**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato
intestinal de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes
dietas**

Poliene Martins Costa

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Poliene Martins Costa
Bióloga

**Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato intestinal de
Spodoptera frugiperda provenientes de diferentes dietas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Costa, Poliene Martins

Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes dietas / Poliene Martins Costa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

116 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Spodoptera frugiperda* 2. Comunidade bacteriana 3. Gene 16S rRNA 4. Adaptação
5. Inibidor de peptidase de soja I. Título

CDD 632.78
C837c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Francisco e Marieta,
pelo amor incondicional,
por serem minha inspiração de força e
pelo suporte em todos os instantes que precisei.*

*À minha irmã , Lélis,
pelo carinho e inúmeros conselhos,
e aos meus sobrinhos Vítor e Luizinho,
pelos momentos de alegria e de doce inocência.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Márcio de Castro Silva Filho, pela orientação, confiança e oportunidade de crescimento profissional;

À professora Dra. Maria Lígia Rodrigues de Macedo, pelo inestimável apoio e imensa contribuição na realização deste trabalho;

Ao Júlio Fatoreto e ao Robson Lunardi da empresa Syngenta, pelo suporte e disponibilidade em auxiliar nas coletas de lagartas na área de milho convencional em Holambra;

Ao Dr. Octávio Franco e Dra. Alinne Castro, pela colaboração no trabalho em Campo Grande;

Ao pesquisador Dr. Maurício Cantão da Embrapa, por toda a ajuda e boa vontade em tirar as minhas dúvidas de bioinformática;

Ao professor Dr. José Roberto Postali Parra por disponibilizar a estrutura do laboratório de Biologia de insetos para condução dos experimentos;

À técnica do laboratório de Biologia de insetos, Neide Graciano Zério, pela ajuda na criação dos insetos e preparo das dietas artificiais;

Ao técnico do laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Rafael Colombi, pela dedicação, ajuda e amizade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento no projeto de pesquisa e pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Departamento de Genética (LGN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (Esalq/USP) pela formação acadêmica;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas: Larissa Spoladore, Júlio Fatoreto, Marcos Araújo, Flávia Franco, Renata Dias, Karina Lopes e aos que passaram por lá, Wiliane Garcia, Fabiana Mingossi, Horácio Montenegro e Marcelo Brandão;

À aluna Suzy Wider do laboratório da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo importante suporte;

Aos companheiros da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB);

Aos meus amados amigos, em especial à Elaine Castelhana, Ingrid Batista e Leandro Machado, que fizeram e fazem parte da minha vida;

Aos meus queridos amigos de Piracicaba, Lourdes Chavarría, Augusto Diniz, Rafaela Roma, Luiz Augusto Cauz, Marina Soriano e Bruna Mendes;

Aos meus familiares, em especial às tias Cidinha e Zeca e ao tio Jorge, pelo constante carinho e conselhos;

Aos meus amados pais Francisco e Marieta, à minha irmã Lélis e aos meus sobrinhos Vítor e Luizinho pela dedicação e amor;

A Deus, pela constante presença e graça da fortaleza, permitindo que eu concluísse esta importante etapa da minha vida.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, MUITO OBRIGADA!

“O homem que vai mais longe é geralmente aquele que está disposto a fazer e a ousar.

O barco da segurança nunca vai muito além da margem.”

Dale Carnegie

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Ocorrência dos insetos herbívoros no mundo	17
2.2 Lagarta <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
2.3 Aspectos gerais do processo digestivo em insetos	18
2.4 Serino peptidases.....	20
2.5 Serino endopeptidases em insetos	20
2.6 Inibidores de peptidases de plantas	21
2.7 Respostas dos insetos aos inibidores de peptidases	23
2.8 Aspectos gerais dos microrganismos simbioses de insetos.....	27
2.9 Características da colonização e diversidade da microbiota no intestino de insetos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Procedência e criação das lagartas <i>S. frugiperda</i> coletadas no campo e criadas em laboratório	35
3.2 Preparo de ensaios biológicos de lagartas <i>S. frugiperda</i> advindas do campo e de criação em laboratório	37
3.2.1 Extração dos inibidores de peptidases de sementes de soja	37
3.2.2 Determinação da concentração do IPS nos ensaios biológicos com lagartas <i>S. frugiperda</i> alimentadas com folhas de soja.....	38
3.2.3 Preparo dos Ensaios biológicos	39
3.2.4 Extração das bactérias proteolíticas do intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	40
3.2.5 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs)	41
3.3 Estudos de expressão de genes que codificam as endopeptidases dos tipos tripsina e quimotripsina de <i>S. frugiperda</i>	41
3.3.1 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	41
3.3.2 Análise de Expressão Gênica por PCR em tempo real.....	42
3.4 Análise da atividade enzimática do intestino de lagartas <i>S. frugiperda</i>	43
3.4.1 Preparo do intestino das lagartas para ensaios bioquímicos	43

3.4.2 Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i> (análise quantitativa)	44
3.4.3 Atividade enzimática de extratos intestinais visualizados em zimograma (análise qualitativa)	45
3.5 Determinação da diversidade bacteriana extraída de fezes de lagartas <i>S.</i> <i>frugiperda</i> advindas do campo e de criação em laboratório	46
3.5.1 Amostragem, coleta e preparo das fezes de lagartas <i>S. frugiperda</i>	46
3.5.2 Extração do DNA para análise do gene 16S rRNA	48
3.5.3 Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento de alto desempenho	48
3.5.4 Análise de bioinformática para dados do gene 16S rRNA	50
4 RESULTADOS	55
4.1 Determinação da concentração do IPS nos ensaios biológicos com lagartas <i>S.</i> <i>frugiperda</i> alimentadas com folhas de soja	55
4.2 Extração das bactérias do intestino médio de <i>S. frugiperda</i> e cultivo em meio para detecção de bactérias proteolíticas	56
4.3 Estudos de expressão de genes que codificam as endopeptidases tripsina e quimotripsina da espécie <i>S. frugiperda</i>	57
4.4 Análise da atividade enzimática do intestino de lagartas <i>S. frugiperda</i>	61
4.5 Perfil da atividade de peptidases intestinais visualizados em géis de eletroforese	64
4.6 Amplificação do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana extraída de fezes de lagartas <i>S. frugiperda</i>	67
4.7 Análise das sequências das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana das amostras fecais de <i>S. frugiperda</i> provenientes de diferentes dietas	68
4.8 Análise da composição e estrutura da comunidade bacteriana das amostras fecais de <i>S. frugiperda</i> provenientes de diferentes dietas	70
5 DISCUSSÃO	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	111

RESUMO

Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes dietas

A importância da praga *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) deve-se não somente aos danos provocados às lavouras de milho, mas a capacidade de se alimentar de uma ampla variedade de famílias de plantas. Lagartas desta espécie são capazes de se adaptar a dietas contendo inibidores de peptidase de soja (IPS). Há uma hipótese de que a microbiota intestinal neste inseto poderia estar envolvida com estes mecanismos de adaptação. Neste contexto, um dos objetivos do trabalho foi verificar se estas bactérias poderiam alterar a expressão gênica de serino peptidases e atividade enzimática nestes lepidópteros em ensaios *in vitro*. Observou-se que no tratamento com tetraciclina, não houve influência na alteração da expressão gênica e da atividade quantitativa das respectivas serino peptidases nas lagartas provenientes dos ambientes diferentes. Ao mesmo tempo, objetivou-se estudar se haveria uma contribuição das bactérias na atividade proteolítica intestinal de *S. frugiperda* ao longo do processo digestivo de insetos, analisando se influenciam no perfil qualitativo das serino peptidases intestinais destas lagartas em zimograma. As lagartas de campo que sofreram a primeira exposição à uma dieta com antibiótico aumentaram a atividade de duas peptidases provavelmente trípticas, também sintetizadas nos tratamentos com IPS e IPS com antibiótico provavelmente como provável resposta adaptativa. Para analisar o efeito do IPS e da tetraciclina em folhas ingeridas por lagartas criadas em laboratório e coletadas em campo, além da influência da dieta natural (cartucho de milho) e da dieta artificial sobre a composição e diversidade da microbiota fecal de *S. frugiperda*, foi feito o sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos utilizando a plataforma de alto desempenho Illumina Miseq. Os valores médios de diversidade de UTOs do índice Shannon detectados nas fezes de *S. frugiperda* foram mais baixos nas amostras de dieta artificial e o segundo índice médio mais baixo foi calculado naquelas provenientes de cartucho de milho no campo, revelando que ambas as amostras apresentaram menor diversidade de espécies na composição da comunidade bacteriana. A abundância relativa em nível de filo bacteriano gerada para todos os conjuntos de amostras fecais demonstrou que os filos mais predominantes foram *Proteobacteria* (73,3%) e *Firmicutes* (24,2%), sendo ambos os filotipos mais abundantes nos grupos de insetos. Os quatro filotipos mais abundantes em nível de gênero corresponderam a *Enterococcus* (23,5%), *Acinetobacter* (20,5%), *Stenotrophomonas* (11,4%) e *Klebsiella* (10,4%). Verificamos que a dieta foi a principal variável que modulou a estrutura das comunidades bacterianas das fezes de *S. frugiperda*. Entretanto, não é possível afirmar se haveria uma contribuição das peptidases das bactérias simbiotes ao processo digestivo de insetos. Com estes novos dados taxonômicos, poderemos isolar as bactérias a partir das fezes destas lagartas e estudar a significância funcional destes simbiotes tais como, detoxificação de compostos tóxicos como inibidores de peptidases de plantas, papel digestivo e nutricional destas bactérias para as lagartas desta espécie.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*; Comunidade bacteriana; Gene 16S rRNA; Adaptação; Inibidor de peptidase de soja

ABSTRACT

Characterization of bacterial community associated to *Spodoptera frugiperda* intestinal tract from different diets

The importance of the pest *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) is due not only to corn crops damage, but the ability to attack a wide variety of plant families. Caterpillars of this species are able to circumvent diets containing soybean peptidase inhibitors (SPI). There is a hypothesis that this insect gut microbiota might be involved in these adaptation mechanisms. One of the goals of this study was to determine whether these bacteria could alter the serine peptidase gene expression or enzymatic activity *in vitro* assays in these Lepidoptera. It was observed that there was no alteration of the gene expression and the quantitative activity of serine peptidases in the caterpillars collected from both different environments fed with tetracycline leaves. At the same time, other objective was to study if there was a contribution from bacteria in the gut proteolytic activity of *S. frugiperda* in the digestive process of insects, analyzing its influence in the qualitative profile of serine peptidase gut worms in zymogram. The field caterpillars that suffered the first exposure to a diet with antibiotic increased the activity of two probably tryptic type peptidases which were also synthesized in IPS and IPS plus antibiotic treatments, probably as likely adaptive response. In order to analyze the effect of IPS and tetracycline in leaves eaten by caterpillars reared in the laboratory and collected in the field, beyond the influence of the natural diet (maize cartridge) and artificial diet on the composition and diversity of fecal microbiota of *S. frugiperda*, the sequencing using high performance Miseq Illumina platform was done in V3-V4 regions of 16S rRNA gene typical of prokaryotes. The average values of Shannon index related to OTUs diversity detected in the feces of *S. frugiperda* were lower in artificial diet samples and second lower mean index was calculated from those collected in the field, showing that both samples showed lower species diversity in the composition of bacterial communities. The relative abundance of bacterial phylum level generated for all fecal samples showed that the most prevalent phyla were *Proteobacteria* (73.3%) and *Firmicutes* (24.2%). Both phylotypes are predominant in insect groups. The four most abundant phylotypes at genus level accounted for *Enterococcus* (23.5%), *Acinetobacter* (20.5%), *Stenotrophomonas* (11.4%) and *Klebsiella* (10.4%). We found that the diet was the main variable that modulated the bacterial communities structure in the feces of *S. frugiperda*. However, it is not possible to state that there would be a contribution of peptidase bacterial symbionts to the digestive process of insects. With these new taxonomic data, we may isolate bacteria from *S. frugiperda* feces and study the functional significance of these symbionts such as detoxification of toxic plant compounds as inhibitors of peptidases, the digestive and nutrition role of these bacteria for the caterpillars species.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; Bacterial community; 16S rRNA Gene; Adaptation; Soybean peptidase inhibitor

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que os insetos sejam os principais responsáveis pela perda de 25 a 40% do total da produção mundial de alimentos (SOBHY et al., 2014). No Brasil, o milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes economicamente pelo recorde de produção e produtividade no país (SILVA; CRUZ; PENTEADO-DIAS, 2014). Entretanto, calcula-se que a lagarta *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) conhecida popularmente como lagarta do cartucho do milho, pode reduzir a produção de grãos desta cultura em até 73% em condições favoráveis (CRUZ et al., 1999; CRUZ; TURPIN, 1982; CRUZ; TURPIN, 1983).

A importância da praga *S. frugiperda* deve-se não somente aos danos provocados por esta espécie às lavouras de milho, mas a capacidade de se alimentar de aproximadamente 23 famílias de plantas (CRUZ; VIANA; WAQUIL, 1999), dificultando o seu controle. Em resposta a uma crescente consciência ecológica, o emprego de métodos químicos para o controle de pragas tem sido evitado, estimulando a busca por agentes bioinseticidas, como o emprego de inibidores de peptidases (IPs) de plantas (DUNSE et al., 2010; PAULILLO et al., 2012; POMPERMAYER et al., 2001). Os IPs são proteínas que podem tanto ser acumuladas durante o desenvolvimento das plantas como proteínas de reserva (RICHARDSON, 1991) quanto também podem ser induzidas sistematicamente em função da herbivoria (RYAN; PEARCE, 1998). Quando ingeridos pelos insetos, o resultado da inibição das peptidases intestinais propicia a redução de aminoácidos disponíveis, comprometendo o processo digestivo, o crescimento e desenvolvimento destas pragas (GATEHOUSE et al., 1979; MACEDO et al., 2010; 2011).

Paralelamente aos estudos relacionados aos efeitos inseticidas dos inibidores de peptidases (MACEDO et al., 2010; POMPERMAYER et al., 2001; SMIGOCKI et al., 2013), outra frente de pesquisa iniciou a busca pelas respostas adaptativas dos insetos herbívoros aos IPs. PAULILLO et al. (2000) testaram o efeito de inibidores de peptidase de soja em dieta artificial sobre *S. frugiperda* e não observaram diferença significativa sobre os parâmetros morfológicos como mortalidade inicial, duração do período larval e peso médio das pupas. Em contraste, ensaios *in vitro* mostraram que as enzimas digestivas do tipo tripsina foram claramente inibidas (PAULILLO et

al., 2000), sugerindo, inclusive em outros trabalhos, que esta espécie é capaz de se adaptar a dietas contendo IPs (BRIOSCHI et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2013).

Recentemente, as contribuições digestivas de bactérias proteolíticas intestinais em alguns insetos herbívoros estão sendo investigadas, mas há ainda pouquíssimas informações a respeito. Sabe-se que o trato intestinal de insetos abriga uma ampla variedade de microrganismos, aproximadamente 55.000 espécies de insetos contêm bactérias simbiotes no sistema digestivo (WILKINSON, 2001), mas estudos relacionando a função da microbiota intestinal no processo digestivo em lepidópteros ainda são inconclusivos. SHINDE et al. (2012) isolaram uma cepa de *B. subtilis* do intestino de lepidópteros *Helicoverpa armigera*. As enzimas secretadas pela bactéria *B. subtilis* foram completamente inibidas por TPCK (inibidor de quimotripsinas), sugerindo que estas peptidases poderiam pertencer à classe de serino peptidases com atividade do tipo quimotríptica, possibilitando deduzir que a microbiota intestinal pode estar envolvida na assimilação de proteínas nos insetos, uma vez que em insetos da ordem Lepidoptera, a digestão primária de proteínas é realizada majoritariamente pelas endopeptidases quimotripsinas (EC 3.4.21.1) e tripsinas (EC 3.4.21.4) (TERRA; FERREIRA, 1994).

Diante disto, o objetivo principal do trabalho foi verificar se a microbiota associada ao trato intestinal de *S. frugiperda* interfere na expressão e atividade de serino peptidases desta lagarta. E os objetivos específicos foram: *i)* verificar se haveria uma contribuição das bactérias na atividade proteolítica intestinal de *S. frugiperda* analisando se influenciam no perfil das serino peptidases intestinais destas lagartas e, ao mesmo tempo, se as peptidases bacterianas poderiam contribuir para a adaptação das lagartas em dietas contendo IPS e/ou antibiótico por meio de alterações na expressão gênica ou atividade enzimática das lagartas; *ii)* analisar a composição e diversidade das comunidades bacterianas associada ao material fecal de *S. frugiperda*, e *iii)* comparar o efeito que a alteração da dieta alimentar (tratada com tetraciclina e IPS), o tipo da dieta (natural e artificial) e o ambiente natural (campo e criação em laboratório) causa sobre a composição da microbiota.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência dos insetos herbívoros no mundo

Atualmente, o estudo de ocorrência das pragas herbívoras no mundo é de extrema importância, pois estes insetos são considerados como a forma de vida mais abundante no ecossistema terrestre (FORISTER et al., 2015), sendo que mais de 50% das milhões de espécies conhecidas são herbívoras, representadas por nove entre as 29 ordens de insetos (ORTEGO, 2012).

Em decorrência dos insetos herbívoros dependerem das plantas para manter a sobrevivência das populações de suas espécies, a especialização na alimentação destes insetos favorece a colonização de novos *habitats* pelos herbívoros e a consequente expansão da distribuição geográfica (DE ARAÚJO et al., 2015). Algumas espécies de insetos, conhecidas como especialistas, apresentam tolerâncias restritas de alimentação de uma ou poucas espécies de plantas (monófagos ou oligófagos, respectivamente). Enquanto que os insetos generalistas alimentam-se de uma ampla gama de espécies de plantas (polífagos) (WHEAT et al., 2007).

Estima-se que os insetos sejam os principais responsáveis pela perda de 25 a 40% do total da produção mundial (SOBHY et al., 2014). A ordem Lepidoptera engloba as pragas de importância econômica que causam os maiores danos às lavouras. Desta forma, o manejo destas pragas é de suma importância para impedir o impacto de mais áreas produtoras, em especial as regiões vulneráveis a fome e desnutrição populacional, visando à sobrevivência das gerações futuras.

2.2 Lagarta *Spodoptera frugiperda*

A espécie *S. frugiperda* é um lepidóptero da família Noctuidae, conhecido popularmente como lagarta do cartucho do milho, que se alimenta de espécies de 23 famílias de plantas, sendo que os principais hospedeiros são gramíneas, incluindo importantes culturas como milho e arroz, caracterizando sua polifagia (CRUZ; VIANA; WAQUIL, 1999).

Esta espécie alimenta-se das folhas, reduzindo a área fotossintética foliar e, conseqüentemente, comprometendo a produção. Estes danos são diferenciados em função da espécie de planta atacada, estágio fenológico, época de ataque e intensidade de infestação (SARMENTO et al., 2002). Dentre várias pragas, *S.*

frugiperda pode ser considerada a principal praga da cultura do milho, sendo que nos estágios iniciais, as lagartas apenas raspam as folhas, mas, a partir do terceiro estágio, elas penetram no cartucho destruindo diversos pontos da folha, danificando-as completamente (GALLO et al., 2002).

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é do tipo holometabólico, compreendendo as fases de ovo, larva (lagarta), pupa e adulto. As mariposas de *S. frugiperda* fazem suas posturas sobre folhas de milho ou outros vegetais que sejam fonte de alimento às lagartas. Os ovos eclodem as lagartas, que irão passar por seis a sete estágios (ou ínstaes), até atingirem desenvolvimento completo, apresentando uma coloração que varia de cinza escuro a marrom. Ao final do período larval, as lagartas penetram no solo, onde desenvolvem-se em pupas de coloração avermelhada. Após a emergência, surgem as mariposas (GALLO et al., 2002).

A importância da praga *S. frugiperda* deve-se não somente aos danos provocados por esta espécie, mas especialmente à dificuldade de seu controle. Segundo FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ (2006), na ausência de agentes de controle biológico, o ataque da praga ocasionou perdas na produção de matéria seca de 47,27% e perdas no rendimento de grãos de milho de 54,49%. Em busca de agentes bioinseticidas, a biotecnologia de plantas resistentes aparece como uma importante ferramenta para o controle de pragas. Variedades de milho resistentes às lagartas *S. frugiperda* neonatas quando comparadas com variedades suscetíveis apresentaram uma combinação de fatores como alto conteúdo de hemicelulose da parede celular, dificultando a herbivoria das lagartas nos primeiros ínstaes, e maior quantidade de feixes vasculares, resultando em lagartas com crescimento reduzido (HEDIN et al., 1990). Entretanto, DAVIS; BAKER; WILLIAMS (1995) submeteram as lagartas neonatas à uma dieta com tecido foliar liofilizado do mesmo genótipo resistente de milho e verificaram que o crescimento foi muito lento, de tal forma que eles associaram os fatores de resistência à baixa qualidade nutricional.

2.3 Aspectos gerais do processo digestivo em insetos

As enzimas digestivas são denominadas de hidrolases. A classificação e numeração destas enzimas foi recomendada pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional em Bioquímica e Biologia Molecular (Comissão de Enzimas) (TERRA; FERREIRA, 1994). As peptidases (peptídeo-hidrolases, EC 3.4) são enzimas que têm como função clivar as ligações peptídicas e incluem as exopeptidases (EC

3.2.4.11-19) e proteinases (endopeptidases, EC 3.4.21-24) (RYAN, 1990; TERRA; FERREIRA, 1994). Pertencentes ao grupo das exopeptidases, as aminopeptidases (EC 3.2.4.11) removem aminoácidos da extremidade N-terminal, enquanto que as carboxipeptidases (EC 3.2.4.16-18) da extremidade C-terminal de uma cadeia peptídica, bem como as dipeptidases (ou dipeptídeo-hidrolases, EC 3.2.4.13). As proteinases podem ser agrupadas em quatro subclasses de acordo com o mecanismo catalítico diferindo nas respectivas especificidades: do tipo serino, cisteíno, aspártico e metaloproteinase. As serinoproteinases (EC 3.4.21) apresentam uma serina e uma histidina no sítio ativo, enquanto que as cisteíno-proteinases (EC 3.4.22) contém uma cisteína. As proteinases do tipo aspártico (EC 3.4.23) apresentam atividade catalítica em pH abaixo de 5,0 devido ao envolvimento do resíduo carboxyl. As metaloproteinases (EC 3.4.24) necessitam de um íon metal no processo catalítico (PÓLGAR, 2005; TERRA; FERREIRA, 1994).

A estrutura básica do trato digestivo é similar entre as ordens de insetos (ENGEL; MORAN, 2013). O intestino dos insetos é compartimentalizado em três partes: intestino anterior, médio e posterior (CHAPMAN, 1998). Em muitos insetos, o intestino médio é o principal local de digestão e absorção dos nutrientes. O pH do conteúdo intestinal em lepidópteros apresenta alta alcalinidade variando de pH 9,0 a pH 12,0 (HARRISON, 2001). Esta alcalinidade está provavelmente correlacionada com a adaptação à fitofagia pelos insetos, pois o alto pH é necessário à digestão da hemicelulose da parede celular vegetal (TERRA; VALENTIN; SANTOS, 1987). As células epiteliais do intestino médio secretam uma rede de quitina embebida numa matriz de proteína e carboidrato denominada de membrana peritrófica (ou matriz peritrófica) (TERRA, 1990). A membrana peritrófica forma uma estrutura semi-permeável que permite a passagem de nutrientes, de enzimas e de moléculas de defesa, mas protege a camada celular epitelial da exposição direta à microrganismos e toxinas (FERREIRA et al., 1994). Esta membrana subdivide o intestino médio no espaço endoperitrófico e ectoperitrófico sendo que a digestão inicial ou primária das proteínas é realizada pelas endopeptidases e ocorre no espaço endoperitrófico, resultando em oligopeptídeos (TERRA; FERREIRA, 1994). Segundo SRINIVASAN; GIRI; GUPTA (2006), as endopeptidases do tipo serino dominam o intestino dos lepidópteros e contribuem com 95% da atividade digestiva total dos insetos desta ordem. No espaço ectoperitrófico, ocorre frequentemente a digestão intermediária dos oligopeptídeos em dímeros pela ação das amino e carboxipeptidases. Na

digestão final, as dipeptidases reduzem os dímeros em monômeros na superfície das células do intestino médio (TERRA; FERREIRA, 1994).

2.4 Serino peptidases

Aproximadamente um terço de todas as peptidases podem ser classificadas como serino peptidases, originalmente distinguida das outras classes pela presença e ordem linear dos resíduos catalíticos histidina (57), aspartato (102) e serina (195), denominada de tríade catalítica “His-Asp-Ser” (BLOW; BIRKTOFT; HARTLEY, 1969), sendo a numeração dos resíduos de acordo com a quimotripsina bovina. Esta tríade caracteriza os membros do clã SA, sendo os membros da família S1 as tripsinas, quimotripsinas e elastases (POLGÁR, 2005).

2.5 Serino endopeptidases em insetos

As quimotripsinas (EC 3.4.21.1), as tripsinas (EC 3.4.21.4) e as elastases (EC 3.4.21.36) pertencentes à família S1 que são serino endopeptidases envolvidas na digestão inicial de proteínas em insetos (TERRA; FERREIRA, 1994). A especificidade destas enzimas não é governada pela tríade catalítica, mas pela interação molecular do subsítio S1 da peptidase com o substrato no resíduo P1. As tripsinas clivam preferencialmente cadeias polipeptídicas na porção C-terminal de resíduos de aminoácidos básicos como arginina ou lisina, enquanto que as quimotripsinas hidrolisam preferencialmente cadeias proteicas na porção C-terminal de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral aromática como fenilalanina, tirosina e leucina e, as elastases clivam em sítios contendo aminoácidos neutros como alanina e glicina (RYAN, 1990).

Em insetos da ordem Lepidoptera, a digestão primária de proteínas é realizada majoritariamente pelas quimotripsinas e tripsinas (TERRA; FERREIRA, 1994). Segundo SRINIVASAN e colaboradores (2006), os aminoácidos que formam a tríade catalítica são altamente conservados tanto em tripsinas como em quimotripsinas de lepidópteros verificados no alinhamento de sequências representativas usando o algoritmo Clustal. Em tripsinas, verificou-se que os aminoácidos são bem conservados nos subsítios S1, diferentemente das quimotripsinas que apresentam maior diversidade.

As quimotripsinas e tripsinas de insetos apresentam peso molecular semelhantes, respectivamente, entre 20-30 kDa e 20-35 kDa (TERRA; FERREIRA,

1994). LOPES; SATO; TERRA (2009) purificaram parcialmente a enzima quimotripsina do intestino de lagartas *S. frugiperda* e detectaram diversas bandas de aproximadamente 27 kDa, enquanto que (FERREIRA et al., 1994) estimaram por filtração em gel que as tripsinas extraídas do intestino de *S. frugiperda* apresentam peso de 28 kDa. Tanto quimotripsinas como tripsinas de insetos apresentam pH ótimo variando de 8 a 11 e, ambas diferem das respectivas enzimas de mamíferos pela instabilidade em pH ácido (TERRA; FERREIRA, 1994).

2.6 Inibidores de peptidases de plantas

A maioria dos inibidores de peptidases (IPs) estudados no reino vegetal origina-se de três famílias principais denominadas Leguminosae, Solanaceae e Gramineae (RICHARDSON, 1991). Os IPs são proteínas que podem tanto ser acumuladas durante o desenvolvimento das plantas como proteínas de reserva (RICHARDSON, 1991) quanto também podem ser induzidas sistematicamente nas partes aéreas, como em folhas, em função da herbivoria (RYAN; PEARCE, 1998).

O modo de ação dos inibidores sobre as peptidases segue um padrão comum em que o sítio reativo dos IPs interagem reversivelmente com a enzima, formando o complexo estável enzima-inibidor, e desta forma, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima (LASKOWSKI; KATO, 1980). Geralmente os inibidores apresentam uma característica em comum que é a estabilidade dos domínios de inibição consiste principalmente pela formação de pontes dissulfeto, proporcionando à estas proteínas resistência às oscilações de pH e ao calor (RICHARDSON, 1991).

Os inibidores têm sido agrupados em famílias de acordo com características funcionais e estruturais, sendo que os principais inibidores de serinopeptidases de plantas são Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, Abóbora e Cevada (OLIVA et al., 2010; RICHARDSON, 1991). Dentre estas famílias, Kunitz e Bowman-Birk são as mais estudadas e melhor caracterizadas.

Os inibidores Kunitz foram relatados em plantas das famílias Leguminosae, Poaceae and Solanaceae (HABIB; FAZILI, 2007). O padrão estrutural da maioria destes inibidores é uma cadeia polipeptídica única de aproximadamente 20 kDa contendo duas pontes dissulfeto e a presença de um único sítio reativo (LEHLE; WRBA; JAENICKE, 1994; OLIVA et al., 2010) Recentemente, inibidores Kunitz da família Leguminosae foram subdivididos em três grupos de acordo com a quantidade

de resíduos cisteína: nenhum ou um resíduo livre, dois ou três resíduos (abrangendo inibidores com uma única ponte dissulfeto), quatro ou mais (membros Kunitz envolvendo duas pontes dissulfeto) (OLIVA et al., 2010). Estas variações no conteúdo de resíduos cisteína sugerem uma diversidade evolutiva no precursor ancestral do tipo Kunitz, com adaptações estruturais que podem favorecer a preservação do sítio de reconhecimento de enzimas alvo (OLIVA; SAMPAIO, 2008).

Os inibidores Bowman-Birk estão presentes tanto em plantas monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Estes inibidores extraídos de sementes dicotiledôneas possuem cadeia polipeptídica rica em cisteína (8-10 kDa) formando sete pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991) caracterizando esta família com alta estabilidade à agentes desnaturantes e calor e, além disso, apresenta dois sítios reativos (RICHARDSON, 1991). Em plantas monocotiledôneas, há dois tipos de Bowman-Birk: um grupo consiste de uma cadeia polipeptídica com massa molecular em torno de 8 kDa com um único sítio reativo e, o outro grupo, a massa aproximada é de 18 kDa com dois sítios (HABIB; FAZILI, 2007; PRAKASH et al., 1996).

Os inibidores de serino peptidase mais estudados nas plantas de soja pertencem à classe Kunitz (SBKI) (KUNITZ, 1945) e Bowman-Birk (SBBI) (Figura 2). Bowman e Birk isolaram e caracterizaram pela primeira vez o inibidor SBBI a partir de sementes de soja (BOWMAN, 1946) (BIRK; GERTLER; KHALEF, 1963). O inibidor SBKI é responsável por 80% da inibição da atividade trípica. Enquanto que SBBI, em função dos dois sítios reativos funcionais, inibe simultaneamente e independentemente tripsinas e quimotripsinas (ODANI; IKENAKA, 1972) (Figura 1). O resultado da inibição das peptidases no intestino dos insetos propicia a redução de aminoácidos disponíveis, comprometendo o processo digestivo, o crescimento e desenvolvimento destas pragas (GATEHOUSE et al., 1979).

Figura 1 - Estrutura tridimensional dos inibidores de peptidase de soja SBBI, à esquerda (PDB-1D6R, (KOEPEKE et al., 2000) e SBKI, à direita (PDB-1AVW, (SONG; SUH, 1998) visualizada no programa pymol. Em vermelho, sítio de inibição à tripsina; em azul, sítio de inibição à quimotripsina; em laranja, pontes dissulfeto e resíduos cisteína

O emprego destes inibidores de peptidases de plantas vem sendo estudados tanto em pesquisas básicas como em aplicadas, apresentando como alvo as peptidases intestinais de muitos grupos de insetos, indispensáveis ao processo de digestão e absorção de nutrientes. PAULILLO et al. (2000) testaram o efeito destes inibidores em dieta artificial sobre *S. frugiperda* e não observaram nenhuma diferença significativa sobre os parâmetros morfológicos como mortalidade inicial, duração do período larval e peso médio das pupas. Em contraste, ensaios *in vitro* mostraram que as enzimas digestivas do tipo tripsina foram claramente inibidas (PAULILLO et al., 2000), sugerindo, inclusive em outros trabalhos, que esta espécie é capaz de se adaptar a dietas contendo inibidores de peptidases (BRIOSCHI et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2013).

2.7 Respostas dos insetos aos inibidores de peptidases

Os efeitos deletérios dos inibidores de peptidases quando incorporados em dietas artificiais sobre o desenvolvimento de insetos foram reportados: retardo na taxa de crescimento, redução no peso das pupas e/ou lagartas, malformação e/ou infertilidade dos adultos, aumento do ciclo de vida. As lagartas neonatas *Diatraea*

saccharalis alimentadas com dietas artificiais contendo 0,5% (p/v) de inibidor de peptidase de soja sofreram retardo no crescimento, refletindo sobre o peso larval e aumento no número de ínstaes quando comparadas com lagartas alimentadas com dieta controle (sem inibidor) (POMPERMAYER et al., 2001). MACEDO et al. (2010) verificaram inúmeros efeitos negativos na praga polífaga *Anagasta kuehniella* como resultado da ingestão crônica de inibidor de tripsina (ApTI): redução significativa do peso e sobrevivência das lagartas; aumento dos períodos larval e pupal, respectivamente, de 5 dias e 10 dias; menos de 28% dos grupos alimentados com dieta contendo ApTI resultaram na emergência de adultos.

Paralelamente aos estudos relacionados aos efeitos inseticidas dos inibidores de peptidases, outra frente de pesquisa iniciou a busca pelas respostas adaptativas dos insetos herbívoros aos IPs (recentemente revisados por MACEDO et al. (2015) e ZHU-SALZMAN; ZENG (2015). Algumas das estratégias adotadas pelas pragas incluem o aumento da síntese de peptidases sensíveis ao inibidor e a síntese de enzimas insensíveis/resistentes à inibição. Entretanto, o mecanismo que desencadeia esta adaptação ainda permanece desconhecido.

Com relação ao aumento da síntese de peptidases digestivas sensíveis ao inibidor, estudos com tabaco transgênico expressando inibidor 2 de tripsina de mostarda (MTI-2), tanto em baixas quanto em altas quantidades, foram testados em bioensaios com lagartas *S. littoralis*. A alta expressão de MTI-2 em folhas resultou em efeitos deletérios nas lagartas incluindo mortalidade e redução do peso larval. Entretanto, *S. littoralis* que se alimentaram de folhas expressando MTI-2 em menores taxas ganharam peso, desenvolvimento larval mais rápido e dano maior às folhas quando comparadas com lagartas controle. Diante destes resultados, os autores concluíram que como resposta adaptativa aos baixos níveis de MTI-2 ingeridos pelas lagartas, elas superexpressaram as peptidases sensíveis, aumentando a atividade proteolítica, refletindo nos respectivos parâmetros morfológicos da lagarta (DE LEO et al., 1998).

Evidências de estratégias distintas adotadas pelos insetos em resposta aos IPs foram observadas por BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE (2004) relacionadas ao tempo e tipo de enzimas sintetizadas. Ao ingerirem dieta artificial contendo inibidores Kunitz e Bowman-Birk de soja, lagartas *H. armigera* inicialmente (durante as primeiras 12 horas em contato com inibidores) houve aumento da expressão de transcritos de todas as enzimas. Numa segunda fase (entre 12 e 24 h), houve uma

redução na expressão das peptidases mais sensíveis aos inibidores e, na terceira fase (após 24 h de exposição), detectou-se que os genes que codificavam as enzimas insensíveis continuavam a ser expressos. Entretanto, devido à falta de estudos comparativos analisando o efeito de IPs de diferentes famílias nas respostas adaptativas de diferentes espécies polífagas, nenhum resultado conclusivo foi feito ainda.

A outra estratégia adotada pelas pragas, isto é, a síntese de enzimas insensíveis/resistentes à inibição, teve como estudo pioneiro a resposta de adaptação de lagartas *S. exigua* ao inibidor de proteinase de batata tipo II (PI-2). JONGSMA et al. (1995) expressaram PI-2 em plantas de tabaco transgênicas cujas folhas foram ingeridas pelas lagartas, resultando em apenas 18% de inibição da atividade trípica. Lagartas *S. exigua* alimentadas com plantas não transgênicas tiveram 78% de sensibilidade da tripsina à inibição. Os autores hipotetizaram que a atividade das enzimas insensíveis aumentou de 2,5 a 3,5 vezes para compensar a perda da atividade das enzimas sensíveis. De forma semelhante, BROADWAY (1996) verificou esta adaptação em *Heliothis zea*.

BRITO et al. (2001) verificaram novas enzimas sintetizadas no intestino de lagartas *Heliothis virescens* após a ingestão de inibidores de peptidases em plantas de tabaco, sendo que a composição de tripsinas foi diferente nas lagartas que ingeriram folhas de tabaco daquelas que se alimentaram de dieta controle (sem IPs). Esta diferença não foi observada para as quimotripsinas. Os autores verificaram a síntese de novas tripsinas resistentes à inibição que apresentavam uma maior afinidade de ligação ao substrato, diminuindo a afinidade com os inibidores e, por consequência, diminuiu a inibição causada pelos IPs. Neste trabalho, atribuiu-se a resistência destas enzimas à formação de oligômeros, que tornavam os sítios ativos destas enzimas distorcidos, contribuindo possivelmente para a menor afinidade de ligação aos IPs.

Em busca de respostas para os mecanismos envolvidos na supressão da inibição das peptidases pelos IPs em insetos, DUNSE et al. (2010) identificaram duas quimotripsinas em lagartas *Helicoverpa* sp. após a exposição à inibidores de quimotripsina em *Nicotiana glauca* (IPNa), sendo uma IPNa-sensível e outra IPNa - resistente. Com o objetivo de elucidarem as diferenças moleculares entre as quimotripsinas (IPNa-sensível e IPNa-resistente), ambas foram expressas de maneira recombinante e mutações sítio-dirigidas foram realizadas no resíduo 192 e

verificou-se que esta alteração não resultou na resistência da quimotripsina ao inibidor protéico. Entretanto, após a substituição de quatro resíduos de aminoácidos na alça 35 da HpCh2A (IPNa-sensível), esta apresentou características similares com uma IPNa-resistente, a HpCh5. Posteriormente, os autores demonstraram que esta alça 35 da enzima resistente não faz pontes de hidrogênio com os inibidores protéicos.

Em continuidade a estes estudos, STEVENS et al. (2013) desenvolveram anticorpos policlonais a partir de tripsina de *H. punctigera* (alvo do inibidor IPNa) e contra duas quimotripsinas desta lagarta, HpCh2 (IPNa -sensível) e HpCh5 (IPNa - resistente) identificadas por DUNSE et al. (2010), e investigaram o efeito da ingestão de IPNa na quantidade e na atividade destas serino peptidases no intestino da espécie *H. armigera*. Devido à alta homologia entre os genes que expressam as serinopeptidases entre *H. punctigera* e *H. armigera*, as imagens de imunofluorescência revelaram que a redução na atividade da tripsina no intestino de *H. armigera* ocorreu devido ao sequestro de quase 50% desta enzima em complexos inativos com o inibidor ingerido e, não em função do decréscimo da quantidade de tripsina no intestino. Enquanto que os dados de imunolocalização mostraram que não houve grandes alterações nos níveis de tripsina e quimotripsina no intestino após a ingestão de IPNa os níveis das enzimas em geral aumentaram nas fezes. Provavelmente em função das tripsinas excretadas ainda estavam complexadas com o IPNa e inativas Igualmente ocorreu com a maioria das quimotripsinas excretadas, como HpCh2, inativas e em complexo com o inibidor. Em contrapartida, o aumento da atividade quimotríptica nas fezes após *H. armigera* ingerir IPNa resultou provavelmente do alto nível de excreção de HpCh5, IPNa-resistente, o qual não estava ao ligado ao inibidor e, portanto, ativo.

Algumas mudanças adaptativas podem ter sido adquiridas por apenas um grupo de insetos ao longo da evolução. LOPES et al. (2004) verificaram que enquanto as tripsinas de diferentes ordens de insetos hidrolisam substratos com resíduos Arg na posição P1, as tripsinas de lepidópteros preferencialmente hidrolisam substratos contendo resíduos Lys. Muitos inibidores de peptidases de plantas contêm Lys na posição P1, tornando-os mais suscetíveis às tripsinas de lepidópteros. Esta estratégia evolutiva adotada pelos lepidópteros favorece a adaptação aos IPs de plantas.

2.8 Aspectos gerais dos microrganismos simbiotes de insetos

Os microrganismos simbiotes são muito comuns em diversas ordens de insetos e, em insetos herbívoros em particular. Simbiotes são definidos como microrganismos que formam associações persistentes e não invasivas com o respectivo hospedeiro de tal forma que não causam sintomas patogênicos. Os simbiotes de insetos podem ser divididos em três categorias baseada na localização no corpo do hospedeiro (Figura 2): primeiramente, alguns simbiotes são intracelulares (células especializadas denominadas de bacteriócitos) ou ficam dentro da cavidade do corpo e, são herdados entre gerações através dos ovos (transmissão vertical), resultando em herança materna. A segunda categoria vive no intestino de muitos insetos, especificamente no lúmen onde eles formam comunidades variando a complexidade destas em diferentes espécies de insetos. E, por último, os microrganismos regularmente colonizam o alimento antes de ser ingerido (HANSEN; MORAN, 2014).

Figura 2 - Microrganismos simbiotes de insetos localizados dentro e fora do corpo do hospedeiro. Lagarta *S. frugiperda* acima ingerindo folha de soja com bactérias que colonizam o alimento (amarelas). Ilustração de parte do intestino da lagarta colonizado por bactérias intestinais (vermelhas). Simbiotes intracelulares localizados fora do intestino e dentro da cavidade do corpo do inseto (azuis)

Segundo DOUGLAS (2015), a diversidade das comunidades microbianas de insetos difere de acordo com as associações estabelecidas entre os subgrupos: associações abertas (sujeitos a invasão por microrganismos externos) entre comunidades adquiridas do habitat e do intestino do inseto; fechadas (isolados pela localização) predominantemente entre bactérias intracelulares.

Nas associações abertas, a dieta alimentar geralmente apresenta-se como principal determinante na estrutura da composição da microbiota intestinal

(DOUGLAS, 2015). A influência da dieta sobre a microbiota pode ser direta ou indireta. Com relação aos efeitos diretos, os microrganismos associados ao alimento ingerido pelo inseto podem variar de acordo com a composição nutricional da fonte alimentar (KOCH; CISAROVSKY; SCHMID-HEMPEL, 2012; TANG et al., 2012) e, aqueles que persistirem às condições adversas do lúmen intestinal e melhor utilizarem os nutrientes derivados do alimento, podem inclusive digerir compostos indigestos pelo hospedeiro. Enquanto que os efeitos indiretos são mediados pelo impacto do alimento na anatomia do intestino e funcionamento imunológico. Quando o percevejo *Riptortus pedestris* se alimenta de folhas tratadas com inseticida fenitrothion, o simbionte do gênero *Burkholderia* apresenta a capacidade de degradar o fenitrothion. Estas bactérias de percevejo são adquiridas pelas ninfas de insetos do solo a cada geração, estabelecendo uma adaptação evolutiva dos insetos resistentes ao inseticida (KIKUCHI; HAYATSU; HOSOKAWA, 2013). SHAO et al. (2011) estudaram o acúmulo de α e β -caroteno em inclusões cristalinas do intestino anterior (fenômeno “*red crop*”) de lagartas *Spodoptera* sp. que ingeriu folhas de plantas potencialmente tóxicas. Uma espécie bacteriana, *Enterococcus casseliflavus* foi encontrada fortemente associada ao cristal vermelho, entretanto uma cepa isolada do intestino do inseto não apresentou pigmentação amarelada, característica típica de cepas capazes de produzir carotenóide, de tal forma que o caroteno intestinal foi adquirido das folhas ingeridas. As lagartas que não desenvolveram estes cristais não se desenvolveram e morreram. Os autores concluíram que a formação de cristais de caroteno e/ou a presença de *E. casseliflavus* no intestino de *Spodoptera* sp. poderia estar relacionada à adaptação do inseto ao alimento tóxico, apesar do mecanismo ser ainda desconhecido.

Nas associações fechadas, os simbiontes intracelulares ficam protegidos nos bacteriócitos da colonização por outros microrganismos oportunistas no corpo do inseto onde, em muitas espécies, estes simbiontes se agrupam formando um bacterioma (ANSELME et al., 2006). As especificidades imunológicas dos bacteriócitos podem ser importantes, como sugeridas pela pesquisa de PAMs em bacteriócitos de lagartas de besouro *Sitophilus zeamais* (BALMAND et al., 2011). Dados transcriptômicos revelaram que uma bactéria endossimbionte gram-negativa de *S. zeamais* (EGS) induziram uma forte resposta sistêmica quando injetada na hemolinfa deste inseto, enquanto que a infecção dos bacteriócitos por EGS provocou a expressão de apenas um PAM codificado pelo gene *coleopterisin-A*,

colA. Portanto fora do bacterioma, EGS são reconhecidos como microrganismos intrusos pelo hospedeiro (ANSELME et al., 2008). BALMAND et al. (2011) mostraram em experimentos de imunohistoquímica com anticorpos contra ColA, altas concentrações deste peptídeo em células epiteliais em volta do intestino do inseto, com sinais mais fortes de ColA nos bacteriócitos circundando bacteriomas. Portanto, a alta expressão de *colA* em tecidos próximos ao ambiente externo (cutícula do inseto), e na fronteira de tecidos contendo os simbiossiontes intracelulares sustenta a ideia de que ColA pode tanto prevenir a invasão por patógenos ou reter os endossimbiontes dentro dos bacteriomas, regulando quantidade e localização.

2.9 Características da colonização e diversidade da microbiota no intestino de insetos

Algumas características do intestino de insetos favorecem a colonização por microrganismos, incluindo proteção contra adversidades externas (radiação ultravioleta, alta temperatura, dissecação) e disponibilidade de nutrientes. Todavia, os microrganismos enfrentam múltiplos desafios hostis no lúmen intestinal, como distúrbio físico causado pelo peristaltismo e pela ecdise do inseto e condições físico-químicas desfavoráveis (conteúdo de oxigênio, pH, espécies reativas de oxigênio) (DOUGLAS, 2015). Em lagartas de lepidópteros, o pH alcalino do conteúdo no intestino médio apresenta-se prejudicial à muitos microrganismos (HARRISON, 2001). O epitélio intestinal secreta um arsenal de enzimas digestivas e é imunologicamente ativo, como no caso do inseto modelo *Drosophila melanogaster* que produz lisozimas (DAFFRE et al., 1994) e sintetiza peptídeos antimicrobianos (PAMs) (BOSCO-DRAYON et al., 2012; LEMAITRE; MIGUEL-ALIAGA, 2013). Além das barreiras químicas à colonização microbiana no intestino médio, as barreiras físicas são estabelecidas pela membrana peritrófica semi-permeável cuja passagem é favorecida para certos microrganismos que secretam quitinase (TSAI et al., 2001), enquanto aqueles que não penetram a membrana ficam transitando no espaço ectoperitrófico, entre a membrana e as células epiteliais, como ilustrado na figura 3 (LEMAITRE; MIGUEL-ALIAGA, 2013).

Figura 3 - Representação do intestino médio do trato digestivo de *D. melanogaster*. (A) Epitélio do intestino consiste de enterócitos, células enteroendócrinas e regenerativas ("stem cells"). (B). Microscopia eletrônica de cortes do intestino de lagartas de terceiro instar com infecção bacteriana no espaço ectoperitrófico (MUNIZ et al., 2007)

Fonte: extraído e adaptado de LEMAITRE; MIGUEL-ALIAGA (2013)

Os enterócitos do epitélio intestinal, também denominados de células colunares em outros insetos (CHAPMAN, 1998), secretam enzimas digestivas e absorvem nutrientes. Atualmente, pouco se sabe sobre a função e modo de ação das células enteroendócrinas (CEEs) e os peptídeos sintetizados em insetos. Os peptídeos CEEs podem atuar localmente, mas não se sabe se eles são secretados na hemolinfa dos insetos (LEMAITRE; MIGUEL-ALIAGA, 2013). Recentemente, CEEs de lagartas de *Drosophila* spp. produziram DH31 que regulavam o peristaltismo do músculo intestinal, tendo como um provável local de ação deste peptídeo em específico (LAJEUNESSE et al., 2010). O aumento da atividade das células regenerativas foi observado quando o intestino sofre algum dano por agentes citotóxicos, como ciclotídeo kalata B1 extraído da planta *Oldenlandia affinis* que afetou o desenvolvimento do lepidóptero *H. armigera* (BARBETA et al., 2008), ou danos causados por bactérias patogênicas. Como resposta adaptativa, ocorre à rápida regeneração do tecido intestinal, mantendo a integridade da barreira física contra a infecção bacteriana (BUCHON et al., 2009).

Segundo HANSEN; MORAN (2014), alguns insetos que se alimentam de material vegetal são capazes de sintetizarem enzimas para digestão da parede celular vegetal, como celulase, pectinase, xilanase. Primeiramente foi descoberto em cupins (WATANABE et al., 1998) e posteriormente em outros grupos de insetos como besouros e grilos (WATANABE; TOKUDA, 2010). Entretanto, o papel da microbiota de cupins e besouros tem sido mais pesquisado na digestão de madeira

morta e em outros tecidos vegetais apodrecidos (ANDERT et al., 2010; WARNECKE et al., 2007).

Excepcionalmente, alguns insetos herbívoros também podem produzir celulases e pectinases codificadas pelo seu próprio genoma, como o besouro *Phaedon cochleariae* que sintetiza enzimas que hidrolisam os polissacarídeos de plantas (KIRSCH et al., 2012). Em alguns casos, os genes de insetos codificadores destas enzimas podem ter sido adquiridos por transferência horizontal de genes (THG) de outros microrganismos, possivelmente de simbiontes do intestino ou associados com a planta. (ACUÑA et al., 2012) reportaram a síntese da manose pelo inseto herbívoro praga do café (*Hypothenemus hampei*), nunca registrado em insetos antes evidenciando uma THG proveniente de bactérias. Análises filogenéticas indicaram que os genes são derivados de bactérias *Bacillus* spp. potencialmente intestinal ou advinda da fonte de alimento. O sequenciamento completo do genoma em diversas espécies de insetos poderá solucionar futuramente quais grupos dos genes são ancestrais de insetos (e geralmente de animais) e quais foram adquiridos por THG.

Recentemente, as contribuições digestivas de bactérias proteolíticas em alguns insetos herbívoros estão sendo investigadas, mas há ainda pouquíssimas informações a respeito. SHINDE et al. (2012) isolou uma cepa de *B. subtilis* do intestino de lepidópteros *H. armigera*. A atividade ótima das enzimas *B. subtilis* foi detectada em pH levemente alcalino. Em análises zimográficas, as peptidases foram completamente inibidas por TPCK (inibidor de quimotripsinas), sugerindo que as enzimas secretadas por *B. subtilis* pertencem à classe de serino peptidases com atividade do tipo quimotríptica, possibilitando hipotetizar que a microbiota intestinal pode estar envolvida na assimilação de aminoácidos nos insetos.

Os microrganismos do intestino de diversas ordens de insetos podem incluir arqueobactérias, fungos ou bactérias (ENGEL; MORAN, 2013). As arqueobactérias metanogênicas e fungos são geralmente encontrados em insetos como cupins e besouros (EGERT et al., 2003; GRÜNWALD; PILHOFER; HÖLL, 2010; LEMKE et al., 2003). As espécies de bactérias abrangem praticamente a grande maioria de microrganismos intestinais de muitos grupos de insetos, revisado por ENGEL; MORAN (2013).

Nos anos 1970, o trabalho de Carl Woese trouxe uma nova perspectiva para caracterizar a diversidade microbiana fornecendo a primeira filogenia de bactérias

baseada nas sequências do gene RNA ribossomal (16S rRNA) (WOESE; FOX, 1977). O gene 16S rRNA é um marcador molecular taxonômico universalmente presente em bactérias e possui domínios altamente conservados flanqueando sequências muito variáveis, que podem ser facilmente utilizadas para amplificação gênica e posteriormente sequenciadas e analisadas, disponibilizando identificações filogenéticas das bactérias em diferentes organismos, seja em vertebrados e invertebrados (DAVE et al., 2012; PERNICE; SIMPSON; PONTON, 2014). Segundo YUN et al. (2014), atualmente a diversidade das comunidades microbianas intestinais mostra-se significativamente maior do que estimada em trabalhos anteriores baseados em métodos de cultivo tradicionais e moleculares convencionais. Com a emergência de tecnologias de sequenciamento de novas gerações, comercialmente disponíveis em 2005, aumentaram a cobertura das análises filogenéticas bacterianas. Como resultado milhões de sequências de 16S rRNA estão atualmente depositadas em bancos de dados como RDP, *Ribosomal Database Project* (WANG et al., 2007), SILVA (PRUESSE et al., 2007) e banco Greengenes (DESANTIS et al., 2006). As tecnologias de sequenciamento modernas definem os grupos taxonômicos microbianos através da identidade das sequências do gene 16S rRNA (ou unidades taxonômicas operacionais, UTOs), sendo que as UTOs a nível de espécie são geralmente definidas pela porcentagem de identidade maior que 97% entre duas sequências (GEVERS et al., 2005).

Atualmente, há uma relativa discordância nos trabalhos quanto à diversidade bacteriana do intestino de insetos e mamíferos. COLMAN; TOOLSON; TAKACS-VESBACH (2012) sequenciaram a diversidade bacteriana no trato intestinal de cinco ordens de insetos, verificando que foi pequena, sugerindo que raramente excede mais de 10 espécies. Em *Drosophila*, detectou-se de 2-20 espécies de bactérias intestinais de insetos coletados em campo e/ou em condições naturais (CHANDLER et al., 2011; WONG; DOUGLAS, 2011), enquanto que a microbiota no intestino de humanos geralmente excede mais de 1000 espécies (LEY et al., 2008a). Uma das hipóteses seja de que a membrana peritrófica no trato digestivo de insetos limita a passagem de microrganismos invasores para o lúmen intestinal, mantendo a diversidade daqueles que persistem e residem no intestino (FERREIRA et al., 1994).

Em contrapartida, YUN et al. (2014) analisaram a variação da microbiota intestinal em 21 ordens de insetos, revelando que foi maior que a diversidade em

mamíferos. Um total de 18 filos de bactérias foi detectado entre as ordens de insetos, sendo que a maioria pertence ao filo *Proteobacteria* (62,1% das sequências classificadas) e *Firmicutes* (20,7%), acompanhada por 6,4% do filo *Bacteroidetes* e 4,8% por *Actinobacteria*. (JONES; SANCHEZ; FIERER, 2013) detectaram pouca diversidade bacteriana em oito ordens de insetos, aproximadamente oito filotipos em cada amostra de inseto analisada. Entretanto, foi usado o inseto inteiro, ao invés de separar apenas o intestino, maximizando a detecção de OTUs de outros simbiontes no sequenciamento como os intracelulares. Outro problema na análise de JONES e colaboradores (2013) foi que os autores excluíram filos de bactérias que representavam 1% da população bacteriana das amostras. Porém, os mesmos quatro filos (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*) que dominam as comunidades associadas ao intestino de insetos (COLMAN; TOOLSON; TAKACS-VESBACH, 2012; YUN et al., 2014) são também as constituintes da maioria dos simbiontes associada ao trato intestinal de mamíferos (LEY et al., 2008; MUEGGE et al., 2011) e de humanos (COSTELLO et al., 2009), sugerindo que estes filos, ou linhagens individuais dentro destes filos, podem ter contribuições adaptativas ecológicas permitindo residir em organismos fisiologicamente diferentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência e criação das lagartas *S. frugiperda* coletadas no campo e criadas em laboratório

As lagartas *S. frugiperda*, provenientes do campo, foram coletadas em plantas de milho convencional na Estação Experimental da Empresa Syngenta, em Holambra, no estado de São Paulo.

Metade das lagartas de campo, denominadas de selvagens, que estavam no 5º instar foi mantida em gelo e imediatamente extraído o intestino médio, sendo que o restante das lagartas de campo foi mantido em folhas de milho até atingirem o estágio de pupa. As pupas foram mantidas em gaiolas até a formação de adultos machos e fêmeas para posterior acasalamento e postura dos ovos no laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP) sob a coordenação do Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, à 25°C, 60±10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14/10 horas no claro/escuro. Assim que as lagartas neonatas (1º instar) eclodiram dos ovos, elas foram transferidas para dieta artificial padrão (MIHSFELDT; PARRA, 1999) (Tabela 1) individualmente em tubos de ensaio e, mantidas por uma geração nesta dieta (DA1), de tal forma que metade destas lagartas DA1 teve o intestino médio extraído ao final do 5º instar e o restante, foi submetido à nova dieta artificial (2ª geração, DA2). Novamente, ao final do penúltimo instar, as lagartas DA2 foram dissecadas (Figura 4). Este grupo de lagartas, denominado de Grupo 1, teve como finalidade comparar a diversidade bacteriana de lagartas em seu ambiente natural e submetidas à ingestão de uma dieta artificial padrão usada em laboratório, além de analisar a atividade enzimática intestinal destas lagartas nestas dietas.

Tabela 1- Composição da dieta artificial padrão usada para criação de lagartas *S. frugiperda* (MIHSFELDT; PARRA, 1999)

Componentes	Quantidade
Feijão	75 g
Germe de Trigo	60 g
Proteína de soja	30 g
Caseína	30 g
Levedura de cerveja	37,5 g
Complexo vitamínico*	9 mL
Ácido ascórbico	3,6 g
Ácido sórbico	1,8 g
Nipagin (Metil parahidroxibenzoato)	3 g
Tetraciclina	113 mg
Formaldeído	3,6 mL
Ágar	23 g
Água	1200 mL

*Complexo vitamínico diluído em 1000 mL de água destilada: 1 g de niacina; 1 g de pantotenato de cálcio; 0,5 g de tiamina; 0,25g de piridoxina; 0,1 g de ácido fólico; 0,02g de biotina; 2 mL de vitamina B₁₂ (1000mg/mL)

Figura 4 - Primeiro ensaio biológico de lagartas *S. frugiperda* (Grupo 1)

No segundo ensaio biológico, os insetos coletados em campo (variando do 4º a 6º instar) foram mantidos individualmente em placas entomológicas com folhas de milho (provenientes do campo) até virarem pupas. Novamente, as pupas foram mantidas em gaiolas até atingirem a fase adulta para posterior acasalamento e postura dos ovos no laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), nas mesmas condições citadas anteriormente. Após as lagartas neonatas terem eclodido dos

ovos, estas foram transferidas para a dieta natural, composta por folhas destacadas de plantas de soja da cultivar Codetec-215 ou Cd-215 (sementes de soja convencional, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Baldin Pinheiro - ESALQ/USP) e, cultivadas no laboratório de Biologia Molecular de Plantas na ESALQ/USP sob a coordenação do Prof. Dr. Márcio Castro Silva Filho, em uma sala com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 14/10 horas no claro/escuro, para a realização dos ensaios biológicos do Grupo 2 (Figura 5).

A partir das populações de lagartas *S. frugiperda*, advindas de dietas artificiais padrão (MIHSFELDT; PARRA, 1999) (Tabela 1) criadas no laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP) nas mesmas condições citadas anteriormente, foram obtidos os ovos. Após as lagartas de 1º instar terem eclodido dos ovos, estas foram transferidas para folhas de soja (Cd-215) para a realização dos ensaios biológicos do Grupo 2 (Figura 5).

Figura 5 - Segundo ensaio biológico de lagartas *S. frugiperda* advindas de campo e de criação em laboratório (Grupo 2)

3.2 Preparo de ensaios biológicos de lagartas *S. frugiperda* advindas do campo e de criação em laboratório

3.2.1 Extração dos inibidores de peptidases de sementes de soja

Os inibidores de peptidase de soja (IPS) foram extraídos a partir de sementes de soja. As sementes foram homogeneizadas (100 g) com auxílio de um

liquidificador em 1000 mL de solução salina (0,15M NaCl) durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em oito camadas de gaze a fim de remover o material sólido. O filtrado foi centrifugado a 3000 x g durante 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o volume do sobrenadante foi ajustado a 70% com acetona gelada, em condições de agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6000 x g durante 20 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi liofilizado durante 72 horas para remoção da acetona residual, fornecendo um concentrado semi-purificado de IPS que foi macerado até virar pó.

3.2.2 Determinação da concentração do IPS nos ensaios biológicos com lagartas *S. frugiperda* alimentadas com folhas de soja

Para determinar a melhor concentração do IPS a ser utilizado nos bioensaios, primeiramente as folhas foram incubadas por 10 minutos, até o total encharcamento das folhas, em água com três concentrações crescentes de IPS 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/v), tendo como controle negativo apenas folha incubada em água (IPS 0%). Testou-se o potencial inibitório do concentrado de IPS nas referidas concentrações medindo-se a atividade residual da tripsina bovina comercial (Sigma), utilizando o substrato sintético cromogênico BApNA (N- α Benzoyl-D-L-Arginine 4-Nitroanilide hydrochloride), específico para tripsinas (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961).

Primeiramente, foi feita a quantificação protéica das folhas de soja incubadas em água com IPS 0,5% a 2% (p/v), usando o método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina, BSA (1 mg.mL⁻¹), como padrão. Foi feita a leitura a 595 nm no espectrofotômetro Spectramax Plus (Molecular Devices, USA).

Para o ensaio antitriptico, uma solução estoque de tripsina bovina (1 mg.mL⁻¹ em HCl 0,0025 N) foi diluída na proporção 1:10 em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 para compor a solução de trabalho. Uma solução estoque de BApNA (0,1 M) previamente preparada em DMSO foi diluída para a concentração de trabalho (0,001 M) em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. O substrato BApNA foi previamente incubado por 15 min a 37°C imediatamente antes de ser utilizado nos ensaios bioquímicos.

Posteriormente, uma alíquota de 10 μ L da tripsina bovina foi pré-incubada com o tampão do ensaio e 5 μ g de IPS em cada concentração estudada, e mantidas por 15 min a 37°C. Uma alíquota de 200 μ L de BApNA foi adicionada à reação,

completando o volume final de 280 μL . Após 20 minutos de incubação a 37°C, foi feita a leitura a 410 nm no espectrofotômetro.

3.2.3 Preparo dos Ensaios biológicos

As lagartas de 1º instar foram alimentadas com folhas de soja Cd-215 até o início do 5º (penúltimo) instar, individualmente, em placas entomológicas com papel filtro qualitativo 70 x 70 mm (Unifil). No penúltimo instar, as lagartas foram transferidas para as folhas tratadas nas respectivas placas (as folhas haviam sido incubadas por 10 minutos, como ilustrado na figura 6, com os respectivos tratamentos listados abaixo):

- 1) com água (controle);
- 2) apenas tetraciclina 76,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluído em água (concentração usada em dietas artificiais (Tabela 1);
- 3) inibidor de peptidase extraído de sementes de soja diluído em água (concentração usada 2% (p/v));
- 4) inibidor de peptidase de soja (2%) + tetraciclina (76,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

As lagartas permaneceram por 48 horas sendo alimentadas com folhas de soja com os respectivos tratamentos até o final do 5º instar e, posteriormente foi extraído o intestino das lagartas (Figura 7).

Figura 6 - Preparo de folhas de soja (cv. Cd-215) para ensaios biológicos. A. Folhas previamente incubadas com os tratamentos. B. Lagartas *S. frugiperda* de 5º instar alimentadas por 48 horas com folhas tratadas (1 – 4)

Figura 7 - Segundo ensaio biológico de lagartas *S. frugiperda* advindas de campo e de criação em laboratório alimentadas por 48 horas no 5º instar com folhas de soja Cd-215 com os respectivos tratamentos (Grupo 2)

3.2.4 Extração das bactérias proteolíticas do intestino médio de *S. frugiperda*

Com a finalidade de verificar se os tratamentos tetraciclina e IPS incubados em folhas de soja poderiam reduzir as populações de bactérias proteolíticas do intestino médio de lagartas, provenientes de campo e de criação em laboratório, as respectivas lagartas foram esterilizadas superficialmente por lavagem com álcool 70% e, em seguida, foram imobilizadas em gelo para extração dos intestinos. A imobilização consiste em colocar as lagartas em uma placa de vidro sobre gelo. Os intestinos foram removidos com auxílio de pinças, e imersos em tubos 1,5 mL, contendo 1 mL de solução salina tampão fosfato (PBS) 1X estéril.

O método de extração de bactérias proteolíticas intestinais foi determinado por DE MENDONÇA et al. (2009), com algumas modificações. Para cada tratamento e repetição, foram utilizados três intestinos imersos em PBS, separadamente em cada tubo. Para facilitar a retirada da microbiota do trato intestinal, cada tubo foi colocado em um agitador mecânico do tipo *vortex* por 1 min e centrifugado por 12000 x g por 5 min à temperatura ambiente. Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} desse conteúdo intestinal.

3.2.5 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs)

Para a contagem das UFCs das bactérias proteolíticas extraídas do intestino de lagartas *S. frugiperda*, as diluições do conteúdo intestinal, como descrito acima, foram plaqueadas no meio nutritivo ágar-leite de detecção de bactérias proteolíticas preparado com 5 g.L⁻¹ de triptona; 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ de glicose; 2,5 g.L⁻¹ de NaCl; 18 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,0. Após a esterilização, para cada 900 mL de meio foi adicionado 100 mL de leite desnatado. Este meio permite visualizar a formação do halo ao redor das colônias de bactérias secretoras de peptidases, identificando-as como proteolíticas (JORDAN, 1903).

As placas foram armazenadas na BOD a 30°C por 48h. As diluições utilizadas para contagem foram 10⁻⁴, pois as colônias apresentavam-se mais espaçadas. As placas foram feitas em triplicatas para cada tratamento.

3.3 Estudos de expressão de genes que codificam as endopeptidases dos tipos tripsina e quimotripsina de *S. frugiperda*

Com a finalidade de estudar o mecanismo de adaptação das lagartas *S. frugiperda* à ingestão de IPS e verificar se a microbiota intestinal estaria envolvida na expressão de serino peptidases, foi feita uma análise de expressão dos genes que codificam tripsinas e quimotripsinas nas lagartas do Grupo 2 durante todo o penúltimo instar por PCR em tempo real. Para cada tratamento, foram armazenados 15 intestinos em cada tubo de 1,5 mL (em triplicatas) a -80°C.

3.3.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir do tecido intestinal previamente macerado em nitrogênio líquido até atingir a consistência de um pó fino homogeneizado com o auxílio de um micropistilo. As amostras de tecido foram colocadas em tubos de 1,5 mL e imediatamente homogeneizadas em 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Finalizada a extração do RNA total, este foi tratado com DNase I (Fermentas) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Com a finalidade de eliminar a DNase I e obter um RNA total de melhor qualidade e pureza, repetiu-se a extração com Trizol[®], porém utilizando a metade do volume indicado pelo fabricante. As amostras foram quantificadas pela leitura a 260 nm e a pureza foi verificada pela razão dos valores de absorbância a 260/280 nm no espectrofotômetro Nanodrop ND-2000

(Thermo Scientific, USA). A integridade das amostras de RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em condições desnaturantes. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.2 Análise de Expressão Gênica por PCR em tempo real

As reações de amplificação por PCR em tempo real (qRT-PCR) foram feitas em triplicatas no equipamento StepOne™ Real-time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação foi composta por 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 µM) (Tabela 2), 12,5 µL do Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 4 µL do cDNA (diluído na proporção 1:400) e 7,9 µL de água livre de nucleases, totalizando 25 µL de volume final. As condições da reação de amplificação utilizadas foram de um ciclo a 50°C por 2 minutos, um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C – 63°C (como descrito na Tabela 2) por 30 segundos. Após o término da amplificação dos fragmentos, foi feita a curva de “melting”, a partir da temperatura de anelamento do primer, adicionando-se 1°C até atingir 95°C.

Os oligonucleotídeos obtidos (Tabela 2) foram desenhados a partir do transcriptoma de lagartas *S. frugiperda* submetidas à ingestão crônica de uma dieta artificial controle e com IPS 0,5% (p/v) realizada por SOUZA (2013).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos dos genes de quimotripsina (SfChy) e tripsina (SfTry) em *S. frugiperda*

Genes	Direto (5'-3')	Reverso (5' - 3')	TA (°C)
SfChy2	CGTCTCAGGAAAACCCAGTC	AGGGACGTTGGAAATGTCAG	61
SfChy4	TGCTCCAGCTCAGCTCGGTC	CGTCATTTCCGACTAGACTTGGAG	63
SfChy5	TTACCGCTAACCGTGTGCTT	CGATGACATCTGACAAGGCG	62
SfChy7	TTCCTGAGCCACGTTAGCTT	CAAGACAGGCTCGTTGTTGA	60
SfChy8	TATGGTACTAGCGTCGCAAG	GAGCAATAGGAGCGAGGTTAT	58
SfChy9	GGATCTCAGCTCGGAGAAAA	GCAAGAGGACCACCAGAGTC	60
SfChy11	GGCTCCACCACTCTCTTCAC	GCAATGGGTTGGATGTTAGC	62
SfChy12	CATGATCAGGCTGAACTCCA	ATACCACCACCAGCACCATC	61
SfChy15	CAATACCGTCTTCGGCTACC	ATGATTCCAGCCTGATACGG	59
SfChy17	CTTTAGTGGCGGTGTCTTCC	GCTTCTATCTCGGCTTGTCTG	60
SfChy19	ACGAACCCACGACTAACAC	TCCCTGGCAAATACCAACTC	60
SfChy21	CAATTTGCCGTCTTCAGT	CACCACCGAGTATAGGATT	58
SfChy22	CTTGCTACGCTAATGTTG	CTGCTCCTCTACCTTACG	58
SfChy23	CTAACCTCAACAACGACATC	TGCCCAGTTTCCTACAAA	58
SfTry1	ACGAGGTGGCAATTAGGAAG	GATCATGCTGCTGGTGACAG	60
SfTry2	TCTTAAACGTCCGAGGCAAG	CCAGGGTAGAAAGCATCAGC	62
SfTry6	TTGTGTTTCTGGCTCTGTGC	GGATCGGTTGTTGAGAAATGG	60
SfTry7	TCGAGAATTACCCAGCATC	AGGTACCGGCTCTGATACGA	58
SfTry8	TCTTCTTTCGCACACAGTGG	GAAGGCAGATGGAGAGTGGA	60
SfTry9	CAGAGGATTGTGGGTGGTTC	TGGGCAGCAGTAAGGATAGC	61
SfTry10	GAATATCGTCCACGGCTCAT	AGCAGTTGTACCCCATCCTG	58
SfTry11	AGCCTTAGGTGTGCCTCAGA	GAAGGTCGCCATAAAAGCAG	58
SfTry12	CCTCGATTACCGCTCTCTTG	GCCATCTGTTCACTTGGTCA	60
S30	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT	61
Actina	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	GTTGGCTTCCATACCCAAGA	61

TA: Temperatura de anelamento do oligonucleotídeo iniciador

A eficiência de amplificação de cada oligonucleotídeo foi obtida para cada corrida, usando-se o software LinReg (RAMAKERS et al., 2003). As análises da expressão relativa dos genes foram realizadas usando-se o programa Relative Expression Software Tool 384 (Rest 384[®]), desenvolvido por PFAFFL (2001). Os genes de referência S30 e actina foram adotados como genes de referência para a normalização dos valores de expressão. Foi feito teste estatístico por meio de 2000 randomizações entre os valores de fluorescência (CTs: *cycle threshold*) dos controles e tratamentos para cada gene e usado o teste t ($P < 0,05$).

3.4 Análise da atividade enzimática do intestino de lagartas *S. frugiperda*

3.4.1 Preparo do intestino das lagartas para ensaios bioquímicos

Com os objetivos de *i)* verificar o efeito da dieta (natural x artificial) sobre a atividade das enzimas intestinais de *S. frugiperda*, realizou-se uma análise

quantitativa da atividade enzimática de serino peptidases das lagartas selvagens com as lagartas submetidas à ingestão de dieta artificial por uma e duas gerações (Grupo 1); *ii*) analisar o efeito do IPS e do antibiótico tetraciclina sobre a atividade enzimática das lagartas advindas de criação em laboratório e coletadas em campo submetidas à ingestão de dieta natural tratada (Grupo 2), estas foram imobilizadas em gelo para extração dos intestinos. Os intestinos foram removidos com auxílio de pinças. Para cada tratamento, foram armazenados 15 intestinos em cada tubo, em triplicatas, e incubados em gelo.

Para a obtenção do extrato protéico, as amostras intestinais foram homogeneizadas com o auxílio de um Potter em 400 μ L Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 em banho de gelo para o extravasamento do fluido enzimático. Posteriormente, os tecidos macerados foram centrifugados a 12000xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para ser usado nos ensaios bioquímicos. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina, BSA (1 mg.mL⁻¹) como padrão. A absorbância resultante foi medida no espectrofotômetro a 595 nm.

3.4.2 Ensaios de atividade enzimática *in vitro* (análise quantitativa)

Nesses ensaios, os extratos protéicos utilizados foram preparados a partir de lotes contendo 15 indivíduos de cada tratamento, com três repetições independentes. A atividade proteolítica total foi determinada usando o substrato azocaseína, originalmente descrita por BROCK; FORSBERG; BUCHANAN-SMITH (1982) e modificada por BROADWAY (1997). As amostras intestinais (20 μ g de proteína) foram incubadas em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 90 μ L azocaseína 1% (10 mg.mL⁻¹, em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0). Após 15 min de incubação a 37°C, a reação foi parada com 100 μ L ácido tricloroacético 10% (p/v). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 min e, em seguida, centrifugadas a 12400xg por 15 min a temperatura ambiente. Um volume de 100 μ L do sobrenadante foi separado em alíquotas na microplaca e foram adicionados 100 μ L de NaOH 1N. A azocaseína é um substrato geral de enzimas proteolíticas, sendo que a hidrólise da caseína libera o corante “azo” no sobrenadante da reação, e este é quantificado fotometricamente a 450 nm. A atividade caseinolítica ou proteolítica foi mensurada

em nmol azocaseína hidrolisado por min/mL/mg de proteína. O ensaio foi feito em triplicatas e o branco do ensaio (tubos sem amostras intestinais) foi realizado.

A atividade trípica foi mensurada pela hidrólise do substrato N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BApNA) (ERLANGER et al., 1961). Inicialmente, uma solução estoque de BApNA 0,1 M foi preparada em DMSO e, em seguida, diluída em solução de trabalho (0,001 M) em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. O substrato BApNA foi previamente incubado por 15 min a 37°C. Proteínas do intestino de lagartas (5 µg) foram incubadas por 15 min a 37°C com o tampão do ensaio, totalizando 80 µL. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de BApNA foi adicionada à reação, completando o volume de reação para 280 µL, e incubado a 37°C durante 30 min.

A atividade quimotríptica foi determinada pela hidrólise do substrato N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA) (DELMAR et al., 1979). Uma solução estoque de SAPNA 0,1 M foi preparada numa solução dimetilformamida 10% (diluído em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0), e diluído em concentração final de 0,001 M em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Proteínas intestinais (5 µg) foram incubadas por 15 min a 37°C com o tampão do ensaio, totalizando 100 µL. Uma alíquota de 20 µL de SAPNA foi adicionada à reação, completando o volume final de 120 µL, e a reação ocorreu a 37°C por 30 min.

Nos ensaios trípico e quimotríptico, a hidrólise dos substratos BApNA e SAPNA, respectivamente, libera o cromóforo p-nitroanilina (pNA) que pode ser quantificado fotometricamente a 410 nm. As atividades trípica e quimotríptica foram mensuradas em nmol de p-nitroanilina por min/mL/mg de proteína. Ambos os ensaios foram feitos em triplicatas com seus apropriados brancos.

Todos os dados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) usando o teste Tukey, sendo que o valor $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

3.4.3 Atividade enzimática de extratos intestinais visualizados em géis de eletroforese (análise qualitativa)

Proteínas foram extraídas do intestino médio (IM) de lagartas *S. frugiperda* no 5º instar e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% contendo SDS (PAGE-SDS), cujos respectivos tamanhos são aparentes e foram estimados por comparação com marcador de baixo peso molecular LMW (GE Healthcare). O gel foi preparado de acordo com o método desenvolvido por SCHMIDT; BLEAKLEY;

NEALSON (1988) com algumas modificações, contendo gelatina 0,1% (MICHAUD; FAYE; YELLE, 1993), também denominado de zimograma de gel de eletroforese. Os extratos protéicos intestinais (10 µg) foram incubados em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 por 30 min em gelo. O grupo controle de amostras intestinais (incubados em tampão) e aqueles incubados com 2 µL de TLCK 5 mM (Sigma), inibidor sintético de tripsina, foram mantidos a 30 min a 37°C, para inibir a atividade proteolítica antes da aplicação no SDS-PAGE 9%. A eletroforese ocorreu a 5°C, o gel foi lavado com solução 2,5% Triton X-100 por 2h, agitando a temperatura ambiente para remoção do SDS. Para a atividade enzimática, o gel foi incubado com Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 por 30 min a 37°C. Subsequentemente, o gel foi submetido à coloração com a solução Coomassie brilliant blue R-250.

3.5 Determinação da diversidade bacteriana extraída de fezes de lagartas *S. frugiperda* advindas do campo e de criação em laboratório

A composição da comunidade bacteriana (baseada no gene 16S rRNA de procariotos) foi obtida de fezes de *S. frugiperda*. Tentou-se utilizar amostras intestinais destas lagartas porém durante a extração total de DNA utilizando o *kit* PowerFecal™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.), estas amostras formaram um fluido muito viscoso na etapa de eluição, comprometendo a integridade e qualidade do DNA.

3.5.1 Amostragem, coleta e preparo das fezes de lagartas *S. frugiperda*

A criação e amostragem das lagartas *S. frugiperda* para a coleta das fezes foi similar àquela detalhada no item 3.1, com algumas modificações. As lagartas coletadas em campo (selvagens) que estavam no 5º instar foram mantidas em folhas de milho (provenientes do campo), em placas entomológicas, até o final deste estágio para a imediata coleta das fezes frescas. Metade destas lagartas de campo foi mantida em folhas de milho até a formação das pupas, as quais foram mantidas no laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), nas condições mencionadas anteriormente (item 3.1). As lagartas de 1º instar que eclodiram dos ovos, foram transferidas para dieta artificial (Tabela 1) individualmente em tubos de ensaio e, mantidas por uma geração nesta dieta até atingirem o estágio de pupa. Após a postura dos ovos, as neonatas foram submetidas à nova dieta artificial (2ª geração) até o final do 5º instar e, em seguida, as fezes frescas foram coletadas (Figura 8).

Para cada tratamento, amostras fecais de 15 lagartas foram armazenadas em um único tubo de 1,5 mL (em triplicatas) a -80°C.

Figura 8 – Primeiro ensaio biológico de lagartas *S. frugiperda* para coleta de fezes

A amostragem do segundo ensaio biológico de *S. frugiperda* para a coleta de amostras fecais foi similar àquela especificada nos itens 3.1 e 3.2.3, com algumas alterações. Os insetos coletados em campo foram mantidos individualmente em placas entomológicas com folhas de milho (provenientes do campo) até virarem pupas, as quais foram realocadas no laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), nas condições especificadas anteriormente (item 3.1). Após as lagartas de 1º instar terem eclodido dos ovos, estas foram transferidas individualmente para placas entomológicas com folhas destacadas de soja (Cd-215) e mantidas no laboratório de Biologia Molecular de Plantas (ESALQ/USP) até o 5º instar. Ao atingirem o penúltimo instar, as lagartas de campo foram transferidas para as folhas com os respectivos tratamentos (detalhado no item 3.2.3) (Figura 9).

Os mesmos bioensaios foram realizados para as populações de lagartas *S. frugiperda* advindas de criação em dieta artificial (Tabela 1, item 3.1) (Figura 9). Imediatamente após 48 horas ingerindo folhas controle e com tetraciclina e IPS, as fezes de 15 lagartas (advindas de campo e de laboratório) de cada tratamento foram separadamente armazenadas em um único tubo de 1,5 mL, em triplicatas, a -80°C.

O efeito aditivo da tetraciclina e do IPS (IPS+TET) sobre a composição da microbiota das lagartas não foi usado neste ensaio biológico.

Figura 9 - Segundo ensaio biológico de *S. frugiperda* para coleta de amostras fecais

3.5.2 Extração do DNA para análise do gene 16S rRNA

A extração total de DNA de três réplicas biológicas da comunidade microbiana presente nas fezes das lagartas *S. frugiperda* foi realizada utilizando o *kit* PowerFecal™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.), conforme as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas pela leitura a 260 nm e a pureza foi verificada pela razão dos valores de absorbância a 260/280 nm em espectrofotômetro Pico200 (Picodrop, England). A integridade do produto da extração foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5.3 Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento de alto desempenho

O gene 16S rRNA consiste de nove regiões hipervariáveis flanqueadas por extremidades com sequências altamente conservadas (BAKER; SMITH; COWAN, 2003). Para a realização das análises do sequenciamento, oligonucleotídeos iniciadores 341F-805R, que flanqueiam as regiões hipervariáveis V3 e V4 para o domínio *Bacteria* (KLINDWORTH et al., 2012), foram utilizados para amplificar os fragmentos do 16S rDNA das triplicatas de DNA das amostras de fezes das lagartas *S. frugiperda* de cada tratamento.

Para o sequenciamento de alto desempenho, sequências de adaptadores Illumina foram adicionados às extremidades 5' de cada oligonucleotídeo iniciador (341F e 805R) (Tabela 3), de acordo com o protocolo Illumina: *High-speed multiplexed 16S Microbial sequencing on the Miseq System*.

Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores com adaptadores Illumina

Região de interesse	Adaptador Illumina (Sentido 5' - 3')	Sequência de Oligonucleotídeos
V3 (341F)	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	CCTACGGGNGGCWGCAG
V4 (805R)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC

Oligonucleotídeos purificados por HPLC pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., USA)

A amplificação dos fragmentos do gene 16S rRNA via reações em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada da seguinte maneira: 0,75 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 µM) (Tabela 3), 12,5 µL da enzima KAPA High Fidelity Hot Start ReadyMix (2x) (KAPA Biosystems), 1 µL do produto de amplificação de 16S rDNA (5 ng. µL⁻¹) e 10 µL de água ultra pura, livre de DNA contaminante (MOBIO, *Laboratories*, Inc.), totalizando 25 µL de volume final. As condições da reação de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguido por 20 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 58°C, extensão por 1 min a 72°C, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C e pelo resfriamento a 4°C. Todas as reações de PCR foram feitas com controle positivo (utilizado DNA da bactéria *Brucella sp.*) e negativo (sem adição de amostra de DNA). O produto da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e o respectivo tamanho estimado por comparação com marcador 1kb MassRulerTM Express LR Forward DNA Ladder (Fermentas).

Os produtos de PCR foram enviados para a Universidade Católica de Brasília campus II em Brasília, DF, Brasil, para a execução do sequenciamento pela plataforma Illumina Miseq (Illumina, Inc., USA). O preparo da biblioteca para o sequenciamento das regiões V3 e V4 do 16S rDNA dos produtos amplificados foi feito seguindo protocolo descrito por CAPORASO et al. (2012) e pelo protocolo fornecido pela Illumina: *High-speed multiplexed 16S Microbial sequencing on the Miseq System*, sendo incorporados *dual index* e adaptadores de sequenciamento Illumina às extremidades 5' e 3' dos produtos de amplificação, utilizando o *kit*

Nextera® XT Index Kit da Illumina (Figura 10). A incorporação desta marcação combinatória de adaptadores visa facilitar a identificação de cada amostra de DNA após o sequenciamento *multiplexing* (PARAMESWARAN et al., 2007; STILLER et al., 2009).

Figura 10 - Esboço da amplificação das regiões hipervariáveis V3 e V4 do 16S rDNA com adaptadores Illumina para o sequenciamento *dual indexing* pela plataforma Illumina MiSeq. Fonte: extraído e adaptado do protocolo fornecido pela Illumina: *High-speed multiplexed 16S microbial sequencing on the MiSeq System*

A qualidade das bibliotecas 16S foi verificada pelo Bioanalyzer (Agilent Technologies) para verificar o tamanho dos produtos de PCR. As bibliotecas 16S foram sequenciadas utilizando o kit de 500 ciclos (*paired-end reads* de 2x250 pb).

3.5.4 Análise de bioinformática para dados do gene 16S rRNA

Os dados foram analisados utilizando o pipeline QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) com *scripts* Python (CAPORASO et al., 2010) (cada *script* utilizado está descrito no Anexo A). Esta ferramenta QIIME contém programas de livre acesso usados para analisar e comparar uma ampla gama de dados de comunidades microbianas fornecidos pelas plataformas de sequenciamento Illumina, gerando interfaces gráficas. Antes de iniciar as análises de bioinformática, a etapa de remoção dos *barcodes* das sequências multiplexadas, denominada *demultiplexing*, foi previamente realizada pelo software MiSeq.

O primeiro passo realizado para o início das análises foi unir os pares das extremidades direta e reversa das sequências (*paired-end reads*), sobrepondo-as usando a ferramenta FLASH (*Fast Length Adjustment of Short reads*) (MAGOČ; SALZBERG, 2011), com uma sobreposição requerida mínima de 30 pb até 450 pb. O alinhamento e a combinação de cada conjunto de *paired-end reads* sequenciados pelo Illumina Miseq resultam significativamente em *contigs* de maior qualidade. Em seguida, as sequências montadas foram transformadas para o formato FASTA.

Posteriormente, um arquivo dos dados metagenômicos, denominado *Mapping file*, foi criado contendo todas as informações das amostras necessárias para análise como: nome de cada amostra e o respectivo nome do arquivo fasta, sequência *barcode* que identifica cada amostra e, por último, a descrição dos tratamentos. Criado este arquivo, este foi usado para gerar um arquivo fasta de sequências combinadas (usando o *script 1* no Anexo A) com legendas válidas do pipeline QIIME baseadas nos nomes das amostras especificadas no *Mapping file*.

Dando continuidade às análises, as sequências combinadas foram definidas por agrupamento em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) a 97% de identidade, utilizando o método uclust (EDGAR, 2010) aplicado para busca de sequências conhecidas e depositadas no banco de dados referência de UTOs do Greengenes (DESANTIS et al., 2006) (utilizando o *script 2* detalhado no Anexo A). As sequências que não apresentaram identidade com sequências do banco de dados foram removidas, assim como as quimeras identificadas foram descartadas (EDGAR, 2010). Resumidamente, UTOs correspondem a agrupamentos (*clusters*) de sequências que representam frequentemente algum grau de relação taxonômica denominado de filotipo, ou seja, sequências agrupadas em identidade de 97% utilizando uclust que representam uma espécie (KUCZYNSKI et al., 2012). Sendo assim, a composição taxonômica foi atribuída de acordo com o sistema de classificação do Greengenes aplicando o *threshold* de identidade de 97%, utilizando como referência o banco de dados de UTOs mais recente (Maio de 2013) do Greengenes.

Os cálculos da quantidade das UTOs dentro de uma amostra são feitos pelos índices de alfa diversidade, enquanto que as UTOs compartilhadas entre duas ou mais amostras diferentes são calculadas pela beta diversidade (LOZUPONE; KNIGHT, 2008). Os índices de alfa diversidade Chao1 de estimativa de riqueza de UTOs (CHAO, 1984) de UTOs observadas (*observed_species*) e o índice Shannon-

Wiener (H') (MAGURRAN, 2004) de estimativa de diversidade de UTOs foram obtidos através do *script* 3 no Anexo A. Calculou-se o estimador Good's_coverage que calcula a porcentagem de indivíduos/espécies amostrados em uma comunidade bacteriana, cuja fórmula é $[1 - (n/N)] \times 100 \%$, onde n corresponde ao número de espécies representadas por UTOs e N ao número total de sequências (GOOD, 1953) (*script* 3 no Anexo A). As curvas de rarefação com UTOs com nível de identidade de 97% foram geradas (*script* 4 no Anexo A) a partir de amostras normalizadas com o menor número das sequências obtidas pelas leituras, tal como os índices de beta diversidade.

Os índices de beta diversidade (Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac e Bray Curtis) foram gerados pelo QIIME. Unweighted e Weighted UniFrac são calculados com base na distância filogenética dos grupos taxonômicos (LOZUPONE; KNIGHT, 2005) através do *script* 5 no Anexo A. Unweighted UniFrac considera apenas a presença ou ausência de UTOs nos ambientes (medida qualitativa) sendo mais adequado para detectar fatores ecológicos que restringem o crescimento bacteriano como pH e temperatura, enquanto que Weighted UniFrac é ideal para revelar diferenças da comunidade bacteriana devido à mudanças na abundância relativa de UTOs (medida quantitativa) provocada por diferenças na disponibilidade de nutrientes minerais no solo ou alteração da dieta ingerida por insetos (LOZUPONE et al., 2007). Em contrapartida, a matriz de similaridade Bray Curtis foi utilizada por não adotar a distância filogenética entre os grupos amostrais (*script* 6 no Anexo A) e por ser uma medida mais sensível às UTOs mais abundantes (PARKS; BEIKO, 2013). As medidas de beta diversidade foram visualizadas pela análise de coordenadas principais (PCoA), desenvolvida para encontrar agrupamentos das comunidades bacterianas semelhantes entre as amostras. Uma matriz é calculada para traçar gráficos bidimensionais (*script* 7 no Anexo A) também chamados de diagramas de grupos que são úteis em mostrar quais ambientes são mais estreitamente relacionados entre si (LEMOS et al., 2011), porém não permite detectar quais são as UTOs das comunidades e suas funções nestes ambientes.

Estes dados dos perfis das comunidades de bactérias foram submetidos ao teste de similaridade não paramétrico (ANOSIM) com 999 permutações (CLARKE, 1993) (*script* 8 no Anexo A) Este teste ANOSIM foi realizado com a finalidade de testar as diferenças na estrutura da microbiota entre grupos de amostras fecais das lagartas *S. frugiperda* submetidas às diferentes dietas, permitindo avaliar o

distanciamento entre os grupos através da correlação (R) entre eles, em que $R=1$ significa que houve a separação da estrutura da comunidade, e quando $R=0$ não ocorreu a separação. Valores de $R > 0,75$ indicam plena separação entre os grupos, valores $> 0,2$ representam separações com algumas sobreposições, enquanto que valores de $R < 0,2$ não apresentam separação (CLARKE, 1993). Adicionalmente, o teste de Mantel foi utilizado para analisar a correlação entre duas matrizes de distância (com 999 permutações) (*script 9* no Anexo A), sendo que o coeficiente Mantel r gerado pode variar de -1 a +1, indicando correlação negativa entre as matrizes quando r tem o valor próximo de -1, quando $r=0$ correspondendo a nenhuma correlação e, altamente positiva para r próximo a +1.

As análises e comparações estatísticas da abundância entre os diferentes grupos taxonômicos bacterianos detectados nas amostras fecais foram determinados através do software STAMP (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) utilizando a tabela com número total de UTOs de cada amostra como arquivo de entrada. Nessa análise, o *p-value* foi calculado usando o teste *two sided* Welch's t-test com múltipla correção de Benjamini-Hochberg FDR baseada no critério de *False Discovery Rate* proposto por Benjamini e Hochberg (1995) ($p < 0,05$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2014).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração do IPS nos ensaios biológicos com lagartas

S. frugiperda alimentadas com folhas de soja

Com a finalidade de estimar a melhor concentração do inibidor de peptidase de soja a ser utilizado nos bioensaios utilizando dieta natural, folhas de soja Cd-215 incubadas individualmente em água com gradiente de concentração de IPS 0% (controle negativo), 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/v), testou-se o potencial inibitório do concentrado de IPS medindo-se a atividade residual da tripsina bovina comercial (Sigma), utilizando o substrato sintético cromogênico BApNA (Figura 11).

Figura 11 - Inibição da atividade proteolítica da tripsina bovina sintética em relação a diferentes doses de proteína do extrato de IPS (ANOVA, $p < 0,01$)

A partir do teste de inibição (Figura 11), a tripsina bovina sintética teve aproximadamente 80% de atividade reduzida e, portanto, optou-se por usar a concentração de IPS 2,0% nos ensaios biológicos subsequentes.

4.2 Extração das bactérias do intestino médio de *S. frugiperda* e cultivo em meio para detecção de bactérias proteolíticas

Os efeitos do antibiótico tetraciclina (TET), do inibidor IPS e dos dois tratamentos em conjunto (IPS+TET) sobre as UFCs de lagartas provenientes dos dois ambientes diferentes foram semelhantes, reduzindo drasticamente a microbiota intestinal da espécie *S. frugiperda*, sugerindo que o inibidor de peptidase de soja possa ter característica bactericida e/ou bacteriostático (Figuras 12 e 13). A quantidade das UFCs das respectivas lagartas alimentadas com folhas com os tratamentos mencionados diferiram estatisticamente do controle, mas não diferiram estatisticamente entre si (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) por miligrama de intestino médio (IM) de lagartas *S. frugiperda*, advindas do campo, alimentadas com folhas de soja submetidas aos quatro tratamentos ilustrados (ANOVA, $p < 0,01$) com a respectiva ilustração das bactérias proteolíticas no meio ágar-leite. Abreviações: CT, controle; TET, tetraciclina; IPS, inibidor de peptidase de soja; IPS+TET, inibidor de peptidase de soja com tetraciclina

Figura 13 - Unidades formadoras de colônias (UFCs) por miligrama de intestino médio (IM) de lagartas *S. frugiperda*, advindas de criação em laboratório, alimentadas com folhas de soja submetidas aos quatro tratamentos ilustrados (ANOVA, $p < 0,01$) com a respectiva ilustração das bactérias proteolíticas no meio ágar-leite. Abreviações: CT, controle; TET, tetraciclina; IPS, inibidor de peptidase de soja; IPS+TET, inibidor de peptidase de soja com tetraciclina

4.3 Estudos de expressão de genes que codificam as endopeptidases tripsina e quimotripsina da espécie *S. frugiperda*

Foi feito uma análise de expressão de 23 genes que codificam serino peptidases, sendo 14 de quimotripsinas e nove de tripsinas, nas lagartas *S. frugiperda* advindas de criação em laboratório que se alimentaram de dieta natural com os quatro tratamentos (Figuras 14 e 15). As folhas de soja controle, não tratadas, foram mensuradas com expressão gênica padrão 1,0. Observou-se que no tratamento com tetraciclina, não houve alteração da expressão em nenhum dos genes de quimotripsina (Figura 14) e tripsina (Figura 15) quando comparado com a expressão do tratamento controle (padrão de expressão gênica 1,0). Como resposta adaptativa, as lagartas que ingeriram folhas com IPS, dos 14 genes de quimotripsina houve aumento da expressão de 10 genes (Figura 14) e em dois genes de tripsina dos nove analisados (Figura 15). Baseado nestes resultados, é importante ressaltar que na análise de expressão dos genes SfChys 9 e 21 no tratamento em conjunto de IPS com o antibiótico, apesar da expressão destes dois genes apresentarem

diferença estatística quando comparado com a expressão do tratamento IPS (Figura 14), provavelmente corresponde a um artefato de técnica já que o tratamento com tetraciclina, enfatizado anteriormente, não participa no aumento da expressão dos genes destas endopeptidases observado nas lagartas criadas em laboratório.

Figura 14 - Expressão relativa dos genes de quimotripsina de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda*, advindas de criação em laboratório, alimentadas com folhas de soja Cd-215 com os diferentes tratamentos por 48 horas. Genes actina e S30 foram usados como referência. As folhas de soja controle, não tratadas, foram mensuradas com expressão gênica padrão 1,0. Resultados significativos ($p < 0,05$); ns = não significativo

Figura 15 - Expressão relativa dos genes de tripsina de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda*, advindas de criação em laboratório, alimentadas com folhas de soja Cd-215 com os diferentes tratamentos por 48 horas. Genes actina e S30 foram usados como referência. As folhas de soja controle, não tratadas, foram mensuradas com expressão gênica padrão 1,0. Resultados significativos ($p < 0,05$); ns = não significativo

Nas lagartas *S. frugiperda* advindas de campo, foi feito a análise de expressão dos genes de quimotripsina (Figura 16) e tripsina (Figura 17) dos tratamentos em folha de soja, porém dos 14 genes de quimotripsina analisados na expressão com lagartas advindas de criação em laboratório (Figura 14), selecionou-se seis genes SfChys 2, 4, 7, 9, 19 e 21 (Figura 16). Dos nove genes de tripsina (Figura 15), selecionou-se três genes SfTrys 7, 8 e 12 (Figura 17) para comparar os resultados entre as lagartas advindas de condições diferentes (laboratório e campo).

SOUZA (2013) propôs uma correlação entre a expressão relativa dos genes de tripsina e a evolução destas proteínas em dados de filogenia de tal forma que foi formado um grupo de enzimas sensíveis ao inibidor de peptidase de soja (sendo o gene SfTry 7 um dos representantes selecionado deste grupo) e o outro grupo de tripsinas insensíveis ao inibidor, sendo dois constituintes os genes SfTrys 8 e 12. Como não foi verificado uma correlação entre a filogenia e expressão relativa dos genes de quimotripsina por SOUZA (2013), selecionou-se aqueles que apresentaram alteração da expressão gênica nas lagartas criadas em laboratório (SfChys 2, 4 e 7) com diferença estatística significativa entre os tratamentos (SfChys

9 e 21) e, por fim, aquele que não apresentou alteração da expressão gênica comparado ao controle (SfChy19).

Nas lagartas coletadas em campo, mesmo nunca expostas à ingestão de dieta natural com antibiótico, novamente não houve alteração da expressão em nenhum dos genes de quimotripsina no tratamento com tetraciclina (Figura 16) e em nenhum dos genes de tripsina (Figura 17) quando comparado com a expressão do tratamento controle. Não houve expressão dos genes SfChys 4, 9 e 19 (dados não mostrados). Da mesma forma que *S. frugiperda* criadas em laboratório, as lagartas de campo também aumentaram a expressão dos genes de quimotripsina e de tripsina como resposta adaptativa à ingestão de IPS, sendo três genes de quimotripsina, SfChys 2, 7 e 21 (Figura 16), e apenas um gene de tripsina SfTry 8 (Figura 17) sendo este gene pertencente ao grupo de enzimas insensíveis corroborando com dados de SOUZA (2013). Portanto, diferentemente do resultado anterior analisado na figura 14, a expressão do gene SfChy21 não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com IPS e IPS com antibiótico.

Figura 16 - Expressão relativa dos genes de quimotripsina de lagartas no fim do 5º instar *S. frugiperda*, coletadas em campo, alimentadas com folhas de soja Cd-215 com os diferentes tratamentos por 48 horas. Genes actina e S30 foram usados como referência. As folhas de soja controle, não tratadas, foram mensuradas com expressão gênica padrão 1,0. Resultados significativos ($p < 0,05$); ns = não significativo

Figura 17 - Expressão relativa dos genes de tripsina de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda*, advindas de campo, alimentadas com folhas de soja Cd-215 com os diferentes tratamentos. Genes actina e S30 foram usados como referência. As folhas de soja controle, não tratadas, foram mensuradas com expressão gênica padrão 1,0. Resultados significativos ($p < 0,05$); ns = não significativo

4.4 Análise da atividade enzimática do intestino de lagartas *S. frugiperda*

Ensaio enzimáticos foram realizados para avaliar se houve alterações na atividade das enzimas digestivas das lagartas provenientes de ambientes diferentes, tanto de criação em laboratório quanto de campo, submetidas à ingestão dos mesmos tratamentos com tetraciclina, IPS e IPS com tetraciclina em dieta natural (folhas de soja) (análise quantitativa), já que observou-se que houve aumento na expressão dos genes que codificam serino proteinases nos tratamentos com IPS e IPS com tetraciclina. Entretanto, a ingestão de folhas contendo os respectivos tratamentos pela *S. frugiperda*, por 48 horas no início do 5º instar, não afetou significativamente a atividade tríptica (Figura 18, mensurada pela hidrólise do BApNA *in vitro*) e quimotríptica (Figura 19, mensurada pela hidrólise do SApNA *in vitro*) comparando com o controle.

Como não houve alteração na atividade de peptidases da classe do tipo serino, foi feito a análise da atividade proteolítica total (mensurada pela hidrólise da azocaseína *in vitro*) do fluido intestinal das lagartas após a ingestão dos referidos tratamentos (Figura 20). Entretanto, não foi mensurada nenhuma alteração da

atividade proteolítica total das enzimas intestinais das lagartas criadas em laboratório (Figura 20A) e daquelas coletadas em campo (Figura 20B) após a ingestão das folhas de soja tratadas com relação ao controle.

Figura 18 - Atividade trípica do fluido intestinal de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda* alimentadas com folhas de soja Cd-215 submetidas aos tratamentos ilustrados (ANOVA, $p<0,05$). (A) Lagartas advindas de criação em laboratório. (B) Lagartas de campo

Figura 19 - Atividade quimotríptica do fluido intestinal de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda* alimentadas com folhas de soja Cd-215 submetidas aos tratamentos ilustrados (ANOVA, $p<0,05$). (A) Lagartas advindas de criação em laboratório. (B) Lagartas de campo

Figura 20 - Atividade proteolítica total do fluido intestinal de lagartas no fim do 5º ínstar *S. frugiperda* alimentadas com folhas de soja Cd-215 submetidas aos tratamentos ilustrados (ANOVA, $p<0,05$). (A) Lagartas advindas de criação em laboratório. (B) Lagartas de campo

A análise da atividade enzimática intestinal foi realizada em lagartas *S. frugiperda* dissecadas logo após retiradas de seu ambiente natural (selvagens) e daquelas que foram submetidas à ingestão de dieta artificial criadas em condições de laboratório por uma e duas gerações subsequentes (DA1 e DA2, respectivamente). Lagartas selvagens, por se alimentarem apenas de folhas, tiveram a atividade trípica intestinal significativamente bem menor às lagartas que passaram a se alimentar de dieta artificial (Figura 21A), altamente nutritiva, rica em vitaminas e outros suplementos (Tabela 1). Diferentemente, as lagartas coletadas no campo e submetidas por uma geração (DA1) ingerindo a dieta enriquecida sofreram uma leve alteração na atividade quimotríptica, enquanto que aquelas mantidas por mais uma geração (DA2) não diferiram da atividade enzimática das lagartas selvagens (Figura 21B). O resultado da atividade proteolítica total das enzimas intestinais das lagartas selvagens, DA1 e DA2 foi praticamente semelhante estatisticamente (Figura 21C) à análise da atividade trípica das respectivas lagartas (Figura 21C). Todos os resultados enzimáticos *in vitro* foram calculados como a média de três experimentos independentes.

Figura 21 - Atividade enzimática do fluido intestinal de lagartas no fim do 5º instar *S. frugiperda* selvagens e submetidas à ingestão de dieta artificial em condições de laboratório por uma (DA1) e duas gerações (DA2) subsequentes. (A) Atividade trípica (ANOVA, $p < 0,01$). (B) Atividade quimotríptica (ANOVA, $p < 0,05$). (C) Atividade proteolítica total (ANOVA, $p < 0,01$)

4.5 Perfil da atividade de peptidases intestinais visualizados em géis de eletroforese

A análise qualitativa do perfil enzimático do intestino médio de lagartas *S. frugiperda* provenientes de diferentes dietas foi ilustrada em zimograma de gel de eletroforese (Figuras 22, 23 e 24). O perfil da atividade proteolítica das lagartas advindas de criação em laboratório resultou no surgimento de cinco peptidases, ambas no controle e nas amostras intestinais de lagartas que ingeriram folhas tratadas (indicadas pelos números à esquerda da figura 22). Entretanto, apesar da intensidade das bandas da peptidase 5 correspondentes ao tratamento controle e tetraciclina não apresentarem nenhuma alteração, observou-se o aumento da intensidade destas bandas quando adicionado IPS na dieta natural, ou seja, o aumento da atividade desta peptidase (sugere-se que a peptidase 1 também tenha sofrido aumento da atividade apesar da alteração da intensidade ter sido muito sutil). Quando os extratos enzimáticos foram tratados com TLCK (inibidor sintético de tripsina), tiveram as bandas 1 e 5 inibidas em todos os tratamentos, sugerindo serem duas peptidases do tipo tripsina.

Em nível quantitativo, comparando os resultados da atividade enzimática das lagartas criadas em laboratório (Figuras 18A e 19A) em que não houve alteração significativa na atividade das peptidases serínicas entre os tratamentos, com a análise qualitativa do perfil enzimático destas lagartas, observa-se o aumento da expressão das enzimas trípticas quando adicionado IPS na dieta comparado aos tratamentos controle e tetraciclina (Figura 22).

Figura 22 - Zimograma de gel de eletroforese de amostras do intestino médio de lagartas *S. frugiperda*, advindas de criação em laboratório, no fim do quinto instar alimentadas por 48 horas com folhas de soja Cd-215 com os tratamentos ilustrados. As amostras dos extratos protéicos do intestino foram tratadas com TLCK (inibidor de tripsina sintético) antes da eletroforese. A atividade proteolítica das amostras aparece como bandas claras (brancas) contra o fundo preto do gel

O perfil da atividade proteolítica de *S. frugiperda* coletadas em campo gerou nove peptidases, sendo que destas foi possível visualizar cinco bandas no controle (bandas 3 e 6 a 9), nove nas amostras intestinais de lagartas que ingeriram folhas tratadas com tetraciclina, e oito bandas na dieta natural quando adicionado IPS (números à esquerda da figura 23). Curiosamente, estas lagartas que sofreram a primeira exposição à uma dieta com antibiótico expressaram de forma mais intensa as peptidases 1 e 2 (também sintetizadas nos tratamentos com IPS), pois especula-se que estas bandas estejam em baixas concentrações no controle mas que não foi viável visualizar as bandas uma vez que quando incubadas com o inibidor sintético de tripsina (TLCK), aparece vestígios da banda 2 em todos os tratamentos provavelmente por esta peptidase sofrer menos efeito com TLCK (diferentemente da peptidase 1 que foi completamente inibida). Como a única peptidase não visível nas folhas tratadas com IPS e IPS com tetraciclina foi a banda 3, há a possibilidade de que ela possa ter sofrido inibição do IPS ingerido pelas lagartas na dieta natural (Figura 23).

A peptidase 9 representada nas amostras de todos os tratamentos teve maior atividade quando a lagarta se alimentou de folhas com inibidor de peptidase de soja,

e provavelmente seja uma serino endopeptidase do tipo tripsina por ter sido inibida pelo TLCK (além das peptidases 1, 2, 7 e 8) (Figura 23).

Figura 23 - Zimograma de gel de eletroforese de amostras do intestino médio de lagartas *S. frugiperda*, coletadas em campo, no fim do quinto instar alimentadas por 48 horas com folhas de soja Cd-215 com os tratamentos ilustrados. As amostras dos extratos protéicos do intestino foram tratadas com TLCK (inibidor de tripsina sintético) antes da eletroforese. A atividade proteolítica das amostras aparece como bandas claras (brancas) contra o fundo preto do gel

A análise e comparação do perfil das enzimas intestinais das lagartas selvagens e àquelas submetidas a uma dieta artificial por uma (DA1) e duas gerações (DA2) tornou possível observar seis peptidases, ambas no controle e nos dois tratamentos (Figura 24). A primeira e a última bandas (peptidases 1 e 6, com alterações mais expressivas no aumento de intensidade) referentes às lagartas coletadas nos cartuchos de milho apresentaram uma sutil expressão e conforme ao tempo de gerações que eram mantidas ingerindo dieta artificial enriquecida, observa-se que havia o aumento da expressão destas putativas enzimas trípticas (uma vez que foram inibidas pelo TLCK), corroborando com resultados do ensaio *in vitro* ilustrados nas figuras 21A e 21C.

Figura 24 - Gel de eletroforese de amostras do intestino médio de lagartas *S. frugiperda* selvagens e àquelas submetidas à uma dieta artificial por uma e duas gerações (DA1 e DA2, respectivamente) no fim do quinto instar alimentadas por 48 horas com folhas de soja Cd-215 com os tratamentos ilustrados. As amostras dos extratos protéicos do intestino foram tratadas com TLCK (inibidor de tripsina sintético) antes da eletroforese. A atividade proteolítica das amostras aparece como bandas claras (brancas) contra o fundo preto do gel

Géis similares foram preparados com o inibidor de quimotripsina, quimostatina. Entretanto, nenhuma inibição das regiões de atividade proteolítica foi detectada (dados não mostrados).

4.6 Amplificação do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana extraída de fezes de lagartas *S. frugiperda*

Os oligonucleotídeos contendo sequências de adaptadores Illumina foram utilizados para amplificar os fragmentos do gene 16S rRNA das triplicatas de DNA das oito amostras de fezes das lagartas *S. frugiperda* de cada tratamento gerando 24 produtos de PCR no tamanho estimado de aproximadamente 500 pb (Figura 25).

Figura 25 - Produtos de PCR amplificados a partir do gene 16S rRNA das réplicas biológicas de DNA de fezes de lagartas *S. frugiperda*. Abreviações: S: Selvagem; DA: mantidas em dieta artificial por duas gerações; IC, It e li: Advindas de criação em laboratório e submetidas aos tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja em folhas de soja, respectivamente; CC, Ct e Ci: Coletadas no campo e submetidas aos tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja em folhas de soja, respectivamente; (numerações correspondentes às réplicas biológicas). C+: DNA da bactéria *Brucella sp.* C-: sem adição de amostra de DNA

4.7 Análise das sequências das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana das amostras fecais de *S. frugiperda* provenientes de diferentes dietas

Um total de 13,03 milhões de sequências de qualidade foram obtidas do 16S rDNA de bactérias (Tabela 4). Com a finalidade de englobar todas as amostras nas análises de alfa e beta diversidade, foi preciso utilizar um número de sequências mínimas. Para as amostras do grupo 1 (réplicas biológicas selvagens e alimentadas com dieta artificial), as análises foram realizadas com 315.221 sequências (Anexo B), e 146.334 sequências para o grupo 2 (Anexo B) e para o grupo total de amostras. A riqueza/abundância estimada de UTOs estimada pelo Chao1 (Tabela 4) e pela curva de rarefação (Figura 26) foi menor significativamente nas réplicas de dieta artificial (DA) com menor valor médio do índice Chao1 (136,65) (Tabela 4), porém com valores muito próximos no restante das 21 amostras, não apresentando diferença significativa da riqueza de UTOs verificados entre os tratamentos remanescentes (Figura 26). Quanto à diversidade de UTOs, os valores médios do índice Shannon detectados nas amostras foram relativamente próximos, no entanto

as amostras de dieta artificial com o índice médio mais baixo (1,7) e, em seguida com o segundo valor médio das amostras selvagens (2,16), revelando que ambas apresentaram menor diversidade de espécies na composição da comunidade bacteriana. A cobertura de todas as amostras para o domínio Bacteria foi estimada acima de 99,98% (Tabela 4), sugerindo que a maioria dos filotipos deste domínio foi representada nas análises do sequenciamento.

Tabela 4 - Número de sequências e UTOs observados, estimativa de riqueza de UTOs (Chao1), índices de diversidade Shannon (H') e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA

Grupo	Amostras	No. sequências	No. UTOs	Chao1	Shannon	Cobertura (%)
1	S1	486536	210	259,79	2,11	99,99
	S2	1092516	215	252,05	1,62	99,99
	S3	996967	214	270	2,74	99,99
	DA1	315221	78	104,25	1,78	99,99
	DA2	383820	102	147,09	1,62	99,99
	DA3	632724	109	158,6	1,71	99,99
2	CC1	146334	126	149,89	2,81	99,98
	CC2	250067	158	209,48	3,44	99,98
	CC3	521724	170	211,35	3,75	99,99
	CT1	670090	183	228,56	3,36	99,99
	CT2	235439	141	168,07	3,4	99,99
	CT3	238286	173	198,2	3,71	99,98
	Ci1	939809	221	268,53	3,08	99,99
	Ci2	955461	230	299,39	2,61	99,99
	Ci3	313939	151	205,08	2,87	99,99
	LC1	697231	186	253,56	3,75	99,99
	LC2	253050	140	155,12	3,35	99,99
	LC3	179788	158	204,31	3,59	99,98
	LT1	624262	176	239,07	3,31	99,99
	LT2	532080	156	204,75	3,21	99,99
	LT3	176344	138	175,19	3,1	99,98
	Li1	617010	203	257,05	2,32	99,99
	Li2	852081	226	302	3,36	99,99
	Li3	928251	213	243,37	3,3	99,99

Abreviações: S: Selvagem; DA: dieta artificial; CC, Ct e Ci: Coletadas no campo com tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja, respectivamente; LC, LT e Li: Advindas de criação em laboratório com tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja, respectivamente (numerações correspondentes às réplicas biológicas)

Figura 26 - Curva de rarefação, estimado pelo índice Chao1, das sequências das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA de amostras fecais de lagartas *S. frugiperda* submetidas à ingestão de diferentes dietas com os respectivos tratamentos, obtidas pelo sequenciamento da plataforma Illumina Miseq, com um ponto de corte de 3% calculada a partir de valores mínimos de sequências para a comunidade de bactérias. As barras representam o desvio padrão da média das três amostras de fezes de *S. frugiperda* de cada tratamento

4.8 Análise da composição e estrutura da comunidade bacteriana das amostras fecais de *S. frugiperda* provenientes de diferentes dietas

Utilizando o banco de dados referência de UTOs do Greengenes, a abundância relativa (*script* 10 no Anexo A) em nível de filo bacteriano gerada para todos os conjuntos de amostras demonstrou que os filos mais predominantes foram *Proteobacteria* (73,3%) e *Firmicutes* (24,2%) (Anexo C, Figura 27). Os filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* apresentaram menores atribuições de sequências, com frequências de 2,2 % e 0,3 % (Anexo C), respectivamente, distribuído nas amostras.

Figura 27 - Abundância relativa dos filos bacterianos associados às fezes de lagartas *S. frugiperda* alimentadas com dietas com os respectivos tratamentos. Sequências do gene 16S rRNA foram classificadas pelo Greengenes a 97% pelo QIIME

Detectou-se diferenças significativas estatisticamente com relação à proporção de sequências para filos do domínio Bacteria considerando $p\text{-value} < 0,05$ para as amostras fecais de lagartas *S. frugiperda* alimentadas em diferentes dietas através da análise feita pelo STAMP (Figuras 28, 29 e 30). Essa análise revelou que o filo *Proteobacteria* foi o mais representativo nas lagartas coletadas em cartucho de milho (selvagens) e em menor proporção, sequências afiliadas a *Actinobacteria* foram significativamente encontradas nestas amostras (Figura 28). Diferentemente, nas lagartas selvagens que foram submetidas à ingestão de dieta artificial por duas gerações predominou sequências da comunidade bacteriana pertencentes ao filo *Firmicutes* (Figura 28). Esta distribuição diferencial de filos bacterianos nestas amostras de fezes corroborou com resultados apresentados no Anexo D.

Figura 28 - Comparação de filios de bactérias relevantes encontrados em amostras fecais obtidas de *S. frugiperda* coletadas em cartuchos de milho no campo (Campo_Selvagem) com lagartas submetidas à ingestão de dieta artificial por duas gerações em condições de laboratório (Lab_Artificial). Os dados foram obtidos utilizando Welch's t-test realizado pelo programa STAMP. *P-values* corrigidos (*q-values*) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR. Apenas filios com $p < 0,05$ foram mostrados

Curiosamente, nas lagartas previamente alimentadas com dieta artificial que passaram a ingerir folhas de soja do início do 1º ao final do 5º instar, observou-se abundância relativa, com relevância estatística, do filo *Proteobacteria* nas fezes destas lagartas e declínio de sequências da comunidade bacteriana pertencentes ao filo *Firmicutes* quando comparado com àquelas que ingeriram apenas dieta artificial (Figura 29).

Figura 29 - Comparação de filios de bactérias relevantes encontrados em amostras fecais obtidas de *S. frugiperda* provenientes de criação em laboratório que ingeriram folhas de soja controle (Lab_Control) com lagartas submetidas à ingestão de dieta artificial por duas gerações (Lab_Artificial). Os dados foram obtidos utilizando Welch's t-test realizado pelo programa STAMP. *P-values* corrigidos (*q-values*) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR. Apenas filios com $p < 0,05$ foram mostrados

Nas lagartas coletadas em campo, a ingestão de IP de soja incubada em folhas de soja em um curto intervalo de tempo (48 h) por *S. frugiperda* resultou em um

pequeno aumento significativo da proporção (0,4%) de sequências da microbiota do filo *Bacteroidetes* encontrada nas amostras fecais comparado às lagartas alimentadas com folhas não tratadas (Figura 30). A ingestão aguda do antibiótico tetraciclina em folhas de soja por estas lagartas coletadas em campo não apresentou relevância estatística sobre a distribuição diferencial de filos bacterianos nas fezes, assim como o efeito do IP de soja e da tetraciclina em folhas ingeridas por lagartas provenientes de criação em laboratório sobre a alteração significativa da proporção de sequências de filotipos da microbiota fecal (dados não mostrados).

Figura 30 - Comparação de filos de bactérias relevantes encontrados em amostras fecais obtidas de *S. frugiperda* coletadas em campo que ingeriram folhas de soja controle (Campo_Controle) com lagartas alimentadas com folhas tratadas com IP de soja. Os dados foram obtidos utilizando Welch's t-test realizado pelo programa STAMP. *P-values* corrigidos (*q-values*) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR. Apenas filos com $p < 0,05$ foram mostrados

Os quatro filotipos mais predominantes em nível de gênero contabilizados na maioria das sequências das amostras fecais corresponderam a *Enterococcus* (23,5%), *Acinetobacter* (20,5%), *Stenotrophomonas* (11,4%) e *Klebsiella* (10,4%), entretanto aproximadamente 22% destas sequências não foram classificadas neste táxon comparando com o banco de dados referência de UTOs do Greengenes (Anexo C). A estrutura da comunidade bacteriana que compõe as fezes provenientes do trato intestinal da lagarta *S. frugiperda* sofreu influência da composição da dieta, como foi possível visualizar na figura 28, em que lagartas de campo (selvagens) predominavam os membros do gênero *Klebsiella* (62,6%) (Anexo C) e, quando estas mesmas lagartas, passaram a se alimentar de dieta artificial enriquecida por duas gerações seguidas, as bactérias do gênero *Enterococcus* (99,4%) (Anexo C) se estabeleceram. Inclusive, detectou-se a presença de gêneros *Stenotrophomonas* apenas em lagartas *S. frugiperda* oriundas de prévia criação em dieta artificial e que ingeriram as folhas de soja em todos os tratamentos realizados nesta dieta natural, enquanto que as comunidades *Acinetobacter sp.* passaram a compor a microbiota

fecal de *S. frugiperda* que se alimentaram de folhas, tanto de soja quanto do cartucho do milho (Figura 31).

Figura 31 - Abundância relativa dos gêneros do domínio Bacteria associados às fezes de lagartas *S. frugiperda* alimentadas com dietas com os respectivos tratamentos. Sequências do gene 16S rRNA foram classificadas pelo Greengenes a 97% pelo QIIME

Para analisar a influência da dieta natural (cartucho de milho) *versus* artificial (Grupo 1), o efeito do IPS e do antibiótico tetraciclina em folhas de soja ingeridas por lagartas advindas de criação em laboratório e coletadas em campo (Grupo 2) e o efeito de todos estes tratamentos (Grupo total) sobre a estrutura da microbiota das amostras fecais, optamos por utilizar a distância de β diversidade calculando três diferentes índices de similaridade Bray-Curtis, Weighted UniFrac e Unweighted UniFrac (Tabela 5). Para estas distâncias de β diversidade testadas, os valores de R para Bray-Curtis revelaram plena separação da estrutura da comunidade da microbiota para todos os grupos estudados, indicando que todos os tratamentos alteraram a estrutura e composição da comunidade bacteriana das fezes de *S. frugiperda*. Como as distâncias filogenéticas Weighted e Unweighted apresentaram valores R análogos, optou-se por apenas demonstrar as medidas Weighted UniFrac e Bray-Curtis em gráficos PCoA (Figura 32). As três medidas de β diversidade foram investigadas e correlacionadas par a par as suas matrizes de distância utilizando 999 permutações para cada teste Mantel (Tabela 6). Os resultados da tabela 6 indicam forte correlação entre as matrizes Bray-Curtis e Weighted UniFrac corroborando com os resultados do teste ANOSIM que indica uma relação

significativa do efeito do tipo da dieta ingerida e do *habitat* da lagarta sobre a composição da comunidade bacteriana nas amostras fecais.

Tabela 5 - Teste ANOSIM para as distâncias de β diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de UTOs

Distâncias de β -diversidade	Grupo 1		Grupo 2		Grupo Total	
	valor R	P value	valor R	P value	valor R	P value
Bray-Curtis	1	0,1	0,73	0,001	0,879	0,001
Weighted UniFrac	1	0,1	0,4132	0,001	0,6938	0,001
Unweighted UniFrac	ND	ND	0,3885	0,001	0,6419	0,001

Abreviação: ND - não determinado

Tabela 6 - Teste de Mantel realizado par a par para as distâncias de β diversidade

Matriz 1	Matriz 2	Grupo 1		Grupo 2		Grupo Total	
		Mantel r	P value	Mantel r	P value	Mantel r	P value
Bray-Curtis	Weighted UniFrac	0,9904	0,002	0,5309	0,001	0,6626	0,001
Bray-Curtis	Unweighted UniFrac	ND	ND	0,5305	0,001	0,6089	0,001
Weighted UniFrac	Unweighted UniFrac	ND	ND	0,363	0,007	0,6018	0,001

Abreviação: ND - não determinado

De acordo com resultados do valor R do teste ANOSIM, não houve significância estatística entre os agrupamentos observados das comunidades bacterianas relacionadas ao Grupo 1 (Tabela 5), provavelmente pelo fato das comunidades bacterianas de lagartas selvagens não terem se agrupado tão bem como as linhagens de bactérias de fezes de *S. frugiperda* provenientes de dieta artificial verificada em ambas as matrizes de similaridade (Anexo E). A provável explicação foi revelada pelo *heatmap* (Anexo D), onde é possível visualizar a correlação da abundância relativa de taxonomias de bactérias com as relações filogenéticas das réplicas das amostras investigadas.

Figura 32 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do 16S rDNA das amostras fecais de *S. frugiperda* coletadas em campo e provenientes de criação em laboratório que ingeriram folhas de soja controle e tratadas com IP de soja e antibiótico tetraciclina (Grupo 2) (A e B) e as amostras fecais de todos os tratamentos (C e D). Essa análise foi realizada pelo agrupamento de matrizes de similaridade Bray Curtis (A e C) e Weighted UniFrac (B e D) para as comunidades bacterianas respectivamente. Símbolos com cores diferentes correspondem às réplicas biológicas para lagartas submetidas às dietas e condições ambientais diferentes

De acordo com o gráfico PCoA, pode-se observar que a influência da dieta e condição de criação (provenientes de criação em laboratório e em campo) pode ter determinado a maior similaridade da estrutura das comunidades bacterianas nas fezes de *S. frugiperda* usando a matriz de similaridade Bray Curtis (Figura 32A). Na matriz Weighted UniFrac, as UTOs mais abundantes agruparam-se significativamente com base no parentesco filogenético destes grupos, tendo como influência os tratamentos nas dietas pois observa-se que a estrutura da comunidade bacteriana nas amostras fecais das lagartas coletadas em campo que se alimentaram de folhas de soja contendo IP de soja por 48 horas é similar à microbiota fecal de *S. frugiperda* advindas de criação em laboratório que ingeriram folhas controle e tratadas com IPS e tetraciclina (por 48 h) (Figura 32B). Na Figura 32C, observa-se que por não adotar a distância filogenética entre os grupos amostrais e considerando as UTOs mais abundantes, a matriz de similaridade Bray Curtis agrupou, com relevância estatística, a estrutura das comunidades bacterianas de forma diferente da matriz filogenética quantitativa (Figura 32D). Como no agrupamento das comunidades bacterianas da Figura 32B, as UTOs das fezes de lagartas de campo que ingeriram IPS são similares filogeneticamente às UTOs de amostras fecais de lagartas criadas em condições de laboratório que ingeriram folhas controle e tratadas (com IPS e antibiótico), diferentemente a microbiota fecal de lagartas de campo nunca expostas a nenhum tratamento apresentaram similaridade com aquelas também coletadas em campo, mas que ingeriram folhas de soja controle e tratadas com tetraciclina. Por fim, a comunidade bacteriana proveniente de fezes de lagartas que se alimentaram de dieta artificial por duas gerações não apresentaram similaridade filogenética com nenhum outro grupo taxonômico de bactérias de amostras fecais (Figura 32D).

5 DISCUSSÃO

Muitos lepidópteros herbívoros, como *S. frugiperda*, são altamente polívoros e naturalmente expostos a bactérias através da dieta. A composição das comunidades bacterianas intestinais exibe variação significativa em diversas ordens de insetos (BRODERICK et al., 2004; DILLON; DILLON, 2004; WONG; CHASTON; DOUGLAS, 2013; YUN et al., 2014). Características como fisiologia do intestino e estágio de desenvolvimento do hospedeiro e seleção da dieta podem influenciar a colonização e estabelecimento da microbiota intestinal. Inúmeros estudos sugeriram que a dieta é o fator majoritário em modular a diversidade bacteriana em insetos hospedeiros (COLMAN; TOOLSON; TAKACS-VESBACH, 2012; LUNDGREN; LEHMAN, 2010; TANG et al., 2012).

Neste trabalho, verificamos que o consumo de tetraciclina e do inibidor de peptidase de soja em dieta natural, separadamente e em conjunto, pelas lagartas *S. frugiperda* reduziu significativamente as populações bacterianas proteolíticas cultiváveis em meio ágar-leite (Figuras 12 e 13). Como característica de um composto de amplo espectro de ação estendendo-se a bactérias Gram positivas e negativas (PEREIRA-MAIA et al., 2010), a tetraciclina teve notável efeito sobre a quantidade da microbiota de lagartas provenientes de dietas diferentes (natural e artificial) em razão deste antibiótico se ligar a um sítio da subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo e, conseqüentemente, impedir a síntese protéica (POEHLSGAARD; DOUTHWAITE, 2005).

O conceito ecológico do termo microbiota se refere a um conjunto de microrganismos, majoritariamente bactérias, que habitam um ecossistema (LEY; PETERSON; GORDON, 2006), usualmente definido no contexto de composição e densidade. Apesar de uma variedade de filotipos bacterianos incluindo *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, etc., terem sido caracterizados e associados a intestinos de lepidópteros (PRIYA et al., 2012; SHAO et al., 2014; TANG et al., 2012) o papel que desempenham na fisiologia e adaptação das lagartas é pouco conhecido. BRODERICK e colaboradores (2004) sugeriram a possibilidade da microbiota intestinal em *Lymantria dispar* fornecer nutrientes essenciais ou exercer atividades bioquímicas relacionadas na digestão do alimento deste hospedeiro.

As serino endopeptidases dominam o intestino dos lepidópteros e contribuem com 95% da atividade digestiva total dos insetos desta ordem (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). Neste trabalho, apesar da redução expressiva das populações bacterianas proteolíticas intestinais de *S. frugiperda* com o antibiótico, não houve influência na alteração da expressão gênica e da atividade quantitativa das serino peptidases do tipo tripsina e quimotripsina das lagartas. Entretanto, observou-se pela primeira vez que a ingestão da tetraciclina mesmo em um curto intervalo de tempo (48 h) pelas lagartas coletadas em campo, gerou uma maior atividade de duas peptidases provavelmente trípticas (Figura 23). Sugere-se que estas lagartas nunca expostas à ingestão de antibiótico, apresentaram maior atividade destas enzimas (comparando com o controle) como resposta adaptativa ao estresse biótico. Neste estudo, embora não tenham sido isoladas peptidases secretadas por bactérias intestinais de *S. frugiperda* devido à necessidade da prévia caracterização da microbiota, SHINDE et al. (2012) observaram em trabalhos anteriores que as espécies de *Bacillus* sp. predominavam no intestino de *H. armigera*, possibilitando que isolassem e detectassem que as enzimas secretadas pela bactéria *B. subtilis* poderiam pertencer à classe de serino peptidases com atividade do tipo quimotríptica pois foram completamente inibidas por TPCK (inibidor de quimotripsinas). No nosso trabalho, foi usado o inibidor quimostatina, porém nenhuma inibição na atividade proteolítica foi observada na zimograma (dados não mostrados). Segundo LEE; ANSTEE (1995), as quimotripsinas de lepidópteros apresentam um sítio ativo mais extenso como característica diferencial das demais peptidases e, desta forma, TPCK e quimostatina não realizam o número de contatos suficientes para modificar quimicamente a enzima, impedindo a sua inativação (LOPES; SATO; TERRA, 2009).

Após verificado que poderia haver uma contribuição das peptidases das bactérias simbiontes ao processo digestivo de insetos, notou-se que as massas moleculares variavam entre 45 a 50 kDa aproximadamente (Figura 23). Baseado neste resultado e com base na literatura, podemos sugerir que como não há relatos de tripsinas de insetos com este padrão de massa molecular acima de 35 kDa (elas geralmente variam entre 20 a 35 kDa) (TERRA; FERREIRA, 1994), poderia haver a formação de oligômeros de enzimas, fenômeno observado por BRITO et al. (2001). Em estudos *in vivo* com pragas de tabaco *H. virescens*, os autores observaram que as tripsinas formaram oligômeros tanto em dieta artificial controle quanto naquelas

que ingeriram dieta natural contendo inibidor em folhas de tabaco, porém verificaram que os oligômeros da última dieta eram mais estáveis provavelmente devido à alteração na constituição enzimática. Diante deste fato, como mecanismo de adaptação, sugere-se que tanto as lagartas *S. frugiperda* coletadas em campo que ingeriram dieta com antibiótico quanto com IPS e IPS com tetraciclina tenham provavelmente formado oligômeros, favorecendo a insensibilidade destas tripsinas (Figura 23). De forma semelhante aos resultados obtidos por BRITO et al. (2001), nos zimogramas das figuras 22 e 24, as lagartas criadas em laboratório apresentaram possíveis oligômeros de enzimas trípticas tanto naquelas que se alimentaram de dieta natural controle quanto nos outros tratamentos. Diante do exposto, sugere-se que as lagartas provenientes de diferentes ambientes e submetidas à ingestão de diferentes dietas, principalmente aquelas com extrato de IP de soja constituído por inibidores Kunitz e Bowman-Birk, apresentam as atividades enzimáticas trípticas mais afetadas do que quimotrípticas possivelmente pelo fato do Kunitz ser responsável por 80% da inibição da atividade tríptica, além do inibidor do tipo Bowman-Birk apresentar atividade inibitória independente tanto para tripsinas quanto para quimotripsinas (ODANI; IKENAKA, 1972). Como elucidado por PAULILLO e colaboradores (2000), as lagartas *S. frugiperda* apresentam maior quantidade de tripsinas (48 U por intestino médio) do que quimotripsinas (8 U/ IM) de tal forma que espera-se que inibidores de tripsina, como Kunitz sejam mais efetivos nesta espécie e, possivelmente favoreçam a maior tendência das tripsinas em formarem prováveis complexos oligoméricos.

Nos ensaios *in vitro* realizados por PAULILLO e colaboradores (2000), a ingestão crônica do mesmo extrato concentrado de IP de soja por *S. frugiperda* afetou significativamente a atividade quantitativa tríptica e quimotríptica diferentemente dos nossos resultados (Figuras 19 e 20), pois vale frisar que a ingestão aguda de IPS (48 h) por esta espécie foi suficiente para alterar apenas qualitativamente a atividade das peptidases visualizadas nos zimogramas (Figuras 22 e 23). Isso pode ser justificado provavelmente não apenas com relação ao diferente tempo de exposição ao inibidor de peptidase de soja, mas às distintas dietas utilizadas para incorporação deste inibidor, ou seja, foi utilizado dieta artificial no estudo feito por PAULILLO et al. (2000) e neste trabalho utilizou-se folhas de soja (dieta natural). Em um estudo comparativo envolvendo lagartas *H. armigera* de quinto instar que se alimentaram por 24 h de dieta artificial e de diferentes cultivares

de soja com a finalidade de estudar as diferenças nas atividades das peptidases do intestino médio foi constatado que o maior nível de atividade proteolítica total foi proveniente de lagartas que ingeriram dieta artificial (NASERI et al., 2010) corroborando com os dados da figura 21C, pois a composição da dieta artificial de lagartas normalmente apresenta alto conteúdo protéico e é nutricionalmente balanceada para proporcionar o melhor desenvolvimento morfológico de insetos comparado com qualquer tipo de dieta natural (KOTKAR et al., 2009). Inclusive, segundo NASERI e colaboradores (2010) a atividade trípica foi maior em *H. armigera* que ingeriram dieta artificial quando comparada com os diferentes cultivares de soja, corroborando novamente com os ensaios *in vitro* da figura 21A e com o perfil das putativas tripsinas do zimograma (Figura 24).

A resposta imediata da ingestão aguda de IPS por esta espécie refletiu na regulação seletiva de genes de serino peptidases, resultando no aumento da expressão relativa da maioria dos genes de quimotripsina (Figura 14), enquanto que a expressão de grande parte dos genes de tripsina (Figura 15) manteve-se a nível basal. Em um estudo temporal elucidado por BOWN e colaboradores (2004) nas primeiras 12 h após ingerirem inibidores Kunitz e Bowman-Birk de soja, lagartas *H. armigera* induziram a expressão geral de tripsinas e quimotripsinas (regulação geral denominada de *shotgun* por BRIOSCHI et al. (2007). Entretanto entre 12 e 24 h, houve uma redução na expressão das peptidases mais sensíveis e, após 24 h de exposição ao inibidor, detectou-se que os genes que codificavam as enzimas insensíveis continuavam a ser expressos de forma seletiva (BOWN et al., 2004). Como nossos experimentos foram realizados com *S. frugiperda* expostas ao IP de soja por 48 h, a inibição das tripsinas foi compensada pela indução da expressão de genes de quimotripsinas, candidatas enzimas insensíveis, corroborando com resultados parecidos obtidos por KUWAR et al. (2015) em estudos de regulação de expressão gênica temporal de serino endopeptidases com *H. armigera* submetidas à dieta com SKTI. Experimentos futuros envolvendo a clonagem destes genes e a expressão das enzimas candidatas poderão ser utilizados num sistema de expressão *in vitro* com ensaios enzimáticos a fim de comprovar a sensibilidade/insensibilidade de tripsinas e/ou quimotripsinas ao inibidor de peptidase de soja.

SOUZA (2013) tentou correlacionar as evoluções filogenéticas dos genes de tripsina e quimotripsina com a expressão relativa dos mesmos visando classificar

enzimas consideradas sensíveis e insensíveis em relação à interação com inibidor, entretanto esta correlação foi possível apenas com os genes de tripsinas em que a autora subdividiu o grupo em dois: no primeiro, as SfTrys 1, 2, 7 e 11 foram consideradas sensíveis, enquanto que o segundo grupo de enzimas insensíveis foi formado pelas SfTrys 6, 8, 9, 10 e 12. Com relação ao primeiro grupo, em nosso estudo o único gene de tripsina que apresentou um sutil aumento na expressão gênica em resposta ao IPS foi o SfTry 7 quando comparado com o controle (Figura 15) nas lagartas *S. frugiperda* criadas em laboratório, porém esta expressão não foi responsiva nas lagartas coletadas em campo que ingeriram inibidor (Figura 14). No grupo das enzimas insensíveis, o gene da tripsina 8 foi significativamente o mais expresso, como dados obtidos por SOUZA (2013), tanto em *S. frugiperda* advindas de criação em laboratório quanto nas de campo, respectivamente nas figuras 15 e 17, alimentadas com dieta natural contendo IP de soja. No nosso trabalho, não houve alteração na expressão do restante dos genes do segundo grupo. MAHAJAN et al. (2013) abordaram que um dos principais fatores que podem influenciar na regulação e expressão diferencial de genes de tripsina e quimotripsina seja o tempo de exposição que um lepidóptero é submetido à ingestão de dieta contendo inibidor. Eles verificaram que em lagartas *H. armigera* que ingeriram o inibidor multi-domínio Pin-II de *Capsicum annuum* (CanPI-7) cronicamente e de forma aguda apresentaram diferenças mais notórias na expressão destes genes em *H. armigera* que se alimentaram de CanPI-7 desde os primeiros estágios de desenvolvimento, assim como nos resultados verificados por SOUZA (2013) em que lagartas *S. frugiperda* foram submetidas à ingestão de IP de soja desde o estágio neonata até o sexto instar, e diferentemente dos dados aqui apresentados devido à ingestão aguda de IPS por *S. frugiperda*.

Sabe-se que a estrutura básica do trato digestivo é similar entre as ordens de insetos (ENGEL; MORAN, 2013), compartimentalizado em três partes: intestino anterior, médio e posterior (CHAPMAN, 1998). O intestino de herbívoros lepidópteros como *S. frugiperda* ocupa praticamente todo o corpo do inseto, pois esta estrutura tem como provável finalidade a rápida passagem e processamento de grandes quantidades de material vegetal, tendo sido estimado a duração de tempo que o alimento permanece no trato digestivo desta espécie ser de aproximadamente 3 horas (LWALABA; HOFFMANN; WOODRING, 2010). As condições alcalinas do pH do conteúdo intestinal em lepidópteros (TERRA; FERREIRA, 1994) associada

com a rápida passagem do bolo alimentar influenciam seletivamente a composição da microbiota intestinal e fecal, limitando a diversidade bacteriana. Além disso, a composição da microbiota pode variar de acordo com o tipo de alimento ingerido e o estágio de desenvolvimento larval (TANG et al., 2012), especialmente durante a fase de pré-pupa e pupa cujo intestino médio em lepidópteros é reestruturado e a membrana peritrófica é perdida, expondo o lúmen intestinal à contaminação por bactérias da superfície cuticular (RUSSELL, V.; DUNN, 1996). Desta forma, neste trabalho a coleta de fezes foi realizada em lagartas ao final do quinto instar.

A saturação das curvas de rarefação (Figura 25, Anexo B) e os valores de cobertura de todas as amostras (Tabela 4) sugerem que a microbiota fecal de *S. frugiperda* foi amostrada efetivamente. Neste trabalho, os valores médios do índice de diversidade Shannon (H') detectados nas amostras fecais de *S. frugiperda* que se alimentaram de dieta artificial (1,7) e aqueles coletados em campo que ingeriram cartucho do milho (2,16) (Tabela 4) foram consideravelmente maiores que os índices H' verificados em amostras intestinais de *S. littoralis* (de 10 dias) tanto em dieta artificial (0,9) quanto natural (1,2) (TANG et al., 2012), sugerindo com estes dados que a composição da microbiota de *S. frugiperda* possa ser um pouco mais complexa. Com resultados contrários, lepidópteros de quarto instar *Pieris rapae* alimentados com dieta artificial e dieta natural apresentaram índices médios Shannon, respectivamente, 1,2 e 0,7. Estes autores confirmaram que folhas utilizadas apresentavam um componente fitoquímico com propriedade bactericida (ROBINSON et al., 2010).

Pelo nosso conhecimento, esta é primeira vez que se estuda o efeito do IP de soja e da tetraciclina sobre a composição da microbiota fecal de lagartas *S. frugiperda* que se alimentaram de folhas incubadas com os respectivos tratamentos. Notou-se um aumento da média dos índices de diversidade H' tanto nas lagartas coletadas em campo que ingeriram folhas de soja controle, com antibiótico e com IPS (3,3; 3,5; 2,8, respectivamente) quanto naquelas provenientes de criação em laboratório (3,6; 3,2; 2,9, respectivamente) (Tabela 4). Este aumento corroborou com resultados obtidos por ROBINSON et al. (2010) que detectaram o efeito do composto fitoquímico com propriedade bactericida (extraído da dieta natural) e de dois antibióticos em dieta artificial sobre a alteração da diversidade bacteriana intestinal de *P. rapae*, resultando no aumento dos índices de diversidade H' , respectivamente, 1,7 e 2,0. Segundo estes autores, a presença destes dois

tratamentos perturbou a estrutura da comunidade, alterando a abundância relativa de vários membros, como pode ter ocorrido com a diversidade da microbiota fecal de *S. frugiperda* após sofrerem exposição ao IPS e à tetraciclina com atividades antibacterianas.

Na literatura, há ainda poucas informações da diversidade bacteriana em insetos lepidópteros, diferentemente de outras ordens de insetos e de mamíferos. Um dos primeiros trabalhos com lepidópteros caracterizando bactérias do intestino de lagartas *L. dyspar* de terceiro instar alimentadas com dieta artificial e natural utilizou a combinação de análise do sequenciamento do gene inteiro 16S rRNA de bactérias cultiváveis e não cultiváveis. A maioria das sequências identificada nesta espécie pertencia aos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* e a minoria à *Actinobacteria* (BRODERICK, N. A. et al., 2004), corroborando com nossos resultados para abundância relativa de filos bacterianos em fezes de *S. frugiperda* (Figura 27). A microbiota de intestino ou fezes de insetos apresenta consistência dos filos predominantes *Proteobacteria* e *Firmicutes* (BELDA et al., 2011; ROBINSON et al., 2010; TANG et al., 2012; WONG; NG; DOUGLAS, 2011), como em estudos realizados por JONES e colaboradores (2013) que observaram maior abundância de membros do filo *Proteobacteria* em oito ordens de insetos, incluindo lepidópteros, sugerindo alguma atividade funcional importante. Enquanto que as bactérias analisadas em todas as fezes e intestinos de mamíferos têm como filos predominantes *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (ECKBURG et al., 2005; LEE; HASE, 2014). A tendência na estabilidade de níveis taxonômicos mais elevados, como filos, e flexibilidade em níveis mais baixos, como espécies, pode indicar uma função desempenhada pela comunidade geralmente mais importante que membros específicos (ROBINSON et al., 2010).

Neste trabalho, membros do grupo de bactérias do filo *Firmicutes* de fezes de *S. frugiperda* que ingeriram dieta artificial foram mais abundantes significativamente que em lagartas alimentadas com dieta natural, tanto em folhas de soja (Figura 29) quanto naquelas coletadas em cartucho de milho no campo (Figura 28), sendo os principais filotipos identificados correspondentes a *Enterococcus* (Figura 31). Este mesmo gênero predominou em lepidópteros criados em laboratório *Plutella xylostella* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010), *S. littoralis* (TANG et al., 2012), e em *H. armigera* (MADHUSUDAN et al., 2011), chegando a 84% de frequência destas bactérias *Enterococcus* sp. na mesma espécie de lagarta *H. armigera* criada em

dieta artificial (XIANG et al., 2006). Inclusive, populações de *Enterococcus* foram mais abundantes em lagartas *M. sexta* alimentadas em dieta natural, especificamente em folhas de tabaco (BRINKMANN; MARTENS; TEBBE, 2008), além de ter predominado em insetos de outras ordens (MARTIN; MUNDT, 1972), incluindo Diptera (COX; GILMORE, 2007) e Coleoptera (LEHMAN; LUNDGREN; PETZKE, 2009). O fato de insetos manterem este gênero no trato intestinal sugere benefícios em potencial. Numa tentativa de distinguir entre bactérias abundantes e metabolicamente ativas de intestino e fezes de *M. sexta* alimentadas com folhas de tabaco, BRINKMANN e colaboradores (2008) compararam os perfis genéticos de polimorfismo fita simples usando produtos de PCR do RNA ribossomal 16S utilizando transcriptase reversa (cDNA) através da mobilidade diferencial por eletroforese em gel de poliacrilamida (técnica denominada RT-PCR-SSCP). Os perfis dos ovos, intestinos e fezes destas lagartas foram dominados por apenas uma banda e o sequenciamento da banda teve identidade com membros *Enterococcus*. Os autores demonstraram que a respectiva banda ocorreu na fração mais pesada do RNA provavelmente por maiores cópias desta molécula, sugerindo uma atividade metabólica. Para confirmar esta atividade, os autores criaram lagartas *M. sexta* cronicamente ingerindo folhas de tabaco em um ambiente enriquecido com $^{13}\text{CO}_2$ a fim de identificar bactérias que assimilaram este substrato por meio de uma sonda de isótopo estável (SIP), seguida da eletroforese RT-PCR-SSCP. Os resultados do SIP confirmaram que o filotipo *Enterococcus* correspondeu à bactéria mais abundante metabolicamente dentro do intestino da lagarta, mas não foi caracterizada esta atividade metabólica. Esta mesma banda não foi detectada nas amostras de folha, mas em ovos de tal forma que os autores sugeriram que estas lagartas possam ter adquirido estas bactérias por transmissão vertical (da mãe para a prole via contaminação de ovos com bactérias nas superfícies). Estas espécies de lagartas costumam ingerir os próprios ovos imediatamente após a eclosão (REINECKE; BUCKNER; GRUGEL, 1980), bem como outros lepidópteros. Porém, estudos recentes apontam que a probabilidade das bactérias associadas ao trato intestinal de lepidópteros de serem adquiridas pela dieta é maior do que serem transmitidos verticalmente pelos ovos da mãe (MASON; RAFFA, 2014).

VAN DER HOEVEN e colaboradores (2008) analisaram as sequências do gene 16S rRNA de bactérias do intestino de *M. sexta* criadas em dieta artificial sem antibiótico, sendo identificadas todas organismos Gram positivos, porém nenhuma

do gênero *Enterococcus*. Os autores sugeriram as outras bactérias Gram positivas em maiores quantidades competiram com filotipos *Enterococcus* por nutrientes e espaço físico, mas não apresentaram nada conclusivo. Inclusive, em gafanhotos *Melanoplus sanguinipe* da ordem Orthoptera criados em condições de laboratório, isolados de *Enterococcus* sp. do intestino e fezes destes insetos foram capazes de produzir acetato, além deste composto ter sido identificado em ambas estruturas digestivas de *M. sanguinipe* (MEAD; KHACHATOURIANS; JONES, 1988). Os autores sugeriram que este acetato possa ter a função de diminuir o pH intestinal do inseto, conferindo uma vantagem adaptativa ao hospedeiro, pois algumas toxinas de bactérias como *B. thuringiensis* são ativadas em pH alcalino em determinados lepidópteros (WILSON; BENOIT, 1993). Inclusive, lagartas *L. dyspar* que são mais suscetíveis às toxinas de *B. thuringiensis* apresentam pequenas populações de bactérias *Enterococcus* sp., especificamente *E. faecalis* no intestino médio deste hospedeiro (BRODERICK et al., 2003).

A identificação de UTOs a 97% de identidade usando sequências do gene 16S rRNA revelou que o intestino da maioria de insetos é bastante simplificado constituído entre 5 a 30 táxons (ROBINSON et al., 2010; WONG et al., 2011) quando comparado com de mamíferos cuja comunidade é mais complexa consistindo de mais de 500 táxons (COSTELLO et al., 2009; DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007). Sugere-se que estas diferenças ocorram devido à imunidade adaptativa de todos os vertebrados que respondem a diferentes microrganismos com base em interações passadas como um tipo de “memória de imunidade”, podendo estimular a diversidade bacteriana mantendo uma comunidade coevoluída, enquanto que os invertebrados possuem um mecanismo mais precário sem este tipo de “memória” (MCFALL-NGAI, 2007). Além disso, nas lagartas *S. frugiperda*, uma barreira física no trato digestivo denominada de membrana peritrófica limita a passagem de microrganismos invasores para o lúmen intestinal, mantendo provavelmente baixa a diversidade daqueles que persistem e residem no intestino (FERREIRA et al., 1994).

Neste trabalho, além do filotipo *Enterococcus*, outros três filotipos em nível de gênero *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Klebsiella* predominaram na maioria das sequências das fezes de *S. frugiperda* tanto criadas em condições de laboratório quanto provenientes do campo, alimentadas com dietas naturais com diferentes tratamentos (Figura 31). Lagartas *S. frugiperda* coletadas em cartucho de milho em

campo apresentaram abundância de filotipos *Klebsiella* (acima de 60%). Isolados deste filotipo foram identificados em análises de sequenciamento de bactérias cultiváveis de lagartas de campo do mesmo gênero *S. littoralis* (ÇAKICI et al., 2014). Uma provável explicação para a alta frequência de *Klebsiella* sp. em lagartas de campo, segundo (DILLON et al., 2005) pode ser de que a microbiota de insetos herbívoros, como gafanhotos *Schistocerca gregaria*, incluindo espécies deste gênero está adaptada a metabolizar compostos químicos de plantas em antimicrobianos com intensa atividade contra bactérias patogênicas ou não residentes, tendo impacto sobre a composição da microbiota, pois bactérias Gram negativas como *Klebsiella* sp. geralmente são mais resistentes do que Gram positivas aos agentes bactericidas (RUSSELL, A.; GOULD, 1988).

As comunidades *Acinetobacter* sp. constituíram a microbiota fecal de *S. frugiperda* que se alimentaram de ambos os tipos de folhas (cartucho de milho e soja, estas últimas tratadas ou não) (Figura 31). Resultados similares foram observados com lepidópteros *B. mori* de quinto instar alimentadas com folhas de alface cujas bactérias intestinais mais predominantes corresponderam ao filotipo *Acinetobacter* (LIANG et al., 2014), sendo também detectadas em lepidópteros de campo de quinto instar *H. armigera* (MADHUSUDAN et al., 2011) e em bactérias cultiváveis de lagartas de campo *S. littoralis* (ÇAKICI et al., 2014). Populações *Acinetobacter* são comumente encontradas em plantas, em solos e muito constante em insetos (GEIGER et al., 2009) com papel ecológico de degradar compostos tóxicos como pesticidas (HAO et al., 2002). Nas lagartas provenientes do campo que ingeriram folhas de soja com antibiótico tetraciclina por apenas 48 horas, houve redução de quatro vezes das populações *Acinetobacter* na microbiota fecal comparada com aquelas que se alimentaram de folhas controle (Anexo C), corroborando com ROBINSON e colaboradores (2010) cujas bactérias deste gênero sofreram redução de duas vezes em lagartas *P. rapae* quando adicionado antibióticos na dieta. Entretanto, quando *S. frugiperda* de campo se alimentou de folhas com IP de soja, a proporção das bactérias *Acinetobacter* mais que dobrou quando comparado com populações da soja controle (Anexo C). Mesmo que nós detectamos que o IP de soja reduziu significativamente as populações bacterianas proteolíticas do intestino de *S. frugiperda* (Figuras 12 e 13), algumas bactérias podem apresentar tolerância a determinados metabólitos químicos vegetais e variar na capacidade de metabolizar estas toxinas (BOONE et al., 2013; MILLER; KOHL;

DEARING, 2014). Os filotipos *Acinetobacter* sofreram aumento da abundância no intestino de lagartas *L. dispar* após ingerirem compostos fenólicos de glicosídeos adicionados em dieta artificial, além de terem sido responsáveis pela redução do conteúdo deste metabólico sugerindo que as interações entre membros de comunidades bacterianas, e entre a microbiota e o inseto hospedeiro, podem estar envolvidas na detoxificação de sistemas de herbivoria (MASON; COUTURE; RAFFA, 2014), porém o papel destas bactérias na fitofagia da espécie *S. frugiperda* é apenas especulativo.

A presença de bactérias Gram negativas *Stenotrophomonas* apenas em lagartas *S. frugiperda* provenientes de múltiplas gerações em dieta artificial que ingeriram as folhas de soja controle e tratadas sugere a influência da ingestão de um dos componentes da dieta artificial (Tabela 1) desenvolvida por MIHSFELDT; PARRA (1999), pois uma das principais características da microbiota deste gênero é a resistência a uma ampla gama de antibióticos, incluindo a tetraciclina (DENTON; KERR, 1998; POULOS et al., 1995).

Finalmente, verificamos no nosso trabalho que a dieta foi a principal variável que modulou as comunidades bacterianas das fezes das lagartas *S. frugiperda* (Figuras 32A a D), pois contribuiu significativamente na alteração da estrutura da microbiota conforme as condições de criação, campo e laboratório (Figuras 32A e C) e formou agrupamentos similares filogeneticamente das populações bacterianas conforme a natureza e composição da dieta (Figuras 32B e D). Inclusive, um resultado interessante observado nas figuras 32B e D foi que a ingestão de IPS em folhas de soja, mesmo por um curto intervalo de tempo, pelas lagartas de campo nunca expostas à este inibidor, foi suficiente para modular a estrutura destas comunidades bacterianas que apresentaram similaridade filogenética, relevante estatisticamente, com os grupos de bactérias de fezes de lagartas criadas em condições de laboratório que ingeriram folhas controle e tratadas (com IPS e antibiótico). Como observamos que o IPS possui atividade antibacteriana (Figuras 12 e 13), a ingestão pelas lagartas de campo do inibidor de peptidase de soja pode ter alterado a estrutura destas populações.

A dieta pode afetar tanto diretamente as condições dentro do hospedeiro como induzindo mudanças do pH intestinal (APPEL; MAINES, 1995; SCHULTZ; LECHOWICZ, 1986) quanto indiretamente afetam a microbiota que, por sua vez, pode favorecer com que o inseto polígrafo utilize diferentes espécies de plantas como

alimento. Há insetos, como as formigas, que requerem de fontes adicionais ou outro meio de fixação de nitrogênio devido à baixa quantidade em aminoácidos essenciais nos exsudatos vegetais (DAVIDSON et al., 2003) de tal forma que esta deficiência alimentar é compensada por determinadas bactérias simbiontes (STOLL et al., 2007), sugerindo que as bactérias estiveram relacionadas com a evolução convergente da herbivoria nas formigas (RUSSELL et al., 2009).

Apesar de que este estudo não tenha caracterizado funcionalmente a microbiota fecal dos lepidópteros *S. frugiperda*, este trabalho é promissor por detalhar informações importantes e inéditas referentes à taxonomia e diversidade da comunidade bacteriana nas fezes de lagartas desta espécie em diferentes dietas nunca testadas. Com estes novos dados taxonômicos, poderemos isolar as bactérias a partir das fezes de *S. frugiperda* e estudar a significância funcional destes simbiontes como, por exemplo, detoxificação de compostos tóxicos como inibidores de peptidases de plantas, papel digestivo e nutricional destas bactérias para as lagartas desta espécie.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Não é possível afirmar se haveria uma contribuição das peptidases das bactérias simbiontes ao processo digestivo de insetos;
- ✓ Os filos bacterianos mais predominantes corresponderam a *Proteobacteria* (73,3%) e *Firmicutes* (24,2%) associada às fezes de *S. frugiperda*, sendo ambos os filotipos mais abundantes nos grupos de insetos;
- ✓ A dieta apresentou-se como a principal variável que modulou a estrutura das comunidades bacterianas fecais destas lagartas.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, R.; PADILLA, B. E.; FLÓREZ-RAMOS, C. P.; RUBIO, J. D.; HERRERA, J. C.; BENAVIDES, P.; LEE, S.-J.; YEATS, T. H.; EGAN, A. N.; DOYLE, J. J. Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 11, p. 4197-4202, 2012.
- ANDERT, J.; MARTEN, A.; BRANDL, R.; BRUNE, A. Inter-and intraspecific comparison of the bacterial assemblages in the hindgut of humivorous scarab beetle larvae (*Pachnoda* spp.). **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 439-449, 2010.
- ANSELME, C.; PÉREZ-BROCAL, V.; VALLIER, A.; VINCENT-MONEGAT, C.; CHARIF, D.; LATORRE, A.; MOYA, A.; HEDDI, A. Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. **BMC biology**, London, v. 6, n. 1, p. 43, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/6/43>>. Acesso em: 28 out. 2015.
- ANSELME, C.; VALLIER, A.; BALMAND, S.; FAUVARQUE, M.-O.; HEDDI, A. Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 6766-6772, 2006.
- APPEL, H.; MAINES, L. The influence of host plant on gut conditions of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 241-246, 1995.
- BAKER, G.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.
- BALMAND, S.; VALLIER, A.; VINCENT-MONÉGAT, C.; VIGNERON, A.; WEISS-GAYET, M.; ROCHAT, D.; HEDDI, A. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. **Science**, Washington, v. 334, n. 6054, p. 362-365, 2011.
- BARBETA, B. L.; MARSHALL, A. T.; GILLON, A. D.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 4, p. 1221-1225, 2008.
- BELDA, E.; PEDROLA, L.; PERETÓ, J.; MARTÍNEZ-BLANCH, J. F.; MONTAGUD, A.; NAVARRO, E.; URCHUEGUÍA, J.; RAMÓN, D.; MOYA, A.; PORCAR, M. Microbial diversity in the midguts of field and lab-reared populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0021751>>. Acesso em: 26 out. 2015.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, London, v. 57, 289–300, 1995.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soybeans. **The Biochemical Journal**, London, v. 87, n. 2, p. 281, 1963.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J.; HARTLEY, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**, London, v. 221, p. 337-340, 1969.

BOONE, C. K.; KEEFOVER-RING, K.; MAPES, A. C.; ADAMS, A. S.; BOHLMANN, J.; RAFFA, K. F. Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 39, n. 7, p. 1003-1006, 2013.

BOSCO-DRAYON, V.; POIDEVIN, M.; BONECA, I. G.; NARBONNE-REVEAU, K.; ROYET, J.; CHARROUX, B. Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. **Cell host & microbe**, London, v. 12, n. 2, p. 153-165, 2012.

BOWMAN, D. E. Differentiation of soybean antitryptic factors. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 63, n. 3, p. 547-550, 1946.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 278-290, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRINKMANN, N.; MARTENS, R.; TEBBE, C. C. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 23, p. 7189-7196, 2008.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 128, n. 2, p. 365-375, 2001.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996.

_____. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 855-874, 1997.

BROCK, F.; FORSBERG, C.; BUCHANAN-SMITH, J. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 561-569, 1982.

BRODERICK, N.; GOODMAN, R.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. Effect of host diet and insect source on synergy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki by zwittermicin A. **Environmental entomology**, College Park, v. 32, n. 2, p. 387-391, 2003.

BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 293-300, 2004.

BUCHON, N.; BRODERICK, N. A.; POIDEVIN, M.; PRADERVAND, S.; LEMAITRE, B. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. **Cell host & microbe**, London, v. 5, n. 2, p. 200-211, 2009.

ÇAKICI, F. Ö.; SEVİM, A.; DEMIRBAG, Z.; DEMİR, A. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, n. 1, p. 99-110, 2014. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-14-38-1/tar-38-1-12-1302-65.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2015.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PENA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, New York, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The International Society for Microbial Ecology journal**, New York, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CHANDLER, J. A.; LANG, J. M.; BHATNAGAR, S.; EISEN, J. A.; KOPP, A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 9, p. e1002272, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002272>>. Acesso em: 28 out. 2015.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of statistics**, Stockholm, p. 265-270, 1984.

CHAPMAN, R. F. Alimentary canal, digestion and absorption. In: CHAPMAN, R. F. (4th Ed.). **The insects**: structure and function. Cambridge: Cambridge university press, 1998. cap. 3, p. 38-66.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian journal of ecology**, Carlton, v. 18, p. 117-117, 1993.

COLMAN, D. R.; TOOLSON, E. C.; TAKACS-VESBACH, C. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 20, p. 5124-5137, 2012.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, Washington, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

COX, C. R.; GILMORE, M. S. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1565-1576, 2007.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I.; TURPIN, F. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; TURPIN, F. Yield impact of larval infestations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to midwhorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, n. 5, p. 1052-1054, 1983.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho**: o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 1999. 39p. (Circular técnica, 31).

DAFFRE, S.; KYLSTEN, P.; SAMAKOVLIS, C.; HULTMARK, D. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 242, n. 2, p. 152-162, 1994.

DAVE, M.; HIGGINS, P. D.; MIDDHA, S.; RIOUX, K. P. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, New York, v. 160, n. 4, p. 246-257, 2012.

DAVIDSON, D. W.; COOK, S. C.; SNELLING, R. R.; CHUA, T. H. Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. **Science**, Washington, v. 300, n. 5621, p. 969-972, 2003.

DAVIS, F. M.; BAKER, G. T.; WILLIAMS, W. P. Anatomical characteristics of maize resistant to leaf feeding by southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 12, n. 1, p. 55-65, 1995.

DE ARAÚJO, W. S.; VIEIRA, M. C.; LEWINSOHN, T. M.; ALMEIDA-NETO, M. Contrasting Effects of Land Use Intensity and Exotic Host Plants on the Specialization of Interactions in Plant-Herbivore Networks. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e0115606, 2015. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/metrics/info:doi/10.1371/journal.pone.0115606>>. Acesso em: 28 out. 2015.

DE LEO, F.; BONADE-BOTTINO, M. A.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 118, n. 3, p. 997-1004, Nov 1998.

DE MENDONÇA, E. G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C.; RIBEIRO, F. R.; DE OLIVEIRA, J. A. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*, criada em diferentes dietas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 18-24, 2009.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; SOUZA, T. P.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M. C.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 165, n. 1, p. 19-25, 2013.

DELMAR, E.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.; GEOKAS, M. A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Analytical biochemistry**, New York, v. 99, n. 2, p. 316-320, 1979.

DENTON, M.; KERR, K. G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 57-80, 1998.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, London, v. 449, n. 7164, p. 811-818, 2007.

DILLON, R.; DILLON, V. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Reviews of Entomology**, London, v. 49, n. 1, p. 71-92, 2004.

DILLON, R.; VENNARD, C.; BUCKLING, A.; CHARNLEY, A. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 1291-1298, 2005.

DOUGLAS, A. E. Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 60, p. 17-34, 2015.

DUNSE, K.; KAAS, Q.; GUARINO, R.; BARTON, P.; CRAIK, D.; ANDERSON, M. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15016-15021, 2010.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, Washington, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, London, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EGERT, M.; WAGNER, B.; LEMKE, T.; BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. W. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6659-6668, 2003.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A. N.; SITNIK, R.; TERRA, W. R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, New York, v. 107, n. 4, p. 631-640, 1994.

FIGUEIREDO, M. D. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1693-1698, 2006.

FORISTER, M. L.; NOVOTNY, V.; PANORSKA, A. K.; BAJE, L.; BASSET, Y.; BUTTERILL, P. T.; CIZEK, L.; COLEY, P. D.; DEM, F.; DINIZ, I. R. The global distribution of diet breadth in insect herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, , Washington, v. 112, n. 2, p. 442-447, 2015.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3.ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GATEHOUSE, A. M.; GATEHOUSE, J. A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A. M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 30, n. 10, p. 948-958, 1979.

GEIGER, A.; FARDEAU, M.-L.; GREBAUT, P.; VATUNGA, G.; JOSÉNANDO, T.; HERDER, S.; CUNY, G.; TRUC, P.; OLLIVIER, B. First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 1364-1370, 2009.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACHEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GOOD, I. J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, London, v. 40, n. 3-4, p. 237-264, 1953.

GRÜNWARD, S.; PILHOFER, M.; HÖLL, W. Microbial associations in gut systems of wood-and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v. 33, n. 1, p. 25-34, 2010.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, New York, v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.

HANSEN, A. K.; MORAN, N. A. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. **Molecular ecology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1473-1496, 2014.

HAO, O. J.; KIM, M. H.; SEAGREN, E. A.; KIM, H. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. **Chemosphere**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 797-807, 2002.

HARRISON, J. F. Insect acid-base physiology. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 46, n. 1, p. 221-250, 2001.

HEDIN, P. A.; WILLIAMS, W. P.; DAVIS, F. M.; BUCKLEY, P. M. Roles of amino acids, protein, and fiber in leaf-feeding resistance of corn to the fall armyworm. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 16, n. 6, p. 1977-1995, 1990.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NASERI, B.; NAVARRO-CERRILLO, G.; ESCRICHE, B.; FERRE, J.; HERRERO, S. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 2730-2737, 2010.

JONES, R. T.; SANCHEZ, L. G.; FIERER, N. A cross-taxon analysis of insect-associated bacterial diversity. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e61218, 2013. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061218>>. Acesso em: 27 out. 2015.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 17, p. 8041-8045, 1995.

JORDAN, E. O. The Society of American Bacteriologists. **Science**, Washington, v. 17, n. 427, p. 369-380, 1903.

KIKUCHI, A.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, p. 1-5, 2013.

KIRSCH, R.; WIELSCH, N.; VOGEL, H.; SVATOŠ, A.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. **BMC genomics**, London, v. 13, n. 1, p. 587, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/587>>. Acesso em: 28 out. 2015.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, Oxford, p. gks808, 2012.

KOCH, H.; CISAROVSKY, G.; SCHMID-HEMPEL, P. Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 81, n. 6, p. 1202-1210, 2012.

KOEPKE, J.; ERMLER, U.; WARKENTIN, E.; WENZL, G.; FLECKER, P. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. **Journal of molecular biology**, London, v. 298, n. 3, p. 477-491, 2000.

KOTKAR, H. M.; SARATE, P. J.; TAMHANE, V. A.; GUPTA, V. S.; GIRI, A. P. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, n. 8, p. 663-670, 2009.

KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; WALTERS, W. A.; GONZÁLEZ, A.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. **Current protocols in microbiology**, New York, p. 1E. 5.1-1E. 5.20, 2012.

KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, Washington, v. 101, n. 2635, p. 668-669, 1945.

KUWAR, S. S.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 59, p. 18-29, 2015.

LAJEUNESSE, D. R.; JOHNSON, B.; PRESNELL, J. S.; CATIGNAS, K. K.; ZAPOTOCZNY, G. Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. **BMC physiology**, London, v. 10, n. 1, p. 14, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6793/10/14>>. Acesso em: 28 out. 2015.

LASKOWSKI, J.R.; M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 49-61, 1995.

LEE, W.-J.; HASE, K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. **Nature chemical biology**, New York, v. 10, n. 6, p. 416-424, 2014.

LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. **Journal of molecular biology**, London, v. 239, n. 2, p. 276-284, 1994.

LEHMAN, R. M.; LUNDGREN, J. G.; PETZKE, L. M. Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. **Microbial ecology**, New York, v. 57, n. 2, p. 349-358, 2009.

LEMAITRE, B.; MIGUEL-ALIAGA, I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v. 47, p. 377-404, 2013.

LEMKE, T.; STINGL, U.; EGERT, M.; FRIEDRICH, M. W.; BRUNE, A. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6650-6658, 2003.

LEMONS, L. N.; FULTHORPE, R. R.; TRIPLETT, E. W.; ROESCH, L. F. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 42-51, 2011.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, Washington, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 776-788, 2008a.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, Oxford, v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006.

LIANG, X.; FU, Y.; TONG, L.; LIU, H. Microbial shifts of the silkworm larval gut in response to lettuce leaf feeding. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 8, p. 3769-3776, 2014.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 55, n. 3, p. 140-152, 2004.

LOPES, A. R.; SATO, P. M.; TERRA, W. R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 70, n. 3, p. 188-1203, 2009.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KELLEY, S. T.; KNIGHT, R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 73, n. 5, p. 1576-1585, 2007.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 557-578, 2008.

LUNDGREN, J. G.; LEHMAN, R. M. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle. **PLoS one**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e10831, 2010. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010831>. Acesso em: 27 out. 2015.

LWALABA, D.; HOFFMANN, K. H.; WOODRING, J. Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 73, n. 1, p. 14-29, 2010.

MACEDO, M. L. R.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; COSTA, P. M.; CASTELHANO, E. C.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptive Mechanisms of Insect Pests Against Plant Protease Inhibitors and Future Prospects Related to Crop Protection: a Review. **Protein and peptide letters**, Hilversum, v. 22, n. 2, p. 149-163, 2015.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; DA SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. D. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenanthra pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 73, n. 4, p. 213-231, 2010.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; DE OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 158, n. 2, p. 164-172, 2011.

MADHUSUDAN, S.; JALALI, S.; VENKATESAN, T.; LALITHA, Y.; SRINIVAS, P. 16S rRNA gene based identification of gut bacteria from field collected larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from tomato ecosystem. **Asian Journal of Bio Science**, Taiwan, v. 6, n. 1, p. 106-113, 2011.

MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, London, v. 27, n. 21, p. 2957-2963, 2011.

MAGURRAN, A. E. Measuring biological diversity. **African Journal of Aquatic Science**, Johannesburg, v. 29, n. 2, p. 285-286, 2004.

MAHAJAN, N. S.; MISHRA, M.; TAMHANE, V. A.; GUPTA, V. S.; GIRI, A. P. Plasticity of protease gene expression in *Helicoverpa armigera* upon exposure to multi-domain *Capsicum annuum* protease inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3414-3420, 2013.

MARTIN, J. D.; MUNDT, J. O. *Enterococci* in insects. **Applied microbiology**, Washington, v. 24, n. 4, p. 575-580, 1972.

MASON, C. J.; COUTURE, J. J.; RAFFA, K. F. Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. **Oecologia**, Berlin, v. 175, n. 3, p. 901-910, 2014.

MASON, C. J.; RAFFA, K. F. Acquisition and structuring of midgut bacterial communities in gypsy moth (Lepidoptera: Erebididae) larvae. **Environmental entomology**, College Park, v. 43, n. 3, p. 595-604, 2014.

MCFALL-NGAI, M. Adaptive immunity: care for the community. **Nature**, London, v. 445, n. 7124, p. 153-153, 2007.

MEAD, L. J.; KHACHATOURIANS, G.; JONES, G. Microbial ecology of the gut in laboratory stocks of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.)(Orthoptera: Acrididae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1174-1181, 1988.

MICHAUD, D.; FAYE, L.; YELLE, S. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 94-98, 1993.

MIHSFELDT, L. H.; PARRA, J. R. P. Biology of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) reared on artificial diet. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 769-776, 1999.

MILLER, A. W.; KOHL, K. D.; DEARING, M. D. The gastrointestinal tract of the white-throated woodrat (*Neotoma albigula*) harbors distinct consortia of oxalate-degrading bacteria. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1595-1601, 2014.

MUEGGE, B. D.; KUCZYNSKI, J.; KNIGHTS, D.; CLEMENTE, J. C.; GONZÁLEZ, A.; FONTANA, L.; HENRISSAT, B.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. **Science**, Washington, v. 332, n. 6032, p. 970-974, 2011.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V.; GATEHOUSE, A. M. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest management science**, Sussex, v. 66, n. 12, p. 1316-1323, 2010.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors IV. Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. **The Journal of biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 5, p. 839-848, 1972.

OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Bauhinia Kunitz-type proteinase inhibitors: structural characteristics and biological properties. **Biological chemistry**, Berlin, v. 389, n. 8, p. 1007-1013, 2008.

OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. C.; SALLAI, R. C.; BRITO, M. V.; SAMPAIO, M. U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 11, p. 1667-1673, 2010.

ORTEGO, F. Physiological adaptations of the insect gut to herbivory. In: (Ed.). **Arthropod-Plant Interactions**: Springer, 2012. cap. 3, p.75-88.

PARAMESWARAN, P.; JALILI, R.; TAO, L.; SHOKRALLA, S.; GHARIZADEH, B.; RONAGHI, M.; FIRE, A. Z. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 35, n. 19, p. e130, 2007.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Measures of phylogenetic differentiation provide robust and complementary insights into microbial communities. **The International Society for Microbial Ecology journal**, New York, v. 7, n. 1, p. 173-183, 2013.

PARKS, D. H.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, London, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PAULILLO, L. C. M.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to

soybean proteinase inhibitors. **Journal of economic entomology**, College Park, v. 93, n. 3, p. 892-896, 2000.

PAULILLO, L. C. M. S.; MAGNO SEBBENN, A.; DE CARVALHO DERBYSHIRE, M. T. V.; GÓES-NETO, A.; DE PAULA BROTTTO, M. A.; FIGUEIRA, A. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* effects of semipurified proteinase inhibitors from *Theobroma* seeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 81, n. 1, p. 34-52, 2012.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. D.; SANTOS, H. D.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PERNICE, M.; SIMPSON, S. J.; PONTON, F. Towards an integrated understanding of gut microbiota using insects as model systems. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 69, p. 12-18, 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

POEHLGAARD, J.; DOUTHWAITE, S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 11, p. 870-881, 2005.

PÓLGAR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 53, n. 1, p. 2161-2172, 2005.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.; TERRA, W.; PARRA, J.; FALCO, M.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001.

POULOS, C.; MATSUMURA, S.; WILLEY, B.; LOW, D.; MCGEER, A. *In vitro* activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 39, n. 10, p. 2220-2223, 1995.

PRAKASH, B.; SELVARAJ, S.; MURTHY, M.; SREERAMA, Y.; RAO, D. R.; GOWDA, L. R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. **Journal of molecular evolution**, New York, v. 42, n. 5, p. 560-569, 1996.

PRIYA, N. G.; OJHA, A.; KAJLA, M. K.; RAJ, A.; RAJAGOPAL, R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e30768, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030768>>. Acesso em: 27 out. 2015.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 35, n. 21, p. 7188-7196, 2007.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, Oxford, p. gks1219, 2012.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, Limerick, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

REINECKE, J. P.; BUCKNER, J.; GRUGEL, S. Life cycle of laboratory-reared tobacco hornworms, *Manduca sexta*, a study of development and behavior, using time-lapse cinematography. **The Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 158, n. 1, p. 129-140, 1980.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: RODGERS, L.J. (Ed.). **Methods in plant biochemistry, Amino Acids, proteins, and nucleic acids**. New York: Academic Press, 1991. p. 259-305.

ROBINSON, C. J.; SCHLOSS, P.; RAMOS, Y.; RAFFA, K.; HANDELSMAN, J. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. **Microbial ecology**, New York, v. 59, n. 2, p. 199-211, 2010.

RUSSELL, A.; GOULD, G. Resistance of *Enterobacteriaceae* to preservatives and disinfectants. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 65, n. s17, p. 167S-195S, 1988.

RUSSELL, J. A.; MOREAU, C. S.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; FUJIWARA, M.; LOHMAN, D. J.; PIERCE, N. E. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 50, p. 21236-21241, 2009.

RUSSELL, V.; DUNN, P. E. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 65-71, 1996.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A.; PEARCE, G. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v. 14, n. 1, p. 1-17, 1998.

SARMENTO, R.; DE SOUZA, R. A.; DE SOUZA, R. S. A.; VIEIRA, S. J.; DE OLIVEIRA, U. H.; HOLTZ, A. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 2, 2002.

SCHMIDT, T. M.; BLEAKLEY, B.; NEALSON, K. H. Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 54, n. 11, p. 2793-2797, 1988.

SCHULTZ, J.; LECHOWICZ, M. Hostplant, larval age, and feeding behavior influence midgut pH in the gypsy moth (*Lymantria dispar*). **Oecologia**, Berlin, v. 71, n. 1, p. 133-137, 1986.

SHAO, Y.; ARIAS-CORDERO, E.; GUO, H.; BARTRAM, S.; BOLAND, W. In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085948>>. Acesso em: 27 out. 2015.

SHAO, Y.; SPITELLER, D.; TANG, X.; PING, L.; COLESIE, C.; MUNCHBERG, U.; BARTRAM, S.; SCHNEIDER, B.; BUDEL, B.; POPP, J.; HECKEL, D. G.; BOLAND, W. Crystallization of alpha- and beta-carotene in the foregut of *Spodoptera* larvae feeding on a toxic food plant. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 273-81, Apr 2011.

SHINDE, A. A.; SHAIKH, F. K.; PADUL, M. V.; KACHOLE, M. S. *Bacillus subtilis* RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin-like proteases. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 3, p. 317-323, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X12000228>>. Acesso em: 27 out. 2015.

SILVA, R.; CRUZ, I.; PENTEADO-DIAS, A. First report of *Dolichozele koebelei* Viereck, 1911 (Hymenoptera: Braconidae) on larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) in maize (*Zea mays* L.) under different cropping systems. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 74, n. 3, p. S218-S222, 2014.

SMIGOCKI, A. C.; IVIC-HAYMES, S.; LI, H.; SAVIĆ, J. Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e57303, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057303>>. Acesso em: 27 out. 2015.

SOBHY, I. S.; ERB, M.; LOU, Y.; TURLINGS, T. C. The prospect of applying chemical elicitors and plant strengtheners to enhance the biological control of crop pests. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 369, n. 1639, p. 2012-2083, 2014.

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. **Journal of molecular biology**, London, v. 275, n. 2, p. 347-363, 1998.

SOUZA, T. P. **Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda***. 2013. 85p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 11, n. 1, p. 132-54, 2006.

STEVENS, J.; DUNSE, K.; GUARINO, R.; BARBETA, B.; EVANS, S.; WEST, J.; ANDERSON, M. The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 197-208, 2013.

STILLER, M.; KNAPP, M.; STENZEL, U.; HOFREITER, M.; MEYER, M. Direct multiplex sequencing (DMPS)—a novel method for targeted high-throughput sequencing of ancient and highly degraded DNA. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 10, p. 1843-1848, 2009.

STOLL, S.; GADAU, J.; GROSS, R.; FELDHAAR, H. Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 90, n. 3, p. 399-412, 2007.

TANG, X.; FREITAK, D.; VOGEL, H.; PING, L.; SHAO, Y.; CORDERO, E. A.; ANDERSEN, G.; WESTERMANN, M.; HECKEL, D. G.; BOLAND, W. Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e36978, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036978>>. Acesso em: 27 out. 2015.

TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 35, n. 1, p. 181-200, 1990.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, New York, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; VALENTIN, A.; SANTOS, C. D. Utilization of sugars, hemicellulose, starch, protein, fat and minerals by *Erinnyis ello* larvae and the digestive role of their midgut hydrolases. **Insect biochemistry**, London, v. 17, n. 8, p. 1143-1147, 1987.

TSAL, Y.-L.; HAYWARD, R. E.; LANGER, R. C.; FIDOCK, D. A.; VINETZ, J. M. Disruption of *Plasmodium falciparum* Chitinase Markedly Impairs Parasite Invasion of Mosquito Midgut. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 6, p. 4048-4054, 2001.

VAN DER HOEVEN, R.; BETRABET, G.; FORST, S. Characterization of the gut bacterial community in *Manduca sexta* and effect of antibiotics on bacterial diversity and nematode reproduction. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 286, n. 2, p. 249-256, 2008.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WARNECKE, F.; LUGINBÜHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T. H.; STEGE, J. T.; CAYOUE, M.; MCHARDY, A. C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, London, v. 450, n. 7169, p. 560-565, 2007.

WATANABE, H.; NODA, H.; TOKUDA, G.; LO, N. A cellulase gene of termite origin. **Nature**, London, v. 394, n. 6691, p. 330-331, 1998.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 55, p. 609-632, 2010.

WHEAT, C. W.; VOGEL, H.; WITTSTOCK, U.; BRABY, M. F.; UNDERWOOD, D.; MITCHELL-OLDS, T. The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 51, p. 20427-20431, 2007.

WILKINSON, T. Disloyalty and treachery in bug-swapping shocker! **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 12, p. 659-661, 2001.

WILSON, G. R.; BENOIT, T. G. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, n. 1, p. 87-89, 1993.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WONG, A. C.; CHASTON, J. M.; DOUGLAS, A. E. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. **The International Society for Microbial Ecology journal**, New York, v. 7, n. 10, p. 1922-1932, 2013.

WONG, C. N. A.; NG, P.; DOUGLAS, A. E. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 1889-1900, 2011.

XIANG, H.; WEI, G.-F.; JIA, S.; HUANG, J.; MIAO, X.-X.; ZHOU, Z.; ZHAO, L.-P.; HUANG, Y.-P. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 52, n. 11, p. 1085-1092, 2006.

YANG, L.; TAN, Z.; WANG, D.; XUE, L.; GUAN, M.-X.; HUANG, T.; LI, R. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. **Scientific reports**, London, v. 4, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep04089>>. Acesso em: 27 out. 2015.

YUN, J.-H.; ROH, S. W.; WHON, T. W.; JUNG, M.-J.; KIM, M.-S.; PARK, D.-S.; YOON, C.; NAM, Y.-D.; KIM, Y.-J.; CHOI, J.-H. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 80, n. 17, p. 5254-5264, 2014.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 60, p. 233-252, 2015.

ANEXOS

ANEXO A - Os dados das sequências das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana das amostras fecais de *S. frugiperda* foram analisados utilizando o *pipeline* QIIME através dos principais scripts *python* (.py) detalhados abaixo

- (1) `add_qiime_labels.py` - i arquivo_FASTA - m Mapping_file.txt - c InputFileName - o sequencias_combinadas
- (2) `pick_closed_reference_otus.py` - i sequencias_combinadas.fna - r 97_otus.fasta - o otus/ - t 97_otu_taxonomy.txt
- (3) `alpha_diversity.py` - i otu_table.biom - m chao1, observed_species, shannon, goods_coverage - o indices_alpha - t 97_otus.tree
- (4) `alpha_rarefaction.py` - i otu_table.biom - o alpha_minimo/ - m Mapping_file.txt - t 97_otus.tree - e valor_cobertura_amostragem
- (5) `beta_diversity_through_plots.py` - i otu_table.biom - o beta_minimo/ - m Mapping_file.txt - t 97_otus.tree - e valor_cobertura_amostragem
- (6) `core_diversity_analyses.py` - i otu_table.biom - m Mapping_file.txt - c Description - t 97_otus.tree - e valor_cobertura_amostragem - o bray_curtis_diversity -- nonphylogenetic_diversity
- (7) `make_2d_plots.py` - i weighted_unifrac_pc.txt - m Mapping_file.txt - 2D_weighted
- (7) `make_2d_plots.py` - i unweighted_unifrac_pc.txt - m Mapping_file.txt - 2D_unweighted
- (7) `make_2d_plots.py` - i bray_curtis_pc.txt - m Mapping_file.txt - 2D_bray
- (8) `compare_categories.py` -- method anosim - i weighted_unifrac_dm.txt - m Mapping_file.txt - c Description - o anosim_weighted - n 999
- (8) `compare_categories.py` -- method anosim - i unweighted_unifrac_dm.txt - m Mapping_file.txt - c Description - o anosim_unweighted - n 999
- (8) `compare_categories.py` -- method anosim - i bray_curtis_dm.txt - m Mapping_file.txt - c Description - o anosim_weighted - n 999
- (9) `compare_distance_matrices.py` --method mantel - i weighted_unifrac_dm.txt, unweighted_unifrac_dm.txt, bray_curtis_dm.txt - o mantel - n 999
- (10) `summarize_taxa_through_plots.py` - i otu_table.biom - m Mapping_file.txt - c Description - o abundancia_relativa

ANEXO B - Curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs das amostras fecais de lagartas *S. frugiperda* submetidas à ingestão de diferentes dietas, obtidas pelo sequenciamento da plataforma Illumina Miseq, com um ponto de corte de 3% calculada a partir de valores mínimos de sequências para as comunidades bacterianas. (A) Lagartas coletadas em cartucho de milho no campo (Campo_Selvagem) comparadas com aquelas que ingeriram dieta artificial por duas gerações em condições de laboratório (Lab_Artificial) (Grupo 1). (B) Lagartas coletadas em campo e provenientes de criação em laboratório que ingeriram folhas de soja controle e tratadas com IP de soja e antibiótico tetraciclina (Grupo 2). As barras representam o desvio padrão da média das três amostras de fezes de *S. frugiperda* de cada tratamento

ANEXO C - Abundância dos amplicons das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana das amostras fecais de *S. frugiperda* alimentadas com diferentes dietas, expressas em % do total das leituras de sequências classificadas pelo Greengenes a 97% de identidade

Filo de bactérias	S	CC	CT	Ci	LC	LT	Li	DA	Frequência Total
<i>Proteobacteria</i>	81,6	63,7	62,5	92,3	93,7	96	96,1	0,4	73,3
<i>Firmicutes</i>	18	24,6	36,4	6,4	4	2	2,3	99,6	24,2
<i>Actinobacteria</i>	0,1	11,7	1,1	0,8	2,2	0,5	1,3	0	2,2
<i>Bacteroidetes</i>	0,3	0	0	0,4	0	1,6	0,3	0	0,3

Gêneros de bactérias	S	CC	CT	Ci	LC	LT	Li	DA	Frequência Total
<i>Acinetobacter</i>	8,8	22,2	5,4	48,2	28,1	19,8	31,1	0,1	20,5
<i>Stenotrophomonas</i>	0,1	0,3	0,5	1,1	24,1	36,5	28,4	0,1	11,4
<i>Klebsiella</i>	62,6	3,8	9,6	1,8	5	1,8	2,1	0,1	10,4
<i>Enterobacter</i>	0,2	12,6	24	6,2	7,1	4,6	5,7	0	7,5
<i>Pseudomonas</i>	0	0,1	0	1,1	3,8	2,2	0	0	1,1
<i>Serratia</i>	0	1,2	3,7	0,9	0	0	0	0	0,7
<i>Enterococcus</i>	17,1	24,3	36	3,3	4	2	2,2	99,4	23,5
<i>Paenibacillus</i>	0,1	0	0	3	0	0	0,1	0	0,4
<i>Arthrobacter</i>	0	11,4	1	0,6	2	0,5	1,2	0	2,1
<i>Chryseobacterium</i>	0	0	0	0,4	0	1,6	0,3	0	0,3
<i>Desconhecido</i>	11,1	24,1	19,8	33,4	25,9	31	28,9	0,3	22,1

Abreviações: S: Selvagem; CC, CT e Ci: Coletadas no campo e submetidas aos tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja em folhas de soja, respectivamente; LC, LT e Li: Advindas de criação em laboratório e submetidas aos tratamentos controle, tetraciclina e inibidor de peptidase de soja em folhas de soja, respectivamente; DA: mantidas em dieta artificial por duas gerações

ANEXO D - *Heatmap* com distribuição de frequência de filos bacterianos nas amostras fecais obtidas de *S. frugiperda* coletadas no campo e submetidas à ingestão de dieta artificial por duas gerações. A diferença na intensidade de cores representa a abundância relativa de taxonomias de bactérias em cada tratamento. O cladograma acima do *heatmap* indica relações filogenéticas das amostras investigadas gerado pelo programa STAMP. Abreviações: S: Selvagem; DA: dieta artificial (numerações correspondentes às réplicas biológicas)