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

**Microbiota intestinal e assinatura isotópica de adultos de
Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como
marcadores para a identificação da fonte alimentar de imaturos**

Adrian Augusto Sosa Gomez Rolim

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

Adrian Augusto Sosa Gomez Rolim
Licenciatura em Ciências Biológicas

Microbiota intestinal e assinatura isotópica de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como marcadores para a identificação da fonte alimentar de imaturos

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2014

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

Gomez Rolim, Adrian Augusto Sosa

Microbiota intestinal e assinatura isotópica de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como marcadores para a identificação da fonte alimentar de imaturos / Adrian Augusto Sosa Gomez Rolim. - - Piracicaba, 2014.
67 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Comunidade bacteriana 2. Etiqueta de sequenciamento 3. Pirosequenciamento
4. Simbiontes I. Título

CDD 632.78
G633m

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

DEDICO

Aos meus pais, Daniel Ricardo Sosa Gómez e Rosélis Rolim Lourenço Sosa Gómez, que sempre me apoiaram, motivaram e me guiaram

À minha esposa Renata e à nossa pequena Alice por me proporcionarem tantas alegrias e despertar a vontade de almejar novos objetivos;

Aos meus irmãos, Alexis e Daniele, pelo carinho e momentos de descontrações, muitas vezes necessárias;

E aos meus sogros, Iara e Gilberto, pelo incentivo e ajuda

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Fernando Luis CÔnsoli pela paciência e dedicação, pelas oportunidades, pelo conhecimento transmitido e pelo ambiente de trabalho.

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli e à equipe do Laboratório de Isótopos Estáveis – CENA, pela oportunidade de trabalhar e adquirir novos conhecimentos.

Ao Colegas de trabalho do Laboratório de Interação em Insetos da ESALQ, pela convivência, pelo aprendizado diário e satisfação de trabalhar em grupo.

A Monsanto pelo apoio e disponibilidade de material para realizar a pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, pela contribuição acadêmica e conhecimentos das diferentes áreas.

Ao Prof. José Roberto Postali Parra e integrantes do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ, por me receber, ajudar e disponibilizar tempo no preparo das amostras para a pesquisa.

Ao Centro Avançado de Tecnologias em Genômicas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela realização do piro sequenciamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa fornecida.

“In dwelling, live close to the ground.

In thinking, keep to the simple.

In conflict, be fair and generous.

In governing, don't try to control.

In work, do what you enjoy.

In family life, be completely present.”

Laozi (Lao Tzu)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Determinação das plantas hospedeiras utilizando isótopos estáveis	19
2.2 Identificação da microbiota intestinal	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Criação de insetos em hospedeiros C3 e C4 para determinação isotópica e da microbiota intestinal	23
3.2 Determinação da assinatura isotópica	23
3.2.1 Preparo do material	23
3.2.2 Análise isotópica por espectrometria de massas	24
3.2.3 Determinação de curvas de detecção para a análise de grupos de insetos	25
3.3 Microbiota intestinal	25
3.3.1 Extração do intestino de adultos	25
3.3.2 Extração do DNA	25
3.3.3 Ampliação da região V1-V3 do gene 16S do rRNA para estudo de metagenômica da microbiota intestinal de <i>S. frugiperda</i>	26
4 RESULTADOS	31
4.1 Assinatura Isotópica	31
4.2 Determinação de curvas para a detecção da assinatura isotópica de adultos de <i>S. frugiperda</i> pela análise de grupos de indivíduos oriundos de soja (C3) e milho (C4)	34
4.3 Análise da microbiota intestinal de <i>S. frugiperda</i>	35
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Microbiota intestinal e assinatura isotópica de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como marcadores para a identificação da fonte alimentar de imaturos

A correta adoção de medidas de manejo de resistência de insetos-pragas é motivo de preocupação constante, inclusive para as novas tecnologias disponíveis, como as plantas geneticamente modificadas para a expressão de toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Portanto, para manter a eficiência das plantas-Bt comercialmente disponíveis, é preconizada a manutenção de áreas de refúgio (livres de plantas Bt) para evitar a rápida seleção de insetos resistentes. No caso de insetos polívoros, a determinação das áreas de refúgio pode levar em consideração a contribuição que fontes não-comerciais e/ou não-transgênicas têm na produção de adultos colonizadores que não sofreram seleção para o evento de transgenia de interesse. A identificação da fonte alimentar pode determinar a procedência de insetos e tornar mais eficiente e segura a implementação de zonas de refúgio e a determinação dos riscos de desenvolvimento de resistência pelo inseto-praga alvo. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial de dois marcadores biológicos, a assinatura isotópica e a microbiota intestinal, para a identificação da fonte de alimento do imaturo pela análise de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), como subsídio para o monitoramento da origem de insetos migrantes em áreas de cultivo Bt para a adoção de estratégias adequadas de manejo de resistência. A análise isotópica de adultos foi realizada utilizando-se insetos criados em 12 plantas hospedeiras distintas, seis de metabolismo C3 e seis de metabolismo C4. Parte dos adultos provenientes dessa criação foram liofilizados, macerados e submetidos à análise isotópica para a determinação dos níveis de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Amostras das plantas utilizadas na alimentação desses insetos também foram submetidas ao mesmo processo de análise. A outra parte dos adultos recém-emergidos de *S. frugiperda* foi utilizada para a determinação da microbiota intestinal pela análise de região do gene do 16S rRNA após sequenciamento em plataforma 454. Os resultados da análise isotópica de carbono para as plantas utilizadas como fonte alimentar apresentaram médias entre -31,37‰ e -25,07‰ para plantas C3 e entre -13,03‰ e -12,26‰ para plantas C4. Adultos de *S. frugiperda* oriundos de lagartas criadas em plantas do grupo C3 apresentaram média de $\delta^{13}\text{C}$ entre -30,36‰ e -23,72‰, enquanto aqueles do grupo C4 apresentaram média entre -18,25‰ e -13,28‰. O sequenciamento da microbiota via metagenômica produziu 126,970 sequências com cerca de 421 pb. O alimento influenciou substancialmente a diversidade da microbiota intestinal associada ao intestino de adultos, independentemente do metabolismo fotossintético da planta hospedeira. Análises comparativas de diversidade em que a abundância relativa dos diferentes componentes foi considerada (Unifrac ponderado) permitiu a distinção de praticamente todas as microbiotas. Foram identificadas várias UTOs exclusivamente associadas à microbiota intestinal de adultos provenientes de cada fonte de alimento, mas a maioria apresentou abundância relativa extremamente baixa. Apenas as UTOs 1199 e 2255 foram exclusivamente associados ao milho com abundância relativa superior a 2,5%.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana; Etiqueta de sequenciamento; Pirosequenciamento; Simbiontes

ABSTRACT

***Spodoptera frugiperda* adult gut microbiota and isotopic signature (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) use as molecular markers to identify larvae food source**

The correct insect resistant management has been a topic of constant concern, even for the newer technologies available, such as genetically modified crops expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins. The use of refuge areas with non-Bt crops to avoid the fast selection for resistant insects is proposed for maintaining the efficiency of Bt-crops. The implementation of refuge areas for polyphagous insects can consider non-commercial and non-Bt crops as sources of susceptible insects. The identification of the food source used during immature development can make the implementation of refuge areas safer and more efficient and allow for better estimates of risk assessment for insect resistance development. The objective of this study is to determine the potential use of, the isotopic signature and gut microbiota of adults as biological markers to allow for the identification of the food source during the larval stage of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). Adults were obtained from larval rearing on 12 food sources, six host-plants with a C3 photosynthetic metabolism and six host-plants with a C4 metabolism. Part of the adults obtained and the food source used during their immature development were lyophilized and macerated, and subjected to $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ isotopic analysis. The remaining adults of *S. frugiperda* were used to determine the composition of the gut microbiota by metagenomic analysis of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene using a 454 sequencing platform. The carbon isotopic signatures obtained for the host-plants used as food source were between -31.37‰ and -25.07‰ for C3 plants, and -13.03‰ and -12.26‰ for C4 plants. Adults of *S. frugiperda* obtained from larval rearing on C3 plants had a carbon isotopic signature between -30.36‰ and -23.72‰, while those from C4 host-plants has between -18.25‰ and -13.28‰. The metagenomic sequencing yielded 126,970 reads with an average of 421bp. The larval food source substantially influenced the diversity of the adult gut microbiota regardless of the plant's photosynthesis metabolism. Comparative analysis among gut microbiota in which the relative abundance was taken into account (weight-Unifrac) allowed the discrimination of the majority of the communities. Several OTUs were identified as exclusive to the adult gut microbiota from different food sources, but most of these OTUs were minor components of the community. OTUs 1199 and 2255, both exclusively associated with corn, were the only ones to represent at least 2.5% of their community.

Keywords: Bacterial community; Tag encoded sequencing; Pyrosequencing; Symbionts

1 INTRODUÇÃO

O manejo da resistência de insetos a inseticidas é primordial para garantir a manutenção da eficiência de inseticidas no controle de insetos-praga, visto que o uso inadequado dos mesmos permite o rápido surgimento de populações de insetos resistentes (BATES et al., 2005). As dificuldades encontradas no manejo de insetos-praga devido ao desenvolvimento de resistência ao método de controle em uso não têm sido diferentes com as novas tecnologias disponíveis, como as plantas geneticamente modificadas que expressam genes que codificam por entomotoxinas provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). São vários os registros do potencial de desenvolvimento de resistência às toxinas de Bt em condições de laboratório, apesar de ainda serem poucos os casos registrados de desenvolvimento de resistência a essa tecnologia a campo (TABASHNIK et al., 2003).

As zonas de refúgio são áreas isentas da aplicação de produtos químicos e de plantas geneticamente modificadas, como aquelas que expressam toxinas Bt. A finalidade dessas áreas de refúgio é a de manter o alelo suscetível em alta frequência na população natural da praga, evitando, assim, a seleção de indivíduos que carregam o alelo que confere resistência ao inseto. Com a alternância de culturas, os indivíduos que sobrevivem à exposição à toxina irão copular com indivíduos suscetíveis oriundos da área de refúgio, ocorrendo, conseqüentemente, a diminuição da pressão de seleção e a diluição do(s) alelo(s) de resistência na população (FRUTOS; RANG; ROYER, 1999; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; TABAHNIK et al., 2014).

No caso das tecnologias Bt, a seleção de insetos resistentes ocorre com maior facilidade quando não há o manejo ou a implementação adequada de áreas de refúgio (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011). Um dos fatores importantes para o correto dimensionamento e implementação da estratégia de refúgio para o manejo de insetos-praga é o conhecimento da procedência dos insetos colonizadores da cultura transgênica. Uma das principais questões associadas ao manejo de áreas de refúgio é a de identificar se os indivíduos que colonizarão a cultura transgênica já foram expostos ao processo de seleção por toxinas Bt, representando, assim, indivíduos que teriam, por consequência, maior probabilidade de carregarem o(s) alelo(s) da resistência. Essa preocupação se torna ainda maior quando culturas transgênicas diferentes expressam a mesma toxina Bt ou toxinas Bt que possuem o

mesmo alvo, facilitando a seleção contínua pelos indivíduos que carregam o(s) alelo(s) da resistência, principalmente quando se trata de inseto-praga polífago (FRUTOS; RANG; ROYER, 1999, STORER et al., 2012; TABAHNIK et al., 2014).

O milho e a soja são atualmente as principais culturas com tecnologia Bt. No Brasil, essas culturas são plantadas em áreas extensas e estão disponíveis no campo ao longo de todo o ano, tornando mais frequente a movimentação de uma praga polífaga, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), de um cultivo a outro, facilitando a seleção de indivíduos resistentes (BERG; HILBECK; BOHN, 2013). Assim, a preservação da tecnologia Bt para o controle de *S. frugiperda* requer o entendimento da associação desse inseto a essas plantas hospedeiras e a sua movimentação de uma cultura a outra para a correta determinação da estratégia de refúgio a ser implementada para o manejo da resistência.

Como milho e soja são cultivadas em plantios sucessivos, insetos selecionados em uma cultura podem dispersar e colonizar a outra. Dessa forma, identificar a planta hospedeira utilizada durante o desenvolvimento imaturo de adultos que colonizam cultivos Bt é uma etapa necessária para a correta avaliação da pressão de seleção exercida nesses indivíduos, assim como para a determinação da contribuição de plantas não-alvo da tecnologia Bt como fonte de indivíduos suscetíveis às toxinas Bt, servindo como áreas de refúgio natural para esse inseto.

Como milho e soja apresentam metabolismo fotossintetizante distintos (milho - metabolismo C4; soja – metabolismo C3), uma das abordagens possíveis para o reconhecimento da associação hospedeira é a possibilidade de distinção de ambas as plantas pela determinação de sua assinatura isotópica (FARGUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989), decorrente do tipo de assimilação do carbono atmosférico. O acúmulo diferencial dos diferentes isótopos de carbono pelas plantas de metabolismo C3 e C4 permite o rastreamento desses isótopos ao longo da cadeia trófica. Assim, é possível a determinação da fonte de alimento de herbívoros após análise da assinatura isotópica de sua carcaça/tecidos, visto que a mesma refletirá a assinatura isotópica da planta que foi consumida (HOBSON, 1999), mesmo quando há troca de alimento, como comprovado pelos estudos de *turn-over* (PETERSON; FRY, 1987).

A distribuição de nitrogênio atmosférico, assim como a de carbono, apresenta duas formas naturais. No caso do nitrogênio, temos na atmosfera 0.4% de ^{15}N e

99.6% de átomos de ^{14}N (HOOD-NOWOTNY, KNOLS, 2007). A confiabilidade da utilização de razões isotópicas de nitrogênio para verificação de plantas hospedeiras utilizadas na fonte alimentar dependem de diversos fatores, entre eles o tipo de fertilização de solo utilizada, que pode, inclusive, ser utilizada para a detecção de insetos que se alimentaram em áreas específicas (UNSICKER et al., 2005; OUYANG et al. 2014).

Apesar da alimentação do adulto poder influenciar os valores da assinatura isotópica, a fonte alimentar explorada por imaturos é o principal componente da razão isotópica nos tecidos do inseto adulto (PONSARD et al., 2004). Portanto, a identificação da fonte alimentar da larva por meio da análise isotópica de carbono e nitrogênio presente nos tecidos de adultos de *S. frugiperda* poderia facilitar a diferenciação das diferentes fontes de alimento utilizadas pelo imaturo, auxiliada ainda pelo fato de adultos desse inseto não necessitar de alimentação para manter suas atividades de reprodução (MILANO et al., 2010), limitando as possíveis interferências decorrentes do *turn-over*.

Outra abordagem possível de ser utilizada para a identificação da planta hospedeira consumida durante a fase imatura de insetos pela análise de adultos é a avaliação da microbiota associada ao trato digestivo. A microbiota intestinal de insetos pode ser alterada pela fonte alimentar devido à presença de diferentes microrganismos associados aos hospedeiros ou pela falta de nutrientes utilizados pelas comunidades presentes no trato digestivo do inseto (KANE; BREZNAK, 1991; SITTENFELD et al., 2002; TANAKA et al. 2006; BALLOR; LAEDERBETTER, 2012). Apesar de se tratar de um inseto de metamorfose completa, há registros da persistência da microbiota associada ao intestino larval no intestino do adulto, inclusive em Lepidoptera (VASANTHAKUMAR et al., 2008; WONG et al., 2011; BRUCKER; BORDENSTEIN, 2012; HAMMER et al., 2014).

Assim, este trabalho teve por objetivo testar a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio e a microbiota intestinal associada a adultos de *S. frugiperda* como marcadores para a determinação da planta hospedeira utilizada durante a fase imatura. A identificação da procedência dos adultos permitirá a melhor aplicação de zonas de refúgio e resultará na produção de novas informações sobre a composição da microbiota intestinal de adultos de Lepidoptera.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Determinações das plantas hospedeiras utilizando isótopos estáveis

O carbono presente na atmosfera, encontrado na forma de dióxido de carbono, representa 0,03% da composição total atmosférica. O carbono apresenta duas formas naturais: o carbono mais leve - ^{12}C - é encontrado em maior quantidade e representa 98,9% do carbono na molécula de CO_2 , enquanto o carbono mais pesado - ^{13}C - representa apenas 1,1% do carbono associado ao CO_2 (O'LEARY, 1988). Plantas podem utilizar as duas formas naturais de carbono distintamente, o que permite a sua divisão em diferentes grupos fotossintetizantes (PARK; EPSTEIN, 1961).

A diferença na razão isotópica de carbono é resultado da discriminação de carbono que ocorre quando o meio utilizado pela planta, no momento da fotossíntese, prioriza um dos dois isótopos de carbono. Portanto, a discriminação e as diferentes vias metabólicas influenciam as proporções de carbono atmosférico obtidos (GHASHGHAIE et al., 2003).

As plantas C4 apresentam variações na razão isotópica de carbono entre -6‰ a -12‰, enquanto plantas C3 apresentam valores menores, entre -22‰ a -30‰. Em plantas C3, a enzima ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (rubisco) tem a função de realizar a fixação de CO_2 atmosférico com maior concentração de ^{12}C , discriminando ^{13}C para produzir energia. Em plantas C4, a rubisco faz a fixação de CO_2 somente após o processo de carboxilação do fosfoenolpiruvato, cujo produto é transportado das células do mesófilo às células da bainha vascular que recobrem os feixes vasculares sem a discriminação de ^{13}C (O'LEARY, 1981).

Em insetos, o carbono é utilizado para atividades essenciais no ciclo de vida, sendo utilizado em bases estruturais, vias metabólicas e no processo de crescimento de tecidos. O carbono é adquirido por meio da alimentação; portanto, a fonte alimentar e a discriminação de carbono também influenciam na proporção dos isótopos de carbono presentes nos tecidos de insetos (TIESZEN et al., 1983). Por meio da diferença de metabolismo da planta e a seleção da fonte alimentar utilizada pelo inseto é possível distinguir os dois grupos de plantas (C3 e C4).

A identificação de carbono e nitrogênio em tecidos de insetos e plantas é verificada por meio de análise da razão isotópica utilizando a espectrometria de

massas. Os níveis de carbono presentes nos tecidos de insetos fitófagos são proporcionais aos mesmos níveis de carbono encontrados na fonte de alimento utilizada (MARKOW; ANWAR; PFEILER, 2000; NAGOSHI et al., 2007).

A razão isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}_{\text{‰}}$) é a divisão do elemento que está sendo analisado pelo elemento com maior abundância natural, dada pela função (1).

$$\delta^{13}\text{C} = (^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} - 1) \cdot 1000 \quad (1)$$

Devido à estabilidade dos isótopos de carbono, é possível utilizá-los para realizar estudos entre diferentes níveis da cadeia trófica, sendo indicada para identificação qualitativa de fonte alimentar envolvendo, principalmente, plantas C3 e C4 (PETELLE; HAINES; HAINES, 1979). A identificação da fonte alimentar de insetos permite obter dados de densidade populacional, biologia e etologia (HAGLER; JACKSON, 2001). O conhecimento da dinâmica populacional permite formular estratégias de manejo de plantios para estabelecer a distribuição espacial e temporal utilizando a diversidade de plantas exploradas para minimizar o aumento da densidade de indivíduos resistentes (FITT, 1989).

A concentração de dióxido de carbono atmosférico é responsável por influenciar indiretamente o consumo de alimento de algumas espécies de lepidópteros. O aumento de dióxido de carbono atmosférico influencia de forma negativa a concentração de nitrogênio nos tecidos foliares de plantas C3 e C4, causando declínio. Com a baixa concentração de nitrogênio nos tecidos das plantas, o inseto passa a consumir mais para compensar a concentração necessária para o desenvolvimento (LINCOLN; SIONIT; STRAIN, 1984), aumentando a injúria causada pela praga.

Assim como o carbono, o nitrogênio também apresenta funções indispensáveis para a manutenção do inseto (JOERN; BEHMER, 1997); no entanto, a razão de nitrogênio pode ser variável de acordo com modificações climáticas, níveis de absorção de nutrientes da fonte alimentar do inseto ou fisiologia da planta explorada (DENIRO; EPSTEIN, 1981; EVANS, 2001).

DeNiro e Epstein (1981) citaram que a possibilidade de utilizar o nitrogênio como técnica de identificação do alimento é possível contanto que o ambiente em que ocorre o crescimento de culturas não utilize formas de fertilizantes que comprometam o valor real de nitrogênio no ambiente. Quanto se tem um ambiente

onde ocorre a fertilização de culturas, é possível utilizar fertilizantes com nitrogênio enriquecido para realizar levantamento de populações. O nitrogênio enriquecido permanece na planta durante longos períodos, especialmente em tecidos de órgãos reprodutivos e folhagem novas, proporcionando dados confiáveis (LEGGARD et al, 1994), sendo consumido e incorporado nos tecidos do inseto herbívoro (STEFFAN; DAANE; MAHR, 2001).

2.2 Identificação da microbiota intestinal

A relação de simbiose entre microrganismos e insetos foi essencial para o processo evolutivo de insetos. Algumas relações de simbiose são tão específicas que uma espécie não sobrevive sem a outra. Insetos associados a fontes de alimento restritas, como o sangue e a seiva de plantas, estabeleceram relações de simbiose obrigatórias com microrganismos, os quais sintetizam e fornecem nutrientes essenciais ao inseto hospedeiro que não estão acessíveis ao mesmo (MORAN, 2007; LOGIN; HEDDI, 2013; DOUGLAS, 2014). O trato digestivo é uma estrutura normalmente repleta de organismos associados que podem estabelecer níveis distintos de interação, de facultativa a obrigatória, com insetos. A microbiota associada ao trato digestivo pode desempenhar funções variadas, como auxiliar na digestão do alimento ou na degradação de compostos xenobióticos, impedir a colonização do trato digestivo por microrganismos patogênicos, e auxiliar na ciclagem de nutrientes, entre outras funções (SCHULTZ; BREZNAK, 1978; LOGIN; HEDDI, 2013; DOUGLAS, 2014).

Assim, os microrganismos que compõem a microbiota intestinal de insetos participam de vários processos fisiológicos importantes, da nutrição à resposta imunológica (REESON et al., 2003; XIANG et al., 2006; DOUGLAS, 2014). Apesar da importância da microbiota associada ao trato digestivo de insetos na sua bioecologia, a grande maioria dos estudos são concentrados na determinação da microbiota intestinal de alguns grupos de insetos, como cupins e pulgões, havendo ainda lacunas na determinação das relações existentes no trato digestivo de adultos de Lepidoptera (BRODERICK et al., 2004). A identificação de bactérias não-cultiváveis é certamente o maior empecilho na determinação da composição da microbiota intestinal, visto que 99% das bactérias presentes no ambiente não são cultiváveis nos meios de cultura tradicionalmente utilizados (AMANN, 1995).

A complexidade da composição da microbiota intestinal de insetos levou muitos pesquisadores a ignorar a relação entre a composição da microbiota intestinal e a biologia de seus hospedeiros. Muitas pesquisas que envolvem estudos da composição da microbiota de insetos estão associadas a cupins, mesmo que provavelmente muitos insetos apresentem maior número de simbioses do que a quantidade de células que compõe seu corpo (DILLON; DILLON, 2004).

O avanço nos métodos moleculares possibilitou explorar e obter resultados com dados completos e mais precisos (DOWD et al., 2008). Entre as diversas técnicas, a utilização de sequenciamento de nova geração, como, por exemplo, o pirosequenciamento em plataforma 454 de amplicons do gene 16S do RNA ribossomal, permite o estudo da comunidade de bactérias associadas a insetos, inclusive as não-cultiváveis (ISHAK et al., 2011).

Apesar das dificuldades na determinação de bactérias verdadeiramente associadas à microbiota intestinal daquelas transientes, é possível minimizar as ocorrências de organismos transientes selecionando insetos saudáveis. Muitas das colônias transientes apenas se reproduzem em situações anormais. As bactérias que fazem parte da microbiota intestinal devem ser capazes de se reproduzir em maior frequência do que são eliminadas. Algumas das características que influenciam a composição da microbiota é a alteração de pH intestinal, a disponibilidade de nutrientes, os quais são alterados de acordo com a fonte alimentar, e a presença de enzimas digestivas (AMANN et al., 1995; DILLON; DILLON, 2004).

Lepidopteros apresentam pH intestinal entre 8 e 10 e potencial de oxidação variando de 400 mV a -200 mV (AMANN et al., 1995). Com a diversidade de estruturas intestinais observadas em insetos é mais comum verificar associações em cecos e estruturas bem desenvolvidas. Acreditava-se que os simbioses de larvas de lepidópteros e alguns insetos da família Acrididae (Orthoptera), por não apresentarem estruturas morfológicas específicas associadas aos microrganismos, não participavam de forma essencial no processo de digestão e nutrição do inseto (APPEL, 1993). No entanto, hoje são vários os registros que demonstram o papel funcional dessa microbiota no desenvolvimento e crescimento desses insetos (JOERN, BEHMER, 1997; SITTENFELD et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de insetos em hospedeiros C3 e C4 para determinação isotópica e da microbiota intestinal

Larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* foram criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3: algodão (*Gossypium hirsutum* var. Delta Opal), crotalária (*Crotalaria spectabilis*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), mucuna preta (*Mucuna aterrima*), soja (*Glycine max* var. M8336RR) e trigo (*Triticum aestivum*), e C4: braquiária (*Brachiaria ruziziensis*), capim colônia (*Panicum maximum*), caruru (*Amaranthus spinosus*), milheto (*Pennisetum glaucum*), milho (*Zea mays* var. DKB390) e sorgo (*Sorghum bicolor* var. AS4615), em condições controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14 h) até a obtenção de pupas. As pupas obtidas foram coletadas e colocadas em placas de Petri no interior de tubos de PVC para a emergência dos adultos. Os adultos obtidos foram posteriormente utilizados para análise isotópica ou para a remoção do intestino para as análises de metagenômica para a determinação da microbiota intestinal.

3.2 Determinação da assinatura isotópica

3.2.1 Preparo do material

Adultos obtidos da criação nas diversas plantas hospedeiras, assim como amostras das plantas hospedeiras oferecidas para as lagartas durante o processo de criação, foram utilizados para determinação da assinatura isotópica após liofilização (Nova lyphe NL-150 Freeze Dryer - Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) do material por 72 h. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em frascos de 50 mL. As amostras das plantas liofilizadas foram posteriormente processadas em micromoinho (MA 048 – Marconi, Brasil), enquanto que as de insetos foram separadas em grupos de três indivíduos e maceradas em cadinho de ágata. O produto da maceração dos insetos foi armazenado em frascos de 25 mL e mantido à temperatura ambiente até o momento das análises isotópicas de carbono e nitrogênio.

Para a análise isotópica dos insetos obtidos nas diferentes plantas hospedeiras, foram utilizados 0,5 mg na análise de carbono e 10 mg na análise de nitrogênio. Para as amostras das plantas, foram utilizados 1 mg na análise de

carbono e 10 mg na análise de nitrogênio. As amostras pesadas foram lacradas em cápsulas de estanho e submetidas à análise isotópica em aparelho de espectrometria de massas. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

3.2.2 Análise isotópica por espectrometria de massas

As análises foram realizadas em espectrômetro de massa automático do tipo viscoso ANCA-IRMS (“Automated Nitrogen e Carbon Analyzer Isotope Ratio Mass Spectrometer”) para amostras sólidas e líquidas. As amostras contidas nas cápsulas de estanho foram colocadas em um carrossel para a introdução do material no espectrômetro de massas. As amostras foram sujeitas à completa combustão em forno a 1500°C, com a subsequente coleta e análise dos gases produzidos nesse processo. O gás produzido foi arrastado por hélio (He) ultrapuro até a região de leitura do gás produzido pela combustão da amostra.

Após a combustão e a formação dos gases foi realizada a purificação do CO₂, que inclui a retenção de água, oxigênio, halogênios e outras impurezas que podem comprometer a leitura do feixe de íons. Para a análise de carbono foi realizada a separação de carbono e nitrogênio por meio de coluna cromatográfica, que separa o N₂ do CO₂ para a detecção individual de cada composto. Para a análise de nitrogênio foi utilizada armadilha de carbosorb para reter o carbono, permitindo, apenas, a leitura de nitrogênio (TRIVELIN; SALATI; MATSUI, 1973).

Após a queima da amostra e da purificação dos gases, foi iniciado o processo de ionização das moléculas para posterior leitura dos isótopos estáveis gerados. Antes da ionização, o gás gerado e purificado escoia por capilares que faz a comunicação entre o reservatório de amostra e a fonte de ionização. As moléculas são ionizadas e seguem por um acelerador de íons ao analisador magnético de íons. No analisador magnético, o feixe de íons gerado pela ionização do gás das amostras sofre alteração no trajeto conforme a massa do feixe de íons. Para que o resultado seja apresentado, é necessário realizar a comparação entre a amostra sendo analisada e a amostra padrão que já apresenta a correção do fracionamento de determinado elemento. Para comparar o resultado das análises de carbono foi utilizado o “Pee Dee Belemnite” (PDB), que é o padrão reconhecido internacionalmente, enquanto que para a comparação de nitrogênio foi utilizado o N₂ atmosférico (BARRIE; PROSSER, 1996).

3.2.3 Determinação de curvas de detecção para a análise de grupos de insetos

Adultos inteiros de *S. frugiperda* provenientes de imaturos alimentados em soja (M8336RR) ou milho (DKB390) foram utilizados para a análise isotópica, ou tiveram apenas suas asas (10 adultos equivalente) utilizadas para análise. O material obtido foi liofilizado e processado para análise, assim como descrito anteriormente, com exceção das asas, que foram maceradas em tubos de 5 mL com o auxílio de bastão de vidro. As massas obtidas das amostras de milho e soja foram utilizadas na produção de misturas (massa/massa) de milho (M) e soja (S): 100M:0S, 80M:20S, 60M:40S, 50M:50S, 40M:60S, 20M:80S e 0M:100S. Cada amostra contou com três repetições. Foram utilizadas de 0,5-1,0 mg/amostra para análise de carbono e de 5-10 mg/amostra para análise de nitrogênio. A análise por espectrometria de massas foi conduzida assim como descrito anteriormente.

3.3 Microbiota intestinal

3.3.1 Extração do intestino de adultos

Adultos recém-emergidos, oriundos de lagartas criadas em diferentes hospedeiros C3 e C4 (ver item 3.1) foram dissecados individualmente em solução salina estéril (0,85% NaCl). Os insetos foram dissecados sob microscópio estereoscópico em ambiente asséptico e os intestinos obtidos foram aleatoriamente agrupados em grupos de cinco intestinos para cada tratamento (planta hospedeira). Apenas os intestinos obtidos sem qualquer tipo de ruptura do epitélio intestinal e completamente isentos de tecidos outros que os do trato digestivo foram utilizados nas análises. As amostras foram armazenadas em etanol absoluto a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.3.2 Extração do DNA

As amostras de intestino coletadas, contendo sua microbiota associada, foram removidas do etanol e mantidas em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Aos intestinos foram adicionados 600 µL de tampão de digestão (3 mM CaCl₂; 2% SDS; 40 mM ditioneitol; 20 mg/mL proteinase K; 100 mM de tampão Tris, pH 8,0; 100 mM NaCl) e os mesmos mantidos a 55°C por 24 h. Ao término desse período foi adicionado 1 volume de fenol: clorofórmio (25:24) à

amostra, a qual foi misturada por meio de agitação. Após a agitação, a amostra foi centrifugada (23.755 *g* x 5 min) para a separação das fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, 1 volume de clorofórmio foi adicionado e a amostra novamente agitada. A mistura foi centrifugada (23.755 *g* x 5 min) e a fase aquosa recuperada. Foram adicionados 20 µg de glicogênio, 0,6 volume de isopropanol e 0,1 volume de 3 M acetato de sódio (pH 5,2). A solução foi incubada a -80°C por 40 min para a precipitação e coleta do DNA genômico após centrifugação (23.755 *g* x 30 min x 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado (3x) em 1 mL de 85% etanol gelado e centrifugado novamente (10 min a 23.755 *g*). O gDNA foi ressuspensão em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e tratado com 3 µL de Rnase (20 ng/mL) livre de DNase por 10 min a 37°C (Gilbert et al., 2007).

A quantidade e integridade do DNA genômico extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,0) em voltagem constante (90V), seguido de visualização em transluminador, utilizando o marcador 1 kb plus DNA ladder (Thermo scientific) como padrão.

3.3.3 Ampliação da região V1-V3 do gene 16S do rRNA para estudo de metagenômica da microbiota intestinal de *S. frugiperda*

A determinação da comunidade de microrganismos associada ao intestino de adultos de *S. frugiperda* obtidos de lagartas criadas em diferentes plantas hospedeiras foi realizada pela amplificação e análise de fragmento do gene do 16S do rRNA, envolvendo as regiões variáveis V1-V3, utilizando os iniciadores universais GRAY28F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3') e GRAY519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3'), adicionados, respectivamente, aos iniciadores universais M13F e M13R em suas terminações 5'. As reações de amplificação contaram com 1 µL da amostra de gDNA (20 ng/µL), 1x tampão da enzima, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 160 pMol de cada iniciador (GRAY28F e GRAY519R), e 1,25 U de TaqDNA polimerase (Promega), em reação com volume final de 50 µL (ISHAK et al., 2011). As reações foram conduzidas em termociclador programado a 95°C por 3 min (1x), seguido de 35 ciclos a 95°C por 40 s, 60°C por 1min, 72°C por 30 s, e extensão final (1x) a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação de amplicons Agencourt AMPure XP: PCR purification kit (Beckman Coulter – Massachusetts, US), seguindo as recomendações do fabricante. Os amplicons purificados foram diluídos a 20 ng/μL e utilizados em reação secundária de amplificação para a inserção das sequências codificadoras para o pirosequenciamento (MIDs). Nessa reação secundária, os amplicons produzidos para a região V1-V3 do 16S do rRNA de bactérias associadas ao trato digestivo de adultos de *S. frugiperda* foram submetidos a reação de PCR utilizando iniciadores senso contendo uma das sequências identificadoras disponíveis (MIDs) (MID1 - algodão, MID2 - crotalária, MID3 - feijão, MID4 - mucuna preta, MID5 - soja, MID6 - trigo, MID7 - braquiária, MID8 - capim colonião, MID9 - caruru, MID10 - milho, MID11 - milho, MID12 - sorgo), juntamente com o iniciador reverso, comum a todos os tratamentos (LIBLB-R) (Tabela 1). Novamente, todos os MIDs e o LIBLB-R foram acrescidos, respectivamente, dos iniciadores universais M13 e M13R, mas agora em suas terminações 3', permitindo o anelamento com as regiões complementares disponíveis nos amplicons produzidos nas reações primárias. A reação de amplificação contou com 1 μL do produto de amplificação de cada tratamento (20 ng/μL), sendo realizada em condições e parâmetros de termociclagem idênticos aos utilizados nas reações primárias. Os amplicons obtidos foram purificados assim como descrito anteriormente, quantificados em Picodrop e encaminhados para sequenciamento em plataforma 454, junto ao laboratório multiusuário do Centro de Tecnologias Avançadas em Genômica, do Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na amplificação da região V1-V3 do gene do 16S rRNA e sequências identificadoras para estudo metagenômico para a caracterização da microbiota de adultos de *Spodoptera frugiperda* oriundos de lagartas criadas em diferentes plantas de metabolismo C3 e C4.

ID MIDs	Sequências (5'-3')
Gray 28F	
M13	CACGACGTTGTAAACGACGAGTTTGATCNTGGCTCAG
Gray 519R	
M13	CAGGAAACAGCTATGACCGTNTTACNGCGGCKGCTG
LibL A	
M13 MID1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGACGACTCACGACG
F	TTGTAAACGAC
LibL A	
M13 MID2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGTAGTATCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID3	CCATCTCATCCCTCGGTGTCTCCGACTCAGACACTACTCGTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACACGTATCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTAGACTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCGTCTAGTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGTACACACTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGTACTGTGTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13 MID9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGTAGATCGTCACGACGTTGTAAA
F	ACGAC
LibL A	
M13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTACGTCTCTCACGACGTTGTAAA
MID10 F	ACGAC
LibL A	
M13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTATACGAGTCACGACGTTGTAAA
MID11 F	ACGAC
LibL A	
M13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTCGCGTCGTCACGACGTTGTAAA
MID12 F	ACGAC
LibLB R	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCAGGAAACAGCTATGACC

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se do programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology v.1.8.0 – <http://qiime.org/>). As sequências obtidas foram organizadas de acordo com suas sequências identificadoras (MIDs) e submetidas a filtros de qualidade que reconhece o número de bases nucleicas ambíguas, corrige os iniciadores (barcodes) e a quantidade de

erros observadas na sequência dos iniciadores, assim como para a seleção das leituras pelo seu tamanho, e para a contagem e organização das sequências de cada tratamento. As sequências aprovadas foram então submetidas ao processo de agrupamento em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) baseando-se na similaridade entre as sequências, utilizando como limite o valor de 97% de similaridade utilizando UCLUST. Assim, as UTOs determinadas representam grupos de sequências que apresentam pelo menos 97% de similaridade entre si. Dentre o grupo de sequências definidas em uma UTO em particular, foi selecionada uma sequência representativa. A sequência que aparece em maior quantidade é selecionada como representativa dentro de cada UTO, e a partir dela determinada a identificação taxonômica e alinhamento filogenético. A designação taxonômica às UTOs obtidas foi realizada utilizando o banco de dados do Ribosomal Database Project (RDP) para identificação do nível taxonômico de cada UTO com no mínimo 0.8 de similaridade entre as sequências representativas das UTOS e as do banco de dados do RDP. As UTOs foram assim classificadas em diferentes níveis taxonômicos dependendo da similaridade obtida em relação às sequências de referência, em: espécie - similaridade > 97%, gênero - similaridade entre 95% - 97%, família – similaridade entre 90% - 95%, ordem – similaridade entre 85% - 90 %, classe – similaridade entre 80% - 85%, filo – similaridade entre 77% - 80%.

Os dados de diversidade e abundância de UTOs obtidos foram utilizados para a determinação de testes de rarefação e de diversidade de Shannon, assim como para a construção de redes taxonômicas utilizando o programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003; CRAWFORD et al., 2009), permitindo a visualização das interligações entre UTOs presentes em indivíduos alimentados em plantas C3 e C4, utilizando as ferramentas disponíveis no próprio QUIIME.

Curvas de rarefação para as diferentes microbiotas estudadas foram construídas e os índices de diversidade dentro de cada comunidade determinado pelo cálculo do índice de Shannon (diversidade alfa) utilizando-se de subamostras aleatórias de 4,000 sequências. As diferenças quanto à composição entre as diversas microbiotas estudadas, a diversidade beta, foram determinadas pelo uso de métricas do UNIFRAC ponderado e não-ponderado, as levam em consideração as relações filogenéticas entre os diferentes componentes das comunidades, assim como disponíveis no QIIME. Análises de Coordenadas Principais (PCoA) e de agrupamento hierárquico das comunidades microbianas estudadas (UPGMA) foram

conduzidas para auxiliar na visualização de componentes informativos da variação observada e para auxiliar na interpretação da matriz de distâncias produzida pela comparação entre as comunidades, sendo os grupamentos formados testados pela produção de repetições aleatórias utilizando-se o método de análise de Jackknife, permitindo, assim, a produção de PCoAs apresentando a variação encontrada em cada comunidade e a geração de árvores com valores de bootstrap. Todos os procedimentos analíticos utilizados seguiram as recomendações padrão disponíveis no QUIIME.

4 RESULTADOS

4.1 Assinatura isotópica

Os valores de assinatura isotópica de carbono (C) obtidos para as diferentes plantas hospedeiras de *S. frugiperda* permitiram a fácil diferenciação de plantas de metabolismo C3 daquelas de C4, mas o mesmo não ocorreu com as determinações isotópicas de nitrogênio (N) (Tabela 2). As assinaturas isotópicas das plantas do grupo C3 utilizadas neste trabalho apresentaram intervalos entre -24,90‰ e -31,29‰, sendo o algodão o de menor valor e o trigo o de maior. Nas plantas do grupo C4 os intervalos foram entre -12,30‰ e -13,12‰, representados pelo sorgo e capim colonião, respectivamente (Tabela 2).

A análise da assinatura isotópica de C das plantas hospedeiras dentro de cada grupo não permitiu a completa diferenciação entre todos os hospedeiros utilizados (Tabela 2). Dentre as plantas de metabolismo C3, a análise de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ não permitiu diferenciar soja ($\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -27,85$) de feijão ($\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -28,05$), enquanto para as plantas de metabolismo C4, os valores de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ obtidos não permitiram a distinção entre braquiária ($\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -13,04$), capim colonião ($\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -13,00$) e caruru ($\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -12,92$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Razão isotópica ($\pm$ se) de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) de plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 utilizadas na criação de *Spodoptera frugiperda*.

	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$		$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$
Algodão	-25,07 $\pm$ 0,07 e	9,74 $\pm$ 0,28 a	Braquiária	-13,04 $\pm$ 0,10 a	5,16 $\pm$ 0,30 a
Crotalária	-27,43 $\pm$ 0,06 d	2,46 $\pm$ 0,75 c	Capim colonião	-13,00 $\pm$ 0,07 a	3,63 $\pm$ 0,31 bc
Feijão	-28,05 $\pm$ 0,03 c	2,52 $\pm$ 0,26 c	Caruru	-12,92 $\pm$ 0,12 a	4,02 $\pm$ 0,40 bc
Mucuna preta	-29,01 $\pm$ 0,05 b	1,04 $\pm$ 0,35 d	Milheto	-12,41 $\pm$ 0,02 c	0,15 $\pm$ 0,23 d
Soja	-27,85 $\pm$ 0,08 c	6,58 $\pm$ 0,32 b	Milho	-12,75 $\pm$ 0,13 b	2,71 $\pm$ 0,36 c
Trigo	-31,37 $\pm$ 0,14 a	-3,07 $\pm$ 0,47 e	Sorgo	-12,26 $\pm$ 0,14 d	4,68 $\pm$ 0,17 b

Porém, como os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram variáveis entre as diferentes plantas dos grupos C3 e C4, a análise conjunta dos dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ permitiu a diferenciação da quase totalidade das plantas analisadas. No grupo C3, foi possível,

com a análise conjunta de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$, diferenciar soja de feijão. Porém, os valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ aproximaram feijão de crotalária, sendo praticamente impossível a diferenciação desses dois hospedeiros pelo uso conjunto desses isótopos (Figura 1). Já para o grupo C4, a análise conjunta de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ permitiu a diferenciação de caruru de capim colonião e braquiária, mas esses dois últimos hospedeiros ficaram muito próximos entre si, sendo ainda difícil a diferenciação entre eles pelo uso dos valores de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ obtidos (Figura 1).

Figura 1 - Relação entre as razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) de plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 utilizadas como fonte alimentar de *Spodoptera frugiperda*.

A análise dos adultos de *S. frugiperda* obtidos de lagartas criadas nas plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 aqui analisadas indicaram valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ entre -23,72‰ e -30,36‰ para os hospedeiros de metabolismo C3 e de $\delta^{13}\text{C}$ entre -13,28‰ e -18,25‰ para aqueles que se desenvolveram em hospedeiros de metabolismo C4, demonstrando a fácil distinção entre adultos oriundos de plantas C3 daqueles oriundos de plantas C4 (Figura 2). À semelhança do observado na análise das plantas hospedeiras, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de adultos de *S. frugiperda* não

permitiram a diferenciação entre os insetos oriundos de criação em plantas C3 daqueles de C4, visto a sobreposição de valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrada para os insetos que se desenvolveram nas diferentes plantas C3 e C4 (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise isotópica ($x \pm se$) de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) de adultos de *Spodoptera frugiperda* que se alimentaram de diferentes plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 durante a fase imatura.

	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$		$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$
Algodão	-27,51 $\pm$ 0,19 b	4,82 $\pm$ 2,27 a	Braquiaria	-13.28 $\pm$ 0,54 c	-0,91 $\pm$ 0,67 bc
Crotalária	-30.36 $\pm$ 0,24 a	2,06 $\pm$ 0,34 ab	Capim colônião	-14.28 $\pm$ 0,03 bc	0,63 $\pm$ 0,61 bc
Feijão	-30.31 $\pm$ 0,33 a	0,38 $\pm$ 0,15 bc	Caruru	-17.44 $\pm$ 3,16 ab	0,47 $\pm$ 0,68 bc
Mucuna preta	-23.72 $\pm$ 0,63 c	1,67 $\pm$ 2,00 c	Milheto	-14.31 $\pm$ 0,32 bc	2,92 $\pm$ 1,07 a
Soja	-29.81 $\pm$ 0,38 a	-1,76 $\pm$ 0,81 c	Milho	-13.65 $\pm$ 0,37 c	-1,28 $\pm$ 0,35 c
Trigo	-29.61 $\pm$ 0,63 a	-0,46 $\pm$ 0,41 c	Sorgo	-18.25 $\pm$ 0,79 a	4,98 $\pm$ 0,38 ab

A $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ determinada para adultos de *S. frugiperda*, assim como no caso das plantas, não permitiu a separação entre todas as fontes alimentares testadas para cada grupo de plantas, C3 e C4 (Tabela 3). Mas nesse caso, a análise conjunta dos valores de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ resultou na separação de praticamente todas as plantas hospedeiras, permanecendo de difícil distinção apenas aquelas amostras oriundas de soja e trigo ou de milho e braquiária (Figura 2). De qualquer forma, a análise conjunta de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ permitiu a diferenciação de adultos provenientes de lagartas que se desenvolveram nas culturas chaves que contam com genes de Bt para a produção de plantas transgênicas, como o milho, entre as plantas de metabolismo C4, e o algodão e a soja, entre aquelas de metabolismo C3 (Figura 2).

Figura 2 – Relação entre as razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de lagartas criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4.

4.2 Determinação de curvas para a detecção da assinatura isotópica de adultos de *S. frugiperda* pela análise de grupos de indivíduos oriundos de soja (C3) e milho (C4)

A análise do peso de adultos provenientes de criação em folhas de soja e milho indicou que os adultos obtidos de lagartas alimentadas em milho apresentaram peso superior a 79,7% daquele de adultos obtidos de lagartas que se desenvolveram em folhas de soja (peso médio de adultos obtidos de criação em soja = $21,4 \pm 6,50$ mg e de criação em milho = $38,6 \pm 10,5$ mg). Dessa forma, as análises para a determinação de curvas que pudessem auxiliar na avaliação da assinatura isotópica de grupos de insetos foram realizadas baseando-se em misturas de massas de tecidos de adultos provenientes de soja (C3) e milho (C4).

A assinatura isotópica de nitrogênio de plantas de soja e milho variaram de 6,58‰ e 2,71‰ (dados não-ilustrados), respectivamente, valores parecidos àqueles

das mariposas. As mariposas de soja apresentaram $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de 5,18‰ e as de milho de 4,60‰, mas os níveis de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ não resultou em relação significativa com misturas de indivíduos oriundos de soja (C3) e milho (C4) (dados não-apresentados). Porém, os valores de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ obtidos para misturas de indivíduos provenientes de soja e milho apresentaram relação linear altamente significativa ($R^2=0.9925$), permitindo a determinação precisa da quantidade de indivíduos de milho ou soja nas misturas realizadas (Figura 3A). A capacidade de determinação da fonte de alimento de larvas utilizando-se grupos de adultos não foi beneficiada pela utilização conjunta dos dados de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ e de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, principalmente pela variação encontrada nos valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ (Tabela 3B).

Figura 3 – Relação (A) das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e (B) da razão isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) de misturas de diferentes proporções (%) de adultos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de soja (S) e milho (M): a) 100M:0S; b) 80M:20S; c) 60M:40S; d) M50:S50; e) M40:S60; f) M20:S80; g) M0:S100.

4.3 Análise da microbiota intestinal de *S. frugiperda*

O sequenciamento dos amplicons do 16S do rDNA das 12 bibliotecas da microbiota associada ao intestino de adultos de *S. frugiperda* produziu 311,868 leituras, das quais 126,970 foram utilizadas após aplicação dos filtros de qualidade e tamanho. As sequências utilizadas para as análises de diversidade apresentaram tamanho médio de 421.4 pb (Tabela 5).

O teste de rarefação indicou que o número de leituras do 16S rDNA analisado para as microbiotas estudadas não permitiu a completa determinação da diversidade

existente, apesar de que em todos os tratamentos foi observada uma acentuada mudança na inclinação das curvas de rarefação com pouco mais de 1.000 leituras analisadas (Figura 4). Apesar das curvas de rarefação não terem indicado a completa amostragem da diversidade existente, mesmo após a análise de mais de 10,000 sequências, a diversidade dentro de cada microbiota não sofreu alterações significativas após a amostragem de mais de 2.000 sequências, assim como indicado pelos índices de Shannon determinados (Figura 5).

Tabela 5 – Numero de total de sequências obtidas de intestino de *S. frugiperda* após os procedimentos de qualidade de cada tratamento estudados.

Hospedeiro C3	Sequências	Hospedeiro C4	Sequências
Algodão	10986	Braquiária	11052
Crotalária	10547	Capim colônia	11068
Feijão	6745	Caruru	10070
Mucuna preta	12064	Milheto	10199
Soja	11394	Milho	10163
Trigo	10469	Sorgo	12213

O teste de rarefação indicou que o número de leituras do 16S rDNA analisado para as microbiotas estudadas não permitiu a completa determinação da diversidade existente, apesar de que em todos os tratamentos foi observada uma acentuada mudança na inclinação das curvas de rarefação com pouco mais de 1.000 leituras analisadas (Figura 4). Apesar das curvas de rarefação não terem indicado a completa amostragem da diversidade existente, mesmo após a análise de mais de 10.000 sequências, o cálculo do índice de Shannon indicou haver pouca variação na diversidade estimada com a amostragem de mais de 2.000 sequências (Figura 5).

Figura 4 - Número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) determinadas na microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos da criação de lagartas em diversos hospedeiros de metabolismo C3 e C4, em relação ao número de sequências da região V1-V3 do 16S do rRNA amostrada.

Figura 5 - Diversidade estimada de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para a microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos da criação de lagartas em diversos hospedeiros de metabolismo C3 e C4, em relação ao número de sequências da região V1-V3 do 16S do rRNA amostradas, assim como determinado pelo cálculo do índice de Shannon.

A análise da diversidade da microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* indicou a existência de pelo menos seis Filos de Bacteria, sendo Proteobacteria o mais abundante em todas as comunidades estudadas, independentemente do metabolismo da planta hospedeira (C3 ou C4), representando de 68.4% das UTOs em soja (C3) a 98.3% em sorgo (C4) (Figura 6). Bacteroidetes foi o segundo Filo mais comum, sendo encontrado em todas as microbiotas intestinais estudadas, representando mais de 10% das UTOs em soja e trigo entre as plantas hospedeiras de metabolismo C3, e em milho para aqueles insetos que se desenvolveram em plantas de metabolismo C4 (Figura 6). Firmicutes foi o terceiro Filo mais comum e abundante, sendo o segundo mais abundante em crotalária, onde representou 29,1% das UTOs (Figura 6).

Figura 6 – Abundância relativa dos diferentes filos de Bactéria associadas à microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de lagartas criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 (plantas C3 - algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo; e C4 - braquiária, capim, caruru, milheto, milho e sorgo).

γ -Proteobacteria foi a Classe mais abundante, representando de 57,0% a 96,4% das UTOs em soja e sorgo, respectivamente, com as demais classes de Proteobacteria, α - e β -Proteobacteria, apresentando número bastante reduzido de UTOs (Figura 7). Apenas Bacilli e Flavobacteriia apresentaram abundância superior a 20% das UTOs determinadas nas diferentes comunidades microbianas do trato digestivo de adultos de *S. frugiperda*. Bacilli se destacou com 29,1% das UTOs em crotalária, sendo, portanto, os únicos representantes de Firmicutes (Figuras 6, 7). Flavobacteriia (Bacteroidetes) também apareceu com abundância em milho, representando 26,8% das UTOs (Figura 7). β -Proteobacteria foi a única das demais classes identificadas a ter abundância representativa nas comunidades estudadas, contando com 11,8% das UTOs da microbiota de adultos oriundos de criação em capim (Figura 7).

Figura 7 - Abundância relativa das diferentes classes de Bactéria associadas à microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de lagartas criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 (plantas C3 - algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo; e C4 - braquiária, capim colonião, caruru, milheto, milho e sorgo).

γ -Proteobacteria é representada, quase que exclusivamente, por representantes de Enterobacteriaceae em todas as microbiotas intestinais estudadas, sendo Moraxellaceae, Pseudomonadaceae e Xanthomonadaceae representantes minoritários dessa classe (Figura 8). Enterococcaceae (Bacilli) e Flavobacteriaceae (Flavobacteriia) são duas outras famílias que se destacam na microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* (Figura 8). Enquanto Enterococcaceae se mostra como a segunda mais abundante em crotalária, representando cerca de 30% da comunidade, em milho são as Flavobacteriaceae que aparecem como o segundo grupo mais abundante (26,8%) (Figura 8).

Figura 8 – Abundância relativa das diferentes famílias de Bacteria associadas à microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de lagartas criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 (plantas C3 - algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo; e C4 - braquiária, capim colômbio, caruru, milheto, milho e sorgo).

Providencia, *Acinetobacter* e *Enterococcus* se destacam entre as UTOs identificadas até o nível de gênero por representarem pelo menos 2% da comunidade bacteriana do intestino dos adultos de *S. frugiperda*. *Providencia* (Enterobacteriaceae) é a mais abundante entre elas para a maioria das comunidades estudadas, representando de 0,07% da comunidade em crotalária a 44,7% em capim (Figura 9). *Acinetobacter* se destaca nas comunidades de algodão, soja, trigo e caruru, onde representa de 6,3 a 9,2%, respectivamente, ocorrendo com abundância inferior a 1,8% nas demais comunidades (Figura 9). *Enterococcus* se destacou pela sua abundância apenas na comunidade de crotalária, onde representa 23,9% da diversidade observada (Figura 9).

Figura 9 - Abundância relativa dos diferentes gêneros de Bacteria associadas à microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de lagartas criadas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4 (plantas C3 - algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo; e C4 - braquiária, capim colonião, caruru, milheto, milho e sorgo).

No entanto, a maior abundância observada nas comunidades de microrganismos intestinais estudadas foi representada por UTOs não-classificadas ao nível de gênero ou a níveis supragenéricos. Essas UTOs representaram de 40,0 a 99,5%, respectivamente, para a microbiota associada a adultos proveniente de criação larval em caruru e milho (Figura 9). As UTOs não identificadas provenientes de Enterobacteriaceae representaram de 36,9% a 92,4% da comunidade total de UTOs não-identificadas para a microbiota de adultos provenientes de criação de imaturos em caruru e feijão, respectivamente. Flavobacteriaceae (de 0% a 26,6%) e Alcaligenaceae (de 0% a 29,3%) também são famílias que apresentaram quantidade substancial de UTOs não-classificadas ao nível de gênero.

Algumas das UTOs não-identificadas representam mais do que 2% da comunidade das microbiotas estudadas, indicando sua possível contribuição ao

hospedeiro (Tabelas 6 e 7). Dentre as 6 UTOs observadas na microbiota proveniente de adultos obtidos de criação em algodão, a UTO460 e UTO3578 representam, cada uma, 6,2% da microbiota total. Em crotalária nove UTOs foram identificadas correspondendo a pelo menos mais de 2% da microbiota total, sendo a UTO4582 a mais abundante entre elas, representando 8,3%. A microbiota intestinal proveniente de criação em folhas de feijão apresentou cinco UTOs representando pelo menos 2% da microbiota total, sendo que entre elas a UTO3051 foi a mais abundante (20,8%) entre todas as microbiotas intestinais de adultos obtidos de criações em plantas C3. As microbiotas intestinais provenientes de adultos de *S. frugiperda* oriundos de criações de lagartas em folhas de soja ou mucuna preta apresentaram sete UTOs compondo mais de 2% de sua microbiota (Tabela 6). A mais abundante em soja foi a UTO460 (2,8%), enquanto que em mucuna preta a UTO3051 representou 4,5% (Tabela 6). Ambas as UTOs mais abundantes em soja e mucuna preta também foram observadas na microbiota intestinal de adultos obtidos de outras plantas hospedeiras. A UTO5850 representou 8,1%, sendo a mais abundante entre as seis UTOs observadas na microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* da criação de imaturos em folhas de trigo (Tabela 6).

Tabela 6 - UTOs não-classificadas ao nível de gênero de Bacteria que representaram, pelo menos, 2% da microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de criação de lagartas em folhas de plantas hospedeiras de metabolismo C3 (algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo).

UTO	Classificação	Microbiotas estudadas					
		Algodão	Crotalária	Feijão	Soja	Mucuna preta	Trigo
359	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
418	Enterobacteriaceae	5,0	4,7	0,6	1,8	0,1	0,0
460	Gammaproteobacteria	6,4	5,7	2,7	2,9	0,1	0,3
559	Enterobacteriaceae	4,4	4,0	1,9	2,1	0,9	0,7
560	Enterobacteriaceae	0,3	0,0	0,4	0,3	0,1	1,6
586	Comamonadaceae	0,2	0,0	0,1	0,3	0,1	2,8
811	Gammaproteobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,8
900	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	2,2	0,1	0,7	0,9
1197	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	2,4	0,1	0,5	0,4
1199	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1600	Gammaproteobacteria	0,1	0,0	0,1	0,1	0,4	0,3
1972	Enterobacteriaceae	1,7	2,0	0,2	1,6	0,1	0,0
2026	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2255	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2511	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	2,7	0,1	0,6	0,6
3008	Enterobacteriaceae	0,4	0,6	0,2	0,2	0,0	0,0
3051	Enterobacteriaceae	0,8	0,5	20,8	0,5	4,6	0,3
3099	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
3152	Gammaproteobacteria	1,6	1,2	0,7	0,9	0,0	0,0
3159	Enterobacteriaceae	4,1	4,6	0,8	2,1	0,3	0,0
3295	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,2	0,0	2,5	0,2
3403	Enterobacteriaceae	0,4	0,0	0,6	0,1	0,9	1,1
3504	Enterobacteriaceae	0,5	0,0	0,6	0,6	2,1	1,6
3578	Enterobacteriaceae	6,2	5,5	0,7	2,7	0,1	0,0
4400	Gammaproteobacteria	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
4458	Alcaligenaceae	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
4962	Enterobacteriaceae	0,1	0,0	0,1	0,2	0,8	0,1
5593	Enterobacteriaceae	0,2	0,0	0,1	0,2	0,3	1,2
5738	Enterobacteriaceae	0,1	0,0	0,0	0,1	4,1	0,0
5850	Enterobacteriaceae	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	8,1
5954	Enterobacteriaceae	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
6130	Enterobacteriaceae	0,1	0,0	1,4	0,3	3,4	1,8
6131	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8
6226	Gammaproteobacteria	0,2	0,0	0,5	0,3	1,8	0,6
6266	Enterobacteriaceae	0,1	0,0	0,2	0,0	0,7	0,0
6363	Enterobacteriaceae	2,0	1,9	0,4	1,2	0,1	0,0

As UTOs que foram observadas nas microbiotas de adultos de *S. frugiperda* provenientes de imaturos criados em plantas C4 apresentaram de três a oito UTOs com no mínimo de 2% de abundância em pelo menos uma das microbiotas estudadas (Tabela 7). A microbiota associada ao intestino de adultos de *S. frugiperda* de criação em braquiária apresentou seis UTOs com mais de 2% de abundância, sendo a UTO3504 correspondente a 8,4% da diversidade total. Na microbiota intestinal de adultos obtidos de criação em capim colonião, cinco UTOs foram observadas, sendo a UTO4458 a mais abundante (12,6%). Apenas três UTOs foram observadas na microbiota intestinal proveniente de criação em caruru, mas a UTO5280 foi a de maior abundância relativa observada entre as microbiotas provenientes de plantas C4 (Tabela 7). A microbiota intestinal de adultos provenientes de milho e milho e milho apresentaram seis UTOs não-classificadas abundantes, sendo a UTO3159 a mais abundante em milho (7,7%) e a UTO1199 (8%) a mais abundante em milho. Adicionalmente, a UTO1199 e a UTO2255 (2,9%) ocorrem exclusivamente em milho (Tabela 7). Por fim, adultos provenientes de criação em sorgo contaram com a UTO559 como a mais abundante, representando 10% da comunidade (Tabela 7).

Tabela 7 – UTOs não-classificadas ao nível de gênero de Bacteria que representaram, pelo menos, 2% da microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de criação lagartas em folhas de plantas hospedeiras de metabolismo C4 (braquiária, capim colônia, caruru, milheto, milho e sorgo).

UTO	Classificação	Microbiotas estudadas					
		Braquiária	Capim colônia	Caruru	Milheto	Milho	Sorgo
359	Enterobacteriaceae	0,3	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0
418	Enterobacteriaceae	0,0	0,8	0,4	3,3	0,8	0,2
460	Gammaproteobacteria	0,2	1,0	0,7	3,1	0,4	2,9
559	Enterobacteriaceae	0,2	0,7	0,2	2,8	1,0	10,7
560	Enterobacteriaceae	8,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
586	Comamonadaceae	0,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,1
811	Gammaproteobacteria	0,0	2,5	2,8	0,0	0,0	0,0
900	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,8	0,1	0,2
1197	Enterobacteriaceae	0,0	0,1	0,0	0,6	0,1	0,5
1199	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0*	0,0
1600	Gammaproteobacteria	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	2,2
1972	Enterobacteriaceae	0,0	0,3	0,1	1,0	0,5	0,1
2026	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
2255	Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9*	0,0
2511	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,0
3008	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,1	2,4	0,4	0,0
3051	Enterobacteriaceae	0,1	0,3	0,1	0,7	0,8	0,3
3099	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	0,0
3152	Gammaproteobacteria	0,0	0,0	0,3	2,9	0,0	0,0
3159	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,5	7,8	0,7	0,2
3295	Enterobacteriaceae	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
3403	Enterobacteriaceae	3,8	0,0	0,0	0,5	0,4	0,2
3504	Enterobacteriaceae	8,5	0,2	0,0	0,8	1,8	3,5
3578	Enterobacteriaceae	0,0	0,7	0,5	3,2	0,6	0,5
4400	Gammaproteobacteria	0,3	0,0	0,0	0,0	5,5	0,0
4458	Alcaligenaceae	0,1	12,6	0,0	0,1	0,0	0,0
4962	Enterobacteriaceae	0,2	0,2	0,0	0,0	1,2	4,2
5593	Enterobacteriaceae	4,5	0,1	0,0	0,4	0,1	0,3
5738	Enterobacteriaceae	0,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1
5850	Enterobacteriaceae	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	1,3
5954	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	3,0
6130	Enterobacteriaceae	0,3	0,3	0,0	1,1	0,5	1,4
6131	Enterobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2
6226	Gammaproteobacteria	3,3	0,4	0,0	0,4	1,1	1,5
6266	Enterobacteriaceae	0,0	0,2	0,0	0,0	0,7	3,2
6363	Enterobacteriaceae	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	2,3

*- UTO exclusiva do tratamento observado

A microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* oriundos de lagartas alimentadas em diferentes hospedeiros de metabolismo C3 e C4 apresentaram inúmeros representantes exclusivos (Tabela 8). Soja (C3) e milho (C4) foram os alimentos utilizados por lagartas de *S. frugiperda* que resultaram no maior número de UTOs exclusivas associadas ao trato digestivo de adultos, em relação às demais plantas hospedeiras (Tabela 8). Em contrapartida, adultos oriundos de criação em feijão apresentaram uma única UTO exclusivamente associada ao trato digestivo, enquanto aqueles oriundos de criação em crotalária e caruru não apresentaram nenhuma UTO exclusiva (Tabela 8). A quase totalidade dessas UTOs exclusivamente associadas ao trato digestivo de adultos obtidos das diferentes fontes de alimento são de abundância extremamente baixa, com exceção de *Morganella* na microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* oriundos de criação em capim-colonião (Tabela 8).

Tabela 8 – Relação da abundância e identificação de bactérias exclusivas, a nível de Família e Gênero, presentes na microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* proveniente de plantas com metabolismo C3 e C4

Bactérias presente na microbiota intestinal de insetos proveniente de plantas C3				
Fonte alimentar	Gênero	Família	Abundância	UTOs
Algodão	<i>Tanticharoenia</i>	Acetobacteraceae	0,025%	5260
Feijão	<i>Melissococcus</i>	Enterococcaceae	0,050%	4071
Mucuna Preta	<i>Enhydrobacter</i>	Moraxellaceae	0,100%	5959
	<i>Rhizobium</i>	Rhizobiaceae	0,025%	5343
Trigo	<i>Alicyciphilus</i>	Comamonadaceae	0,025%	5216
	<i>Edwardsiella</i>	Enterobacteriaceae	0,025%	5885
	<i>Hydrocarboniphaga</i>	Sinobacteraceae	0,025%	3462
	<i>Luteibacter</i>	Xanthomonadaceae	0,050%	4965
Soja	<i>Bradyrhizobium</i>	Bradyrhizobiaceae	0,025%	6733
	<i>Capnocytophaga</i>	Flavobacteriaceae	0,025%	1741
	<i>Chryseobacterium</i>	Flavobacteriaceae	0,275%	1569
	<i>Dermabacter</i>	Dermabacteraceae	0,025%	2182
	<i>Finegoldia</i>	Clostridiaceae	0,125%	40
	-	Streptococcaceae	0,025%	5693
	-	Actinosynnemataceae	0,025%	3117
	-	Beijerinckiaceae	0,025%	2273
Bactérias presente na microbiota intestinal de insetos proveniente de plantas C4				
Fonte alimentar	Gênero	Família	Abundância	UTOs
Sorgo	<i>Elizabethkingia</i>	Flavobacteriaceae	0,025%	4713
Milho	<i>Haloanella</i>	Flavobacteriaceae	0,075%	1702
	-	Flavobacteriaceae	8,000%	1199
	-	Flavobacteriaceae	2,900%	2255
Capim Colonião	<i>Morganella</i>	Enterobacteriaceae	5,950%	4842 1300 2912
	<i>Tetrathlobacter</i>	Alcaligenaceae	0,025%	6612
Braquiária	<i>Azospirillum</i>	Rhodospirillaceae	0,050%	4928
	<i>Swaminathania</i>	Acetobacteraceae	0,350%	6047
Milheto	<i>Brachybacterium</i>	Dermabacteraceae	0,025%	6359
	<i>Clostridium</i>	Clostridiaceae	0,050%	2399
	<i>Lactobacillus</i>	Lactobacillaceae	0,025%	2159
	-	Micrococcaceae	0,025%	368
	-	Pasteurellaceae	0,075%	5817 857
	-	Chitinophagaceae	0,075%	6152 6406 6182
	-	Neisseriaceae	0,050%	2254
	<i>Neisseria</i>	Neisseriaceae	0,025%	6555
	<i>Rubrobacter</i>	Rubrobacteraceae	0,025%	1499

Análises da diversidade entre as microbiotas intestinais, levando-se (unifrac ponderado) ou não (unifrac não-ponderado) em consideração a abundância das diferentes entidades taxonômicas identificadas e as suas relações filogenéticas, demonstraram que as microbiotas em questão foram afetadas pela fonte de alimento, independentemente do tipo de metabolismo fotossintético apresentado (Figuras 10 e 11). A variação explicada pelas variáveis nos diferentes eixos do PcoA associado às análises de Unifra não-ponderado foi muito baixa, inferior a 15%, mas, mesmo assim, permitiu a diferenciação entre a maioria das microbiotas estudadas (Figura 10A). A análise de UPGMA permitiu a visualização de diversos grupos com mais de 50% de suporte de bootstrap, sendo os grupos formados por capim, caruru, trigo e mucuna preta e por algodão, soja, sorgo, feijão, milho, milheto, crotalária e braquiária, os que ganharam maior sustentação (Figura 10B). As microbiotas de adultos obtidos de criação em milho e milheto, duas plantas de metabolismo C4, permaneceram em um subclado com a microbiota de adulto obtidos de crotalária, uma planta de metabolismo C3 (Figura 10B). Nesse caso ainda, a comunidade de milheto resolve em um ramo mais interno juntamente com a de crotalária, permanecendo a de milho externa a este subclado mais interno (Figura 10B). As microbiotas de adultos provenientes de soja e algodão foram as únicas obtidas de criação em plantas hospedeiras que apresentaram o mesmo metabolismo fotossintético que apresentaram grupamento distinto e significativo (Figura 10B).

Figura 10 – Análise de coordenadas principais (PCoA) (A) e de UPGMA (B) da diversidade entre as comunidades bacterianas do intestino de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de criação de larvas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4, utilizando o método Unifrac não-balanceado. Em (B), as cores dos ramos representam os valores de sustentação por bootstrap, sendo: vermelho – 75-100%; amarelo – 50-75%; verde: 25-50%.

Quando a abundância relativa das UTOs foi considerada na análise comparativa da diversidade das microbiotas pelo método do Unifrac balanceado, a porcentagem de variação explicada nos diferentes eixos do PCoA atingiu 31% no eixo PC1 e 21% no PC2, sendo possível a visualização de microbiotas bem distintas (Figura 11A). A análise de UPGMA resultou em grupamentos distintos e com suporte de bootstrap muito superior daqueles obtidos nas análises não-ponderada (Figura 11B). A microbiota de adultos de *S. frugiperda* de criação em milho foi a mais distinta, formando ramo próprio com 75 a 100% de suporte de bootstrap (Figura 11B). As microbiotas de adultos obtidos de soja, algodão e trigo, todos hospedeiros de metabolismo C3, foram bem próximas entre si, formando um subclado separado com suporte de bootstrap de 75 a 100%. Porém, a de trigo se coloca mais próxima a de algodão, permanecendo a de soja externa a esse subclado interno, também sustentado por alto valor de bootstrap (Figura 11B). Todas as demais microbiotas de adultos oriundos de plantas de metabolismo C3 ou C4 resolveram em um grande clado contendo subclados internos com valores de sustentação de bootstrap significativos para o posicionamento isolado dessa microbiota. Apenas aquelas de feijão (C3) e de sorgo (C4) resolveram juntas em um mesmo subclado (Figura 11B).

Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) (A) e de UPGMA (B) da diversidade entre as comunidades bacterianas do intestino de adultos de *Spodoptera frugiperda* obtidos de criação de larvas em plantas hospedeiras de metabolismo C3 e C4, utilizando o método Unifrac balanceado. Em (B), as cores dos ramos representam os valores de sustentação por bootstrap, sendo: vermelho – 75-100%; amarelo – 50-75%; verde: 25-50%.

5 DISCUSSÃO

O uso de isótopos estáveis de carbono como marcador para a identificação da fonte de alimento de imaturos de *S. frugiperda* pela análise de adultos foi extremamente eficiente na separação de insetos provenientes de plantas hospedeiras de metabolismo fotossintético C3 ou C4, confirmando que a baixa variação de carbono disponível naturalmente na atmosfera e a sua exploração por plantas de diferentes grupos metabólicos (C3 e C4) pode ser facilmente detectada e relacionada a níveis tróficos superiores (TRIVELIN et al., 1973; POST, 2002; BLUTHGEN et al., 2003; KUBASEK et al., 2013). Como a fonte alimentar de imaturos de *S. frugiperda* permanece a mesma durante todo o seu desenvolvimento larval, pois não a exploração concomitante de diferentes recursos alimentares por imaturos no ambiente natural não relatada como habitual, e o adulto não necessita de recursos nutricionais para desempenhar suas atividades reprodutivas, a assinatura isotópica de carbono desse inseto não está sujeita às variações decorrentes de processos de turn-over, permitindo que o mesmo reflita a assinatura isotópica de sua fonte alimentar durante a fase imatura (OSTROM et al., 1997; HOOD-NOWOTNY et al., 2010; MILANO et al., 2010).

O nitrogênio, ao contrário do carbono, não se mostrou um bom indicador para a identificação do alimento utilizado pela fase imatura de *S. frugiperda*, utilizando os adultos para a análise isotópica. As discrepâncias observadas nos valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ entre plantas e insetos oriundos de criação em plantas do mesmo grupo de metabolismo fotossintetizante podem ser decorrentes da variação à qual a disponibilidade de nitrogênio sofre devido a fatores como temperatura (JOERN; BEHMER, 1997), tipo de solo, utilização de fertilizantes, reciclagem de nitrogênio realizado pelas plantas (EVANS, 2001), associações a bactérias fixadoras de nitrogênio (DELWICHE; STEYN, 1970).

Assim como a assimilação de carbono altera a assinatura isotópica de plantas, cada planta pode apresentar sua própria comunidade de bactérias associadas, sejam elas habitantes do filoplano ou endofíticas, e que podem estabelecer as mais diversas interações com a planta hospedeira (İNCEOĞLU et al., 2010; PINI et al., 2011; BULGARELLI et al., 2013; GAIERO et al., 2013; MA et al., 2013). Essa microbiota associada às plantas também pode ser compartilhada (PRIYA et al., 2012; FLUGERAB, FEIN, 2010) e estabelecer associações com

insetos herbívoros (PINEDA et al., 2013; MASON et al., 2014), mesmo que em caráter temporário, o que poderia explicar a variação de UTOs associadas a *S. frugiperda*. Há relatos de que a microbiota intestinal de insetos difere em resposta ao posicionamento sistemático do inseto e à fonte de alimento utilizada (TOMAS et al., 2011; COLMAN et al., 2013), sendo ainda demonstrada a representação da comunidade de bactérias do filoplano de plantas hospedeiras como membros dominantes da microbiota intestinal de herbívoros (PRIYA et al., 2012), há relatos que também demonstram que microbiota intestinal de insetos apresenta simbioses que desempenham funções específicas na relação com alimento, sendo fundamentais para o bem sucedido uso desse recurso alimentar (HANSEN, MORAN, 2014; ZHU et al., 2014).

Mesmo que a quase totalidade dos estudos para determinação da microbiota intestinal tenha sido realizada com fases do desenvolvimento que realizam alimentação ativa, há indicações de que a microbiota intestinal adquirida na fase de alimentação mais ativa (fase larval), permaneça associada ao intestino do adulto, mesmo naqueles insetos de metamorfose completa (MARTINSON et al., 2012). Em *Heliconius erato*, foi demonstrado que a microbiota intestinal associada a imaturos sofre um declínio de 50% em sua diversidade no momento da formação da pupa, e que a aquisição de alimentos pela fase adulta faz com que a diversidade inicial da microbiota intestinal nessa fase volte a ser elevada, mostrando agora o efeito do alimento nessa fase do desenvolvimento do inseto (HAMMER et al., 2014). Porém, assim como discutido anteriormente, não esperamos que a diversidade da microbiota associada ao intestino de adultos de *S. frugiperda* sofra alterações significativas na diversidade de sua microbiota com o seu envelhecimento, dado ao fato de que esses insetos dispensam alimentação nessa fase da vida para o desempenho de suas atividades reprodutivas (MILANO et al., 2010).

Assim, fica evidente que a microbiota de insetos é influenciada por fatores diversos que incluem o alimento e sua microbiota associada, ao mesmo em que indica que associações particulares devem ocorrer para a exploração de determinados recursos alimentares, o que resulta em variações na estrutura das comunidades de microrganismos associados ao trato intestinal, assim como aquelas observadas nesse trabalho. De qualquer forma, mesmo com o número reduzido de UTOs especificamente associadas ao inseto em decorrência de sua fonte alimentar,

principalmente no que se refere a simbiontes com participação significativa na microbiota, foi evidente que a análise da diversidade da microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda*, especialmente quando se considerou a abundância relativa de seus representantes, se mostrou com um excelente marcador para identificar a fonte de alimento utilizada pela fase larval.

6 CONCLUSÕES

- A assinatura isotópica de carbono de adultos de *Spodoptera frugiperda* reflete a assinatura isotópica da fonte de alimento utilizada na fase larval;
- A análise conjunta das assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio de adultos de *Spodoptera frugiperda* permite diferenciar a fonte alimentar utilizada na fase larval entre hospedeiros de metabolismo C3 (algodão, crotalária, feijão, mucuna preta, soja e trigo) e C4 (braquiária, capim colonião, caruru, milheto, milho e sorgo);
- Dentre as diversas plantas hospedeiras utilizadas como alimento por *Spodoptera frugiperda*, a análise conjunta da assinatura isotópica de carbono e nitrogênio de tecidos de adultos não permite diferenciar adultos oriundos de lagartas que se alimentaram de milho daquelas que se alimentaram de braquiária;
- É possível a determinação da fonte de alimento (C3 ou C4) utilizada pela fase larval de *Spodoptera frugiperda* e a do número de adultos que utilizaram esses alimentos pela análise da assinatura isotópica de carbono de grupos de adultos;
- A diversidade dentro (alfa) e entre (beta) da microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* é influenciada pela fonte de alimento utilizada durante a fase larval, independentemente do metabolismo fotossintético da planta;
- Proteobacteria é mais abundante na microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda*, independentemente das fontes de alimento testadas;
- As UTOs mais abundantes na microbiota intestinal de adultos de *Spodoptera frugiperda* oriundos de larvas criadas em diferentes hospedeiros de metabolismo C3 e C4 representam gêneros não-classificados;
- Os simbiossiontes representados pelas UTO1199 e UTO2255 apresentaram abundância relativa elevada e foram exclusivamente associados à microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda*, os quais foram provenientes de criação em milho.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, v.59, n.1, p.143–169, 1995.

APPEL, H M. The chewing herbivore gut lumen: physiochemical conditions and their impact on plant nutrients, allelochemicals, and insect pathogens. Boca raton, FL: **Insect-Plant Interactions**, New York, p.209–223.1993.

BALLOR, N.R.; LEADBETTER, J.R. Analysis of extensive [fefe] hydrogenase gene diversity within the gut microbiota of insects representing five families of dictyoptera. **Microbial Ecology**, New York, v.63, n.3, p.586–595, 2012.

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W. and YAMASAKI, S.(Ed.). **Mass Spectrometry of Soils** Crewe, p. 1-46, 1996. ,

BATES, S.L.; ZHAO, J.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, New York, v.23, n.1, p.57-62, 2005.

BERG, J.V.; HILBECK, A.; BOHN, T. Pest resistance to Cry1Ab Bt maize: Field resistance, contributing factors and lessons from South Africa. **Crop protection**, Guildford, v.54, p.154-160, 2013.

BLUTHGEN, N.; GEBAUER, G.; FIEDLER, K. Disentangling a rainforest food web using stable isotopes: dietary diversity in a species-rich ant community. **Oecologia**, Berlin, v.137, n.3, p.426-435, 2003.

BRUCKER, R.M.; BORDENSTEIN, S.R. The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities **Evolution**, . Lancaster, v.66, n.2, p.349–362, 2012.

BUENO, A.F.B.; PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRAC, B.S.; BEATRIZ, C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B; SOSA-GÓMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L; HIROSE, E.; MOSCARDI, F.; CORSO, I.C.; LENITA JACOB OLIVEIRA, L.O.; ROGGIA, S.

Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.64, p.807-838, 2013.

COLMAN, D.R.; TOOLSON, E.C.; VESBACH, C.D. T. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? **Molecular Ecology**, Oxford, v.21, p.5124-5137, 2013.

CRAWFORD, P.A.; CROWLEY, J.R.; SAMBANDAM, N.; MUEGGE, B.D.; COSTELLO, E.K.; HAMADY, M; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.106, n.27, p.11276-11281, 2009.

DELWICHE, C.C.; STEYN, P. L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. **Environment Science and Technology**, Easton, v.4, n.11, p.929–935, 1970.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.49, p.71–92, 2004.

DOUGLAS, A.E. The molecular basis of bacterial–insect symbiosis. London, GB: **Journal of Molecular Biology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.005>, 2014.

DOWD, S.E.; SUN, Y.; WOLCOTT, R.D.; DOMINGO, A.; CARROLL, A.J.A. Bacterial tag–encoded flx amplicon pyrosequencing (btefap) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned salmonella-infected pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.5, n.4, p.459-472, 2008.

EVANS, R.D. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v.6, n.3, p.121–126, 2001.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, London, v.36, n.5, p.533–543, 2011.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agro-ecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.34, p.17-52, 1989.

FLUGER, A.C.; FEIN, E.Z. Do plants and insects share the same symbionts? **Israel Journal of Plant Sciences**, Jerusalem, v.58, n.2, p.113-119, 2010.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.19, n.3, p.227–276, 1999.

GAIERO, J.R.; MCCALL, C.A.; THOMPSON, K.A.; DAY, N.J.; BEST, A.S.; DUNFIELD, K.E. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. Columbus, Ohio, US: **American Journal of Botany**, Columbus, v.100, n.9, p.1738-1750, 2013.

GHASHGHAIE, J.; BADECK, F.W.; LANIGAN, G.; NOGUÉS, S.; TCHERKEZ, G.; DELÉENS, E.; CORNIC, G.; GRIFFITHS, H. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C3 plants. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.2, p.145–161, 2003.

GILBERT, M.T.P.; MOORE, W.; MELCHIOR, L.; WOROBEY, M. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. **Plos one**, San Francisco, v.2, n.3, e272, 2007.

GLENN R. GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonies microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.125, p.1401–1412, 1995.

GUNDUZ, E.A.; DOUGLAS, A.E. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. **Proceedings of the Royal Society**, London, v.276, p.987-991, 2009.

HAMMER T.J.; MCMILLAN, W.O.; FIERER, N. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. **Plos one**, San Francisco, v.9, n.1, e86995, 2014.

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

HOOD-NOWOTNY, R.; L. MAYR, L.; KNOLS, B.G.J. Use of carbon-13 as a population marker for *Anopheles arabiensis* in a sterile insect technique (SIT) context. **Malaria Journal**, London, v.5, n.6, p. 1-8, 2006.

İNCEOĞLU, O.; SALLES, J. F.; OVERBEEK, L.V.; ELSAS, J.D.V. Effects of plant genotype and growth stage on the beta-proteobacteria communities associated with different potato cultivars in two fields. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n.11, p.3675-3684, 2010.

ISHAK,H.D.; PLOWES,R.; SEN,R.; KELLNER,K.; MEYER,E.; ESTRADA,D.A.; DOWD,S.E.; MUELLER,U.G. Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16s amplicon 454 pyrosequencing **Microbial Ecology**, . Oxford, v.61, p.821–831, 2011.

JOERN, A.; BEHMER, S.T. Importance of dietary nitrogen and carbohydrates to survival, growth, and reproduction in adults of the grasshopper *Ageneotettix deorum* (Orthoptera: Acrididae). **Oecologia**, Berlin, v.112, n.2, p.201-208, 1997.

KANE, M.D.; BREZNAK, J.A. Effect of host diet on production of organic acids and methane by cockroach gut bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.9, p.2628-2634, 1991.

KAUTZ, S; RUBIN, B.E.R.; RUSSELL, J.A.; MOREAU, C.S. Surveying the microbiome of ants: comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,v.79, n. 2, p.525–534, 2013.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.43, p.243–270, 1998.

KUBÁSEK, J.; URBAN, O.; ŠANTRŮČEK, J. C4 plants use fluctuating light less efficiently than do C3 plants: a study of growth, photosynthesis and carbon isotope discrimination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.149, n.4, p.528–539, 2013.

LEDGARD, S.F.; DOUGLAS, J.A.; SPROSEN, M.S.; FOLLETT, J.M. Uptake and redistribution of ^{15}N within an established asparagus crop after application of ^{15}N -labelled nitrogen fertilizer. **Annals of Botany**, London, v.73, n.2, p.169-173, 1994.

LINCOLN, D.E.; SIONIT, N.; STRAIN, B.R. growth and feeding response of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to host plants grown in controlled carbon dioxide atmospheres. **Environmental Entomology**, College Park, v.13, p.1527-1530, 1984.

LOGIN, F.H.; HEDDI, A. Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.59, n.2, p.232-239, 2013.

MA, B.; LV, X.; WARREN, A.; GONG, J. Shifts in diversity and community structure of endophytic bacteria and archaea across root, stem and leaf tissues in the common reed, *Phragmites australis*, along a salinity gradient in a marine tidal wetland of northern China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.104, n.5, p.759-768, 2013.

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, p.901-910, 2014.

MARKOW, T.A.; ANWAR, S.; PFEILER, E. Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in natural populations of *Drosophila* species and their hosts. **Functional Ecology**, Oxford, v.14, n.2, p. 261–266, 2000.

MARTINSON, V.G.; MOY, J.; MORAN, N.A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.78, n.8, p.2830-2840, 2012.

MILANO, P.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ODA, M.L.; CÔNSOLI, F.L. Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.2, p.172-180, 2010.

MORAN, N.A. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Allahabad, Iv.104, p.8627-8633, 2007.

MURÚA, G; VIRLA, E. Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). **Acta Zoológica Mexicana**, Mexico, v.20, n.1, p.199, 2004.

NAGOSHI, R.N.; ADAMCZYK, J.J.; MEAGHER, R.L.; GORE, J.; JACKSON, R. Using stable isotope analysis to examine fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in a cotton habitat. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, n.5, p.1569-1576, 2007.

O'LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, . Dordrecht, v.20, n.4, p.553-567, 1981.

O'LEARY, M.H. Carbon isotopes in photosynthesis. **Journal of Bioscience**, Bangalore, v.38, n.5, p.328-336, 1988.

OSTROM, P.H.; GARCIA, M.C.; GAGE, S.H. Establishing pathways of energy flow for insect predators using stable isotope ratios: field and laboratory evidence. **Oecologia**, Berlin, v.109, n.1, p.108 - 113, 1997.

PARK, R.; EPSTEIN, S. Metabolic fractionation of C^{13} & C^{12} in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.36, n.2, p. 133-138, 1961.

PASHLEY, D.P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. **Evolution**, Lancaster, v.42, n.1, p.93–102, 1988.

PASHLEY, D.P.; MARTIN, J.A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.80, n.6, p.731-733, 1987.

PINEDA, A.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M.J.; POZO, M.J. Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? **Functional Ecology**, Oxford, v.27, n.3, p.574-586, 2013.

PINI, F.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in alphaproteobacteria? **Genes**, Basel, v.2, n.4, p.1017-1032, 2011.

PONSARD, S.; BETHENOD, M. T.; BONTEMPS, A.; PÉLOZUELO, L.; SOUQUAL, M.C.; BOURGUET, D. Carbon stable isotopes: a tool for studying the mating, oviposition, and spatial distribution of races of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, among host plants in the field. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.82, p.1177–1185, 2004.

POST, D.M. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. **Ecology**, Tempe, v.83, n.3, p.703–718, 2002.

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, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030768

SCHULTZ, J.E.; BREZNAK, J.A. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.35, n.5, p.930-936, 1978.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA NS.; WANG JT.; RAMAGE D.; AMIN N.; SCHWIKOWSKI B.; IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.13, n.11, pg. 2498-2504, 2003.

SITTENFELD, A.; LORÍO, L.U.; MORA, M.; NIELSEN, V.; ARRIETA, G.; JANZEN, D.H. Does a polyphagous caterpillar have the same gut microbiota when feeding on different species of food plants? **Revista de Biología Tropical**, San Jose, CR: (online), v.50, n.2, p.547-560, 2002.

SPARKS, A.N. A Review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v.62, n.2, p.82-87, 1979.

STEFFAN, S.A.; DAANE, K.M.; MAHR, D.L. ¹⁵N-enrichment of plant tissue to mark phytophagous insects, associated parasitoids, and flower-visiting entomophaga. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.98, n.2, p.173–180, 2001.

STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.110, n.3, p.294–300, 2012.

TABASHNIK, B.E.; SANCHEZ, D.M.; WHALON, M.E.; HOLLINGWORTH, R. M.; CARRIERE, Y. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.107, n.2, p.496-507, 2014.

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; MORIN, S.; SISTERSON, M.S.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M.; ZHAO, J. Insect resistance to transgenic bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.96, n.4, pg.1031-1038, 2003.

TANAKA, H.; AOYAGI, H.; SHINA, S.; DODO, Y.; YOSHIMURA, T.; NAKAMURA, R.; UCHIYAMA, H. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* shiraki. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.71, n.6, p.907–917, 2006.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, Berlin, v.57, n.1, p.32-37, 1983.

TOMÁS, A.A.P.; SITTENFELD, A.; LORÍO, L.U.; CHAVARRÍA, F.; MORA, M.; JANZEN, D.H.; GOODMAN, R.M.; SIMON, H.M. Comparison of midgut bacterial diversity in tropical caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae) fed on different diets. **Environmental Entomology**, College Park, v.40, n.5, p.1111-1122, 2011.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massa. **Boletim Técnico CENA**, Piracicaba, v.2, p.41, 1973.

VASANTHAKUMAR, A.; HANDELSMAN, J.; SCHLOSS, P.D. ; BAUER, L.S.; RAFFA, K.F. Gut microbiota of an invasive subcortical beetle, *Agrilus planipennis fairmaire*, across various life stages. **Environmental Entomology**, College Park, v.37, n.5, p.1344-1353, 2008.

WAQUIL, J.M. Manejo integrado de pragas: revisão histórica e perspectivas. Embrapa Milho e Sorgo. In: 24º CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2002. Florianópolis. **Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS)** Florianópolis: Ed. 24, 2002.

WOLF, W.W.; WESTBROOK, J.K.; RAULSTON, J.; PAIR, S.D.; HOBBS, S.E.; RILEY, J.R.; MASON, P.J.; JOYCE, R.J.V. Recent airborne radar observations of migrant pests in the united states [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v.328, p.619-630, 1990.

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

ZHU, F.; POELMAN, E.H.; DICKE, M. Insect herbivore-associated organisms affect plant responses to herbivory. **New Phytologist**, Cambridge, 2014, doi: 10.1111/nph.12886.