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

**Microbiota intestinal de *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae)
associada aos agrossistemas do Novo Mundo: diversidade e capacidade de
utilização de inseticidas**

Ana Flávia Freitas Gomes

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

**Piracicaba
2018**

Ana Flávia Freitas Gomes
Engenheira Agrônoma

**Microbiota intestinal de *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae) associada
aos agrossistemas do Novo Mundo: diversidade e capacidade de utilização de
inseticidas**

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

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

Piracicaba
2018

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

Gomes, Ana Flávia Freitas

Microbiota intestinal de *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae) associada aos agrossistemas do Novo Mundo: diversidade e capacidade de utilização de inseticidas / Ana Flávia Freitas Gomes. - - Piracicaba, 2018.

73 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Desintoxicação 2. Holobionte 3. Microbioma 4. Simbiose I. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Custódio e Dorinha, e ao meu irmão, Arthur, por todo apoio e carinho. Por serem meu porto seguro.

Ao meu namorado, Diego, pelo carinho, companheirismo e cumplicidade.

À Mariana e Bruna, minha primeira família de Piracicaba, e a todos os amigos que conquistei ao longo dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cònsoli, pela orientação, ensinamentos e confiança. Por ser um exemplo de profissional e me incentivar sempre.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos (ESALQ/USP), Bruna, Luís, Nathalia, Wanessa, Pedro, Diandra, Ana, Iara, Aline, Caio, Letícia, Mariane, Eloísa, Matheus e Marcelle, pelo auxílio nos experimentos, pela companhia e apoio. Pelos cafés, conversas e risadas.

Aos amigos e familiares que me auxiliaram nas coletas de insetos no campo.

Ao Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP) pelo fornecimento das lagartas de *Spodoptera albula*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* e *Spodoptera frugiperda*.

Ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP) pelo fornecimento das linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes e suscetíveis a inseticidas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP pelo suporte.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
– Carl Sagan

RESUMO

Microbiota intestinal de *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae) associada aos agrossistemas do Novo Mundo: diversidade e capacidade de utilização de inseticidas

Insetos são os organismos multicelulares mais bem-sucedidos no ecossistema terrestre e sua riqueza se deve, em parte, à simbiose com microrganismos. Geradora de diversidade fenotípica, a comunidade microbiana associada a insetos permite a manutenção de fenótipos complexos capazes de colonizar novos nichos e de se adaptar a fatores de estresse. A relevância da relação de simbiose na ordem Lepidoptera, todavia, tem sido questionada em função da alta variabilidade da comunidade bacteriana associada aos seus representantes. Tendo como modelo de estudo lagartas do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), esse trabalho teve por objetivo melhor compreender a composição e diversidade da microbiota associada ao intestino de lepidópteros, assim como verificar o efeito da pressão de seleção direcionada à resistência na sua estrutura e capacidade de utilização de inseticidas como fonte de carbono. Para isso, foi realizada a análise metagenômica da comunidade microbiana intestinal de quatro espécies do gênero *Spodoptera* assim como de cinco populações naturais de *S. frugiperda* e de linhagens suscetível e resistentes desse inseto praga. Foram avaliadas linhagens de *S. frugiperda* resistentes aos inseticidas spinosad, chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, flubendiamide, teflubenzuron e à toxina de *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105+Cry2Ab2. A análise da composição, riqueza e capacidade da comunidade bacteriana utilizar inseticidas foi baseada na determinação de índices de diversidade alfa e beta, no isolamento de bactérias intestinais em meio seletivo e na análise do potencial de crescimento dos isolados em inúmeros inseticidas. Nossos resultados indicam a importância da microbiota intestinal para esse gênero de Lepidoptera. Bactérias do gênero *Enterococcus* foram predominantes em todas as populações de *Spodoptera* analisadas, independentemente da espécie, dieta ou pressões de seleção às quais as lagartas foram expostas. Populações naturais de *S. frugiperda* apresentaram um microbioma mais diverso e com maior número de bactérias capazes de metabolizar inseticidas. A diversidade do microbioma, assim como a presença e capacidade de bactérias utilizarem inseticidas como fonte de carbono para o seu crescimento foram influenciadas pelo nível de exposição a tais compostos, demonstrando que, assim como o hospedeiro, a microbiota intestinal também se encontra em pressão de seleção direcionada a resistência.

Palavras-chave: Desintoxicação; Holobionte; Microbioma; Simbiose

ABSTRACT

Gut microbiota of *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae) associated with New World agrosystems: diversity and capacity of insecticides utilization

Insects are the most successful multicellular organisms in the terrestrial ecosystem and their richness is partially due to symbiosis with microorganisms. The microbial community associated with insects allows the maintenance of complex phenotypes capable of colonizing new niches and adapting to stressors. The relevance of symbiosis in Lepidoptera, however, has been questioned due to the high variability of the bacterial community associated with its representatives. Using *Spodoptera* larvae as a model, this work aimed to better understand the composition and diversity of the gut microbiota associated with Lepidoptera, as well as to verify the effects of the selection pressure with insecticides in the microbial gut structure and the ability of members of the community to metabolize insecticides as carbon source. Thus, we performed a metagenomic analysis of the gut microbial community of four species of the genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), as well as for five natural populations of *S. frugiperda* and susceptible and resistant strains of this pest. Strains of *S. frugiperda* resistant to the insecticides spinosad, chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, flubendiamide, teflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1A.105 + Cry2Ab2 were evaluated. The analysis of the composition, richness and ability of the bacterial community to metabolize insecticides were carried out through alpha and beta diversity indexes, isolation of intestinal bacteria in selective medium and analysis of the growth potential of isolates in multiple insecticides. Our data indicate the importance of symbiosis for *S. frugiperda*. *Enterococcus* prevailed in all populations analyzed, regardless of the species of *Spodoptera*, food source or selection pressure that the larvae were exposed. Microbial diversity and ability to metabolize insecticides were higher in natural populations exposed to a range of stressors in the field. The diversity of the gut microbial community associated to *Spodoptera frugiperda*, as well as the ability of its members to metabolize insecticides, were influenced by the degree of exposure to insecticides, showing that, like the host, the gut microbiota is also under selection pressure to resistance.

Keywords: Detoxification; Holobiont; Microbiome; Symbiosis

1. INTRODUÇÃO

A simbiose, definida como a associação próxima entre quaisquer organismos por De Bary (1879), desempenha papel fundamental na evolução e adaptação a novos nichos (Shapira, 2016). Organismos em simbiose são denominados simbiontes e podem estabelecer relação de mutualismo, comensalismo ou parasitismo (Moran, 2006). A colonização por microrganismos não patogênicos é intrínseca à classe Insecta (Douglas, 2015) e pode ser benéfica ou até mesmo requerida para o desenvolvimento normal do inseto hospedeiro. Microrganismos que não estabelecem relações de patogenicidade com insetos influenciam da nutrição à defesa e reprodução do hospedeiro (Moran, 2007), interferindo na aptidão e diversidade de insetos no ecossistema terrestre (Voirol et al., 2018). De acordo com a localização em relação ao hospedeiro, simbiontes são classificados como ecto ou endossimbionte, sendo os últimos ainda denominados endocitobiontes quando sua colonização é intracelular, ou ectocitobionte, quando está no lúmen de algum órgão ou na hemocele (Hansen & Moran, 2014). Quanto a relação de dependência hospedeiro-microrganismo, simbiontes são classificados como primários obrigatórios ou secundários facultativos (Moran, 2006). Simbiontes obrigatórios normalmente têm histórias evolutivas longas com seus hospedeiros (Feldhaar, 2011), enquanto os facultativos parecem ter estabelecido associações mais recentes, mantendo a capacidade de retornar a uma condição de vida livre (Moya et al., 2008).

Embora não sejam essenciais à sobrevivência do hospedeiro, simbiontes facultativos podem beneficiar o hospedeiro oferecendo proteção a inimigos naturais e tolerância à fontes de estresse (Montllor et al., 2002; Oliver et al., 2005), além de, em alguns casos, atuarem como manipuladores reprodutivos, como *Spiroplasma (Tenericutes)* (Martins et al., 2010; Anbutsu & Fukatsu, 2011) e *Wolbachia (Proteobacteria)* (Werren et al., 2008). Simbiontes secundários são frequentemente encontrados em apenas uma fração da população, na qual eles podem ter efeitos marcantes sobre o fenótipo do hospedeiro (Oliver et al., 2010). Em associação obrigatória ou facultativa com microrganismos, o inseto pode adquirir características fenotípicas que garantem a sobrevivência frente à exposição a fatores de estresse e, como unidade, estão sujeitos à ação da pressão de seleção em condições naturais (Guégan et al., 2018). Desafiando o conceito clássico de indivíduo (Gilbert et al., 2012), inseto e sua microbiota residente podem ser vistos assim como um organismo quimérico – uma unidade ecológica denominada holobionte (Margulis, 1991), formada pelo genoma do hospedeiro e pelos genomas da microbiota associada (hologenoma) (Zilber-Rosenberg &

Rosenberg, 2008; Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). Do ponto de vista evolutivo, o hologenoma atua como uma fonte de variabilidade e de informação genética (Bordenstein & Theis, 2015). Enquanto o genoma do hospedeiro é altamente conservado, o genoma do microbioma é dinâmico e capaz de mudar rapidamente em resposta ao ambiente, seja através do aumento ou redução de microrganismos particulares, da aquisição de novos microrganismos ou da transferência horizontal de genes (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018).

O microbioma atua como força motriz para a inovação evolutiva, permitindo a manutenção de fenótipos complexos capazes de se adaptar às condições adversas presentes no meio (Mereghetti et al., 2017; Itoh et al., 2018). Em insetos, o conceito de holobionte como unidade de seleção em evolução (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008) foi abordado principalmente em relações de simbiose obrigatória (Guerrero et al., 2013; Mandrioli & Manicardi, 2013), onde ocorre alto grau de fidelidade e o genoma microbiano é transmitido verticalmente – da mãe para os descendentes. Simbioses facultativas, todavia, também abrangem o termo holobionte uma vez que afetam o fenótipo do hospedeiro e são estabelecidas a cada geração através da transmissão horizontal (Theis et al., 2016). Simbiontes facultativos são encontrados principalmente no intestino de insetos (Dillon & Dillon, 2004; Engel & Moran, 2013) e podem ter sua diversidade moldada em função da dieta (Colman et al., 2012), localização geográfica e clima (Gayatri Priya et al., 2012), além de variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, filogenia (Yun et al., 2014) e pressões de seleção às quais o hospedeiro foi exposto (Almeida et al., 2017).

Em Lepidoptera, a associação com microrganismos está envolvida em atividades como nutrição (Visôttto et al., 2009; Pal & Karmakar, 2018), reprodução (Werren et al., 2008) e proteção contra inseticidas ou metabólitos secundários de plantas (Itoh et al., 2018; Mason et al., 2018). Pesquisas sobre a composição da microbiota intestinal de lepidópteros indicam uma comunidade microbiana altamente variável intra e interespecificamente, o que foi justificado como uma resposta à ausência de condições adequadas para a colonização estável de comunidades bacterianas (Hammer et al., 2017; Voirol et al., 2018). Em geral, o intestino de lepidópteros não é compartimentalizado, apresenta pH alcalino e tem sua estrutura modificada durante a metamorfose, o que pode comprometer o estabelecimento de uma microbiota residente fixa a cada geração (Staudacher et al., 2016; Hammer et al., 2017). Alguns grupos bacterianos, no entanto, são observados com frequência na literatura relacionada ao microbioma de lagartas (Mereghetti et al., 2017), como as famílias *Clostridiaceae* (*Firmicutes*), *Enterococcaceae* (*Firmicutes*) e *Enterobacteriaceae*

(*Proteobacteria*), reconhecidas como um núcleo funcional potencial na espécie *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) (Tang et al., 2012; Shao et al., 2014; Chen et al., 2016). O microbioma variável de lepidópteros sugere a possibilidade da manutenção de uma microbiota dinâmica com alta adaptabilidade em diferentes condições de estresse, baseado na redundância de sua contribuição funcional. O papel da comunidade simbiote na plasticidade fenotípica na ordem Lepidoptera, no entanto, ainda não é clara, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a interação hospedeiro-microrganismo nesse grupo de insetos, assim como a sua contribuição como holobionte frente às pressões de seleção em condições naturais.

Referências

- Almeida, L. G. de, Moraes, L. A. B. de, Trigo, J. R., Omoto, C., and Cônsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. *PLoS One* 12, e0174754. doi:10.1371/journal.pone.0174754.
- Anbutsu, H., and Fukatsu, T. (2011). *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont. *Environ. Microbiol. Rep.* doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00240.x.
- Bordenstein, S. R., and Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* doi:10.1371/journal.pntd.0005749.
- Chen, B., Teh, B. S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., et al., (2016). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep29505.
- Colman, D. R., Toolson, E. C., and Takacs-Vesbach, C. D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05752.x.
- Dillon, R. J., and Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71–92. doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123416.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* doi:10.1146/annurev-ento-010814-020822.
- Engel, P., and Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/1574-6976.12025.
- Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* doi:10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x.
- Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A., and Rajagopal, R. (2012). Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS One* 7, e30768. doi:10.1371/journal.pone.0030768.
- Gilbert, S. F., Sapp, J., and Tauber, A. I. (2012). A symbiotic view of life: we have never been individuals. *Q. Rev. Biol.* doi:10.1086/668166.

- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., et al., (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*. doi:10.1186/s40168-018-0435-2.
- Guerrero, R., Margulis, L., and Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol.* doi:10.2436/20,1501.01.188.
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., and Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 9641–9646. doi:10.1073/pnas.1707186114.
- Hansen, A. K., and Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol. Ecol.* doi:10.1111/mec.12421.
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., and Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Nat. Prod. Rep.* doi:10.1039/c7np00051k.
- Mandrioli, M., and Manicardi, G. (2013). Evolving aphids: one genome-one organism insects or holobionts? *Invertebr. Surviv. J.* 10, 1–6. Available at: <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ287.pdf>.
- Margulis, L. (1991). Symbiogenesis and symbiogenesis, p 1–14. In Margulis L, Fester R (ed), *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT Press doi:10.1007/s00360-013-0744-5.
- Martins, A. B., Ventura, I. M., and Klaczko, L. B. (2010). *Spiroplasma* infection in *Drosophila melanogaster*: What is the advantage of killing males? *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2010.06.002.
- Mason, C. J., Jones, A. G., and Felton, G. W. (2018). Co-option of microbial associates by insects and their impact on plant–folivore interactions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/pce.13430,
- Mereghetti, V., Chouaia, B., and Montagna, M. (2017). New insights into the microbiota of moth pests. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2450, doi:10.3390/ijms18112450,
- Montllor, C. B., Maxmen, A., and Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* doi:10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x.
- Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Curr. Biol.* 16, R866–71. doi:10.1016/j.cub.2006.09.019.
- Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 8627–8633. doi:10.1073/PNAS.0611659104.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., and Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg2319.
- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., and Moran, N. A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu. Rev. Entomol.* doi:10.1146/annurev-ento-112408-085305.
- Oliver, K. M., Moran, N. A., and Hunter, M. S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.0506131102.

- Pal, S., and Karmakar, P. (2018). Symbionts associated with insect digestive system and their role in insect nutrition. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 421–425. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/327581657>.
- Rosenberg, E., and Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6, 78. doi:10.1186/s40168-018-0457-9.
- Shao, Y., Arias-Cordero, E., Guo, H., Bartram, S., and Boland, W. (2014). In vivo pyro-sip assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS One* 9, e85948. doi:10.1371/journal.pone.0085948.
- Shapira, M. (2016). Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 31, 539–549. doi:10.1016/j.tree.2016.03.006.
- Staudacher, H., Kaltenpoth, M., Breeuwer, J. A. J., Menken, S. B. J., Heckel, D. G., and Groot, A. T. (2016). Variability of bacterial communities in the moth *Heliothis virescens* indicates transient association with the host. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0154514.
- Tang, X., Freitak, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., Cordero, E. A., et al., (2012). Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS One* 7, e36978. doi:10.1371/journal.pone.0036978.
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., et al., (2016). Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* 1, e00028-16. doi:10.1128/mSystems.00028-16.
- Visôto, L. E., Oliveira, M. G. A., Ribon, A. O. B., Mares-Guia, T. R., and Guedes, R. N. C. (2009). Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* doi:10.1603/022.038.0415.
- Voirol, L. R. P., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., and Fatouros, N. E. (2018). Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.00556.
- Werren, J. H., Baldo, L., and Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro1969.
- Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., et al., (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01226-14.
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

2. MICROBIOTA INTESTINAL DE ESPÉCIES AMERICANAS DE *Spodoptera* GUENÉE (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

O avanço de técnicas moleculares, como o sequenciamento de nova geração (NGS), nos permitiu melhor investigar a dinâmica e diversidade de microrganismos associados a eucariotos. De forma independente do cultivo, tornou-se possível a compreensão da relação de simbiose ao nível de comunidade – quem são os microrganismos, qual sua abundância e o que fazem. A associação com microrganismos é comum a insetos e, seja obrigatória ou facultativa, pode afetar diretamente a bioecologia do hospedeiro. Em Lepidoptera, a contribuição funcional de simbioses, assim como a existência de uma microbiota residente, tem sido alvo de discussão na comunidade científica. A fim de melhor compreender a relação da microbiota intestinal e seus insetos hospedeiros, esse trabalho teve por objetivo comparar a microbiota associada ao intestino de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), todas pragas de culturas de importância econômica como milho, soja e algodão. Assim, lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Spodoptera albula* (Walker), *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker), obtidas de criação em condições de laboratório, foram dissecadas para a extração do intestino médio e posterior análise metagenômica da microbiota associada. A caracterização da composição da microbiota foi realizada via sequenciamento da região V3 - V4 do gene 16S do RNA ribossomal. Os experimentos foram realizados em triplicata e as leituras obtidas em plataforma Illumina MiSeq analisadas com o software QIIME2. A diversidade e estrutura da comunidade microbiana associada ao intestino das diferentes espécies de *Spodoptera* foi analisada utilizando-se de índices de diversidade alfa e beta e da classificação taxonômica via busca heurística contra sequências do banco SILVA 128. A microbiota mostrou-se predominantemente composta por bactérias do gênero *Enterococcus*, com mais de 95% de abundância em todas as espécies amostradas, o que sugere a importância do táxon ao gênero *Spodoptera*. No entanto, pelo menos quatro filotipos de *Enterococcus* foram identificados associados ao intestino de *Spodoptera*, indicando haver diferenças entre os *Enterococcus* de algumas das espécies estudadas.

Palavras-chave: Adaptação hospedeira; Metagenômica; Microbiota intestinal; Simbiose

Abstract

The advancement of molecular techniques, such as the new generation sequencing (NGS), allowed to better investigate the dynamics and diversity of the microorganisms associated with eukaryotes. Regardless of cultivation, it became possible to understand the relationship with microbes at the community level – diversity, abundance and functional contribution of microorganisms. The association with microorganisms is common in insects and, whether obligate or facultative, can directly affect host bioecology. In Lepidoptera, however, the functional contribution of symbionts, as well as the existence of a resident microbiota, has been a matter of debate in the scientific community. In order to better understand the relationship between symbionts and insects, this research aimed to compare the gut microbial community of species of the genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae).

All species are known as pests of important crops such as corn, soybeans and cotton. Larvae of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Spodoptera albula* (Walker), *Spodoptera eridania* (Cramer) and *Spodoptera cosmioides* (Walker) were reared under laboratory conditions and dissected for midgut collection and subsequent metagenomic analysis of the associated microbiota. Microbiota characterization was performed by sequencing the V3 - V4 region of the 16S rRNA gene. Experiments were performed in triplicate and the results were analyzed with the QIIME2 software. Diversity and structure of the gut microbial community associated with different species of *Spodoptera* were analyzed using alpha and beta diversity indexes and the taxonomic classification was performed by comparison to the sequences of the SILVA 128 database. Gut microbiota of species of *Spodoptera* was predominantly composed of bacteria of the genus *Enterococcus*, with more than 95% abundance in all *Spodoptera* species, suggesting the importance of this taxon to the genus *Spodoptera*. At least four *Enterococcus* phylotypes were identified in the midgut of the studied species of *Spodoptera*.

Keywords: Host adaptation; Metagenomics; Gut microbiota; Symbiosis

3. MICROBIOTA INTESTINAL DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): A INFLUÊNCIA DE INSETICIDAS NA SUA DIVERSIDADE E A SELEÇÃO DE BACTÉRIAS METABOLIZADORAS DE INSETICIDAS

Resumo

A simbiose com bactérias pode ter efeito direto na fisiologia e desenvolvimento de insetos e atuar como facilitadora na adaptação a novos nichos. O inseto, junto com sua microbiota associada, adquire características fenotípicas que garantem a sobrevivência frente a fatores de estresse, como em situações de escassez de alimento e exposição a compostos tóxicos. Utilizando como modelo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e sua microbiota intestinal associada, esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência da pressão de seleção presente no meio agrícola sobre a estrutura, diversidade e aptidão da microbiota intestinal desse inseto. O efeito da pressão de seleção, nesse caso direcionada a resistência à inseticidas, foi avaliado sobre a microbiota associada ao intestino de linhagens de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes a inseticidas, assim como de populações naturais amostradas em campo. Os experimentos foram conduzidos via análise metagenômica das regiões v3 e v4 do 16S ribossomal (16S rRNA), isolamento e cultivo de bactérias em meio mínimo seletivo e análise da performance dos isolados em múltiplos inseticidas. O grau de exposição a inseticidas influenciou na composição do microbioma de *S. frugiperda*, assim como na capacidade e potencial de seus membros degradarem inseticidas. Todas as populações de *S. frugiperda* em estudo demonstraram microbiota composta majoritariamente por bactérias do gênero *Enterococcus* (Firmicutes). A maioria dos filotipos com capacidade de metabolizar inseticidas, no entanto, foi classificada como *Proteobacteria*. A microbiota intestinal das populações naturais de *S. frugiperda* foi mais diversa e uniforme do que aquela das linhagens resistentes selecionadas em laboratório e apresentou maior número de filotipos com capacidade de degradar múltiplos inseticidas. Ainda, grande parte dos filotipos isolados em meio seletivo mostraram-se fixados na microbiota intestinal das populações naturais de *S. frugiperda*, indicando a importância da relação de simbiose e do possível papel funcional de bactérias desintoxicantes no intestino desse lepidóptero.

Palavras-chave: Desintoxicação; Holobionte; Seleção microbiana; Simbiose

Abstract

Bacterial symbiosis directly affects insect physiology and development, facilitating insect adaption to new environmental conditions. Insects and associated microbiota acquire phenotypic features that guarantee survival against biotic and abiotic stress factors, as in situations of food shortage and exposure to toxic compounds. Using *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its associated gut microbiota as a model, we aimed to evaluate the influence of selection pressures on the structure, diversity and fitness of the gut microbiota. We focused our work on insecticide resistant phenotypes of *S. frugiperda* using insecticides as a source of selection pressure. We thus compared the gut microbiota composition of susceptible and insecticide-resistant strains of *S. frugiperda*, as well as the microbiota of natural populations sampled in the field. The experiments were conducted through metagenomic analysis of the 16S ribosomal (16S rRNA) regions v3 and v4, isolation

and culture of bacteria in selective minimal medium (SMM), and analysis of the growth of isolates in SMM using multiple insecticides as the only source of carbon. The degree of insecticide exposure influenced the composition of the gut microbiota of *S. frugiperda*, as well as the growth capacity and potential of its members to use the insecticides tested as a source of carbon. In addition, most of the phylotypes isolated in SMM were fixed in the gut microbiota of natural populations of *S. frugiperda*, indicating the importance of the symbiotic relationships identified and their possible role in the detoxification of insecticides in the host.

Keywords: Detoxification; Holobionte; Microbial selection; Symbiosis

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

- A análise metagenômica da comunidade bacteriana associada ao intestino de *S. albula*, *S. cosmíoides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*, assim como de populações de *S. frugiperda* selecionadas em laboratório e amostradas no campo, demonstrou a predominância de bactérias do gênero *Enterococcus* (*Firmicutes*), independente da espécie, dieta ou pressões de seleção às quais as lagartas foram expostas. Nossos resultados indicam a importância desse táxon para o gênero *Spodoptera*.
- Apesar da abundância de *Enterococcus*, *Proteobacterias* associadas ao intestino de *S. frugiperda* foram os membros do microbioma que apresentaram maior potencial na metabolização de inseticidas.
- A composição e diversidade da microbiota intestinal de *S. frugiperda*, assim como a presença e capacidade de bactérias metabolizarem inseticidas foi influenciada pelo nível de exposição a tais compostos, demonstrando que a microbiota intestinal dessa espécie-praga também se encontra em pressão de seleção direcionada a resistência.

Nossos resultados indicam a importância da relação da simbiose para esse gênero de Lepidoptera. Pesquisas futuras incluem a avaliação da contribuição funcional destas bactérias, *Enterococcus* e proteobactérias capazes de metabolizar inseticidas, assim como o estudo da sua transmissão e estabelecimento entre as gerações de *Spodoptera* - pontos essenciais para a melhor compreensão do papel da simbiose no fenótipo e performance do hospedeiro em condições de estresse.