

## VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI COMPOSTI A BASSO IMPATTO AMBIENTALE SUL PROCESSO DI ACQUISIZIONE DI "CANDIDATUS PANTOEA CARBEKII" DA PARTE DELLE NEANIDI DI *HALYOMORPHA HALYS*

M. ANDREOLLI<sup>1</sup>, I. CHECCHIA<sup>1</sup>, G.E. FELIS<sup>1</sup>, M. PASINI<sup>2</sup>, S. LAMPIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, via Strada Le Grazie 15  
37134 Verona

<sup>2</sup>Agrea Centro Studi, via G. Garibaldi 5/16 - 37057 San Giovanni Lupatoto (VR)  
max.pasini@agrea.it

### RIASSUNTO

*Halyomorpha halys* è diventato uno dei principali parassiti di molte colture di interesse agrario. Una promettente azione di controllo di *H. halys* è basata sulla riduzione della vitalità del principale batterio simbiote presente nelle sue uova: *Candidatus Pantoea carbekii*. Le iniziali analisi di microscopia elettronica hanno permesso di rivelare che il microrganismo si colloca sulla superficie interna del corion. Per valutare la mortalità di *Ca. P. carbekii* a seguito di diversi trattamenti con prodotti a potenziale azione biocida sulle uova, è stato fondamentale ottimizzare un protocollo commerciale *live/dead assay*. Trattamenti effettuati con prodotti a base di zolfo e rame hanno evidenziato valori tra il  $76,3 \pm 14,13$  e il  $79,97 \pm 7,44\%$  di mortalità batterica e del  $91,67 \pm 14,43$  e  $86,81 \pm 12,97\%$  di mortalità delle neanidi, che non arrivano al secondo stadio. Un prodotto a base di acido peracetico, acetico e perossido di idrogeno ha mostrato percentuali di mortalità del  $39,66 \pm 6,7\%$  dei batteri e  $62,34 \pm 5,74\%$  delle neanidi. Infine, la propoli ha mostrato una mortalità microbica del  $25,37 \pm 0,63\%$  e del  $26,38 \pm 5,58\%$  delle neanidi. Questo studio conferma che la vitalità delle neanidi è correlata alla presenza di batteri endosimbionti, e che prodotti a base di rame e zolfo possono essere efficaci nel contenimento di *H. halys*.

**Parole chiave:** agricoltura sostenibile, cimice asiatica, saggio vivi/morti, simbiosi batterica obbligata

### SUMMARY

#### SUPPRESSIVE EFFECTS OF LOW IMPACT PRODUCTS ON THE *CANDIDATUS PANTOEA CARBEKII* ACQUISITION BY NEWLY-EMERGED NYMPHS OF *HALYOMORPHA HALYS*

The Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys*) has become an invasive pest of many crops. A promising control approach against *H. halys* is based on the suppression of its main symbiotic bacteria found in its eggs. The initial analysis performed by electron microscopy showed the presence of the bacteria on the inner surface of the chorion membrane. An optimization of the commercial protocols *live/dead assay* was fundamental in order to evaluate the bacterial vitality after different egg treatments. Sulfur-and copper-based products showed a bacterial mortality of  $76.3 \pm 14.13$  and  $79.97 \pm 7.44\%$  and a nymphs mortality of  $91.67 \pm 14.43$  e  $86.81 \pm 12.97\%$  respectively. A product based on peracetic acid, acetic acid and hydrogen peroxide showed a dead percentage of  $39.66 \pm 6.7\%$  for bacteria and  $62.34 \pm 5.74\%$  for nymphs. Eventually, the lower dead rate of either *Ca. P. carbekii* ( $25.37 \pm 0.63\%$ ) or nymphs ( $26.38 \pm 5.58\%$ ) was obtained by using propolis. This study confirms that the vitality of the nymphs is related to the presence of its bacterial symbiont and suggests that sulfur and copper-based products are effective in *H. halys* control.

**Keywords:** sustainable agriculture, Brown Marmorated Stink Bug, *live/dead assay*

## INTRODUZIONE

*Halyomorpha halys* (Stål, 1855), meglio conosciuta come cimice asiatica, è un pentatomide recentemente insediato in Nord America ed Europa. La sua marcata polifagia, l'alto potenziale riproduttivo e l'elevata mobilità la rendono uno dei principali parassiti di molte colture di interesse agrario, tra cui specie arboree ed ortaggi, di cui compromette gravemente la resa e la qualità (Rice et al., 2014; Gonella et al., 2020). È noto che *H. halys* è colonizzata da una specie batterica simbiote dominante, non coltivabile *in vitro*, *Candidatus Pantoea carbekii* (*Ca. P. carbekii*), che svolge un ruolo chiave nella fisiologia contribuendo positivamente alla sua *fitness* (Taylor et al., 2014; Gonella et al., 2019). L'endosimbiote viene trasmesso verticalmente attraverso secrezioni riversate sulle ovature che sono poi ingerite dalle ninfe (Gonella et al., 2019). Durante lo sviluppo delle neanidi, i simbionti di molti pentatomidi colonizzano la porzione terminale dell'intestino medio, chiamata regione V4 (Fukatsu e Hosokawa, 2002; Prado et al., 2006; Karamipour et al., 2016) localizzandosi, durante la fase adulta, nelle cavità delle cripte dell'intestino medio (Oishi et al., 2019).

L'interruzione della trasmissione verticale di *Ca. P. carbekii* può rappresentare un interessante approccio per la riduzione delle popolazioni di insetti fitofagi di rilevanza economica come *H. halys* (Gonella et al., 2020). Un'azione di controllo del parassita *H. halys* basata sulla riduzione della vitalità di *Ca. P. carbekii* è stata per la prima volta suggerita da Taylor et al., (2014). Tale lavoro riporta una minore sopravvivenza delle ninfe sia nella prima che nella seconda generazione dopo un trattamento delle uova con una soluzione disinfettante a base di cloro. Infusi di compost derivanti da letame di pollame e scarti di funghi sono state le prime sostanze utilizzate in agricoltura saggiate per la soppressione di *Ca. P. carbekii*. I risultati hanno evidenziato che trattamenti con tali composti aumentavano la mortalità di *H. halys* al primo e al secondo stadio di sviluppo. D'altra parte, lo stesso lavoro puntualizza come tali sostanze possano avere un effetto ovicida diretto, andando quindi non tanto ad esercitare un'azione basata su una ridotta assunzione del batterio simbiote da parte dell'insetto, ma direttamente sulla schiusa delle uova (Mathews e Barry, 2014). In un altro lavoro, a seguito di diversi trattamenti sulle uova, è stata valutata parallelamente sia la mortalità delle ninfe che la vitalità di *Ca. P. carbekii* nelle ninfe stesse (Gonella et al., 2019). I risultati riportano che prodotti commerciali a base di rame, zinco e acido citrico causano la mortalità delle ninfe a seguito della riduzione della vitalità di *Ca. P. carbekii* (Gonella et al., 2019).

Il presente studio si è posto gli obiettivi di: i) visualizzare l'esatta collocazione di *Ca. P. carbekii* all'interno dell'uovo mediante analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM); ii) mettere a punto un protocollo per la precisa valutazione della mortalità di *Ca. P. carbekii*, all'interno delle uova di *H. halys*; iii) applicare il protocollo per valutare la mortalità del batterio nelle uova a seguito di trattamenti effettuati con diversi prodotti e iv) valutare la mortalità delle neanidi dopo tali trattamenti.

## MATERIALI E METODI

### **Prodotti a confronto, ottenimento delle ovature, analisi della mortalità delle neanidi**

Le ovature da saggiare sono state ottenute in allevamenti in cella climatica con temperatura di 25°C, U.R. 60% e fotoperiodo pari a 16:8 (luce:buio). Si tratta di uova deposte dalle 8 alle 32 ore prima dell'applicazione. Gli allevamenti sono costituiti da box del tipo BugDorm in cui sono inseriti maschi e femmine provenienti dal campo, alimentati con fagiolino, peperone, kiwi, semi di girasole in accordo con i metodi più produttivi (Dingha e Jackai, 2016).

Le ovature raccolte dagli allevamenti sono state incollate su un piccolo supporto rettangolare in PET in attesa dell'applicazione, previo conteggio del numero di uova presenti.

Una ovatura costituiva una replica e sono state utilizzate 3 repliche per ogni trattato, mentre il testimone è stato replicato 12 volte. Dopo l'applicazione ogni ovatura è stata posta in scatole di plastica (contenitori per alimenti) con fagiolini come fonte di alimentazione e una provetta con tampone di carta assorbente e acqua per l'idratazione. Il disegno sperimentale utilizzato è la randomizzazione completa.

L'applicazione dei diversi prodotti (riportati in tabella 1) è stata fatta attraverso l'immersione diretta dell'ovatura nella soluzione insetticida per 3 secondi e successivo tamponamento del liquido in eccesso (nel caso del testimone, solo in acqua) con carta da filtro. Dopo l'applicazione è iniziato il periodo di osservazione, con la registrazione del numero di uova non schiuse, del numero di neanidi neonate e della loro mortalità, fino al raggiungimento della seconda età.

Tabella 1. Caratteristiche delle sostanze utilizzate nella sperimentazione

Numero tesi	Sostanza attiva	Formulato	Concentrazione	Dose formulato per ettolitro (hL)
1	Testimone (trattato con acqua)	-	-	-
2	Propoli	Propoli	150 g/L	250 mL
3	Acido peracetico + idrogeno perossido + acido acetico	Jetfive	5 + 20 + 10%	600 mL
4	Sodio ipoclorito + sodio idrossido + sodio tetraborato decaidrato	Amuchina	1 + 0,03 + 0,03%	tal quale
5	Zolfo	Thiopron	825 g/L	500 mL
6	Rame da idrossido	Kocide 2000	35%	150 g

### Analisi SEM (Scanning Electron Microscopy)

Le uova (entro 1 giorno dall'ovideposizione, 5-10 uova per trattamento) sono state immerse in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%; 5 µL per ogni uovo) e sottoposte ai seguenti trattamenti prima dell'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM): (i) vortex per 15 sec; (ii) vortex per 30 sec in PBS; (iii) immersione in candeggina al 9% per 2 min, seguito da tre lavaggi in PBS; (iv) nessun trattamento (testimone).

Le uova sono state quindi fissate in 3% glutaraldeide, 2% paraformaldeide, in tampone fosfato di potassio 0,1 M pH 7,2 (PB) per circa 12 ore e successivamente risciacquate tre volte per 10 minuti con PB. I campioni sono stati trattati con 1% (p/v) di tetrossido di osmio (OsO<sub>4</sub>) in PB per 1 h. Dopo due lavaggi PB, i campioni sono stati disidratati mediante successivi lavaggi in etanolo al 50, 75, 95 e 100% per 15 min ciascuno. Dopo la disidratazione, i campioni sono stati liofilizzati, e visualizzati al microscopio elettronico a scansione LEO 1455 (Zeiss). Inoltre, 5 µL di soluzione fisiologica in cui sono state miscelate mediante agitazione con vortex le uova sono stati trasferiti su un vetrino, essiccato a 60°C ed osservato mediante microscopio ottico.

### Analisi della mortalità di *Ca. P. carbekii* nelle uova di *H. halys*

La valutazione della mortalità di *Ca. P. carbekii* è stata effettuata il medesimo giorno dei trattamenti. Per ciascuna sostanza sono state considerate almeno due repliche biologiche, e per ciascuna replica biologica sono state considerate due repliche tecniche. Il protocollo ha previsto l'utilizzo del kit commerciale *Dead/Live assay* (Invitrogen). In particolare, la metodica è stata messa a punto ed ottimizzata secondo quanto segue: 20 uova sono state

trasferite in una eppendorf, immerse in 25  $\mu$ L di soluzione fisiologica (0,9 % di NaCl) e miscelate mediante vortex per 1 min. L'eluato risultante, contenente le cellule batteriche derivanti dalle uova, è stato trasferito in una nuova eppendorf e portato ad un volume finale di 50  $\mu$ L con soluzione fisiologica. Si sono aggiunti 2  $\mu$ L della *staining solution dead-live* (diluita 1:1 con dimetilsolfossido) ed incubato per 15 min al buio. Si è quindi centrifugato a 4.500 g per 5 min, prelevato circa 40-45  $\mu$ L di fisiologica e risospeso il pellet usando il liquido in eccesso. Si sono quindi prelevati 4  $\mu$ L del campione ed effettuata l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Per ogni trattamento sono state effettuate 30 differenti fotografie. Sono state quindi contate le cellule rosse e verdi e calcolata la percentuale di mortalità batterica.

### Analisi statistica

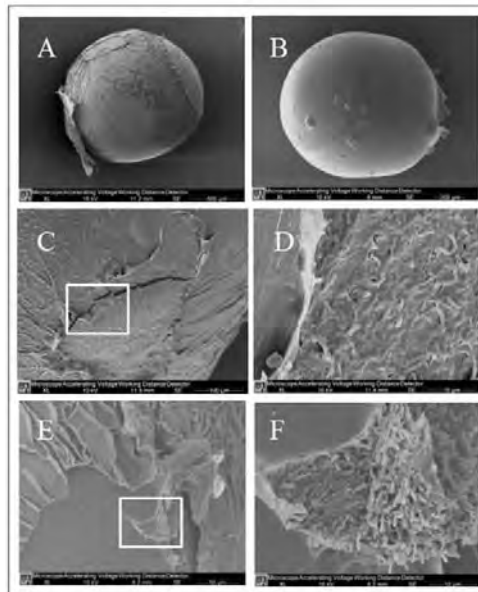
I dati della prova dead/live assay sono stati confrontati mediante analisi statistica ANOVA, seguita dal test di Tukey HSD (Honestly Significant Difference) con soglia di significatività impostata al 95% (p-value < 0,05). I dati della prova di mortalità delle neanidi sono stati confrontati mediante analisi statistica ANOVA, seguita dal test SNK (Student-Newman-Keuls) con soglia di significatività sempre al 95% (p-value < 0,05).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Visualizzazione di *Ca. P. carbekii* mediante microscopia elettronica a scansione

Le analisi al SEM sono state condotte al fine di valutare l'esatta collocazione del microrganismo *Ca. P. carbekii* nelle uova della cimice asiatica (figura 1).

Figura 1. Immagini al SEM delle uova di *H. halys*. (A) uovo non trattato; (B) uovo trattato con candeggina al 9%; (C) uovo agitato con vortex per 15 sec; (D) particolare della figura C che mostra la presenza delle cellule batteriche all'interno della superficie del corion; (E) uovo agitato con vortex per 30 sec più pipettamento; (F) particolare della figura E che mostra le cellule batteriche tra il corion e superficie interna dell'uovo



I trattamenti delle ovature mediante vortex hanno determinato lo sfaldamento del corion - la membrana esterna che ricopre l'uovo secreta durante l'ovideposizione (Kenyon et al., 2015) – consentendo la visualizzazione del batterio sulla superficie interna di tale membrana. Di contro, il microrganismo risulta non visibile sia sulla superficie esterna delle uova non trattate, sia sulle uova precedentemente trattate con candeggina. Quest'ultimo trattamento sembra aver infatti rimosso completamente sia il corion sia le cellule batteriche.

Infine, l'osservazione al microscopio ottico ha permesso di osservare cellule batteriche all'interno della soluzione fisiologica in cui erano immerse le uova durante il trattamento con vortex (dato non mostrato).

L'analisi al SEM evidenzia la presenza di una popolazione batterica sulla membrana interna del corion (Kenyon et al., 2015). Tale risultato riprova che il batterio simbiote possa essere trasmesso verticalmente attraverso secrezioni riversate sulle ovature, poi ingerite dalle ninfe appena dopo la loro nascita (Taylor et al., 2014). Tale trasmissione è già stata osservata in altri pentatomidi come *Eurydema* sp. e *Sibaria englemanni* (Kikuchi et al., 2012; Bistolas et al., 2014). Le osservazioni al SEM hanno inoltre evidenziato che il trattamento mediante vortex permette una sfaldatura del corion consentendo sia la visualizzazione dei batteri al suo interno, sia la dispersione dei batteri nella soluzione fisiologica. Questo aspetto è risultato di particolare importanza per la messa a punto di un protocollo per il calcolo della percentuale di mortalità di *Ca. P. carbekii*.

### **Valutazione della percentuale di mortalità di *Ca. P. carbekii* nelle uova di *H. halys***

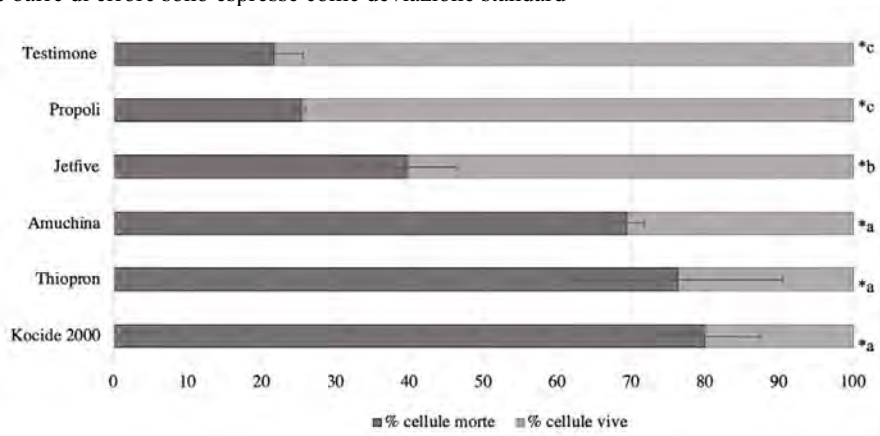
Un aspetto fondamentale di questo lavoro è stata la scelta e successiva ottimizzazione di un protocollo rapido, economico ed affidabile per la valutazione della percentuale di mortalità di un microrganismo presente in matrici (uova di cimice asiatica) dal peso di pochi mg e non coltivabile *in vitro*.

Per valutare la mortalità di *Ca. P. carbekii* è stato scelto ed ottimizzato un protocollo commerciale *live/dead assay*. Tale metodica utilizza un trattamento con dei fluorofori e successive osservazioni al microscopio a fluorescenza. La popolazione batterica è trattata con un mix contenente SYTO® 9 e ioduro di propidio che legano gli acidi nucleici e hanno un diverso grado di penetrazione a seconda dello stato di integrità della parete cellulare batterica, con il risultato che le cellule integre (vive) emettono fluorescenza nel verde, mentre le cellule aventi membrana e pareti danneggiate (morte) fluorescono nel rosso. La successiva visualizzazione e conta delle cellule avviene al microscopio a fluorescenza e permette il calcolo della percentuale di mortalità batterica.

Il protocollo utilizzato evidenzia numerosi vantaggi rispetto ad altre metodiche basate su tecniche molecolari, quali, per esempio, PMA *real-time* PCR (Soto-Muñoz et al., 2014) e *real-time* PCR partendo da molecole di RNA (Gonella et al., 2019). Il protocollo *dead/live assay* è una metodica molto sensibile e quindi utilizzabile anche per campioni che contengono solo un limitato numero di cellule batteriche. Le metodiche molecolari prevedono infatti l'estrazione di DNA o RNA, un passaggio che può risultare spesso limitante se il numero di microrganismi contenuti nella matrice è molto contenuto. Inoltre, le metodiche *real-time* prevedono diversi passaggi, quali estrazione DNA, retro-trascrizione e amplificazione, ognuno dei quali non è esente da errori sperimentali. Per ultimo, tali metodiche prevedono la quantificazione di materiale genetico derivante da cellule vive e solo mediante sottrazione da standard interni o da campioni testimone si può valutare la percentuale di mortalità (Soto-Muñoz et al., 2014; Gonella et al., 2019). Al contrario, il protocollo *dead/live assay* permette in un singolo passaggio la visualizzazione e conta contemporanea delle singole cellule batteriche sia vive che morte, riducendo l'entità di errori sperimentali.

Le prove con uova testimone (trattate con acqua) e controllo positivo (trattato con Amuchina) hanno mostrato una mortalità di *Ca. P. carbekii* rispettivamente pari a  $21,62 \pm 3,99$  e del  $69,41 \pm 2,34$  % ( $p < 0,05$ ). Sono stati saggiati 4 formulati di cui solo la propoli ha mostrato una mortalità batterica pari al  $25,37 \pm 0,63$ %, statisticamente non significativa ( $p > 0,05$ ) rispetto al testimone. I risultati hanno evidenziato una maggiore percentuale di mortalità ( $p < 0,05$ ) nel caso di prodotti a base di zolfo (Thiopron) e rame (Kocide 2000) con valori tra il  $76,30 \pm 14,13$  e il  $79,97 \pm 7,44$ %, rispettivamente; mentre il prodotto a base di acido peracetico, acido acetico e perossido di idrogeno (Jetfive) ha mostrato percentuali di mortalità inferiori:  $39,66 \pm 6,7$  ( $p < 0,05$ ) (figura 2).

Figura 2. Percentuale di cellule batteriche morte e vive a seguito dei trattamenti sulle ovature. Le barre di errore sono espresse come deviazione standard



\*Lettere diverse indicano una differenza significativa nel test di Tukey HSD ( $p < 0,05$ )

Il lavoro qui esposto riporta per la prima volta i dati di mortalità di *Ca. P. carbekii* direttamente nelle uova a seguito di diversi trattamenti. Sebbene esistano evidenze in letteratura che la propoli possieda proprietà antimicrobiche (Silva-Carvalho et al., 2015), tale composto è risultato l'unico che non ha mostrato una mortalità batterica significativa dopo il trattamento. Tale risultato può essere attribuito probabilmente all'utilizzo di una concentrazione del principio attivo troppo bassa. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che la propoli non è una sostanza asettica, come ci si potrebbe aspettare da una sostanza ad azione disinfettante, ma può contenere un vasto numero di microrganismi, tra cui specie appartenenti al genere *Pantoea* (Casalone et al., 2020).

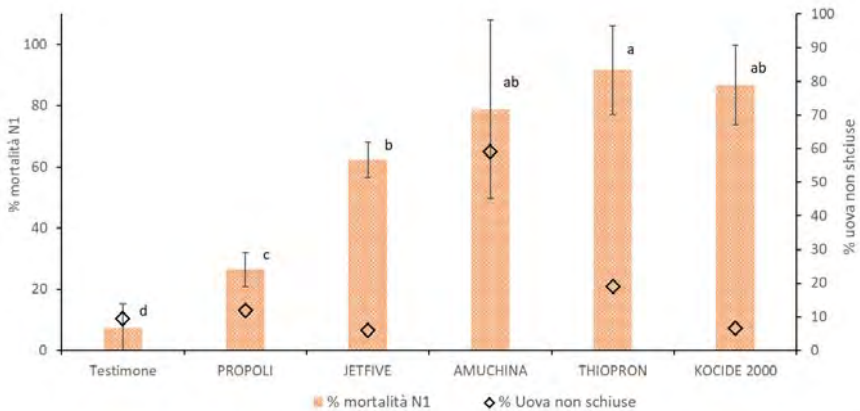
I prodotti a base di rame e zolfo hanno evidenziato la maggior percentuale di mortalità di *Ca. P. carbekii* nelle uova. Anche se con percentuali minori, anche il composto a base di acidi organici è risultato avere un'efficacia nella riduzione della vitalità batterica. Tale azione può essere attribuibile alle ben note proprietà antibatteriche di tali composti già presenti all'interno di prodotti commerciali per la difesa di diverse colture agricole (Weld e Gunther, 1947; Finten et al., 2017). Prodotti a base di rame ed acidi organici hanno già evidenziato di aumentare la mortalità di *Ca. P. carbekii* in neanidi di *H. halys* (Gonella et al., 2019). Di contro, ad oggi nessun lavoro in letteratura ha riportato gli effetti di un trattamento delle uova di cimice asiatica con prodotti a base di zolfo.

### Analisi della mortalità delle neanidi

La figura 3 mostra la percentuale di mortalità totale delle neanidi neonate nel periodo che va dalla schiusura alla prima muta, assieme alla percentuale di uova non schiuse (mortalità delle uova). La base su cui è calcolato il dato della mortalità delle N1 è il numero di uova schiuse.

Come si può osservare, la mortalità prenatale è piuttosto bassa e omogenea in quasi tutti i trattati, tranne che nel trattato con Amuchina, dove le uova non schiuse sono il  $59,17 \pm 29,22\%$ . Questo dato, che all'analisi statistica è risultato altamente significativo ( $P < 0,01$ ), suggerisce che vi sia un effetto diretto di questa sostanza anche sullo sviluppo embrionale. In ogni caso, sulla quota rimasta di ovature schiuse è stata calcolata anche per questo trattamento la mortalità delle N1. A questo riguardo, si evidenzia nella figura 3 come tutti i trattati abbiano in diverso grado risentito dell'applicazione effettuata, con medie che si discostano significativamente dal controllo. In particolare, il preparato a base di Propoli ha fatto registrare  $1'26,38 \pm 5,58\%$ , Jettfive il  $62,34 \pm 5,75\%$ , Thiopron il  $91,67 \pm 14,43\%$ , Kocide 2000  $1'86,81 \pm 12,97\%$ .

Figura 3. Valori percentuali di mortalità delle neanidi di primo stadio (N1) e di uova non schiuse. Le barre rappresentano la deviazione standard



### CONCLUSIONI

Il lavoro qui descritto riporta per la prima volta i risultati di mortalità di *Ca. P. carbekii* nelle uova di *H. halys* a seguito di trattamenti con prodotti a base di propoli, zolfo, rame ed acidi organici. A tal fine è stato ottimizzato un protocollo commerciale *dead/live assay*. L'analisi di mortalità batterica effettuata direttamente sulle uova e non nelle ninfe come precedentemente riportato (Gonella et al., 2019), conferma che l'uovo ospita il microrganismo endosimbionte *Ca. P. carbekii*, poi trasmesso alle ninfe che lo ingeriscono. Inoltre, le evidenze sperimentali mostrano che trattamenti con prodotti a base di rame, zolfo ed acidi organici sulle uova di cimice asiatica inducono un significativo aumento della mortalità sia di *Ca. P. carbekii* che delle ninfe prima del secondo stadio di sviluppo. Sebbene debbano essere condotti ulteriori studi, i risultati suggeriscono che tali composti possono potenzialmente garantire un efficace rimedio per la difesa della cimice asiatica in campo.

## LAVORI CITATI

- Bistolos K. S., Sakamoto R. I., Fernandes J. A., Goffredi S. K., 2014. Symbiont polyphyly, co-evolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. *Frontiers in Microbiology*, 5, 349
- Dingha N., Jackai A. N., 2016. Laboratory rearing of the brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) and the impact of single and combination of food substrates on development and survival. *Can. Entomol.* 149, 1, 1-14 doi:10.4039/tce.2016.39
- Finten G., Agüero M. V. Jagus R. J., 2017. Citric acid as alternative to sodium hypochlorite for washing and disinfection of experimentally-infected spinach leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 318-325
- Fukatsu T., Hosokawa T., 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 389-396
- Gonella E., Orrù B., Alma A. 2019. Egg masses treatment with micronutrient fertilizers has a suppressive effect on newly-emerged nymphs of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *Entomologia Generalis*, 39, 231-238
- Gonella E., Orrù B., Marasco R., Daffonchio D., Alma A., 2020. Disruption of Host-Symbiont Associations for the Symbiotic Control and Management of Pentatomid Agricultural Pests - A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 547031
- Karamipour N., Mehrabadi M., Fathipour Y., 2016. Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, 6, 33168
- Kashkouli M., Castelli M., Floriano A. M., Bandi C., Epis S., Fathipour Y., Mehrabadi M., Sasser D., 2021. Characterization of a novel *Pantoea* symbiont allows inference of a pattern of convergent genome reduction in bacteria associated with Pentatomidae. *Environmental Microbiology*, 23, 1, 36-50
- Kenyon L. J., Meulia T., Sabree Z. L., 2015. Habitat visualization and genomic analysis of “*Candidatus Pantoea carbekii*,” the primary symbiont of the brown marmorated stink bug. *Genome biology and evolution*, 7, 2, 620-635
- Kikuchi Y., Hosokawa T., Nikoh N., Fukatsu T., 2012. Gut symbiotic bacteria in the cabbage bugs *Eurydema rugosa* and *Eurydema dominulus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*, 47, 1, 1-8
- Mathews C. R., Barry S., 2014. Compost tea reduces egg hatch and early-stage nymphal development of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist*, 97, 4, 1726-1732
- Prado S. S., Rubinoff D., Almeida R. P. P., 2006. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 577-585
- Silva-Carvalho R., Baltazar F., Almeida-Aguiar C., 2015. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 29 pp
- Soto-Muñoz L., Teixidó N., Usall J., Viñas I., Crespo-Sempere A., Torres R., 2014. Development of PMA real-time PCR method to quantify viable cells of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist to control the major postharvest diseases on oranges. *International journal of food microbiology*, 180, 49-55
- Taylor C. M., Coffey P. L., DeLay B.D., Dively, G.P., 2014. The importance of gut symbionts in the development of the brown marmorated stink bug, *H. halys* (Stål). *PLoS One*, 9, 3
- Weld J. T., Gunther A., 1947. The antibacterial properties of sulfur. *The Journal of experimental medicine*, 85, 5, 531-542