhibitors and *Serratia marcescens* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Environmental Entomology*, *30*(2), 449-455.
- Cooper WR, Nicholson SJ, Puterka J. 2014. Potential Transmission of *Pantoea*

spp. and *Serratia marcescens* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) to Plants by *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*. Vol. 107, pp 63-65.

- Corrêa-Ferreira BS, De Azevedo J. 2002. Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agricultural and Forest Entomology*, *4*(2), 145-150.
- Cohen AC. 2018. Ecology of insect rearing systems: a mini-review of insect rearing papers from 1906-2017. *Advances in Entomology*, 6(02), 86.
- Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, Daffonchio D. 2010. Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Applied and Environmental Microbiology, 76*(21), 6963-6970.
- Curzi MJ, Zavala JA, Spencer JL, Seufferheld MJ. 2012. Abnormally high digestive enzyme activity and gene expression explain the contemporary evolution of a *Diabrotica* biotype able to feed on soybeans. *Ecology and Evolution*, 2(8), 2005-2017. doi:10.1002/ece3.331.
- Daugherty DM, Neustadt MH, Gehrke CW, Cavanah LE, Williams L, Green DE. 1964. An evaluation of damage to soybeans by brown and green stink bugs. *Journal of Economic Entomology*, *57*(5), 719-722.
- de Roode JC, Hunter MD. 2019. Self-medication in insects: when altered behaviors of infected insects are a defense instead of a parasite manipulation. *Current opinion in insect science*, *33*, 1-6.
- Dematheis F, Zimmerling U, Flocco C, Kurtz B, Vidal S. 2012. Multitrophic Interaction in the Rhizosphere of Maize: Root Feeding of Western Corn Rootworm Larvae Alters the Microbial Community Composition. *PLoS ONE* 7(5): e37288. doi:10.1371/journal.pone.0037288
- Depieri RA, Panizzi AR. 2011. Duration of feeding and superficial and in-depth

damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical entomology*, *40*, 197-203.

- Dillon RJ, Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, *49*(1), 71-92.
- Dillon FM, Chludil HD, Mithöfer A, Zavala JA. 2020. Solar UVB-inducible ethylene alone induced isoflavonoids in pods of field-grown soybean, an important defense against stink bugs. *Environmental and Experimental Botany*, *178*, 104167.
- Dong ZX, Li HY, Chen YF, Wang F, Deng XY, Lin LB, Guo J. 2020. Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiological research*, *231*, 126370.
- Douglas AE. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, *60*, 17-34.
- Encuesta anual, Red de Manejo de Plagas -REM-, Aapresid, 2021.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(27), 11002-11007.
- Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects–diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, *37*(5), 699-735.
- Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Dainat B. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio*, *7*(2), e02164-15.
- Fenton B, Margaritopoulos JT, Malloch GL, Foster SP. 2010. Micro-evolutionary change in relation to insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Ecological Entomology*, *35*, 131-146.

- Flores F. 2020. Manejo de chinches en soja. Informe EEA INTA Marcos Juárez.
- Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. 2012. Insect symbionts as hidden players in insect–plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, *27*(12), 705-711.
- Friman J, Karssemeijer PN, Haller J, de Kreek K, van Loon JJ, Dicke M. 2021. Shoot and root insect herbivory change the plant rhizosphere microbiome and affects cabbage–insect interactions through plant–soil feedback. *New Phytologist*, *232*(6), 2475-2490.
- Gamundi JC, Capurro J, Gerster G, Molinari A, Lorenzatti S. 1996. Evaluación de cultivares de soja del grupo IV y V frente al ataque de la oruga medidora y chinches. *Soja. Para mejorar la producción*.
- Gamundi JC, Andrian M, Bacigaluppo D, Lago M, Lenzi L, Randazzo P, Bodrero M. 2003. Incidencia del complejo de chinches en el cultivo de soja con diferentes espaciamientos entre líneas. *Soja. Para mejorar la producción, Eds. INTA, 142p*.
- Gamundi JC, Sosa MA. 2007. Caracterización de daños de chinches en soja y criterios para la toma de decisiones de manejo. Chinches fitófagas en soja. Revisión y Avances en el Estudio de su Ecología y Manejo 1–19.
- GEA (Guía estratégica para el Agro), Estimaciones Nacionales de Producción, Bolsa de Comercio de Rosario, 2022.
- Geib SM, Jimenez-Gasco MDM, Carlson JE, Tien M, Jabbour R, Hoover K. 2009. Microbial community profiling to investigate transmission of bacteria between life stages of the wood-boring beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Microbial Ecology*, *58*, 199-211.
- Giacometti R, Barneto J, Barriga LG, Sardoy PM, Balestrasse K, Andrade AM, Pagano EA, Alemano SG, Zavala JA. 2016. Developing seeds of field-grown soybean respond to stink bug damage inducing MAPK activity and -regulated

defenses. Pest Management Science.

- Gitaitis R, Walcott R, Culpepper S, Sanders H, Zolobowska L, Langston D. 2002. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Protection*, *21*(10), 983-989.
- Godálová Z, Kraková L, Puškárová A, Bučková M, Kuchta T, Piknová Ľ, Pangallo D. 2016. Bacterial consortia at different wine fermentation phases of two typical Central European grape varieties: Blaufränkisch (Frankovka modrá) and Grüner Veltliner (Veltlínske zelené). *International journal of food microbiology*, *217*, 110-116.
- Grimont PA, Grimont F. 1978. The genus *Serratia*. Annual Reviews in Microbiology, 32(1), 221-248.
- Hammer TJ, Sanders JG, Fierer N. 2019. Not all animals need a microbiome, *FEMS Microbiology Letters* **366**:1–11.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Company S, Campisano A, Sessitsch, A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*, *79*(3), 293-320.
- Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ, Aldrich JR. 2006. Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *99*(1), 91-95.
- Howard MM, Muñoz CA, Kao-Kniffin J, Kessler A. 2020. Soil microbiomes from fallow fields have species-specific effects on crop growth and pest resistance. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1171.
- Hung PQ, Kumar SM, Govindsamy V, Annapurna K. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean

varieties. *Biology and Fertility of Soils*, *44*, 155-162.

- Informes Técnicos. Vol. 6, nº 161, ISSN 2545-6636, Comercio exterior. Vol. 6, Nº 14, Complejos exportadores, Primer semestre de 2022, ISSN 2545-6644, *Instituto Nacional de Estadística y Censos*.
- Ishii K, Adachi T, Hara T, Hamamoto H, Sekimizu K. 2014. Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori. Journal of invertebrate pathology* 117: 61-67.
- Jain S, Gaind R, Gupta KB, Dawar R, Kumar D, Paul P, Deb M. 2013. *Yokenella regensburgei* infection in India mimicking enteric fever. *Journal of medical microbiology*, *62*(6), 935-939.
- Jones WA, Sullivan MJ. 1982. Role of host plants in population dynamics of stink bug pests of soybean in South Carolina. *Environmental Entomology*, *11*(4), 867-875.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Kim EK, Kim SH, Nam HJ, Choi MK, Lee KA, Choi SH, Lee WJ. 2012. Draft genome sequence of *Commensalibacter intestini* A911T, a symbiotic bacterium isolated from Drosophila melanogaster intestine.
- Knight KM, Gurr GM. 2007. Review of *Nezara viridula* (L.) management strategies and potential for IPM in field crops with emphasis on Australia. *Crop Protection*, *26*(1), 1-10.
- Kosako Y, Sakazaki R, Yoshizaki, E. 1984. *Yokenella regensburgei* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family Enterobacteriaceae. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, *37*(3), 117-124.

- Kostenko O, van de Voorde TF, Mulder PP, van der Putten WH, Martijn Bezemer T. 2012. Legacy effects of aboveground–belowground interactions. *Ecology Letters*, *15*(8), 813-821.
- Krishnan M, Bharathiraja C, Pandiarajan J, Prasanna VA, Rajendhran J, Gunasekaran P. 2014. Insect gut microbiome–An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *4*, S16-S21.
- Kuhnigk T, König H. 1997. Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. *Journal of basic microbiology*, *37*(3), 205-211.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, *6*(12), 1244-1251.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and soil*, *273*, 91-99.
- Kwong WK, Moran NA. 2013. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order ‘Enterobacteriales’ of the Gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *63*(Pt_6), 2008-2018.
- Lauzon CR, Bussert TG, Sjogren RE, Prokopy RJ. 2013. *Serratia marcescens* as

a bacterial pathogen of *Rhagoletis pomonella* flies (Diptera: Tephritidae). EJE, 100(1), 87-92.

- Lee DJ, Lee JB, Am Jang H, Ferrandon D, Lee BL. 2017. An antimicrobial protein of the *Riptortus pedestris* salivary gland was cleaved by a virulence factor of *Serratia marcescens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 67:427-433.
- Leskey TC, Lee DH, Short BD, Wright SE. 2012. Impact of insecticides on the invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): analysis of insecticide lethality. *Journal of Economic Entomology*, 105(5), 1726-1735.
- Li G, Sun J, Meng Y, Yang C, Chen Z, Wu Y, Li H. 2022. The Impact of Environmental Habitats and Diets on the Gut Microbiota Diversity of True Bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Biology*, *11*(7), 1039.
- Liu YS. 2007. Study on the intestinal bacteria in *L. migratoria manilensis*. *Chinese Journal of Microecology*, *24*(4), 34.
- Liu Y. 2007. Study on the intestinal bacteria of *Eupolyphaga sinensis* Walker. *Chinese Journal of Microecology*, *19*(2), 158.
- Lo YC, Chuang YW, Lin YH. 2011. *Yokenella regensburgei* in an immunocompromised host: a case report and review of the literature. *Infection*, *39*, 485-488.
- Lomate PR, Bonning BC. 2016. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Scientific reports*, *6*(1), 27587.
- Lundgren JG, Lehman RM, Chee-Sanford J. 2007. Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *100*(2), 275-282.
- Lundgren JG, Lehman RM. 2010. Bacterial gut symbionts contribute to seed

digestion in an omnivorous beetle. *PLoS one*, 5(5), e10831.

- MacCollom GB, Lauzon CR, Sjogren RE, Meyer WL, Olday F. 2009. Association and attraction of blueberry maggot fly Curran (Diptera: Tephritidae) to *Pantoea* (Enterobacter) *agglomerans*. *Environmental Entomology*, *38*(1), 116-120.
- Mareggiani G, Pelicano A. 2013. Principales especies de importancia Agrícola. Zoología agrícola. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 2013. Cap. 7, pp 175-201.
- Massaro R, Gamundi JC, Tardivo JM. 1983. Utilización de "Franjas trampas" en soja para el control de chinches. *Informe técnico*, *34*.
- Mason CJ. 2020. Complex relationships at the intersection of insect gut microbiomes and plant defenses. *Journal of chemical ecology*, *46*(8), 793-807.
- Matsuura Y, Koga R, Nikoh N, Meng XY, Hanada S, Fukatsu T. 2009. Huge symbiotic organs in giant scale insects of the genus *Drosicha* (Coccoidea: Monophlebidae) harbor flavobacterial and enterobacterial endosymbionts. *Zoological science*, *26*(7), 448-456.
- McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, Vuong HQ, Russell KA, Hale AR, Mueller UG. 2017. Flowers and wild megachilid bees share microbes. *Microbial ecology*, *73*, 188-200.
- McPherson JE, McPherson RM. 2000. Stink bugs of economic importance in America north of Mexico. CRC, Boca Raton, FL.
- Medina V. 2017. Tesis doctoral: Comunidades microbianas asociadas al intestino de la chinche verde, *Nezara viridula*: Biodiversidad y función biológica.
- Medina V, Sardoy PM, Soria M, Vay CA, Gutkind GO, Zavala JA. 2018. Characterized non-transient microbiota from stinkbug (*Nezara viridula*) midgut deactivates soybean chemical defenses. *PLoS ONE* 13(7): e0200161. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200161

- Medina V, Rosso BE (ex-aequo), Soria M, Gutkind GO, Pagano EA, Zavala JA. 2022. Feeding on soybean crops changed gut bacteria diversity of the southern green stinkbug (*Nezara viridula*) and reduced negative effects of some associated bacteria. *Pest Management Science*, 78(11), 4608-4617.
- Meiners SJ, Phipps KK, Pendergast TH, Canam T, Carson, WP. 2017. Soil microbial communities alter leaf chemistry and influence allelopathic potential among coexisting plant species. *Oecologia*, *183*, 1155-1165.
- Montecchia MS, Tosi M, Soria MA, Vogrig JA, Sydorenko O, Correa OS. 2015. Pyrosequencing Reveals Changes in Soil Bacterial Communities after Conversion of Yungas Forests to Agriculture. *PLoS ONE* 10(3): e0119426. doi:10.1371/journal.pone.0119426
- Musolin DL. 2012. Surviving winter: diapause syndrome in the southern green stink bug *Nezara viridula* in the laboratory, in the field, and under climate change conditions. *Physiological Entomology*, *37*(4), 309-322.
- Nakabachi A, Shigenobu S, Sakazume N, Shiraki T, Hayashizaki Y, Carninci P, Fukatsu T. 2005. Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, Buchnera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(15), 5477-5482.
- Oliveira SMPD, Morais BAD, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, Vilela ML, Brazil RP, Mello RP. 2001. Microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentadas com sangue e com sangue e sacarose. *Cadernos de Saúde Pública*, *17*, 229-232.
- Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, Nikoh N, Koga R, Meng XY, Kikuchi

Y. 2015. Insect's intestinal organ for symbiont sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(37), E5179-E5188.

- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Solymos P. 2019. *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6*.
- Panizzi AR, Galileo MH, Gastal HA, Toledo JF, Wild CH. 1980. Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymph in soybeans. *Environmental Entomology*, *9*(3), 293-297.
- Panizzi AR, Slansky Jr F. 1985. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida entomologist*, 184-214.
- Panizzi AR, Meneguim AM. 1989. Performance of nymphal and adult *Nezara viridula* on selected alternate host plants. *Entomologia experimentalis et applicata*, *50*(3), 215-223.
- Panizzi AR, Slansky Jr F. 1991. Suitability of selected legumes and the effect of nymphal and adult nutrition in the southern green stink bug (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of economic entomology*, *84*(1), 103-113.
- Panizzi AR, Saraiva SI. 1993. Performance of nymphal and adult southern green stink bug on an overwintering host plant and impact of nymph to adult food-switch. *Entomologia experimentalis et applicata*, *68*(2), 109-115.
- Panizzi AR. 1997. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual review of entomology*, *42*(1), 99-122.
- Panizzi AR. 2000. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, *29*, 1-12.
- Panizzi AR, McPherson JE, James DG, Javahery M, McPherson RM. 2000. Stink

bugs (Pentatomidae). *Heteroptera of economic importance*, *828*.

- Panizzi AR, Lucini T. 2016. What happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible reasons to explain populations decline. *Neotropical entomology*, *45*(6), 619-628.
- Panizzi AR, Lucini T, Čokl A, Borges M. 2017. Host plant-stinkbug (Pentatomidae) relationships. *In Stinkbugs: Biorational control based on communication processes* (pp. 31-58). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Pankaj S, Amit, N. 2002. Bacteria associated with *Bactrocera* sp.(Diptera: Tephritidae)-isolation and identification. *Pest Management and Economic Zoology*, 10(1), 1-9.
- Paradis E, Schliep K. 2018. *ape* 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, *35*(3), 526–528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633.
- Pasti MB, Pometto AL, Nuti MP, Crawford, D. 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2213-2218.
- Patil NB, Shinde SR. 2014. Isolation, molecular characterization and plant growth promoting traits of *Neoasaia chiangmaiensis* (KD) from banana. *International Journal of Environmental Sciences*, *5*(2), 309-319.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Dubourg V. 2011. Scikit-learn: Machine learning in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, *12*, 2825–2830.
- Pérez-Cobas AE, Maiques E, Angelova A, Carrasco P, Moya A, Latorre A. 2015. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*, *FEMS Microbiology Ecology*, 91. https://doi.org/10.1093/femsec/fiv022.

- Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, De Arruda IC, Franchini JC, Lara FM. 2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. Journal of Chemical Ecology 29, 1223–1233.
- Possebom T, Lucini T, Panizzi AR. 2020. Stink bugs nymph and adult biology and adult preference on cultivated crop plants in the southern Brazilian neotropics. *Environmental entomology*, *49*(1), 132-140.
- Prado SS, Golden M, Follett PA, Daugherty MP, Almeida RPP. 2009. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 38:103–109.
- Praet J, Cnockaert M, Meeus I, Smagghe G, Vandamme P. 2017. *Gilliamella intestini* sp. nov., *Gilliamella bombicola* sp. nov., *Gilliamella bombi* sp. nov. and *Gilliamella mensalis* sp. nov.: Four novel *Gilliamella* species isolated from the bumblebee gut. *Systematic and Applied Microbiology*, *40*(4), 199-204.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2–approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS One*, *5*(3), e9490.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Rizzo HF. 1972. Enemigos naturales del cultivo de la soja. *Rev. Institucional de la Bolsa de Cereales*, *2851*, 42-47.
- Rizzo HF. 1976. Hemípteros de interés agrícola: chinches perjudiciales y chinches benéficas para los cultivos (No. 595.754 R627). Hemisferio Sur.
- Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Triplett EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The*

ISME Journal, *1*(4), 283-290.

- Roh SW, Nam YD, Chang HW, Kim KH, Kim MS, Ryu JH, Bae JW. 2008. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*, *74*(20), 6171-6177.
- Romero B, Dillon FM, Zavala JA. 2020. Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and decrease herbivore performance. *Arthropod-Plant Interactions* 14:89–99.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston. MA URL http://www.rstudio.com/.
- Russell EE. 1952. Stink bugs on seed alfalfa in southern Arizona (No. 903). US Department of Agriculture.
- Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee WJ. 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. S*cience*, *319*(5864), 777-782.
- Sahani SK, Saha T, Kumari K, Ansar, M. 2023. Diversity of bacterial communities associated with the gut of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Eastern India. researchquare.com
- Salamanca F, Zambon S. 2014. Complejo de chinches de la Soya o Soja. Asesor Internacional Agronómico en CropLife Latin América, Desarrollo Técnico de Mercado. BASF, Brasil. Informe Marzo.
- Sardoy P, Ilina N, Borniego L, Traverso L, Pagano EA, Ons S, Zavala JA. 2021. Proteases inhibitors-insensitive cysteine proteases allow *Nezara viridula* to feed on growing seeds of field-grown soybean. *Journal of Insect Physiology*, *132*, 104250.

- Schäfer A, Konrad R, Kuhnigk T, Kämpfer P, Hertel H, König H. 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *Journal of Applied microbiology*, *80*(5), 471-478.
- Servín-Garcidueñas LE, Sánchez-Quinto A, Martínez-Romero E. 2014. Draft genome sequence of *Commensalibacter papalotli* MX01, a symbiont identified from the guts of overwintering monarch butterflies. *Genome Announcements*, *2*(2), e00128-14.
- Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual review of entomology*, *47*(1), 845-881.
- Shikano I. 2017. Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens, *Journal of Chemical Ecology* **43***:* 586–598.
- Siozios S, Moran J, Chege M, Hurst GD, Paredes JC. 2019. Complete reference genome assembly for *Commensalibacter* sp. strain AMU001, an acetic acid bacterium Isolated from the gut of honeybees. *Microbiology resource announcements*, *8*(1), e01459-18.
- Stadler T, Buteler M, Ferrero AA. 2006. Susceptibilidad a endosulfan y monitoreo de resistencia en poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Insecta, Heteroptera: Pentatomidae), en cultivos de soja de Argentina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 65: 109-119.
- Stam JM, Kroes A, Li Y, Gols R, van Loon JJ, Poelman EH, Dicke M. 2014. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annual review of plant biology*, *65*, 689-713.
- Stock I, Sherwood KJ, Wiedemann, B. 2004. Antimicrobial susceptibility

patterns, β-lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *48*(1), 5-15.

- Sudakaran S, Salem H, Kost C, Kaltenpoth, M. 2012. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*, *21*(24), 6134-6151.
- Sugio A, Dubreuil G, Giron D, Simon JC. 2015. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *Journal of Experimental* Botany, 66:467-78.
- Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, Musolin DL, Fujisaki K, Fukatsu T. 2011. Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* 46:483–488.
- Terra WR, Ferreira C. 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. *Insect molecular biology and biochemistry* (pp. 365-418). Academic press.
- Todd JW, Herzog DC. 1980. Sampling phytophagous Pentatomidae on soybean. *Sampling methods in soybean entomology*, 438-478.
- Todd JW. 1989. Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annual review of entomology*, *34*(1), 273-292.
- Trumper V, Edelstein J. 2008. Chinches fitófagas en Soja. Revisión en el estudio de su ecología y manejo. INTA. ISBN 978-987-521.290-9
- Underhill GW. 1934. *The green stinkbug* (Vol. 294). Virginia Polytechnic Institute. Virginia Agricultural Experiment Station.
- Valzania L, Martinson VG, Harrison RE, Boyd BM, Coon KL, Brown R. 2018. Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 (7): e0006638.

- Vasanthakumar A, Delalibera Jr I, Handelsman J, Klepzig KD, Schloss PD, Raffa KF. 2006. Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environmental Entomology*, *35*(6), 1710-1717.
- Velasco LRI, Walter GH. 1992. Availability of different host plant species and changing abundance of the polyphagous bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, *21*(4), 751-759.
- Velasco LRI, Walter GH. 1993. Potential of host-switching in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) to enhance survival and reproduction. *Environmental Entomology*, *22*(2), 326-333.
- Vorwerk S, Martinez-Torres D, Forneck A. 2007. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch). pubag.nal.usda.gov.
- Vos M, Wolf AB, Jennings SJ, Kowalchuk GA. 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiol Rev. 37(6):936-54. doi:10.1111/1574-6976.12023.
- Walterson AM, Stavrinides J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS microbiology reviews*, *39*(6), 968-984.
- Wang H, Jin L, Zhang H. 2011. Comparison of the diversity of the bacterial communities in the intestinal tract of adult *Bactrocera dorsalis* from three different populations. *Journal of applied microbiology*, *110*(6), 1390-1401.
- Wickham H, Wickham H. 2016. Data analysis. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*, 189-201.
- Woodside AM. 1947. Weed hosts of bugs which cause cat-facing of peaches in

Virginia. *Journal of Economic Entomology*, *40*(2), 231-233.

- Yang H, Schmitt-Wagner D, Stingl U, Brune A. 2005. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environmental Microbiology*, *7*(7), 916-932.
- Yukphan P, Malimas T, Potacharoen W, Tanasupawat S, Tanticharoen M, Yamada Y. 2005. *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *51*(5), 301-311.
- Yukphan P, Malimas T, Takahashi M, Kaneyasu M, Potacharoen W, Tanasupawat S, Yamada Y. 2006. Phylogenetic relationships between the genera *Swaminathania* and *Asaia*, with reference to the genera *Kozakia* and *Neoasaia*, based on 16S rDNA, 16S-23S rDNA ITS, and 23S rDNA sequences. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *52*(5), 289-294.
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim MS, Park DS, Bae JW. 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(17), 5254-5264.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. Plant Physiology. 134:1181-1190.
- Zavala JA, Casteel CL, Berenbaum MR, De Lucia EH. 2008. Anthropogenic increases in carbon dioxide promote damage by invasive insects by compromising plant defenses. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105:5129-5133.

- Zavala JA. 2010. Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. Ciencia Hoy 20 (117): 52-59.
- Zavala JA, Mazza CA, Dillon FM, Chludil HD, Ballaré CL. 2015. Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions. Plant, Cell & Environment. 38:920-928.
- Zheng H, Nishida A, Kwong WK, Koch H, Engel P, Steele MI, Moran NA. 2016. Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio*, *7*(6), e01326-16.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and environmental microbiology*, *68*(5), 2198-2208.