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

**Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera:
Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações
na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro**

Luís Gustavo de Almeida

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

**Piracicaba
2013**

Luís Gustavo de Almeida
Engenheiro Agrônomo

**Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae):
potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de
inseticidas pelo hospedeiro**

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

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

Piracicaba
2013

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

Almeida, Luís Gustavo de

Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro / Luís Gustavo de Almeida.- - Piracicaba, 2013.

104 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Biodegradação 2. Biotecnologia 3. Microbiota 4. Pesticidas I. Título

CDD 632.78
A447s

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Lúcia, pelo amor, apoio, incentivo, segurança e compreensão durante meus estudos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Luís CÔnsoli pela oportunidade, orientação, amizade, confiança e por todos os valiosos conhecimentos compartilhados, que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto, Laboratório de Resistência de Artrópodes às Táticas de Controle pela essencial ajuda no fornecimento de todas as linhagens resistentes e populações de *Spodoptera frugiperda* e produtos químicos utilizados nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo, Laboratório de Ecologia Química da UNICAMP, pelas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS).

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada à Química de Produtos Naturais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelas análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS).

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos, Adrian Gomez, Aline Guidolin, Aline Peruchi, André Patrício, Bruna Merlin, Daniel Solis, Fábio Dossi, Felipe Domingues, Fernanda Müller, Guilherme Rossi, Lígia Hansen, Pablo Coronel, Priscila Fortes, Tamires Fedato e Wanessa Scopel, pela companhia e ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes às Táticas de Controle, em especial a Dra. Eloísa Salmeron, pela grande ajuda no fornecimento de material para o desenvolvimento desse trabalho.

À querida Natália, pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos em que o desenvolvimento desse estudo dividiu nosso tempo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (proc. 2010/13714-3).

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Simbiose em insetos	25
2.2 Microbiota intestinal de insetos	26
2.2.1 Herbivoria, xenobióticos, simbiontes e a resistência de insetos a inseticidas	27
2.2.2 Microrganismos, biodegradação e a resistência de insetos a inseticidas.....	28
2.3 Biorremediação.....	30
2.4 O modelo - <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material biológico estudado – <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
3.2 Isolamento, cultivo e caracterização molecular de bactérias simbiontes associadas ao trato digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i> com capacidade de utilização de inseticidas como única fonte de carbono	33
3.2.1 Isolamento e cultivo	33
3.2.2 Caracterização molecular e filogenia	34
3.3 Caracterização de isolados de <i>Enterococcus casseliflavus</i> e <i>Enterococcus mundtii</i> obtidos do trato digestivo de lagartas de linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a inseticidas	36
3.3.1 Caracterização quanto à sensibilidade a antibióticos	36
3.3.2 Caracterização quanto ao metabolismo de carboidratos.....	37
3.3.3 Caracterização via sequenciamento de multilocus (MLS)	38
3.3.4 Similaridade dos isolados de <i>Enterococcus casseliflavus</i> e <i>Enterococcus mundtii</i>	39

3.4 Determinação da associação simbiotes - <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
3.4.1 Associação com linhagem suscetível de <i>Spodoptera frugiperda</i> de laboratório	39
3.4.2 Associação com populações naturais de <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
3.5 Determinação da capacidade de crescimento de simbiotes selecionados do trato digestivo de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em meio de cultura contendo inseticidas como a única fonte de carbono disponível	42
3.6 Efeito da concentração de inseticidas no crescimento de simbiotes isolados do trato digestivo de lagartas resistentes de <i>Spodoptera frugiperda</i>	42
3.7 Determinação da degradação de xenobióticos no processo de cultivo <i>in vitro</i>	43
3.7.1 Cultivo dos isolados	43
3.7.2 Preparação das amostras	45
3.7.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS/MS): Deltamethrin e Lambda-cyhalothrin	45
3.7.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC/MS/MS): Chlorpyrifos ethyl, Lufenuron e Spinosad	46
3.7.5 Análise de degradação	47
3.8 Verificação de possíveis rotas de transmissão de bactérias simbiotes associadas ao trato digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	47
3.8.1 Transmissão vertical: aquisição pela contaminação da superfície externa do ovo	47
3.8.2 Transmissão vertical: aquisição transovariana.....	48
3.9 Participação de bactérias simbiotes na resposta de <i>Spodoptera frugiperda</i> a inseticidas: <i>Microbacterium arborescens</i> e lufenuron.....	48
3.9.1 Inoculação de <i>Microbacterium arborescens</i> em lagartas da linhagem suscetível de <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
3.9.2 Determinação da curva resposta a lufenuron	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Isolamento seletivo e cultivo de bactérias simbiotes com atividade de biodegradação de inseticidas.....	51

4.2 Caracterização molecular e diversidade de bactérias	54
4.3 Caracterização de isolados de <i>Enterococcus casseliflavus</i> e <i>Enterococcus mundtii</i> obtidos do intestino de lagartas de linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a inseticidas	60
4.3.1 Caracterização quanto à sensibilidade a antibióticos	60
4.3.2 Verificação da similaridade dos isolados quanto ao metabolismo de carboidratos	61
4.3.3 Caracterização via sequenciamento de multilocus (MLS)	63
4.4 Determinação da natureza da associação entre os simbiontes isolados de indivíduos resistentes e <i>Spodoptera frugiperda</i>	64
4.4.1 Associação com linhagem suscetível de <i>Spodoptera frugiperda</i> de laboratório.....	64
4.4.2 Associação com populações naturais de <i>Spodoptera frugiperda</i>	65
4.5 Determinação da capacidade de crescimento de simbiontes selecionados do intestino de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em meio de cultura contendo inseticidas como a única fonte de carbono	67
4.6 Efeito da concentração dos diferentes inseticidas no crescimento de simbiontes isolados do trato digestivo de lagartas resistentes a inseticidas.....	69
4.7 Determinação da degradação dos xenobióticos no processo de cultivo <i>in vitro</i>	71
4.8 Verificação de possíveis rotas de transmissão de bactérias simbiontes associadas ao trato digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	73
4.8.1 Transmissão vertical: aquisição pela contaminação da superfície externa do ovo.....	73
4.8.2 Transmissão vertical: aquisição transovariana	73
4.9 Participação de bactérias simbiontes na resposta de <i>Spodoptera frugiperda</i> a lufenuron .	73
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIA	83
APÊNDICES	95

RESUMO

Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro

A capacidade de degradação de compostos xenobióticos por organismos vivos, principalmente bactérias, tem sido objeto intenso de pesquisa, principalmente por aqueles microrganismos isolados do solo. Dessa forma, a busca por novos nichos que resultem no isolamento de microrganismos altamente eficientes se torna cada vez mais necessária. Assim, dada a diversidade de interações inseto – bactérias, este estudo buscou explorar insetos resistentes a inseticidas como nicho de bactérias com capacidade de degradação de pesticidas para o desenvolvimento de estudos voltados à *i*) utilização dessas bactérias na biorremediação e *ii*) determinação de sua contribuição na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro. Assim, esse trabalho teve por objetivos *i*) isolar, identificar e caracterizar microrganismos associados ao trato digestivo de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a lambda-cyhalothrin e deltamethrin (piretróide), chlorpyrifos ethyl (organofosforado), spinosad (naturalyte) e lufenuron (inibidor de síntese de quitina), *ii*) verificar o seu potencial de biodegradação desses compostos, *iii*) estudar sua associação a populações naturais de *S. frugiperda* e *iv*) determinar seu papel na metabolização de xenobióticos. Bactérias com potencial de biodegradação foram selecionadas via cultivo seletivo da flora associada ao trato intestinal de lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* em meio mínimo M9 acrescido de 10 µg/mL de um dos inseticidas em estudo como única fonte de carbono. As bactérias isoladas foram sujeitas à análise de PCR-RFLP do gene do 16S rDNA, com três enzimas de restrição (*EcoRI*, *Rsa*, *DdeI*), resultando na identificação de 16 isolados. Após sequenciamento, dez filotipos foram identificados, distribuídos em Firmicutes (Enterococcaceae e Staphylococcaceae), γ -Proteobacteria (Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae), β -Proteobacteria (Comamonadaceae) e Actinobacteria (Micrococcaceae e Microbacteriaceae). *Enterococcus*, *Pseudomonas* e *Microbacterium* foram os únicos representados por dois filotipos, sendo ainda encontrados um filotipo de *Delftia*, *Leclercia*, *Staphylococcus* e *Arthrobacter*. *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* foram isolados de praticamente todas as linhagens resistentes de *S. frugiperda*. Análises de antibiograma e do metabolismo de carboidratos indicaram a similaridade entre os clones de *E. casseliflavus*, enquanto que os clones de *E. mundtii* diferiram de maneira expressiva. Apesar disso, os alelos analisados para tipagem via multilocus não resultaram em diferenças. Análises de PCR-diagnóstico do intestino de lagartas de *S. frugiperda* de linhagem suscetível de laboratório resultaram na detecção de quatro dos dez filotipos isolados do intestino de linhagens resistentes de *S. frugiperda*. Já em populações naturais foram encontrados cinco dos dez filotipos. O isolado com maior capacidade de crescimento em cada inseticida foi selecionado e todos apresentaram resposta dependente da concentração dos inseticidas, sendo encontrado efeito antimicrobiano em alguns inseticidas. A análise de cromatografia acoplada a espectrometria de massas comprovou a degradação dos inseticidas utilizados pelos diferentes isolados. A colonização do trato digestivo de linhagem suscetível de *S. frugiperda* com um dos filotipos (*Microbacterium arborescens*) isolado de lagartas resistentes a lufenuron resultou em CL₅₀ cerca de 10 vezes superior àquela da linhagem aposimbionte. Assim, linhagens resistentes de *S. frugiperda* se mostraram um excelente reservatório de bactérias com capacidade de degradação dos inseticidas testados e que podem auxiliar na metabolização desses produtos pelo hospedeiro, assim como ser exploradas na descontaminação de áreas que apresentam resíduos desses xenobióticos.

Palavras-chave: Biodegração; Biotecnologia; Microbiota; Pesticidas

ABSTRACT

Symbionts of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): biotechnological potential for bioremediation and implications for insecticide metabolization by the host

The capacity of living organisms to degrade xenobiotics has been intensively studied, mainly for soil-associated bacteria. Thus, there is a growing need to search for new niches to lead to the isolation of highly efficient microorganisms. As insect-bacteria interactions are very diverse, we focused on exploiting insecticide resistant insects as a niche of pesticide-degrading bacteria to develop studies devoted to a) bacterial utilization in bioremediation and ii) determination of bacterial contribution to insecticide metabolization by the host insect. Our main objectives were to i) isolate, identify and characterize the microorganisms associated to the gut of resistant strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) capable to degrade lambda-cyhalothrin, deltamethrin (pyrethroids), chlorpyrifos ethyl (organophosphate), spinosad (naturalyte) and lufenuron (chitin synthesis inhibitor), ii) verify their potential to degrade these insecticides, iii) to verify their association to natural populations of *S. frugiperda*, and iv) to determine their role in the metabolization of xenobiotics in the host. Bacteria with biodegrading capacity were selected from the gut flora of fifth instars of *S. frugiperda* on selective media based on the minimum media M9 added of 10 µg/mL of one of the insecticides selected as the sole carbon source. The isolated bacteria were subjected to RFLP-PCR analysis of the 16S rDNA gene using three restriction enzymes (*EcoRI*, *Rsa*, *DdeI*), which led to the identification of 16 isolates. These isolates were grouped in ten phylotypes after sequencing, representing Firmicutes (Enterococcaceae and Staphylococcaceae), γ-Proteobacteria (Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae), β-Proteobacteria (Comamonadaceae) and Actinobacteria (Micrococcaceae and Microbacteriaceae). *Enterococcus*, *Pseudomonas* and *Microbacterium* were the only represented by more than two phylotypes. *Delftia*, *Leclercia*, *Staphylococcus* and *Arthrobacter* were also represented. *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus mundtii* were isolated from almost all resistant lines of *S. frugiperda*. Antibigram and carbohydrate metabolism assays indicated the similarity among the isolates of *E. casseliflavus*, while those of *E. mundtii* displayed some differences. However, no molecular differences were observed by comparing different alleles in multilocus sequence analysis. Diagnostic-PCR analysis of a susceptible, lab-strain of *S. frugiperda* allowed the identification of four out of the ten phylotypes isolated from resistant strains. But no bacteria from the susceptible strain could be cultivated in the selective media. In natural populations of *S. frugiperda*, five out of the ten isolates were detected. The most active isolate to degrade each pesticide was selected for further tests and all displayed a dose-dependent response to the insecticides. Analyses by gas or liquid chromatography-coupled mass spectrometry demonstrated the capacity of each isolate to degrade the insecticides tested. Gut colonization of larvae from the susceptible strain with *Microbacterium arborescens* isolated from resistant larvae increased the LC₅₀ to lufenuron in 10 fold when compared to the aposymbiont strain. Thus, resistant strains of *S. frugiperda* are an excellent reservoir of bacteria capable of degrading the tested insecticides, and have a potential to be exploited for the bioremediation of xenobiotic contaminated areas. Moreover, these bacteria can auxiliate the host insect to metabolize insecticides and may play a role in insect response to insecticides.

Keywords: Biodegradation; Biotechnology; Microbiota; Pesticides

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Morfotipos de bactérias (128) associados ao trato digestivo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes a diferentes inseticidas isolados em meio mínimo M9, contendo um dos inseticidas testados como fonte principal de carbono (10 µg/mL), em meio acrescido (1 g/L) ou não de glicose 52
- Figura 2 - Morfotipos de bactérias associados ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas isolados em meio mínimo M9 + 10 µg/mL do inseticida testado com ou sem glicose (1 g/L) em função do tempo (dias) de crescimento no meio líquido para: chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, spinosad, lufenuron como fonte principal de carbono 53
- Figura 3 - Perfis representativos da análise de PCR-RFLP do gene 16S rDNA de bactérias associadas ao intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes a lambda-cyhalothrin isoladas em meio mínimo de cultivo contendo como fonte principal de carbono o inseticida avaliado. Padrões de restrição obtidos com a) *EcoRI*; b) *Rsa*; e c) *DdeI*. Padrões: AAA (01, 04, 06, 08); ABA (07, 15); BAA (10, 11, 12, 13, 14 16); BBA (02, 03, 05); CCB (09). (M = marcador de peso molecular – 100 bp Ladder DNA Marker AXYGEN®) 54
- Figura 4 - Frequência dos 128 clones de bactérias simbiotes de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas analisados por PCR-RFLP, selecionados e identificados a partir das sequências parciais do gene 16S rDNA (550 pb). Identificação das espécies obtida por comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBI e do EzTaxon-e 58
- Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir das sequências da região 16S rDNA (1400 pb), pelo método de *neighbor-joining*, mostrando a filogenia de bactérias isoladas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo 59

Figura 6 - Caracterização quanto ao consumo de carboidratos das espécies de *Enterococcus* isoladas de *Spodoptera frugiperda* resistente aos inseticidas chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), deltamethrin (Dm), spinosad (Sp) e lufenuron (Luf). Galerias API 50 CH (bioMérieux) inoculadas com A. *Enterococcus casseliflavus* (IIL-Cl05, IIL-Sp06, IIL-Lc32 e IIL-Dm01) e B. *Enterococcus mundtii* (IIL-Cl25, IIL-Sp24, IIL-Lc16 e IIL-Luf18) após 48 horas de incubação. Composição das galerias: 0 controle; 1 glicerol; 2 eritritol; 3 D-arabinose; 4 L-arabinose; 5 D-ribose; 6 D-xilose; 7 L-xilose; 8 D-adonitol; 9 Metil-βD-xilopiranosido; 10 D-galactose; 11 D-glicose; 12 D-frutose; 13 D-manose; 14 L-sorbose; 15 L-ramnose; 16 dulcitol; 17 inositol; 18 D-manitol; 19 D-sorbitol; 20 Metil-αD-manopiranosido; 21 Metil-αD-glucopiranosido; 22 N-acetilglucosamina; 23 amigdalina; 24 arbutina; 25 esculina citrato de ferro; 26 salicina; 27 D-celobiose; 28 D-maltose; 29 D-lactose; 30 D-melibiose; 31 D-sacarose; 32 D-trealose; 33 inulina; 34 D-melezitose; 35 D-rafinose; 36 amido; 37 glicogênio; 38 xilitol; 39 gentiobiose; 40 D-turanose; 41 D-lixose; 42 D-tagatose; 43 D-fucose; 44 L-fucose; 45 D-arabitol; 46 L-arabitol; 47 gluconato de potássio; 48 2-cetogluconato de potássio; 49 5-cetogluconato de potássio..... 62

Figura 7 - PCR-diagnóstico do trato intestinal de lagartas de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda* para verificar a associação de bactérias anteriormente isoladas do intestino de linhagens resistentes a inseticidas via cultivo em meio seletivo. Tamanho do amplicon (pb) de acordo com a tabela 2 64

Figura 8 - Distribuição e frequência dos isolados de bactérias associadas ao intestino de lagartas de populações de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos principais inseticidas utilizados para o controle desse inseto, nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Bahia 66

Figura 9 - Crescimento, em meio mínimo M9 + 10 µg/mL de inseticida como única fonte de carbono, de isolados de bactérias associadas ao intestino de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas..... 68

Figura 10 - Crescimento dos isolados, selecionados em: A. chlorpyrifos ethyl, B. lambda-cyhalothrin, C. deltamethrin, D. spinosad e E. lufenuron, associados ao trato digestivo de lagartas de populações de *Spodoptera frugiperda* resistentes a esses inseticidas e suas respostas a diferentes concentrações do xenobiótico testado (10 - 20 - 40 - 80 - 160 µg/mL).70

Figura 11 - Curvas-padrão obtidas para lambda-cyhalothrin e deltamethrin via GC-MS/MS, utilizando concentrações de 50, 200, 350, 500 e 650 µg/mL, e para chlorpyrifos ethyl, lufenuron, spinosyn A e spinosyn D via UPLC-MS/MS utilizando as concentrações 50, 100, 150, 200 e 300 ng/mL..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes investigados para caracterização via MLS de <i>Enterococcus casseliflavus</i> e <i>Enterococcus mundtii</i> , sequências utilizadas nas reações de amplificação (1: iniciador senso; 2: iniciador antissenso)	38
Tabela 2 - Iniciadores (1-senso, 2-antissenso) espécie-específicos para a realização de PCR-diagnóstico para a detecção dos simbioses do trato digestivo de lagartas de linhagens selecionadas de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a inseticidas, em populações naturais desse inseto.....	41
Tabela 3 - Populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> coletadas na cultura do milho em diferentes regiões do Brasil	41
Tabela 4 - Estrutura química, fórmula e massa molecular, e o tipo de análise cromatográfica dos inseticidas estudados.....	44
Tabela 5 - Identificação por similaridade das sequências do gene 16S rDNA (1400 pb em tamanho) de bactérias simbioses de lagartas resistentes de <i>Spodoptera frugiperda</i> isoladas nos diferentes inseticidas testados. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBI e do EzTaxon-e	55
Tabela 6 - Sensibilidade dos isolados de <i>Enterococcus casseliflavus</i> e <i>Enterococcus mundtii</i> a doze antibióticos, avaliada pelo diâmetro do halo de inibição de crescimento (mm).....	61
Tabela 7 - Similaridade entre isolados de <i>Enterococcus mundtii</i> oriundos do trato digestivo de lagartas de linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes aos inseticidas chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e lufenuron (Luf). A silimilaridade foi calculada com base nos resultados das análises de sensibilidade a antibióticos, metabolismo de carboidratos e MLS	63

Tabela 8 - Degradação total, natural e bacteriana dos inseticidas lambda-cyhalothrin, deltamethrin, chlorpyrifos ethyl, lufenuron e spinosad (spinosyn A e D) após 5 dias de cultivo dos isolados de bactérias associadas ao trato digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a inseticidas	72
--	----

1 INTRODUÇÃO

Insetos são os organismos multicelulares mais abundantes e diversos que habitam o globo. Inúmeras de suas adaptações a condições adversas ou inadequadas estão relacionadas à sua associação a microrganismos simbiotes (ISHIKAWA, 2003). Apesar da associação com microrganismos ser comum a uma ampla variedade de organismos multicelulares (GILBERT; SAPP; TAUBER, 2012), como animais e plantas, ela também parece ser comum aos organismos unicelulares (VON DOHLEN et al., 2001; NODA et al. 2005; HONGO et al. 2007; WHITE; TORRES, 2009).

No entanto, dada à sua abundância, os insetos são o maior grupo onde são encontrados microrganismos simbiotes, estabelecendo com os mesmos as mais diversas relações, do mutualismo verdadeiro ao parasitismo (ISHIKAWA, 2003). A microbiota simbiote pode apresentar associações facultativas ou obrigatórias, abrigo o espaço endocelular, a cavidade hemocélica, o lúmen intestinal ou estar associada à superfície do tegumento de insetos. Em relações obrigatórias, a microbiota simbiote pode ser abrigada em unidades celulares próprias isoladas (bacteriócito) ou agrupadas formando um órgão específico (bacterioma), localizado na hemocela do inseto (BUCHNER, 1965; ZOOK, 2004; BAUMANN; MORAN; BAUMANN, 2006; KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2007; DOUGLAS, 2011).

A associação de insetos a simbiotes pode afetar substancialmente diversos aspectos bioecológicos do hospedeiro (inseto) (JANSON et al., 2008; HARRIS et al. 2010; FELDHAAR, 2011). Estes microrganismos simbiotes podem estar envolvidos na produção de metabólitos essenciais a insetos que se alimentam de dietas de difícil digestão, como pêlos e celulose, ou dietas nutricionalmente inadequadas, como o floema (DOUGLAS, 2009; MACDONALD; THOMAS; DOUGLAS, 2011; LOGIN; HEDDI, 2012). Entretanto, torna-se cada vez mais evidente que as contribuições dos simbiotes não estão limitadas somente à nutrição. Em muitos casos, simbiotes de insetos são essenciais não apenas para a suplementação nutricional de seus hospedeiros, mas também agem na defesa indireta do inseto, protegendo-o do ataque de inimigos naturais, como entomófagos (OLIVER; MORAN; HUNTER, 2005; HANSEN et al., 2007; VORBURGER; GEHRER; RODRIGUEZ, 2010) e entomopatógenos (FERRARI et al., 2004; SCARBOROUGH; FERRARI; GODFRAY, 2005; BROWNLIE; JOHNSON, 2009; JAENIKE et al., 2010). Simbiotes associados a insetos ainda desempenham importante função na evolução da herbivoria, dado o seu papel na detoxificação de metabólitos secundários produzidos pela planta hospedeira (DOWD, 1991;

IBANEZ; GALLET; DESPRÉS, 2012). A função de detoxificação associada a simbioses também se aplica a xenobióticos utilizados para seu controle, sendo a capacidade de catabolização de pesticidas demonstrada direta (via análises de degradação) (BOUSH; MATSUMARA, 1967, DOWD; SHEN, 1990; KIKUCHI et al., 2012) ou indiretamente (via histoquímica) (DOWD 1989, 1991).

O papel diverso desempenhado pela microbiota simbiótica de insetos tem despertado a atenção da comunidade científica quanto a possibilidade de exploração de simbioses associados a insetos para o i) desenvolvimento de novas estratégias de controle de insetos-praga e de doenças por eles transmitidas (BEARD et al., 2001; MILLER; LAMPE; LANZON, 2007; SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008; MCMENIMAN et al., 2009; HOFFMANN et al., 2011), ii) como fonte de moléculas que possam ter aplicações biotecnológicas (CHAVES; NETO; TENREIRO, 2009), como enzimas de interesse industrial (SAADEDDIN; RESEARCH; SEVILLE, 2012; VILANOVA et al., 2012) ou substâncias que sirvam ao controle de microrganismos patogênicos (AZEVEDO et al., 2000; KOHLWEYER et al., 2006; PIEL, 2004, ZUCCHI et al., 2010).

Dessa forma, a capacidade da microbiota associada a insetos em participar de processos de metabolização de compostos xenobióticos é relevante por dois motivos: i) a atuação da microbiota simbiótica na degradação de compostos xenobióticos pode influenciar diretamente a resposta de insetos a inseticidas; ii) trata-se de um nicho seletivo para o isolamento de microbiota capaz de degradar inseticidas, podendo ser utilizada diretamente na descontaminação de áreas de interesse, ou servir como fonte para o isolamento de enzimas que possam então ser exploradas para a mesma finalidade (DUA et al., 2002; ALCALDE et al., 2006; SCOTT et al., 2008; RUSSELL et al., 2011; KIKUCHI et al., 2012).

A utilização de microrganismos na descontaminação do ambiente tem sido amplamente explorada para solucionar problemas associados ao uso intensivo de pesticidas em áreas de atividade agrícola intensa (SCOTT et al., 2008; AHMAD et al., 2011). A atividade agrícola no Brasil é intensa e as fronteiras agrícolas ainda estão em plena expansão, levando à instalação de imensas áreas de monocultivo, que, dada às condições climáticas favoráveis e à existência de variedades de plantas com características próprias, são mantidas por ciclos sucessivos e contínuos durante todo o ano (SAUER; LEITE, 2012). Esta atividade agrícola intensa favorece o surgimento de pragas e requer o uso intensivo de métodos de controle, principalmente o químico. Mas o uso intenso de produtos fitossanitários acaba produzindo efeitos indesejáveis ao agroecossistema e ambiente, favorecendo, por exemplo, o

surgimento de resistência de insetos a inseticidas e a contaminação do solo e da água (COOK, 2000; STARK; BANKS, 2001; RAAIJMAKERS; VLAMI; SOUZA, 2002).

A conscientização da população quanto à necessidade de conservação do ambiente tem exigido o uso de práticas agrícolas menos nocivas ao ambiente e aos organismos não-alvo, assim como despertado o interesse para o desenvolvimento de técnicas que levem à degradação de moléculas orgânicas utilizadas em agroecossistemas (xenobióticos), normalmente nocivas ao ambiente. A capacidade de degradação de compostos xenobióticos por organismos vivos (biodegradação), principalmente bactérias, tem sido objeto intenso de pesquisa, mas muitos dos microrganismos isolados são obtidos principalmente do solo (GRANT; DANIELL; BETTS, 2002; PARALES et al., 2002; GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2004; FUENTES et al., 2010; SASIKALA et al., 2012). Estes microrganismos, basicamente bactérias, são objeto de estudo para aplicação na biorremediação, processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados para remover ou reduzir xenobióticos no ambiente (UETA et al., 1999).

Dessa forma, a busca por novos nichos que resultem no isolamento de microrganismos altamente eficientes se torna cada vez mais necessária. Assim, dada a participação esperada que a microbiota associada a insetos pode ter na degradação de inseticidas (BOUSH; MATSUMARA, 1967; DAUGHTON; HSIEH, 1977; DOWD 1989, 1991; DOWD; CHEN, 1990; KIKUCHI et al., 2012) e a demonstrada capacidade de que insetos possam ser manipulados para o desenvolvimento de microbiota seletiva para a degradação de compostos tóxicos (HAYASHI et al., 2007), a microbiota associada a insetos pode se mostrar uma fonte diversa e intocada de microrganismos com elevado potencial para exploração biotecnológica para a biorremediação.

Porém, a relevância do potencial da microbiota associada a insetos não se restringe ao seu potencial biotecnológico quanto à sua capacidade de biodegradação. A participação da microbiota em processos de detoxificação de metabólitos secundários de defesa da planta (DOWD, 1991), as evidências de interação entre as rotas de metabolização de compostos de defesa de plantas e a de inseticidas (BRATTSTEN, 1988; RUSSELL et al., 2011), as alterações na composição da microbiota de insetos suscetíveis e resistentes (INDIRAGANDHI et al., 2007) e a já demonstrada capacidade de degradação de pesticidas (BOUSH; MATSUMARA, 1967; DAUGHTON; HSIEH, 1977; DOWD; SHEN, 1990; KIKUCHI et al., 2012), indicam a importância que a mesma pode ter no contexto de manejo de pragas e no desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de pragas. A caracterização e identificação de microrganismos que participem desse processo permitiriam

o desenvolvimento de estudos que levassem ao melhor entendimento de mecanismos de desenvolvimento de tolerância e/ou resistência de insetos a inseticidas ou a compostos secundários de defesa de plantas.

Assim, esse trabalho teve por objetivos i) isolar, identificar e caracterizar microrganismos associados ao trato digestivo de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes aos principais inseticidas utilizados para seu controle, ii) verificar o seu potencial de biodegradação e iii) estudar a associação dos microrganismos selecionados a diferentes populações (suscetível, resistente e natural) de *Spodoptera frugiperda* e iv) o seu papel na metabolização de xenobióticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Simbiose em insetos

Ao longo de quatro bilhões de anos de evolução biológica surgiram milhões de espécies no planeta. Embora isto seja em grande parte devido à diferenciação repetida e incessante de espécies preexistentes, a diferenciação de espécies não foi o único processo que produziu a biodiversidade de hoje. Outros processos, como as relações de predação, parasitismo e simbiose também tiveram consequências importantes na evolução das espécies (ISHIKAWA, 2003; DOUGLAS, 2011).

Insetos estão entre os animais mais bem sucedidos na Terra, tanto no que diz respeito à sua biomassa quanto à sua biodiversidade. Estima-se que até 20% de todos os insetos são obrigatoriamente associados a microrganismos simbiontes, e é provável que a capacidade de associação a microrganismos tenha contribuído muito para o seu sucesso evolutivo. Um fator importante para esse sucesso é a adaptação de insetos a uma grande variedade de dietas, sendo a diversidade de hábitos alimentares desenvolvidos reflexo, em parte, da associação a simbiontes (FELDHAAR; GROSS, 2009).

Os simbiontes podem apresentar associações facultativas ou obrigatórias, abrigando o espaço endocelular, a cavidade hemocélica, o lúmen intestinal ou a superfície do tegumento de insetos. Em relações obrigatórias, simbiontes podem ser abrigados em unidades celulares próprias isoladas (bacteriócito) ou agrupadas, formando um órgão específico (bacterioma), localizado na hemocele do inseto. A diversidade de relações existentes nas interações inseto-simbionte aponta para um sistema com elevada diversidade microbiana e para a existência de mecanismos de interação fundamentais ao entendimento de processos bioecológicos de insetos (ZOOK, 2004; BAUMANN; MORAN; BAUMANN, 2006; KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2007; DOUGLAS, 2011).

Simbiontes comumente observados em associação com o aparelho digestivo de insetos desempenham papéis importantes na nutrição de seus insetos hospedeiros (SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008; BROWNLIE; JOHNSON, 2009; FELDHAAR, 2011). Acredita-se que muitos microrganismos estejam envolvidos com a nutrição de insetos via o processamento do alimento por meio da quebra de moléculas complexas, pela síntese de nutrientes essenciais (vitaminas e aminoácidos essenciais) ou pela reciclagem de nitrogênio. Estes microrganismos simbiontes estariam envolvidos com fontes metabólicas valiosas para alguns insetos que se alimentam de dietas de difícil digestão, como a celulose, ou dietas

carentes de nutrientes essenciais (vitaminas, aminoácidos essenciais), como o floema. Entretanto, torna-se cada vez mais evidente que as contribuições dos simbiossitos não estão limitadas somente à nutrição. Em muitos casos, simbiossitos de insetos são importantes na nutrição do inseto, seja pela produção de nutrientes importantes ou pela reciclagem de nitrogênio. Ainda, também agem na defesa indireta do inseto hospedeiro, protegendo-o de infecções ou metabolizando compostos indesejáveis (ISHIKAWA, 2003; DILLON; DILLON, 2004; BROWNLIE; JOHNSON, 2009; DOUGLAS, 2009; MACDONALD; THOMAS; DOUGLAS, 2011; FELDHAAR, 2011).

2.2 Microbiota intestinal de insetos

Os simbiossitos extracelulares estão presentes em cavidades do corpo de seu hospedeiro, onde o trato digestivo é considerado o habitat primário. Assim, a microbiota presente no trato digestivo de insetos apresenta relações variadas com o hospedeiro, de patogênica a mutualista, sendo um componente importante para o entendimento da biologia intestinal de insetos (DILLON; CHARNLEY, 2002; DILLON; DILLON, 2004; DOUGLAS, 2011).

A microbiota do intestino de insetos é composta por grande variedade de espécies que se alojam, geralmente, no mesêntero (intestino médio) e proctodéu (intestino posterior). Em moscas-das-frutas, o principal local de proliferação microbiana é o lúmen do intestino médio, onde as mesmas participam do processo de digestão (DILLON; DILLON, 2004). Em contrapartida, em muitos insetos fitófagos, a região do intestino posterior forma uma grande câmara anaeróbia para a fermentação da celulose ou para digestão de polissacarídeos da planta hospedeira com ação de microrganismos simbiossitos. Assim, a microbiota intestinal evoluiu como um recurso valioso para as mais diversas rotas metabólicas necessárias aos insetos (ISHIKAWA, 2003; DILLON; DILLON, 2004).

Além de sua participação no processo de digestão e assimilação de nutrientes, o intestino é considerado a primeira linha de defesa. A microflora bacteriana confinada ao intestino é rica, diversa e compreende bactérias Gram positivas e negativas. Entre as bactérias Gram positivas, algumas auxiliam na digestão do alimento, enquanto outras são patogênicas e acabam recebendo grande atenção devido ao seu potencial para o controle de pragas agrícolas (DILLON; DILLON, 2004). Entre estes patógenos destaca-se *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae), uma bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir

inclusões cristalinas durante a esporulação, as quais são responsáveis por sua atividade tóxica (PRIEST; DEWAR, 2000).

A diversidade de simbioses em insetos está diretamente relacionada à variedade de estruturas especializadas presentes no intestino e a diversos fatores que incluem o pH, o potencial redox, a presença de enzimas digestivas e o tipo de alimento ingerido. Considerando a grande diversidade de insetos e a falta de informações sobre muitos gêneros de bactérias, é difícil generalizar sobre a localização da microbiota intestinal no inseto. Porém, insetos com aparelho digestivo mais simples possuem menor diversidade microbiana, enquanto que aqueles com estruturas mais complexas, contendo cecos gástricos, divertículos e bacteriócitos têm maior diversidade de microrganismos mutualistas (DILLON; DILLON, 2004). Os principais grupos de bactérias associadas ao intestino de insetos e mais comumente encontradas pertencem às famílias Proteobacteria e Firmicutes (DOUGLAS, 2011).

2.2.1 Herbivoria, xenobióticos, simbioses e a resistência de insetos a inseticidas

Os agroecossistemas consistem em complexas relações tróficas entre plantas hospedeiras, herbívoros e seus inimigos naturais (PRICE et al., 1980). As plantas desenvolveram inúmeros mecanismos de defesa ao longo de sua corrida evolucionária contra o ataque de herbívoros. Estes mecanismos de defesa envolvem a utilização dos mais variados tipos de metabólitos secundários que podem desempenhar funções das mais variadas, desde a repelência até a morte do herbívoro. Nesta corrida evolucionária, insetos herbívoros também desenvolveram mecanismos para se adaptar à presença de compostos nocivos ao seu desenvolvimento em seu substrato alimentar. Estes mecanismos envolvem a degradação, detoxificação e/ou sequestro de compostos secundários produzidos pela planta, a produção de repertório enzimático diverso, entre outros (FERRY et al., 2004; DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007; RUSSELL et al., 2009, IBANEZ; GALLET, DESPRÉS, 2012). Apesar de muitos dos processos de desintoxicação pela ingestão de toxinas associadas à planta hospedeira ter sua origem em processos metabólicos de insetos (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007), em muitos casos a microbiota associada ao trato digestivo do inseto herbívoro apresenta papel fundamental nesse processo (DOWD, 1991; CLAUDIANOS et al., 2006; CARDOZA; HOFSTETTER; VEGA, 2012).

A existência desses mecanismos de desintoxicação em insetos, os quais evoluíram em resposta às pressões de seleção do ambiente, permitiu que alguns insetos fossem tolerantes mesmo às primeiras moléculas sintéticas surgidas (BRATTSTEN, 1988), visto que

resistência, por definição, implica na existência de um processo pré-adaptativo, sendo, conseqüentemente, de origem genética e hereditária (MARTINELLI; OMOTO, 2006; DARBY, 2009). A tolerância natural observada ocorre devido ao fato de que alguns dos mecanismos de resistência a compostos secundários de plantas são os mesmos a atuarem em processos de desintoxicação de moléculas sintéticas utilizadas para o controle de insetos (BRATTSTEN, 1988; DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007).

Simbiontes associados a insetos compartilham uma longa associação que envolveu processos de seleção e adaptação, principalmente no que se refere ao processo de seleção e utilização do substrato alimentar, visto que aleloquímicos influenciam as associações entre o herbívoro e a planta e a microbiota associada (BERENBAUM, 1988). A microbiota associada a insetos também responde às pressões de seleção do ambiente, como, por exemplo, às moléculas inseticidas, visto as mudanças qualitativas e quantitativas na composição da microbiota de populações resistentes quando comparadas a populações suscetíveis de insetos (INDIRAGANDHI et al., 2007). Estas alterações são esperadas, visto que alguns pesticidas também podem apresentar atividade antimicrobiana (VIRÁG; NAÁR; KISS, 2007), além dos relatos já existentes de simbiontes com demonstrada capacidade de degradação de compostos orgânicos sintéticos (BOUSH; MATSUMARA, 1967; DAUGHTON; HSIEH, 1977; DOWD 1989, 1991; DOWD; SHEN, 1990; KIKUCHI et al., 2012).

Apesar de todas as evidências da existência de mecanismos comuns de defesa de insetos a compostos secundários de plantas e a moléculas sintéticas, e da participação da microbiota associada a insetos em processos de degradação destes compostos, pouco se conhece a respeito da participação da microbiota no desenvolvimento de mecanismos de resistência de insetos a inseticidas.

2.2.2 Microrganismos, biodegradação e a resistência de insetos a inseticidas

O sistema metabólico que se tem mostrado mais adequado para a biodegradação de xenobióticos via biorremediação é o microbiano, uma vez que microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos, representando, portanto, um suporte para a manutenção da vida na Terra (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2004).

Esta extraordinária diversidade metabólica se deve à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de metabolismo

integrado, apresentada pela comunidade microbiana, onde os produtos do metabolismo de um microrganismo podem servir de substrato para outros. Este intenso sinergismo metabólico entre microrganismos, praticamente ausente nos organismos mais complexos, é de fundamental importância na biodegradação de xenobióticos (JANSSEN et al., 2005).

A microbiota intestinal evoluiu como um recurso valioso para algumas rotas metabólicas de insetos. A transformação microbiana de compostos no intestino do inseto e a adaptação de microrganismos para usar os metabólitos resultantes dessa transformação são processos importantes que têm grandes implicações para o conhecimento das interações multitróficas que ocorrem em insetos (DILLON; DILLON, 2004).

No intestino de insetos, sob condições anaeróbias, as reações enzimáticas comuns para muitos inseticidas incluem a hidrólise, a decloração, a redução do grupo nitro e a dealquilação das cadeias laterais. As bactérias podem ser parcialmente responsáveis por estas atividades metabólicas, e quando o inseticida tem a possibilidade de percorrer todos os passos catalíticos de uma determinada rota de degradação enzimática, provavelmente ele se torna um possível nutriente para o microrganismo, sendo os produtos de sua degradação utilizados como recurso nutritivo para o metabolismo bacteriano (ZHANG; BENNETT, 2005).

Para os insetos, a principal vantagem na capacidade de degradação seletiva de um inseticida é a sua sobrevivência quando expostos a esse xenobiótico, enquanto que para as bactérias, a vantagem é simplesmente uma questão de acesso a outras fontes de nutrientes. No entanto, bactérias apresentam capacidade de produção de diversas enzimas altamente eficientes para a degradação de compostos xenobióticos, enquanto os insetos se restringem a enzimas generalistas, como esterases, citocromo P450 e glutathione-S-transferase (ROE et al., 1998; RUSSELL et al., 2011).

Contudo, o estudo de enzimas de insetos e bactérias simbiotes que possam estar envolvidas na metabolização de xenobióticos pode permitir o melhor entendimento de mecanismos de desenvolvimento de tolerância e/ou resistência de insetos a inseticidas. Além disso, trata-se de um nicho seletivo para o isolamento de microbiota capaz de degradar pesticidas, podendo ser utilizada diretamente na descontaminação de áreas de interesse (DUA et al., 2002; ALCALDE et al., 2006; SCOTT et al., 2008; RUSSELL et al., 2011; KIKUCHI et al., 2012).

2.3 Biorremediação

As moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas “recalcitrantes”, podem ser de origem natural, produzidas pelo metabolismo biológico, ou sintéticas, produzidas por tecnologias industriais modernas e estranhas ao ambiente natural, por esta razão, denominadas “xenobióticas”. As moléculas xenobióticas introduzidas no ambiente, desde o início do século XX, compreendem vários tipos de compostos aplicados na indústria química e de materiais, tais como pesticidas, corantes, fármacos, polímeros e plásticos, podendo ser tóxicos a sistemas biológicos. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional de comunidades biológicas. Por estas razões, há, atualmente, grande preocupação em se desenvolver tecnologias para descontaminação de ambientes poluídos por xenobióticos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2004).

O processo biotecnológico de remediação (biorremediação) tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica como alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterros ou áreas de contenção (PARALES et al., 2002). Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos também sejam indicadas para a descontaminação de ambientes, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa mais adequada ecologicamente e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados por moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (UETA et al., 1999).

Os processos biológicos de descontaminação enquadrados na categoria de biorremediação utilizam, geralmente, microrganismos autóctones (do próprio ambiente) ou introduzidos (em estado nativo) com capacidade de biodegradar xenobióticos, resultando em produtos de degradação com estrutura menos recalcitrante em relação à molécula original, ou de mineralização do xenobiótico, produzindo compostos químicos simples, como: CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{-2} e PO_4^{-2} (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2004; ÖNNEBY; JONSSON; STENSTRÖM, 2010).

A diversidade microbiana é um componente importante da diversidade biológica global mundial. Os avanços tecnológicos recentes em explorar a diversidade microbiana revelaram que uma grande porcentagem de microrganismos ainda não são conhecidos, assim como seus papéis ecológicos. Desta forma, a seleção de microrganismos é o principal passo

para o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização eficaz na agricultura sustentável, proteção ambiental e saúde humana e animal. Várias aplicações envolvendo microrganismos são amplamente conhecidas na solução de problemas em áreas agrícolas (produtividade, proteção fitossanitária e manutenção da fertilidade do solo) e em questões ambientais (biorremediação do solo e da água). O tratamento de esgoto e a reciclagem de resíduos agrícolas e industriais são outras aplicações importantes da tecnologia microbiana. Espera-se que a utilização de microrganismos em combinação com a evolução de elementos como a eletrônica, software, imagem digital e nanotecnologia, irá desempenhar um papel importante na resolução de problemas globais do século XXI (AHMAD et al., 2011).

2.4 O modelo - *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que ataca dezenas de culturas economicamente importantes (SARMENTO et al., 2002). A alta capacidade de reprodução, polifagia e o hábito migratório dessa praga permitem sua rápida disseminação ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (GIOLO et al., 2012). Em grande parte do continente americano, este inseto ocorre como sério problema fitossanitário (KERGOAT et al., 2012). No Brasil, é a principal praga da cultura de milho, causando severos prejuízos para a economia do país. Em virtude dessa situação, diferentes aspectos de sua bioecologia e controle têm sido enfatizados (CRUZ, 2002).

O controle de *S. frugiperda* tem dependido, principalmente, do uso de inseticidas. Como essa praga pode atacar o milho em qualquer época do ano, a frequência e intensidade do uso de inseticidas têm aumentado nos últimos anos, resultando no desenvolvimento de resistência da praga aos principais grupos de inseticidas, tornando-se comuns os relatos de fracassos no seu controle com os inseticidas hoje disponíveis (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

O primeiro relato de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas foi realizado por Young e McMillian (1979), que identificaram resistência ao carbaril numa população do estado da Flórida, EUA. Desde então, foi identificada resistência às principais classes de inseticidas em populações de *S. frugiperda*. Yu (1991) detectou razões de resistência que variaram de 2 a 216 vezes para inseticidas do grupo dos piretróides, 12 a 271 vezes para fosforados e de 14 a 192 vezes para carbamatos. No Brasil, Diez-Rodriguez e Omoto (2001) verificaram que a

intensidade de resistência de *S. frugiperda* ao piretróide lambda-cyhalothrin foi de aproximadamente 13 vezes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico estudado – *Spodoptera frugiperda*

Populações naturais de *S. frugiperda* foram selecionadas por pressão de seleção em laboratório para seleção de genótipos resistentes aos piretróides deltamethrin e lambda-cyhalothrin, ao organofosforado chlorpyrifos ethyl, ao “naturalyte” spinosad e ao inibidor de síntese de quitina lufenuron. Todas as linhagens resistentes foram selecionadas, mantidas e disponibilizadas pelo Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). Estas linhagens foram selecionadas e mantidas sob constante processo de seleção, mantendo os insetos e sua microbiota associada, constantemente expostos aos produtos químicos para os quais foram selecionadas.

As linhagens de *S. frugiperda* foram criadas em dieta artificial à base de feijão, seguindo protocolo de criação descrito por Parra (1986).

3.2 Isolamento, cultivo e caracterização molecular de bactérias simbiontes associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* com capacidade de utilização de inseticidas como única fonte de carbono

3.2.1 Isolamento e cultivo

Lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* de cada uma das cinco linhagens selecionadas pela sua resistência a deltamethrin, lambda-cyhalothrin, chlorpyrifos ethyl, spinosad ou lufenuron, assim como lagartas da linhagem de *S. frugiperda* suscetível a esses produtos, foram esterilizadas superficialmente em 5% de hipoclorito de sódio em 70% etanol (1 banho – 5 min) e enxaguadas em banhos sucessivos (3x – 1min) em água destilada estéril. As lagartas foram utilizadas para obtenção do trato digestivo após dissecação em meio mínimo M9 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) estéril e seu conteúdo (1 intestino equivalente) colocado em frascos de 50 mL contendo o mesmo meio acrescido de 10 µg/mL de um dos inseticidas ao qual a população era resistente. Da mesma forma, em um segundo tratamento, adicionou-se glicose (1 g/L) ao meio mínimo de cultivo acrescido de inseticida. O meio contendo glicose também foi utilizado por favorecer o crescimento de bactérias de crescimento lento e que poderiam ser reticentes ao uso dos inseticidas como fonte de carbono

para o seu crescimento. Em ambos os tratamentos foi adicionado 0,1% (v/v) do surfactante Tween 20 para melhor incorporação do inseticida ao meio seletivo. No preparo do inóculo, foram dissecadas seis lagartas por população e os intestinos colocados em 6 mL de meio M9 estéril e macerados com auxílio de pistilo estéril para exposição do conteúdo intestinal.

O material foi incubado a 28°C sob agitação constante (225 rpm) por até 10 dias, sendo alíquotas retiradas, diluídas seriadamente (1, 1/10, 1/100) e plaqueadas em meio mínimo M9 + ágar + 10 µg/mL do pesticida testado, após 5, 7 e 10 dias do início do cultivo. As placas foram incubadas a 28°C até a obtenção do crescimento desejado dos isolados selecionados. O experimento foi feito em triplicata, sendo considerada como repetição cada frasco de cultivo e cada placa inoculada por uma das três diluições testadas.

As colônias obtidas foram morfotipadas pelas suas características morfológicas (tamanho, cor e formato) e de crescimento, sendo que pelo menos três clones de cada morfotipo foram reisolados para posterior caracterização molecular. Cada clone isolado foi cultivado em meio líquido e uma alíquota das células em cultivo preservada em 20% glicerol e depositada na Coleção de Simbiontes de Insetos do Laboratório de Interações em Insetos, mantida a -80°C. Amostras de cada clone também foram mantidas no meio de cultura + ágar adequado e utilizadas para a realização dos ensaios propostos.

3.2.2 Caracterização molecular e filogenia

Os morfotipos selecionados foram cultivados a 28°C, por 16 a 24 h, sob agitação constante (225 rpm), em 1 mL de meio M9 enriquecido com glicose (1 g/L) e 10 µg/mL do inseticida selecionado. Após o período de cultivo, as células foram sedimentadas via centrifugação (2000g x 5 min) e utilizadas para a extração do DNA genômico, segundo o protocolo de Sunnucks e Hales (1996). A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (w/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, a 70 V por 1 h, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH = 7,2).

O gene 16S do rDNA foi selecionado como marcador molecular para a identificação tentativa dos isolados e amplificado por meio de reação de PCR utilizando 10-20 ng de DNA genômico, tampão da enzima (1x), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador (8f - 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1491r - 5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3') (WEISBURG et al., 1991) e 0,625 U de Taq polimerase (Promega), em reação com volume final de 25 µL. As amplificações foram conduzidas em termociclador programado a 95°C por 4 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C

por 10 min (1 ciclo). O produto da reação foi resolvido em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, via eletroforese em voltagem constante de 100 V em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH = 7,2) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging Systems). Os amplicons obtidos foram submetidos ao tratamento com enzimas (exonuclease e fosfatase alcalina) para a eliminação de resíduos de iniciadores e dNTPs. Em um volume de 10 µL do produto de PCR foram acrescentados 1 U de exonuclease (Promega) e 1 U de fosfatase alcalina (Promega). A reação foi incubada a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 15 min.

Antes de serem submetidas ao sequenciamento, os amplicons foram submetidos à análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”) via digestão utilizando-se das enzimas de restrição *EcoRI*, *Rsa* e *DdeI* (Promega). Uma alíquota de 4 µL de cada produto de PCR foi digerida em uma mistura de reação de 10 µL (0,5 µL da enzima, 1 µL de tampão e 4,5 µL de água), adequada de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Em seguida, a reação foi incubada a 37°C por 4h, e os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 100V. O tamanho dos fragmentos de restrição foi estimado graficamente usando o programa GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.) e o marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) como referência. Amostras com padrão de digestão similar foram agrupadas e o amplicon selecionado para sequenciamento para cada grupo que tenha apresentado o mesmo morfotipo e padrão de RFLP.

Os amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional junto ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo. Exatamente 1400 pb do gene 16S rDNA foram obtidos via sequenciamento com os iniciadores empregados na reação original de amplificação e o iniciador universal 515f (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') (TURNER et al., 1999).

As sequências obtidas foram comparadas àquelas disponíveis junto aos bancos de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; KIM et al., 2012), utilizando as ferramentas de busca apropriadas disponibilizadas nos mesmos para a identificação putativa dos isolados obtidos. As sequências do 16S rDNA obtidas foram visualizadas no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. As sequências completas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa Mega 5.05, utilizando os parâmetros padrão (penalidade de

“gap” = 15, extensão de “gap” = 9) (TAMURA et al., 2011). Relações filogenéticas foram inferidas por meio do teste de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) para a obtenção da árvore filogenética. O modelo de Jukes e Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) foi utilizado para gerar um processo evolutivo obtendo uma matriz de distâncias. Sequências do gene 16S rDNA de bactérias mais próximas aos isolados foram obtidas junto ao banco de dados do NCBI/EzTaxon-e e utilizadas na árvore para a formação de clados bem definidos.

3.3 Caracterização de isolados de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* obtidos do trato digestivo de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas

Os diferentes isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* obtidos a partir do cultivo do conteúdo do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* em meio seletivo contendo inseticidas como única fonte de carbono (*E. casseliflavus*: chlorpyrifos ethyl, deltamethrin, lambda-cyhalothrin e spinosad; *E. mundtii*: lambda-cyhalothrin, chlorpyrifos ethyl, spinosad e lufenuron) foram caracterizados via análise de sua sensibilidade a antibióticos, capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e tipagem via sequenciamento de multilocus.

3.3.1 Caracterização quanto à sensibilidade a antibióticos

Para o teste de sensibilidade a antibióticos, os isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* foram suspensos em meio TSB e a suspensão foi ajustada para 10^6 UFC/mL. O teste de sensibilidade foi realizado utilizando a técnica de disco difusão (BAUER et al., 1966), empregando sistema comercial para testes de antibiograma (Laborclin), seguindo as recomendações do fabricante. Os isolados foram inoculados (0,5 mL) em placas de Petri (150 x 15 mm) contendo meio TSA. Após a completa absorção, os discos contendo os antibióticos a serem testados foram distribuídos equidistantemente na placa. As placas foram incubadas a 28°C e a resposta dos isolados avaliada pela medida, em milímetros (mm), do halo de inibição formado ao redor do disco após 48 horas de incubação. Os antibióticos utilizados foram: cefepime (CPM/30µg), ciprofloxacina (CIP/5µg), clindamicina (CLI/2µg), cloranfenicol (CLO/30µg), eritromicina (ERI/15µg), gentamicina (GEN/10µg), oxacilina (OXA/1µg), penicilina (PEN/10U), rifampicina (RIF/30µg), sulfazotrim (SUT/25µg), tetraciclina (TET/30µg) e vancomicina (VAN/30µg).

3.3.2 Caracterização quanto ao metabolismo de carboidratos

A capacidade dos diferentes isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* em metabolizar fontes distintas de carboidratos foi verificada utilizando-se do sistema comercial API 50 CH (bioMerieux, França), seguindo as recomendações do fabricante. Esse sistema permite a comparação da atividade metabólica de diversos isolados quanto à sua capacidade de metabolização de 49 fontes distintas de carboidratos. Assim, os isolados foram cultivados em meio TSB e a suspensão ajustada para 10^6 UFC/mL. A suspensão foi centrifugada ($1000g \times 2 \text{ min} \times 20^\circ\text{C}$), e o sedimento de células obtido ressuspensão em meio apropriado composto por sulfato de amônio (2 g), extrato de levedura (0,5 g), triptona (1 g), fosfato dissódico (3,22 g), fosfato monopotássico (0,12 g), vermelho de fenol (0,17 g) em água desmineralizada pH 7,4 (1000 mL). A suspensão de células obtida foi igualmente distribuída nos microtubos disponíveis para os ensaios de metabolismo. Os microtubos foram incubados a 28°C e avaliados após 48 horas, sendo o resultado positivo dado pela alteração de cor devido a produção de ácido decorrente da metabolização da fonte de carboidrato em condição de anaerobiose, revelada pelo indicador de pH do meio. Esse sistema permite a avaliação da capacidade de metabolização das seguintes fontes de carboidratos: 2-cetogluconato de potássio (2KG); 5-cetogluconato de potássio (5KG); D-adonitol (ADO); amido (AMD); amigdalina (AMY); arbutina (ARB); D-celobiose (CEL); D-arabinose (DARA); D-arabitol (DARL); D-fucose (DFUC); dulcitol (DUL); D-xilose (DXYL); eritritol (ERY); esculina citrato de ferro (ESC); D-frutose (FRU); D-galactose (GAL); gentiobiose (GEN); glicerol (GLY); D-glicose (GLU); glicogênio (GLYG); gluconato de potássio (GNT); inositol (INO); inulina (INU); D-lactose (LAC); L-arabinose (LARA); L-arabitol (LARL); L-fucose (LFUC); L-xilose (LXYL); D-lixose (LYX); D-maltose (MAL); D-manitol (MAN); metil- α -D-glucopiranosido (MDG); metil- α -D-manopiranosido (MDM); metil- β -D-xilopiranosido (MDX); D-melibiose (MEL); D-melezitose (MLZ); D-manose (MNE); N-acetilglucosamina (NAG); D-rafinose (RAF); L-ramanose (RHA); D-ribose (RIB); D-sacarose (SAC); salicina (SAL); L-sorbose (SBE); D-sorbitol (SOR); D-tagatose (TAG); D-trealose (TRE); D-turanose (TUR) e xilitol (XLT).

3.3.3 Caracterização via sequenciamento de multilocus (MLS)

Para a caracterização dos isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* via MLS, vários locus utilizados na tipagem de *Enterococcus faecalis* e/ou *Enterococcus faecium*, disponíveis no banco de dados de MLST (<http://www.mlst.net/databases/default.asp>), foram selecionados para sua utilização em reações de amplificação e na caracterização dos isolados de interesse (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador programado a 94°C por 5 min (1 ciclo); 94°C por 30s, 52°C por 30s e 72°C por 1 min (30 ciclos); e 72°C por 7 min (1 ciclo). O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1 %, seguida de separação dos amplicons via eletroforese em voltagem constante (100V), assim como descrito anteriormente. Os amplicons obtidos foram tratados com exonuclease e fosfatase alcalina, assim como descrito anteriormente, e o produto obtido encaminhado para sequenciamento bidirecional no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo.

Tabela 1 - Genes investigados para caracterização via MLS de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii*, sequências utilizadas nas reações de amplificação (1: iniciador senso; 2: iniciador antissenso)

Gene	Sequência (5' – 3')	Amplicon (pb)
glicose-6-fosfato desidrogenase	gdh-1: GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	gdh-2: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	gyd-1: CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC	395
	gyd-2: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
fosfato-cassete transporter binding	pstS-1: CGGAACAGGACTTTTCGC	583
	pstS-2: ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
glicocinase	gki-1: GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
	gki-2: ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
chiquimato-5-desidrogenase	aroE-1: TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	459
	aroE-2: GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
D-alanine ligase	ddl-1: GAGACATTGAATATGCCTTATG	414
	ddl-2: AAAAAGAAATCGCACCG	
acetil-CoA-acetiltransferase	yiql-1: CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
	yiql-2: GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	
adenilato quinase	adk-1: TATGAACCTCATTTTAATGGG	437
	adk-2: GTTGACTGCCAAACGATTTT	

As sequências obtidas foram visualizadas no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. As sequências obtidas foram editadas no programa MEGA 5.0.5, utilizadas de forma isolada e concatenadas para a comparação dos isolados de *E. mundtii* e *E. casseliflavus* obtidos do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a diversos inseticidas utilizando o programa de alinhamento múltiplo de sequências - Clustalw (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

3.3.4 Similaridade dos isolados de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii*

Os isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* foram comparados considerando os resultados obtidos nas análises de sensibilidade a antibióticos, metabolismo de carboidratos e MLS. Assim, uma tabela de similaridade foi obtida por meio da comparação par a par (0 = dissimilar; 1 = similar) de cada um dos parâmetros avaliados para os isolados de *E. casseliflavus* ou de *E. mundtii*, sendo, então, calculada a similaridade entre os isolados pela semelhança dos resultados obtidos nos ensaios de antibiograma, metabolismo de carboidratos e sequência dos diversos alelos analisados.

3.4 Determinação da associação simbiotes - *Spodoptera frugiperda*

3.4.1 Associação com linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda* de laboratório

As sequências de 16S do rDNA obtidas para cada isolado selecionado foram alinhadas com sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI e do EzTaxon-e para o desenvolvimento de iniciadores senso e/ou antisenso espécie-específicos (Tabela 2), utilizados ou não em associação com um dos iniciadores universais inicialmente empregados (8f ou 1491r).

A detecção dos isolados selecionados de lagartas resistentes a inseticidas e que apresentaram capacidade de utilização de pelo menos um (1) dos inseticidas testados foi realizada via PCR-diagnóstico utilizando-se dos iniciadores espécie-específicos anteriormente descritos. Assim, cinco lagartas de quinto ínstar da população suscetível de *S. frugiperda* mantida em laboratório foram esterilizadas superficialmente, dissecadas e seu trato intestinal obtido conforme descrito no item 3.2.1. Após a maceração com auxílio de pistilo estéril, todo o conteúdo intestinal foi misturado em tampão ATL (QIAGEN) e alíquotas de 180 µL submetidas à extração de DNA genômico utilizando-se do sistema comercial de extração de

DNA DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi verificada via eletroforese em gel de agarose, assim como descrito anteriormente.

Reações de PCR-diagnóstico foram realizadas utilizando 10-20 ng de DNA genômico, tampão da enzima (1x), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,625 U de Taq polimerase (Promega), em reação com volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador programado a 95°C por 4 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, X°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C por 10 min (1 ciclo), onde X refere-se às diferentes temperaturas de anelamento exigidas para cada conjunto de iniciador espécie-específico (Tabela 2). O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1% e a separação dos fragmentos foi feita em voltagem constante (100V), assim como descrito anteriormente. A visualização dos produtos de amplificação foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging Systems) e os amplicons obtidos analisados quanto ao tamanho do fragmento, tendo como referência o marcador 100 bp Ladder DNA Marker (Axygen). Os amplicons confirmados foram tratados com exonuclease e fosfatase alcalina, assim como descrito anteriormente, e o produto obtido encaminhado para sequenciamento bidirecional no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo.

3.4.2 Associação com populações naturais de *Spodoptera frugiperda*

A associação dos simbiossitos isolados do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a diversos inseticidas com populações naturais desse inseto foi verificada via PCR-diagnóstico, assim como descrito anteriormente.

A presença e frequência de ocorrência desses simbiossitos em lagartas de populações naturais de *S. frugiperda* foram verificadas em populações coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Bahia (Tabela 3), os quais representam as principais regiões produtoras de milho do país. Foram analisadas 10 lagartas por população. Essas lagartas foram submetidas, individualmente, ao processo de extração de DNA genômico e o DNA obtido utilizado para a realização de PCR-diagnóstico para a detecção dos simbiossitos selecionados, de forma análoga ao descrito anteriormente.

Tabela 2 - Iniciadores (1-senso, 2-antissenso) espécie-específicos para a realização de PCR-diagnóstico para a detecção dos simbiontes do trato digestivo de lagartas de linhagens selecionadas de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas, em populações naturais desse inseto

Simbionte	Fonte de carbono	Iniciadores (5' – 3')	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Cl, Dm, Lc, Sp	Ec-1: ATGGAAGAAAGTTGAAAGGCG Ec-2: AAGGGGAAGCTCTATCTCTAG	56	820
<i>Enterococcus mundtii</i>	Cl, Lc, Luf, Sp	Em-1: ATGGTTTCGTTTTGAAAGGCG Em-2: AGGGGTGAACAGTTACTCTC	56	285
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Luf	Ss-1: TCGGCTGTCACTTATAGATGG Ss-2: CCGTCAAGACTTGTTTCAGTTA	56	254
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Dm	An-1: TCAACTCCGGTTCTGCAGT An-2: AGGTCTTTCCGGTTCATGTC	56	374
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Cl	Mp-1: ATACTGGATATGTGACGTGAC Mp-2: ACTAGTTCCCAACGTTTACG	56	644
<i>Microbacterium arborescens</i>	Luf	Ma-1: GGTCAGTAGCTGGAAAGAAT Ma-2: GTTTCAGACGTTTCTCTATA	56	804
<i>Delftia lacustris</i>	Cl	Da-1: ACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTTC Da-2: TGTGTGCAGGTTCTCTTTC	56	211
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Cl	La-1: ATCAGATGTGCCCAGATGG La-2: CAAGGGAACAACCTCCAAG	58	601
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Lc	Ps-1: GCAGTAAGTTAATACCTTGCTG Ps-2: ACCCTCTGCCATACTCTAG	56	196
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Sp	Pp-1: AGGAAGGGCTCATAGCGAATACC Pp-2: CTACCGCACTCTAGCCAGACA	58	197

Cl: chlorpyrifos ethyl; Dm: deltamethrin; Lc: lambda-cyhalothrin; Luf: lufenuron; Sp: spinosad

Tabela 3 - Populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas na cultura do milho em diferentes regiões do Brasil

População	Município	Data de coleta	Latitude	Longitude
RS-09	Santo Ângelo – RS	16/05/2012	28°17'56''S	54°15'46''O
PR-37	Sabáudia – PR	23/05/2012	23°18'43''S	51°29'43''O
SP-14	Palmital – SP	02/05/2012	22°46'31''S	50°13'46''O
MG-14	Uberlândia – MG	28/12/2011	19°12'49''S	48°10'26''O
GO-18	Rio Verde – GO	16/12/2011	17°47'52''S	50°55'40''O
BA-29	Barreiras – BA	11/04/2012	11°40'19''S	36°03'40''O
MT-20	Campo Novo do Parecis – MT	18/04/2012	13°24'47''S	57°57'51''O

3.5 Determinação da capacidade de crescimento de simbioses selecionados do trato digestivo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em meio de cultura contendo inseticidas como a única fonte de carbono disponível

A capacidade de crescimento dos simbioses isolados de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas em meio de cultivo contendo os inseticidas investigados como a única fonte de carbono foi verificada pela observação da curva de crescimento dos mesmos, para permitir a seleção de isolados que apresentassem o maior crescimento nos substratos em questão, para a realização de testes subsequentes.

A curva de crescimento dos diferentes isolados obtidos foi determinada utilizando-se de meio mínimo de cultivo (M9) acrescido do inseticida (10 µg/mL) utilizado no processo de seleção dos mesmos. Assim, suspensões de 10^5 UFC/mL de cada isolado foram preparadas, inoculadas (0,12 mL) em 3 mL do meio mínimo + inseticida e cultivadas por nove dias nas condições anteriormente descritas. Alíquotas (100 µL) eram removidas diariamente para a determinação do número de células bacterianas pela técnica de microcolônias. As alíquotas obtidas foram sujeitas a diluições seriadas, sendo inoculados 10 µL de cada diluição, na forma de gotas (4 gotas por diluição), em placas contendo meio TSA. As placas de meio foram incubadas em estufa biológica por até 48 horas a 28°C para posterior determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Esse experimento contou com três repetições para cada período amostral, sendo cada amostra de cultivo de 3 mL considerada como uma repetição.

3.6 Efeito da concentração de inseticidas no crescimento de simbioses isolados do trato digestivo de lagartas resistentes de *Spodoptera frugiperda*

O efeito da concentração dos diferentes inseticidas na capacidade de crescimento de simbioses selecionados do trato digestivo de lagartas resistentes de *S. frugiperda* foi investigado apenas para o simbiote que apresentou a maior capacidade de crescimento, em cada tratamento, assim como determinado no item 3.5.

A capacidade de crescimento desses simbioses em concentrações distintas dos diferentes inseticidas avaliados foi verificada em meio M9 acrescido de 10, 20, 40, 80 ou 160 µg/mL de inseticida. Suspensões de 10^5 UFC/mL dos simbioses selecionados foram preparadas, inoculadas (0,12 mL) em 3 mL do meio M9 com as diferentes concentrações do inseticida e submetidos ao cultivo por 9 dias, assim como descrito anteriormente. Os

recipientes de cultivo eram amostrados diariamente e o número de células bacterianas determinado utilizando-se a técnica de microcolônia, assim como descrito anteriormente. Foram realizadas três repetições para cada período amostral, sendo cada amostra de cultivo de 3 mL considerada uma repetição.

3.7 Determinação da degradação de xenobióticos no processo de cultivo *in vitro*

3.7.1 Cultivo dos isolados

O potencial de degradação dos xenobióticos foi avaliado apenas para os isolados que apresentaram o maior potencial de crescimento em cada um dos inseticidas utilizados como substrato. Assim, suspensões de 10^6 UFC/mL para cada um desses isolados foram inoculadas (0,2 mL) em alíquotas de 50 mL de meio mínimo M9 acrescido de 10 µg/mL do inseticida correspondente e cultivados sob agitação constante a 28°C, pelo período necessário para o seu máximo crescimento, assim como determinado no item 3.5. Cada tratamento contou com três repetições, sendo cada amostra de cultivo de 50 mL considerada uma repetição. Alíquotas de 50 mL do meio mínimo M9 acrescido dos inseticidas, mas sem bactérias, também foram cultivadas nas mesmas condições daqueles contendo bactérias para que a degradação natural dos inseticidas pudesse ser avaliada.

Dependendo da natureza química do inseticida, a degradação do mesmo pela ação das bactérias simbiotes foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa-massa (GC-MS/MS) ou por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa-massa (LC-MS/MS) (Tabela 4).

Tabela 4 - Estrutura química, fórmula e massa molecular, e o tipo de análise cromatográfica dos inseticidas estudados

Inseticida	Estrutura química	Fórmula molecular	Massa molecular	Tipo de análise cromatográfica
Chlorpyrifos ethyl		$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,59 g/mol	LC-MS/MS
Lambda-cyhalothrin		$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449,85 g/mol	GC-MS/MS
Deltamethrin		$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505,21 g/mol	GC-MS/MS
Spinosad	spinosyn A	$C_{41}H_{65}NO_{10}$	731,98 g/mol	LC-MS/MS
	spinosyn D	$C_{42}H_{67}NO_{10}$	746,00 g/mol	
Lufenuron		$C_{17}H_8Cl_2F_8N_2O_3$	511,15 g/mol	LC-MS/MS

3.7.2 Preparação das amostras

Para as análises cromatográficas, os meios de cultivo foram submetidos à centrifugação (10000g x 10 min x 4°C), o sobrenadante coletado e sujeito à extração líquido-líquido (ELL) com acetato de etila (HPLC grade - JTBaker). Um volume de acetato de etila foi adicionado ao volume das amostras em funil de separação, misturado vigorosamente, e a fração orgânica coletada após a separação das fases. Os extratos obtidos foram concentrados em rotoevaporador (Tecnal) (40 rpm; 45°C) e acondicionados em recipientes escuros de 9 mm (Sun Sri) a -20°C até a análise.

3.7.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS/MS): Deltamethrin e Lambda-cyhalothrin

Os extratos orgânicos obtidos para deltamethrin e lambda-cyhalothrin foram secos em fluxo de N₂, ressuspensos em 200 µL de MeOH e analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas em cromatógrafo gasoso HP6890, equipado com coluna capilar HP-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, 30 m de comprimento x 320 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura da fase estacionária) (Agilent 19091J-413), e acoplado a um detector de massas HP5973 em modo de impacto de elétrons, com energia de ionização de 70eV. As injeções de 1 µL das amostras foram realizadas com razão de divisão 20:1, utilizando He como gás de arraste (1,2 mL/min), temperatura da porta de injeção de 250°C, temperatura inicial do forno de 200°C, com incremento de 4°C/min até 300°C, com 5 min a 300°C.

A identificação dos compostos nas amostras foi dada pela comparação das fragmentações de massas obtidas com padrões de deltamethrin [m/z 172 (30), 175 (29), 181 (100), 208 (15), 209 (16), 253 (57)] e lambda-cyhalothrin [m/z 181 (100), 197 (92), 208 (72), 449 (10)]. A concentração de ambos os compostos nos extratos orgânicos foi calculada usando-se curvas-padrão construídas com diluições seriadas (50, 200, 350, 500 e 650 µg/mL) de deltamethrin ($y = 145788x$, $r^2 = 0,998$) e lambda-cyhalothrin ($y = 245320x$, $r^2 = 0,998$).

3.7.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC/MS/MS): Chlorpyrifos ethyl, Lufenuron e Spinosad

Os extratos orgânicos obtidos para chlorpyrifos ethyl, lufenuron e spinosad foram secos em fluxo de N₂, resuspensores em 1 mL de MeOH e submetidos à separação cromatográfica em sistema de cromatografia líquida.

As análises por UPLC-MS das amostras dos inseticidas e soluções padrões foram realizadas em cromatógrafo líquido ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado ao espectrômetro de massas XEVO TQ-S (Waters, Manchester, UK). O sistema foi equipado com uma bomba quaternária, um degaseificador a vácuo e um injetor automático. Para a separação cromatográfica dos analitos foi utilizada uma coluna ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 µm). A fase móvel foi composta de H₂O + 0,1% de acetato de amônio como sistema A e MeOH + 0,1% de ácido fórmico como sistema B. As condições de eluição foram: 5 min de gradiente, de modo que o tempo de análise foi de 0-5 min com uma proporção de fase móvel de 65-97% de MeOH. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL/min. Os parâmetros de operação utilizado no espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar 3,2 kV, temperatura da fonte 150°C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ 350°C, fluxo do gás do cone 150 L/h. A ionização das amostras foi realizada usando fonte de ionização Z-spray operando em modos positivo e negativo de análise. Em todas as análises, o método analítico utilizado foi realizado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A dissociação ativada por colisão (CAD) foi realizada utilizando argônio (Ar) como gás de colisão. Desta forma, para chlorpyrifos ethyl foi selecionado o íon precursor de m/z 350 e o íon fragmento de m/z 97 (350 > 97), para spinosyn A o íon precursor de m/z 773 e o íon fragmento de m/z 142 (773 > 142), para spinosyn D o íon precursor de m/z 747 e o íon fragmento de m/z 142 (747 > 142), sendo para esses inseticidas em modo positivo de análise. No caso do lufenuron, este foi analisado em modo negativo, sendo selecionado o íon precursor de m/z 509 e o íon fragmento de m/z 326 (509 > 326).

A concentração dos compostos nas amostras foi determinada por comparação com as curvas de calibração obtidas pela análise de diluições seriadas de chlorpyrifos ethyl ($y = 2E+07x$, $r^2 = 0,999$), spinosyn A ($y = 5E+07x$, $r^2 = 0,997$), spinosyn D ($y = 1E+07x$, $r^2 = 0,996$) e lufenuron ($y = 2E+06x$, $r^2 = 0,978$) nas concentrações de 0,5, 10, 50, 100 e 250 ng/mL. A aquisição dos dados foi realizada com o programa MassLynx 4.1 e o gerenciador de aplicativos TargetLynx (Waters).

3.7.5 Análise de degradação

A partir da determinação da concentração dos produtos nas amostras, via comparação com curvas-padrão para cada inseticida, foi calculada a degradação total (DT%), a degradação natural (DN%) (dada pela degradação obtida no controle) e a degradação bacteriana ($DB\% = DT\% - DN\%$) do inseticida. A média das três repetições foi utilizada para comparação com análise estatística feita pelo teste t ($P < 0,05$).

3.8 Verificação de possíveis rotas de transmissão de bactérias simbiotes associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

3.8.1 Transmissão vertical: aquisição pela contaminação da superfície externa do ovo

A verificação da aquisição dos simbiotes associados ao trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* via alimentação do córion no momento da eclosão, foi investigado em estudo comparativo da presença desses simbiotes no intestino de lagartas obtidas de ovos que passaram por esterilização superficial ou não. Assim, posturas obtidas de indivíduos da população suscetível de *S. frugiperda* foram divididas em dois grupos. Um grupo não recebeu qualquer tratamento de esterilização superficial (controle), enquanto o outro passou pela individualização e esterilização superficial dos ovos em 0,2% de hipoclorito de sódio em 70% etanol (1 banho – 5 min), seguido por três banhos sucessivos (1 min/cada) em água destilada estéril e um banho final em solução aquosa de sulfato de cobre a 1% (1 min). Os ovos foram colocados em placas de Petri revestidas com papel filtro estéril e incubadas a 25°C. Todo o procedimento de individualização e esterilização foi realizado em condições assépticas.

Após a eclosão, as lagartas foram transferidas para poços de placas plásticas estéreis para o cultivo de células (35 x 10 mm por célula) contendo 3 mL de dieta artificial estéril/poço. Cada poço da placa recebeu duas lagartas neonatas, sendo a placa vedada para manter a assepsia do ambiente interno e posteriormente transferida para ambiente controlado (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 12h) para o desenvolvimento das lagartas.

Após 10 dias da inoculação em meio artificial, as lagartas de cada poço foram submetidas à extração de DNA genômico para a realização de PCR diagnósticos para a detecção dos simbiotes identificados nesse estudo, assim como descrito anteriormente. Esse experimento foi conduzido com 24 repetições, sendo as lagartas obtidas em cada poço da placa consideradas como uma repetição.

3.8.2 Transmissão vertical: aquisição transovariana

Para a verificação da aquisição dos simbioses associados ao trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* via ovário, pupas fêmeas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível foram selecionadas, individualizadas e mantidas em condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 12h). Após a emergência, 10 fêmeas virgens foram sacrificadas em 70% etanol e dissecadas para obtenção de ovariolos. Ovariolos obtidos de cada indivíduo foram submetidos à extração de DNA genômico e PCR diagnósticos para a detecção dos simbioses identificados nesse estudo, assim como descrito anteriormente.

3.9 Participação de bactérias simbioses na resposta de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas: *Microbacterium arborescens* e lufenuron

O papel das bactérias simbioses isoladas na resposta de *S. frugiperda* a inseticidas foi avaliado exclusivamente para o isolado *M. arborescens*, obtido de lagartas resistentes a lufenuron. A capacidade dessa bactéria em afetar a resposta do inseto a lufenuron foi avaliada pela colonização induzida do trato digestivo de lagartas suscetíveis, visto que a mesma não apresentava associação com essa bactéria.

3.9.1 Inoculação de *Microbacterium arborescens* em lagartas da linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*

Para inoculação da bactéria de interesse em lagartas da linhagem suscetível de *S. frugiperda* a inseticidas, posturas foram coletadas e tratadas como coortes. Cada coorte foi subdividida, fornecendo indivíduos neonatos que foram alimentados em dieta normal ou em dieta acrescida de 0,2 mL de suspensão a 10^6 UFC/mL de *M. arborescens* em 0,85% salina estéril, enquanto a dieta do controle recebeu apenas solução salina. As lagartas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente para seu completo desenvolvimento e obtenção de adultos. As posturas obtidas de adultos em que as lagartas se desenvolveram em dieta contendo as bactérias em questão foram separadas e parte das lagartas neonatas coletadas foi submetida à extração de DNA genômico e PCR diagnósticos para a detecção desse simbiote, assim como anteriormente descrito. O restante das lagartas (com ou sem bactéria) foi inoculado em dieta artificial para a manutenção dos indivíduos da linhagem.

3.9.2 Determinação da curva resposta a lufenuron

Comprovada a presença de *M. arborescens* nas linhagens alimentadas em dieta artificial suplementada com esse simbiote, lagartas foram submetidas ao bioensaio de curva resposta do inseticida de interesse. O método de bioensaio adotado foi o de ingestão mediante tratamento superficial da dieta artificial com inseticida.

Os experimentos foram conduzidos em placa plástica para o cultivo de células (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA). Cada um dos 24 poços da placa foi preenchido com 1,25 mL de dieta artificial e as placas mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta até a geleificação da dieta para evitar a contaminação superficial da mesma. Uma vez geleificada, a superfície da dieta no interior de cada poço da placa recebeu 30 µL de solução inseticida, em uma das concentrações testadas.

As diferentes concentrações do inseticida foram obtidas mediante diluição do ingrediente ativo em acetona contendo 0,1% (v/v) do surfactante Tween 20. Foram testadas as seguintes concentrações: 0,10; 0,18; 0,32; 0,56; 1,00; 1,80 µg/mL. As placas do tratamento testemunha receberam apenas surfactante a 0,1% (v/v). Após o tratamento da superfície da dieta, as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar até a completa absorção da solução depositada na superfície da dieta. Posteriormente, uma lagarta de 3º ínstar (0-12 h) foi transferida para cada poço da placa, totalizando 120 lagartas por concentração. As placas foram vedadas e mantidas em condições controladas ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14 h) para avaliação da mortalidade após 120 h do início do experimento. Foram considerados mortos os indivíduos que ao serem tocados com a ponta de um estilete nos últimos segmentos abdominais não responderam com movimentos coordenados ou que tiveram o crescimento comprometido, sem a troca de ínstar. Os dados de mortalidade obtidos foram utilizados para a determinação de curva resposta das coortes com e sem simbiote via análise de Probit com o programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A partir dessa análise, foram estimados os valores das concentrações letais médias (CL_{50}).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento seletivo e cultivo de bactérias simbiontes com atividade de biodegradação de inseticidas

O meio de cultivo M9 + 10 µg/mL de inseticida se mostrou adequado para o isolamento de bactérias com potencial de atividade de biodegradação. O cultivo de bactérias associadas ao trato intestinal de lagartas de *S. frugiperda* resistentes em meio seletivo resultou no cultivo de um número elevado de colônias de bactérias em meios contendo os diferentes inseticidas testados (Figura 1). Em contrapartida, o cultivo de microrganismos associados ao trato intestinal de lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis aos inseticidas testados não resultou no isolamento de bactérias com potencial de atividade de biodegradação de pesticidas.

A análise morfológica dos isolados produzidos levou a seleção de 128 morfotipos, sendo que, no geral, chlorpyrifos ethyl e lambda-cyhalothrin foram os substratos que permitiram o isolamento do maior número de morfotipos (Figura 1). A maioria dos meios testados sem glicose permitiu o crescimento e isolamento de inúmeros morfotipos, com exceção de deltamethrin (Figura 1). Esta fonte de carbono, mesmo que oferecida associada a pequena concentração de glicose como fonte adicional de carbono, levou ao isolamento de apenas seis morfotipos (Figura 1). Spinosad foi outra molécula que resultou no isolamento de um número reduzido de morfotipos em cultivos em que foi oferecido como fonte exclusiva de carbono. No entanto, quando glicose foi adicionada como fonte de carbono adicional, um número substancial de morfotipos foi selecionado (Figura 1). Lambda-cyhalothrin e lufenuron foram as fontes de carbono que resultaram no isolamento do maior número de morfotipos sem adição de glicose (Figura 1).

Figura 1 - Morfotipos de bactérias (128) associados ao trato digestivo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes a diferentes inseticidas isolados em meio mínimo M9, contendo um dos inseticidas testados como fonte principal de carbono (10 µg/mL), em meio acrescido (1 g/L) ou não de glicose

Os isolados obtidos do cultivo em meio mínimo contendo chlorpyrifos ethyl e lambda-cyhalothrin como fonte principal de carbono apresentaram crescimento mais rápido quando não foi adicionada glicose ao meio (Figura 2). Nesta condição, a maioria dos isolados cresceu no sétimo dia de cultivo, obtendo uma grande variedade de morfotipos. Já no meio com glicose, a maior variedade de morfotipos apareceu mais tarde, após sete dias de cultivo (Figura 2). Em deltamethrin, onde somente o meio enriquecido apresentou isolados, o número de morfotipos foi igual nos três períodos (Figura 2). Em spinosad, isolados foram selecionados apenas após cinco dias de cultivo no meio enriquecido com glicose, sendo que no meio contendo apenas o inseticida, o isolamento de colônias foi possível apenas nos períodos mais prolongados de cultivo (Figura 2). Situação semelhante foi encontrada em lufenuron, porém, maior diversidade de morfotipos ocorreu nos períodos iniciais de cultivo (Figura 2).

Figura 2 - Morfortipos de bactérias associados ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas isolados em meio mínimo M9 + 10 µg/mL do inseticida testado com ou sem glicose (1 g/L) em função do tempo (dias) de crescimento no meio líquido para: chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, spinosad, lufenuron como fonte principal de carbono

4.2 Caracterização molecular e diversidade de bactérias

A análise por PCR-RFLP dos morfotipos obtidos permitiu a identificação de oito padrões de restrição entre os morfotipos selecionados de chlorpyrifos ethyl, cinco de lambda-cyhalothrin, dois de deltamethrin, quatro de spinosad e quatro de lufenuron (Figura 3).

Figura 3 - Perfis representativos da análise de PCR-RFLP do gene 16S rDNA de bactérias associadas ao intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes a lambda-cyhalothrin isoladas em meio mínimo de cultivo contendo como fonte principal de carbono o inseticida avaliado. Padrões de restrição obtidos com a) *EcoRI*; b) *RsaI*; e c) *DdeI*. Padrões: AAA (01, 04, 06, 08); ABA (07, 15); BAA (10, 11, 12, 13, 14, 16); BBA (02, 03, 05); CCB (09). (M = marcador de peso molecular – 100 bp Ladder DNA Marker AXYGEN®)

A análise das sequências parciais do 16S rDNA (550 pb) de pelo menos três clones para cada padrão de PCR-RFLP observado em cada tratamento realizado (inseticida), para cada morfotipo obtido, em cada período amostral (5, 7 e 10 dias), resultou na seleção de 16 isolados para o completo sequenciamento, sendo cinco de chlorpyrifos ethyl (IIL-CI 05, 22, 25, 29 e 32), três de lambda-cyhalothrin (IIL-Lc 09, 16 e 32), dois de deltamethrin (IIL-Dm 01 e 05), três de spinosad (IIL-Sp 06, 16 e 32) e três de lufenuron (IIL-Luf 12, 14 e 18).

As sequências do gene 16S rDNA utilizadas para a caracterização molecular foram de 1400 pb. Assim, as sequências completas dos 16 isolados selecionados foram comparadas com aquelas disponíveis junto ao banco de dados do NCBI e do EzTaxon-e, obtendo a identificação das mesmas por similaridade (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação por similaridade das sequências do gene 16S rDNA (1400 pb em tamanho) de bactérias simbiotes de lagartas resistentes de *Spodoptera frugiperda* isoladas nos diferentes inseticidas testados. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBI e do EzTaxon-e

Isolado	Similaridade			
	Fonte de carbono	Correspondente mais próximo	Nº acesso GenBank	Identidade
IIL-CI05	Chlorpyrifos ethyl	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AJ420804	99.80%
IIL-CI22	Chlorpyrifos ethyl	<i>Delftia lacustris</i>	EU888308	100.0%
IIL-CI25	Chlorpyrifos ethyl	<i>Enterococcus mundtii</i>	AJ420806	99.70%
IIL-CI29	Chlorpyrifos ethyl	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	AB273740	98.80%
IIL-CI32	Chlorpyrifos ethyl	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AJ491806	99.80%
IIL-Lc09	Lambda-cyhalothrin	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CP002881	99.90%
IIL-Lc16	Lambda-cyhalothrin	<i>Enterococcus mundtii</i>	AJ420806	99.70%
IIL-Lc32	Lambda-cyhalothrin	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AJ420804	99.80%
IIL-Dm01	Deltamethrin	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AJ420804	99.80%
IIL-Dm05	Deltamethrin	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	X80743	99.40%
IIL-Sp06	Spinosad	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AJ420804	99.80%
IIL-Sp19	Spinosad	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	AJ575816	100.0%
IIL-Sp24	Spinosad	<i>Enterococcus mundtii</i>	AJ420806	99.70%
IIL-Luf12	Lufenuron	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	AJ421446	99.90%
IIL-Luf14	Lufenuron	<i>Microbacterium arborescens</i>	X77443	100.0%
IIL-Luf18	Lufenuron	<i>Enterococcus mundtii</i>	AJ420806	99.70%

As análises das sequências atribuíram os isolados a três filos distintos: Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Actinobacteria foi representada por duas famílias, Micrococcaceae e Microbacteriaceae, ambas pertencentes a Classe Actinobacteria. Em Firmicutes, duas famílias, Enterococcaceae e Staphylococcaceae, representando, respectivamente, as Ordens Lactobacillales e Bacillales, ambas pertencentes a Classe Bacilli, foram identificadas. Em Proteobacteria, a Classe β -Proteobacteria foi representada pela família Comamonadaceae, enquanto a Classe γ -Proteobacteria contou com representantes das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.

A maior diversidade de bactérias com capacidade de utilização de um dos inseticidas testados como fonte de carbono foi encontrada no trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao inseticida chlorpyrifos ethyl, onde cinco filotipos, representando três filos e quatro famílias distintas de bactérias, Firmicutes-Enterococcaceae (*Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii*), Proteobacteria-Enterobacteriaceae (*Leclercia adecarboxylata*), Proteobacteria-Comamonadaceae (*Delftia lacustris*) e Actinobacteria-Microbacteriaceae (*Microbacterium paraoxydans*), apresentaram capacidade de crescimento em meio de cultivo contendo chlorpyrifos ethyl como fonte exclusiva de carbono (Tabela 5).

Nos inseticidas lambda-cyhalothrin e spinosad foram isolados, em cada um, três filotipos. *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus casseliflavus* pertencentes a Firmicutes-Enterococcaceae, comuns aos dois inseticidas e os representantes de Proteobacteria-Pseudomonadaceae, *Pseudomonas stutzeri*, em lambda-cyhalothrin, e *Pseudomonas psychrotolerans*, em spinosad. Em meio de cultivo contendo o inseticida lufenuron, foram isolados três filotipos. *Microbacterium arborescens* pertencente a Actinobacteria-Microbacteriaceae, *Enterococcus mundtii* a Firmicutes-Enterococcaceae e *Staphylococcus sciuri* a Firmicutes-Staphylococcaceae. Finalmente, meios enriquecidos com deltamethrin levaram ao isolamento dos filotipos *Enterococcus casseliflavus* Firmicutes-Enterococcaceae e *Arthrobacter nicotivorans* Actinobacteria-Micrococcaceae.

Com a identificação molecular das bactérias e as análises de PCR-RFLP dos 128 morfotipos isolados nos diferentes tratamentos foi possível a determinação da frequência relativa de cada espécie no meio de cultivo utilizado (Figura 4). Assim, *Leclercia adecarboxylata* (Enterobacteriaceae) foi a predominante em chlorpyrifos ethyl, enquanto duas Enterococcaceae, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii*, foram as predominantes nos demais inseticidas, sendo *E. casseliflavus* em lambda-cyhalothrin e deltamethrin, e *E. mundtii* em spinosad e lufenuron (Figura 4).

Os dois filotipos de Enterococaceae foram os únicos que ocorreram em mais de um inseticida testado. *Enterococcus casseliflavus* só não ocorreu no trato digestivo de lagartas resistentes a lufenuron, enquanto *Enterococcus mundtii* não foi recuperado apenas do cultivo do trato digestivo de lagartas resistentes a deltamethrin (Tabela 5, Figura 5). Com relação aos demais filotipos isolados, todos os inseticidas tiveram pelo menos uma bactéria de ocorrência exclusiva. O trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl foi o mais diverso, contando com cinco espécies de bactérias capazes de utilizar esse inseticida como fonte de carbono, sendo três delas, *Delftia lacustris*, *Leclercia adecarboxylata* e *Microbacterium paraoxydans*, de ocorrência exclusiva (Tabela 5). Em lagartas resistentes a lufenuron, a exclusividade se dá por duas espécies *Microbacterium arborescens* e *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*. Para as demais linhagens resistentes analisadas, apenas um único outro filotipo, além daqueles pertencentes a *Enterococcus*, foi cultivado (Tabela 5, Figura 5).

A árvore filogenética construída utilizando-se dos isolados identificados neste trabalho e de sequências de linhagens tipo mais próximas permitiu verificar que a quase totalidade dos isolados resolveram em ramos muitos bem definidos com as linhagens tipos mais próximas, formando clados indistintos com as mesmas. Os dois filotipos putativamente identificados como *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii*, que contaram com representantes isolados de amostras distintas, agruparam todos em seus clados específicos, com alto valor de suporte de *bootstrap* (Figura 5).

Figura 4 - Frequência dos 128 clones de bactérias simbiotas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas analisados por PCR-RFLP, selecionados e identificados a partir das sequências parciais do gene 16S rDNA (550 pb). Identificação das espécies obtida por comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBI e do EzTaxon-e

Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir das sequências da região 16S rDNA (1400 pb), pelo método de *neighbor-joining*, mostrando a filogenia de bactérias isoladas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos diferentes inseticidas. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo

4.3 Caracterização de isolados de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* obtidos do intestino de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas

4.3.1 Caracterização quanto à sensibilidade a antibióticos

O teste de antibiograma indicou que os isolados de *E. casseliflavus* possuem o mesmo padrão de sensibilidade aos antibióticos testados. Desta forma, os isolados se comportaram como resistentes apenas aos antibióticos oxacilina (1 µg) e tetraciclina (30 µg), sendo a eritromicina (15 µg) o maior inibidor de crescimento para essa espécie (Tabela 6).

Para os isolados de *E. mundtii*, o teste de antibiograma indicou um comportamento diferente entre os isolados. Enquanto os isolados de lambda-cyhalothrin e spinosad foram idênticos na resposta aos antibióticos, os isolados de chlorpyrifos ethyl e lufenuron apresentaram diferenças únicas. Diferentemente dos demais, o isolado IIL-CI25 de chlorpyrifos ethyl se apresentou como o único suscetível à oxacilina (1 µg), e o isolado IIL-Luf18 de lufenuron à cefepime (30 µg). Na resposta ao antibiótico clindamicina (2 µg), foi encontrada a maior variação entre os isolados, onde o halo de inibição para os isolados IIL-CI05 e IIL-Luf18 foi aproximadamente o dobro daquele para os isolados IIL-Lc16 e IIL-Sp24. Nos demais antibióticos os isolados se comportaram de maneira similar, sendo rifampicina (30 µg) o maior inibidor de crescimento para essa espécie (Tabela 6).

Tabela 6 - Sensibilidade dos isolados de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* a doze antibióticos, avaliada pelo diâmetro do halo de inibição de crescimento (mm)

Isolado*	Espécie	Antibiótico** - diâmetro do halo de inibição (mm)											
		ERI	CLI	CLO	CIP	GEN	OXA	PEN	RIF	SUT	TET	VAN	CPM
IIL-Cl05	<i>E. casseliflavus</i>	30	13	24	24	15	0	27	26	30	0	24	17
IIL-Dm01	<i>E. casseliflavus</i>	33	13	27	26	14	0	25	24	29	0	25	17
IIL-Lc32	<i>E. casseliflavus</i>	33	11	31	24	13	0	24	23	30	0	23	16
IIL-Sp06	<i>E. casseliflavus</i>	32	13	30	24	13	0	32	24	29	0	22	17
IIL-Cl25	<i>E. mundtii</i>	36	33	30	31	18	15	24	42	32	20	27	0
IIL-Luf18	<i>E. mundtii</i>	40	36	40	28	18	0	26	45	39	18	33	20
IIL-Lc16	<i>E. mundtii</i>	39	17	34	33	19	0	24	44	35	15	27	0
IIL-Sp24	<i>E. mundtii</i>	38	19	35	33	20	0	26	40	34	17	30	0

*Cl: chlorpyrifos ethyl; Lc: lambda-cyhalothrin; Dm: deltamethrin; Sp: spinosad; Luf: lufenuron

**ERI - Eritromicina (15 µg), CLI - Clindamicina (2 µg), CLO - Cloranfenicol (30 µg), CIP - Ciprofloxacina (5 µg), GEN - Gentamicina (10 µg), OXA - Oxacilina (1 µg), PEN - Penicilina G (10U), RIF - Rifampicina (30 µg), SUT- Sulfazotrim (25 µg), TET - Tetraciclina (30 µg), VAN - Vancomicina (30 µg), CPM - Cefepime (30 µg)

4.3.2 Verificação da similaridade dos isolados quanto ao metabolismo de carboidratos

A caracterização dos diferentes isolados quanto ao metabolismo de carboidratos revelou um mesmo padrão de metabolização para os isolados de *E. casseliflavus* (Figura 6A), enquanto que os de *E. mundtii* apresentaram variações (Figura 6B). Os isolados de *E. mundtii* IIL-Cl25 e IIL-Lc16 foram capazes de metabolizar 28 fontes de carboidratos, sendo 25 em comum. Enquanto IIL-Cl25 foi capaz de metabolizar D-sorbitol (19), D-rafinose (35) e D-turanose (40), IIL-Lc16 metabolizou D-arabinose (3), L-ramanose (15) e gluconato de potássio (47). O isolado IIL-Sp24 foi capaz de metabolizar 22 dos carboidratos testados, sendo 20 em comum a IIL-Lc16 e 19 a IIL-Cl25, sendo o único capaz de metabolizar metil- α -D-manopiranosido (20) e glicogênio (37). Já o isolado IIL-Luf18 foi aquele com menor capacidade de metabolizar os carboidratos testados, utilizando 15 deles. Desses, 13 em comum com IIL-Cl25 e IIL-Luf18 e 12 com IIL-Lc16, sendo o único a metabolizar 5-cetogluconato de potássio (49).

A. *Enterococcus casseliflavus*

B. *Enterococcus mundtii*

Figura 6 - Caracterização quanto ao consumo de carboidratos das espécies de *Enterococcus* isoladas de *Spodoptera frugiperda* resistente aos inseticidas chlorpyrifos ethyl (CI), lambda-cyhalothrin (Lc), deltamethrin (Dm), spinosad (Sp) e lufenuron (Luf). Galerias API 50 CH (bioMérieux) inoculadas com A. *Enterococcus casseliflavus* (IIL-CI05, IIL-Sp06, IIL-Lc32 e IIL-Dm01) e B. *Enterococcus mundtii* (IIL-CI25, IIL-Sp24, IIL-Lc16 e IIL-Luf18) após 48 horas de incubação. Composição das galerias: 0 controle; 1 glicerol; 2 eritritol; 3 D-arabinose; 4 L-arabinose; 5 D-ribose; 6 D-xilose; 7 L-xilose; 8 D-adonitol; 9 Metil-βD-xilopiranosido; 10 D-galactose; 11 D-glicose; 12 D-frutose; 13 D-manose; 14 L-sorbose; 15 L-ramanose; 16 dulcitol; 17 inositol; 18 D-manitol; 19 D-sorbitol; 20 Metil-αD-manopiranosido; 21 Metil-αD-glucopiranosido; 22 N-acetilglucosamina; 23 amigdalina; 24 arbutina; 25 esculina citrato de ferro; 26 salicina; 27 D-celobiose; 28 D-maltose; 29 D-lactose; 30 D-melibiose; 31 D-sacarose; 32 D-treose; 33 inulina; 34 D-melezitose; 35 D-rafinose; 36 amido; 37 glicogênio; 38 xilitol; 39 gentiobiose; 40 D-turanose; 41 D-lixose; 42 D-tagatose; 43 D-fucose; 44 L-fucose; 45 D-arabitol; 46 L-arabitol; 47 gluconato de potássio; 48 2-cetogluconato de potássio; 49 5-cetogluconato de potássio

Assim, a avaliação da similaridade entre os diferentes isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* quanto à utilização das diferentes fontes de carboidratos analisadas indicou que os isolados de *E. casseliflavus* são idênticos, enquanto os de *E. mundtii* apresentam dissimilaridade considerável quanto ao seu metabolismo de carboidratos.

4.3.3 Caracterização via sequenciamento de multilocus (MLS)

Dos diferentes genes investigados para caracterização via MLS de *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, quatro resultaram na produção de amplicons: glicose-6-fosfato desidrogenase (*gdh*), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*gyd*), adenilato quinase (*adk*) e D-alanine ligase (*ddl*). Após trimagem das sequências, 530 pb do *gdh*, 395 pb do *gyd*, 437 pb do *adk* e 414 pb do *ddl* para cada bactéria foram utilizados para análises de similaridade. Análises das sequências obtidas não indicou qualquer diferença nesses alelos entre os isolados de *E. casseliflavus* (IIL-CI05, IIL-Lc32, IIL-Dm01, IIL-Sp06) ou entre os isolados de *E. mundtii* (IIL-CI25, IIL-Lc16, IIL-Sp24, IIL-Luf18) (ver alinhamentos em Apêndice). Dessa forma, ao analisarmos de forma conjunta a resposta dos diferentes isolados de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* a antibióticos, seu metabolismo de carboidratos e a diversidade de alelos, foi possível verificar que os isolados de *E. casseliflavus* foram idênticos (dado não-apresentado), enquanto que os de *E. mundtii* apresentaram diferenças entre si (Tabela 7). A maior divergência encontrada foi dada pelas diferenças no metabolismo de carboidratos entre os isolados, que junto a sensibilidade a antibióticos, auxiliou na diferenciação dos isolados de *E. mundtii*, apesar de os mesmos serem geneticamente idênticos quanto as sequências dos alelos analisados.

Tabela 7 - Similaridade entre isolados de *Enterococcus mundtii* oriundos do trato digestivo de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos inseticidas chlorpyrifos ethyl (CI), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e lufenuron (Luf). A silimilaridade foi calculada com base nos resultados das análises de sensibilidade a antibióticos, metabolismo de carboidratos e MLS

Similaridade	IIL-CI25	IIL-Sp24	IIL-Lc16	IIL-Luf18
IIL-CI25	-	0,825	0,794	0,774
IIL-Sp24	-	-	0,887	0,733
IIL-Lc16	-	-	-	0,702
IIL-Luf18	-	-	-	-

4.4 Determinação da natureza da associação entre os simbiossiontes isolados de indivíduos resistentes e *Spodoptera frugiperda*

4.4.1 Associação com linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda* de laboratório

As análises de PCR-diagnóstico do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* suscetível resultaram na detecção de quatro filotipos que também ocorreram nas linhagens resistentes estudadas: *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *S. sciuri* e *P. stutzeri* (Figura 7). O sequenciamento dos amplicons obtidos, todos do tamanho esperado, apresentou identidade mínima de 99,96%.

Figura 7 - PCR-diagnóstico do trato intestinal de lagartas de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda* para verificar a associação de bactérias anteriormente isoladas do intestino de linhagens resistentes a inseticidas via cultivo em meio seletivo. Tamanho do amplicon (pb) de acordo com a tabela 2

4.4.2 Associação com populações naturais de *Spodoptera frugiperda*

As análises de PCR-diagnóstico do intestino de lagartas de *S. frugiperda* de populações naturais resultaram na detecção de cinco dos dez filotipos isolados do intestino de linhagens resistentes de *S. frugiperda* a inseticidas via cultivo em meio seletivo. Foram detectadas em populações naturais: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *Leclercia adecarboxylata* e *Pseudomonas stutzeri*.

Enterococcus mundtii e *P. stutzeri* foram detectadas em todos os indivíduos de todas as regiões avaliadas. Já *E. casseliflavus* e *L. adecarboxylata*, apesar de também serem detectadas em todas as regiões avaliadas, não foram fixadas, ou seja, nem todos os indivíduos da população apresentavam associação com estas bactérias (Figura 8). *E. casseliflavus* ocorreu com maior frequência nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo (100%), seguidos do Mato Grosso (90%), da Bahia (70%) e do Paraná (50%), sendo os estados de Minas Gerais e Goiás os com menor ocorrência (20%). Já *L. adecarboxylata* ocorreu com maior frequência nos estados do Rio Grande do Sul, de São Paulo e do Mato Grosso (100%), seguidos da Bahia (90%), do Paraná e de Minas Gerais (70%), sendo o estado de Goiás o de menor ocorrência (50%) (Figura 8). *S. sciuri* foi detectada em apenas três das regiões avaliadas, sendo mais comumente associada a lagartas de Goiás (90%) (Figura 8).

Figura 8 - Distribuição e frequência dos isolados de bactérias associadas ao intestino de lagartas de populações de *Spodoptera frugiperda* resistentes aos principais inseticidas utilizados para o controle desse inseto, nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Bahia

4.5 Determinação da capacidade de crescimento de simbiontes selecionados do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em meio de cultura contendo inseticidas como a única fonte de carbono

Os isolados de bactérias associadas ao intestino de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* resistentes foram avaliados quanto a capacidade de crescimento em meio mínimo M9 + 10 µg/mL de inseticida, para que o isolado mais ativo sobre aquele substrato pudesse ser selecionado para ensaios futuros sobre o potencial de degradação dos diferentes inseticidas avaliados.

Assim, entre as bactérias isoladas do intestino de lagartas resistentes a chlorpyrifos ethyl, o isolado IIL-C129, *L. adecarboxylata*, foi o que apresentou maior capacidade de crescimento, atingindo densidade celular de 10^9 UFC/mL após três dias de cultivo, enquanto *M. paraoxydans* necessitou de seis dias de cultivo para alcançar 10^8 UFC/mL (Figura 9A).

Pseudomonas stutzeri foi a bactéria que apresentou crescimento mais rápido e intenso quando utilizando lambda-cyhalothrin como fonte de carbono, atingindo 10^9 UFC/mL com cerca de quatro dias de cultivo (Figura 9B). Na utilização de deltamethrin como fonte de carbono, *A. nicotinovorans* foi aquela a apresentar o maior crescimento no menor espaço de tempo (10^{10} UFC/mL em cinco dias), enquanto *P. psychrotolerans* foi a mais apta a explorar spinosad (10^9 UFC/mL em cinco dias) (Figura 9C, D). Lufenuron foi a única fonte de carbono em que as diferentes bactérias isoladas apresentaram capacidade de crescimento similar, sendo que todas elas atingiram 10^8 UFC/mL. Porém, *M. arborescens* atingiu essa densidade em um período de tempo menor se comparado aos demais isolados (Figura 9E).

Apesar de algumas bactérias terem sido comumente isoladas de várias linhagens resistentes, como *E. mundtii* e *E. casseliflavus*, esses isolados não se destacaram quanto a sua capacidade em metabolizar os inseticidas estudados como única fonte de carbono. Dessa forma, foram selecionados os seguintes isolados para ensaios futuros quanto ao potencial de degradação de inseticidas: *L. adecarboxylata* para chlorpyrifos ethyl, *P. stutzeri* para lambda-cyhalothrin, *A. nicotinovorans* para deltamethrin, *P. psychrotolerans* para spinosad e *M. arborescens* para lufenuron.

Figura 9 - Crescimento, em meio mínimo M9 + 10 µg/mL de inseticida como única fonte de carbono, de isolados de bactérias associadas ao intestino de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas

4.6 Efeito da concentração dos diferentes inseticidas no crescimento de simbioses isolados do trato digestivo de lagartas resistentes a inseticidas

No geral, a maioria dos isolados selecionados responderam de forma proporcional ao aumento da concentração de inseticida no meio até 80 µg/mL, com exceção de *P. psychrotolerans*, que se mostrou sensível a concentrações de spinosad superiores a 40 µg/mL. Para todas as demais bactérias testadas, concentrações de 160 µg/mL se mostraram nocivas ao desenvolvimento das mesmas (Figura 10).

A resposta do isolado IIL-CI29, *L. adecarboxylata*, a chlorpyrifos ethyl, foi proporcional ao aumento da concentração até 80 µg/mL, mas nessa concentração a velocidade de crescimento foi reduzida. A maior concentração (160 µg/mL) demonstrou certa toxicidade, visto que o número de UFC/mL foi muito inferior àquela das demais concentrações (Figura 10A). O isolado IIL-Lc09, *P. stutzeri*, apresentou comportamento semelhante em lambda-cyhalothrin (Figura 10B). O crescimento bacteriano foi diretamente proporcional a concentração do inseticida apenas nas três primeiras concentrações (10 µg/mL = $3,6 \times 10^9$ UFC/mL; 20 µg/mL = 6×10^9 UFC/mL; 40 µg/mL = $2,6 \times 10^{10}$ UFC/mL), havendo certa redução a 80 µg/mL ($1,5 \times 10^{10}$ UFC/mL) (Figura 10B). Além disso, os valores máximos de UFC/mL nas três concentrações inferiores foram obtidos no terceiro dia de cultivo, sendo que a densidade máxima a 80 µg/mL obtida apenas no quarto dia (Figura 10B). Assim, a concentração ótima para esse isolado foi a de 40 µg/mL, sendo capaz de alcançar $2,6 \times 10^{10}$ UFC/mL no quinto dia de crescimento (Figura 10B).

O isolado IIL-Dm05, *A. nicotinovorans*, teve comportamento muito parecido em deltamethrin ao do isolado IIL-CI29 em chlorpyrifos ethyl, sendo capaz de crescer em todas as concentrações do inseticida. A única diferença na dinâmica de crescimento entre esses dois isolados, além da fonte de carbono utilizada, foi a de que o isolado de deltamethrin teve o crescimento ótimo a 80 µg/mL (Figura 10C).

O isolado IIL-Sp19, *P. psychrotolerans*, foi totalmente inibido nas concentrações de 80 e 160 µg/mL de spinosad, sendo 20 µg/mL a melhor para a multiplicação dessa bactéria (Figura 10D). Já o isolado IIL-Luf14, *M. arborescens*, respondeu bem a todas as concentrações do inseticida testadas. Seu crescimento ótimo se deu a 40 µg/mL, com pico de crescimento a uma densidade de 10^{10} UFC/mL no quarto dia (Figura 10E). A resposta desse isolado a concentrações maiores de lufenuron foi semelhante a dos demais.

Figura 10 - Crescimento dos isolados, selecionados em: A. chlorpyrifos ethyl, B. lambda-cyhalothrin, C. deltamethrin, D. spinosad e E. lufenuron, associados ao trato digestivo de lagartas de populações de *Spodoptera frugiperda* resistentes a esses inseticidas e suas respostas a diferentes concentrações do xenobiótico testado (10 - 20 - 40 - 80 - 160 µg/mL)

4.7 Determinação da degradação dos xenobióticos no processo de cultivo *in vitro*

A capacidade de degradação dos isolados selecionados em cada inseticida foi determinada utilizando GC-MS/MS para os piretróides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, e LC-MS/MS para chlorpyrifos ethyl, spinosad e lufenuron.

Os métodos propostos para análise de degradação desses xenobióticos mostraram-se eficientes na detecção dos inseticidas após o cultivo e extração dos tratamentos propostos. A eficiência média de extração desses inseticidas para a análise foi de cerca de 50%, sendo a concentração dos produtos determinada via comparação com curvas-padrão para cada inseticida (Figura 11).

Figura 11 - Curvas-padrão obtidas para lambda-cyhalothrin e deltamethrin via GC-MS/MS, utilizando concentrações de 50, 200, 350, 500 e 650 µg/mL, e para chlorpyrifos ethyl, lufenuron, spinosyn A e spinosyn D via UPLC-MS/MS utilizando as concentrações 50, 100, 150, 200 e 300 ng/mL

A maioria dos inseticidas estudados sofreu degradação natural que variou de 0 a 9%, sendo lambda-cyhalothrin o mais sensível à degradação natural nas condições desse estudo (Tabela 8). A degradação dos inseticidas testados pelas diferentes bactérias isoladas do intestino de lagartas resistentes de *S. frugiperda* variou de 27 a 77%, dependendo da molécula e microrganismo testado, mas a degradação obtida pela ação bacteriana foi sempre muito superior àquela dada pela degradação natural (Tabela 8). Chlorpyrifos ethyl foi o que sofreu menor degradação (27%) pela bactéria selecionada, *L. adecarboxylata*, enquanto spinosyn D, um dos componentes do spinosad, foi a mais sensível à degradação por *P. psychrotolerans* (77%) (Tabela 8).

Tabela 8 - Degradação total, natural e bacteriana dos inseticidas lambda-cyhalothrin, deltamethrin, chlorpyrifos ethyl, lufenuron e spinosad (spinosyn A e D) após 5 dias de cultivo dos isolados de bactérias associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas

Inseticida	Isolado utilizado	Análise de degradação ($\pm$ SE, n=3)*		
		DT %	DN %	DB %
Lambda-cyhalothrin	IIL-Lc09 – <i>P. stutzeri</i>	46,5 $\pm$ 7,2	9,3 $\pm$ 3,7 ^b	37,2 $\pm$ 3,9 ^a
Deltamethrin	IIL-Dm05 – <i>A. nicotinovorans</i>	59,6 $\pm$ 6,1	4,7 $\pm$ 4,6 ^b	54,9 $\pm$ 9,3 ^a
Chlorpyrifos ethyl	IIL-CI29 – <i>L. adecarboxylata</i>	31,0 $\pm$ 9,8	4,0 $\pm$ 1,2 ^b	27,0 $\pm$ 8,7 ^a
Lufenuron	IIL-Luf14 – <i>M. arborescens</i>	38,0 $\pm$ 16,7	0,0 $\pm$ 0,0 ^b	38,0 $\pm$ 16,7 ^a
Spinosyn A	IIL-Sp19 – <i>P. psychrotolerans</i>	48,6 $\pm$ 10,3	2,8 $\pm$ 1,4 ^b	45,8 $\pm$ 11,6 ^a
Spinosyn D		81,0 $\pm$ 7,2	3,8 $\pm$ 1,9 ^b	77,2 $\pm$ 9,2 ^a

* DT% = degradação total do inseticida após 5 dias de cultivo com a bactéria

DN% = degradação natural do inseticida após 5 dias de cultivo sem a bactéria

DB% = DT% - DN% (degradação do inseticida após 5 dias de cultivo com a bactéria descontando a degradação natural)

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo Teste t de Student (P<0,01)

4.8 Verificação de possíveis rotas de transmissão de bactérias simbiotes associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

4.8.1 Transmissão vertical: aquisição pela contaminação da superfície externa do ovo

A verificação da aquisição de simbiotes associados ao trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível mostrou que *E. mundtii*, *E. casseliflavus* e *P. stutzeri*, associados a essa linhagem (item 4.4.1), persistiram associados ao intestino de lagartas mesmo após a esterilização superficial dos ovos, sendo, no entanto, *S. sciuri* subsp. *sciuri* eliminada. Assim, esses resultados sugerem que *S. sciuri* subsp. *sciuri* seja adquirida do ambiente, via alimentação do córion no momento da eclosão, enquanto as demais bactérias analisadas estejam associadas diretamente ao vitelo/embrião.

4.8.2 Transmissão vertical: aquisição transovariana

Após a dissecação de fêmeas virgens recém-emergidas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível, os resultados de PCR-diagnóstico mostraram que *E. mundtii*, *E. casseliflavus* e *P. stutzeri* também estão presentes no aparelho reprodutor desse inseto. *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, presente no trato intestinal de lagartas dessa linhagem, não foi detectada associada aos ovários de fêmeas de *S. frugiperda*. Assim, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* e *P. stutzeri*, que pertencem à microbiota intestinal de lagartas, são transmitidos verticalmente para a prole.

4.9 Participação de bactérias simbiotes na resposta de *Spodoptera frugiperda* a lufenuron

A colonização de *M. arborescens* no intestino de lagartas neonatas da linhagem suscetível de *S. frugiperda* foi eficiente, sendo sua presença comprovada em gerações sucessivas do inseto por meio de PCR-diagnóstico.

Com a obtenção da curva resposta a diferentes concentrações de lufenuron em lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, foi observada diferença significativa na capacidade suporte entre a linhagem com o simbiote e aquela apossimbiote. Lagartas colonizadas pela bactéria foram capazes de suportar uma concentração maior do inseticida em comparação a lagartas sem este simbiote.

A análise de probit revelou que a linhagem aposimbionte obteve uma CL_{50} estimada em 2,74 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 0,947 ($\pm$ 0,130), χ^2 de 0,747, com 4 graus de liberdade. Já na linhagem com o simbiote, a CL_{50} foi igual a 25,36 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 0,560 ($\pm$ 0,135), χ^2 de 0,561, com 4 graus de liberdade. A introdução dessa bactéria na microbiota de lagartas da população suscetível alterou a capacidade suporte de lufenuron pelo inseto, com uma dose 9,23 vezes maior em relação a lagarta suscetível sem o simbiote, evidenciando assim, seu papel na metabolização de xenobióticos.

5 DISCUSSÃO

O intestino de lagartas provenientes de linhagens de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas se mostrou um nicho adequado para a seleção direcionada de microrganismos com capacidade de biodegradação, se revelando como uma alternativa à busca por esses microrganismos comumente realizada junto ao solo (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

O potencial de degradação de inseticidas já é relatado para várias das bactérias facultativas isoladas de *S. frugiperda* ou para relativos próximos. Assim, há registros do potencial de degradação de organofosforados por *Delftia acidovorans* (TEHARA; KEASLING, 2003), *Microbacterium* (CABRERA et al., 2010) e *Pseudomonas* (SIDDARAMAPPA; RAJARAM; SETHUNATHAN, 1973), mas são escassos relatos de bactérias com potencial de degradação do organofosforado chlorpyrifos ethyl (SINGH et al., 2004). Os relatos existentes indicam *Arthrobacter* sp. (MALLICK et al., 1999), *Enterobacter asburiae* (SINGH et al., 2004) e *Pseudomonas stutzeri* (SASIKALA et al., 2012) como microrganismos capazes de degradar esse composto. Assim, vários dos isolados produzidos a partir do isolamento seletivo de bactérias com potencial de degradação de chlorpyrifos ethyl já são conhecidos da literatura, mas não existem registros que indiquem o potencial de degradação de chlorpyrifos ethyl por *Leclercia adecarboxylata*.

O mesmo ocorre para os piretróides, onde *Arthrobacter nicotinovorans*, isolada exclusivamente em deltamethrin, e *Pseudomonas stutzeri*, isolada exclusivamente em lambda-cyhalothrin, não são relatadas como sendo capazes de degradar estes inseticidas, apesar do reconhecido potencial dessas bactérias em programas de biorremediação (AISLABIE et al., 2005; SAIKIA et al., 2005).

A degradação de spinosad e lufenuron no solo é relatada como sendo dada, principalmente, pela ação microbiana (HALE; PORTWOOD, 1996; PESARO, 2004). Mas ainda não existem relatos de bactérias com o potencial de degradação desses compostos. Esses fatos colaboram com a expectativa de que o intestino de linhagens resistentes de insetos poderia oferecer um nicho diferenciado para a seleção de bactérias com potencial de degradação de inseticidas, visto o isolamento de três filotipos de bactérias do intestino de linhagens de *S. frugiperda* resistentes com capacidade de degradação desses inseticidas.

A ocorrência de espécies de bactérias distintas em associação às linhagens resistentes de *S. frugiperda*, todas com capacidade de degradação de inseticidas, indica que a comunidade de bactérias do intestino dessas linhagens analisadas sofre alterações em resposta aos produtos xenobióticos, os quais podem exercer seleção, sugerindo que populações do

inseto expostas a diferentes fontes de seleção possam contribuir com microbiota distinta, principalmente no que se refere à biodegradação de xenobióticos. O efeito de fatores ligados à alimentação na composição da microbiota intestinal tem sido alvo intenso de investigação, principalmente no Homem, sendo nítida a alteração da comunidade em resposta ao tipo de alimento consumido, bem como a outros fatores (LI et al., 2008; CHO; BLASER, 2012), assim como também demonstrado para insetos (HAYASHI et al., 2007; INDIRAGANDHI et al., 2007).

O efeito de inseticidas como fator de seleção da microbiota intestinal de insetos ficou evidente pela detecção de bactérias obrigatoriamente associadas a *S. frugiperda*, *E. mundtii* e *P. stutzeri*, já que essas bactérias associadas à linhagem suscetível de *S. frugiperda* foram incapazes de apresentar capacidade de crescimento em meios contendo os inseticidas testados como única fonte de carbono. Bactérias que sofrem pressão de seleção direcionada no ambiente são desejadas porque sua maquinaria genética é selecionada pela capacidade em converter inseticidas tóxicos em compostos simples, atóxicos (ROCKNE; REDDY, 2003).

Da microbiota selecionada do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes, *Enterococcus* foi o gênero mais abundante e recorrente nos diferentes grupos de inseticidas testados. *Enterococcus* spp. são amplamente distribuídos na natureza, estando associados a habitats diversificados, como a água, o solo, as plantas e o trato gastrointestinal de vertebrados e invertebrados (PALMER et al., 2010). *Enterococcus* são relatados em mais de 37 taxa de insetos, distribuídos nas mais diversas ordens (MARTIN; MUNDT, 1972).

As espécies de *Enterococcus* mais frequentemente encontradas em insetos são *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. casseliflavus*, com ocorrência de até 50% em mais de 37 taxa de insetos analisados (MARTIN; MUNDT, 1972; INGLIS; LAWRENCE; DAVIS, 2000; DILLON; CHARNLEY, 2002; PRIYA et al., 2012). Apesar de menos frequente, *Enterococcus mundtii* também foi isolado do trato intestinal de lagartas de outros lepidópteros (VISÔTTO et al., 2009; CAPPELLOZZA et al., 2011). Mas o mecanismo de aquisição foi abordado apenas para a associação patogênica de *E. mundtii* a *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), onde a transmissão desse microrganismo via transovariana foi descartada, já que a sua eliminação era conseguida com sucesso após a esterilização superficial de ovos do inseto hospedeiro (CAPPELLOZZA et al., 2011).

De qualquer forma, um resultado inesperado interessante foi a verificação da associação obrigatória de *S. frugiperda* a um dos filotipos de *Enterococcus* identificados, *E. mundtii*, associado a 100% dos indivíduos de populações naturais de *S. frugiperda* de diversas regiões do país. Outro filotipo, *P. stutzeri*, assim como *E. mundtii*, também se mostrou

obrigatoriamente associado a *S. frugiperda*. A associação obrigatória dessas bactérias a *S. frugiperda* é corroborada pela verificação de que a aquisição das mesmas pelas lagartas ocorre via transmissão transovariana, assim como demonstrado, já que a aquisição via alimentação da superfície contaminada do córion do ovo foi descartada. No caso particular de *E. mundtii*, essas observações contrastam com aquelas relatadas para a linhagem patogênica associada a *B. mori*, assim como discutido anteriormente (CAPPELLOZZA et al., 2011).

Relatos de transmissão transovariana de simbioses em insetos são comuns, mas normalmente ocorre com simbioses intracelulares (DOUGLAS, 1998; PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006; KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2008). Simbioses associados ao trato digestivo de insetos são normalmente transmitidos à geração filial via contaminação da superfície do ovo (BUCHER, 1963, FUKATSU; HOSOKAWA, 2002; PRADO; ALMEIDA, 2009), alimentação de pellets fecais maternos (FUKATSU; HOSOKAWA, 2002) ou pela aquisição direta do ambiente (KIKUCHI et al., 2012). Apesar da transmissão transovariana de simbioses associados ao lúmen intestinal de insetos não ser comum, há pelo menos o registro da associação de *Enterococcus* com tecidos reprodutivos (testículos e ovários) de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Heliothis subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae) (MILLER; MILLER, 1996).

Apesar da associação obrigatória de *E. mundtii* e *P. stutzeri* a *S. frugiperda*, não há nesse momento qualquer indicação que permita estabelecer o tipo de interação estabelecida entre essas bactérias e o seu inseto hospedeiro. Porém, muitos dos relatos existentes envolvendo a associação *Pseudomonas* e insetos se referem a algumas espécies entomopatogênicas desse gênero, como *P. aeruginosa* e *P. entomophila*, que despertam o interesse pelo seu potencial como fonte alternativa para o controle de insetos-praga (JAROSZ, 1997, SCHNEIDER; DORN, 2001, VODOVAR et al., 2005). Mas há também, de forma contraditória, relatos demonstrando a associação benéfica de bactérias desse gênero a insetos, como a associação obrigatória de *P. melophthora* a *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae), que além de contribuir com o inseto hospedeiro com a síntese de aminoácidos essenciais (MIYAZAKI; BOUSH; BAERWALD, 1968), também o auxilia na degradação de diversos inseticidas (BOUSH; MATSUMARA, 1967). No caso específico de *P. stutzeri*, não foi encontrado nenhum relato de associação específica a insetos, mas há relatos de sua associação e ação probiótica a outros grupos de artrópodes, como às larvas do crustáceo *Artemia* (MAHDHI et al., 2010).

As relações estabelecidas entre *Enterococcus* e insetos são bastante diversificadas, sendo que algumas espécies de reconhecida patogenicidade podem até ser exploradas como

fontes de moléculas com atividade inseticida (PARK et al., 2007, SEVIM; DEMIRBAG; DEMIR, 2010; CAPPELLOZZA et al., 2011), enquanto outras são comensais (ROH et al., 2008; MASON et al., 2011). A relação de comensalismo pode estar associada à manutenção da resposta imunológica inata do inseto (ROH et al., 2008), e pode ser modificada de comensal a patogênica dependendo da localização da bactéria no interior do inseto, se no lúmen intestinal ou na hemocele (MASON et al., 2011).

A associação comum de *Enterococcus* a diversos insetos levou à proposta de utilização da associação *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) - *Enterococcus faecalis* como modelo para estudos de patogenicidade dessa bactéria aplicados ao homem (COX; GILMORE, 2007). No entanto, não tivemos sucesso na localização de informações que indicassem o potencial de *E. mundtii* e *E. casseliflavus* em degradar xenobióticos (inseticidas), ou na contribuição dos mesmos ao inseto hospedeiro. Há indicações, porém, que *Enterococcus* são os microrganismos mais ativos metabolicamente no intestino de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), indicando o potencial de contribuição desse simbiote ao seu hospedeiro (BRINKMANN; MARTENS; TEBBE, 2008).

Mas ao contrário de *Enterococcus mundtii* e *Pseudomonas stutzeri*, todas as outras bactérias com potencial de degradação dos inseticidas testados e que foram isoladas de linhagens resistentes de *S. frugiperda* estão facultativamente associadas a esse hospedeiro. A associação facultativa de microrganismos que contribuem com a degradação de inseticidas por insetos não é inédita, assim como demonstrado pela associação de *Burkholderia* ao percevejo *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) (KIKUCHI et al., 2012). Ainda, o efeito que fatores bióticos e abióticos podem exercer na composição da comunidade de microrganismos que habitam o lúmen intestinal (BENSON et al., 2010; SPOR; KOREN; LEY, 2011; AHARON et al., 2013) e a possibilidade de que a estrutura dessa comunidade seja direcionada por fatores de seleção externos (HAYASHI et al., 2007), explicariam as diversas associações facultativas específicas identificadas para as diferentes linhagens resistentes de *S. frugiperda* e os microrganismos delas isolados com o potencial de degradação de inseticidas.

O papel dos simbiossiontes de insetos na metabolização de compostos xenobióticos é um assunto ainda pouco estudado pela comunidade científica. Bactérias simbiossiontes podem desempenhar um importante papel na ecologia nutricional dos insetos (DOUGLAS, 2009), porém várias outras características ecologicamente relevantes mediadas por simbiossiontes estão sendo investigadas, incluindo a defesa contra patógenos e parasitos (HAINE, 2008; JAENIKE et al., 2010), adaptação ao meio ambiente (WERNEGREEN, 2012), influência sobre as

interações inseto-planta (IBANEZ; GALLET; DESPRÉS, 2012) e impacto na dinâmica populacional (MORAN; MCCUTCHEON; NAKABACHI, 2008). Assim, a presença de bactérias simbiotes que influenciam a capacidade de um inseto em tolerar agentes estressores naturais e artificiais, tais como inseticidas, tem despertado a atenção quanto à possibilidade de participação dos simbiotes na resistência de insetos a inseticidas (GHANIM; KONTSEDALOV, 2009; KONTSEDALOV et al., 2009; KIKUCHI et al., 2012; SU; ZHOU; ZHANG, 2013). Esses relatos sustentam os resultados aqui apresentados da contribuição dada pela bactéria simbiote *M. arborescens* quando inoculada no intestino de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda*, as quais apresentaram CL_{50} cerca de 10 vezes superiores àquela apresentada por lagartas aposimbiontes de isolinhagem irmã ao inseticida lufenuron. A capacidade demonstrada de degradação de lufenuron por essa bactéria em ensaios *in vitro* é um forte indicativo de que essa bactéria contribua ativamente na degradação do produto ingerido pela lagarta via secreção de enzimas de degradação, apesar de que o mecanismo de degradação envolvido necessite de investigação detalhada para a sua completa caracterização.

6 CONCLUSÕES

- O intestino de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas é um nicho promissor para a seleção direcionada de bactérias com potencial de degradação de inseticidas;
- O simbiote *M. arborescens* reduz a sensibilidade de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda* a lufenuron;
- O intestino de lagartas da linhagem de *S. frugiperda* suscetível não apresenta microbiota associada com capacidade de crescimento nos diferentes inseticidas testados;
- O intestino de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl foi o que apresentou o maior número de bactérias com capacidade de biodegração;
- *E. mundtii* e *E. casseliflavus* são as únicas bactérias associadas ao intestino de mais de uma linhagem resistente de *S. frugiperda*;
- Os isolados de *E. casseliflavus* obtidos das diferentes linhagens de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas são idênticos, enquanto que os de *E. mundtii* diferem entre si;
- Os isolados *L. adecarboxylata*, *P. stutzeri*, *A. nicotinovorans*, *P. pschychrotolerans* e *M. arborescens* são os que melhor utilizam os inseticidas com os quais foram selecionados como fonte de alimento;
- A capacidade de crescimento dos simbioses isolados é dose-dependente;
- *E. mundtii* e *P. stutzeri* estão obrigatoriamente associados a populações naturais de *S. frugiperda* distribuídas em sete regiões do Brasil;
- *E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *P. stutzeri* são adquiridos por *S. frugiperda* via transmissão transovariana, enquanto os demais podem ser adquiridos via alimentação do córion ou diretamente do ambiente.

REFERÊNCIA

- AHARON, Y.; PASTERNAK, Z.; YOSEF, M.B.; BEHAR, A.; LAUZON, C.; YUVAL, B.; JURKEVITCH, E. Phylogenetic, metabolic, and taxonomic diversities shape Mediterranean fruit fly microbiotas during ontogeny. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 1, p. 303-313, 2013.
- AHMAD, I.; KHAN, M.S.A.; AQIL, F.; SINGH, M. Microbial applications in agriculture and the environment: A broad perspective. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. **Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications**. New York: Springer, 2011. p. 1-28.
- AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial-degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 33, n. 6, p. 925-942, 1995.
- AISLABIE, J.; BEJ, A.K.; RYBURN, J.; LLOYD, N.; WILKINS, A. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 279-286, 2005.
- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, Madrid, v. 24, n. 6, p. 281-287, 2006.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Santiago, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BAUMANN, P.; MORAN, N.A.; BAUMANN, L. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. In: DWORKIN, M. **The Prokaryotes**, New York: Springer, 2006, v. 1, p. 403-438.
- BEARD, C.B.; DOTSON, E.M.; PENNINGTON, P.M.; EICHLER, S.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R.V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, London, v. 31, n. 5, p. 621-627, 2001.
- BENSON, A.K.; KELLY, S.A.; LEGGE, R.; MA, F.; LOW, S.J.; KIM, J.; ZHANG, M.; OH, P.L.; NEHRENBURG, D.; HUA, K.; KACHMAN, S.D.; MORIYAMA, E.N.; WALTER, J.; PETERSON, D.A.; POMP, D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, n. 44, p. 18933-18938, 2010.
- BERENBAUM, M.C. Isobolographic, algebraic, and search methods in the analysis of multiagent synergy. **International Journal of Toxicology**, Thousand Oaks, v. 7, n. 7, p. 927-938, 1988.

- BOUSH, G.M.; MATSUMARA, F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 60, n.4, p. 918-920, 1967.
- BRATTSTEN, LB. Potential role of plant allelochemicals in the development of insecticide resistance. In: BARBOSA, P.; LETOURNEAU, D.K. **Novel Aspects of Insect – Plant Interactions**, New York: John Wiley, 1988. p. 313-348.
- BRINKMANN, N.; MARTENS, R.; TEBBE, C. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 74, n. 23, p. 7189-7196, 2008.
- BROWNLIE, J.C.; JOHNSON, K.N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. **Trends in microbiology**, London, v. 17, n. 8, p. 348-354, 2009.
- BUCHER, G.E. Survival of populations of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder in the gut of *Galleria mellonella* (Linnaeus) during metamorphosis, and transmission of the bacteria to the filial generation of the host. **Journal Insect Pathology**, New York, v. 5, p. 336-343, 1963.
- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of Animals With Plant Microorganisms.** , New York: Interscience 1965. 909p.
- CABRERA, J.A.; KURTZ, A.; SIKORA, R.A.; SCHOUTEN, A. Isolation and characterization of fenamiphos degrading bacteria. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, n. 6, p. 1017-1027, 2010.
- CAPPELLOZZA, S.; SAVIANE, A.; TETTAMANTI, G.; SQUADRIN, M.; VENDRAMIN, E.; PAOLUCCI, P.; FRANZETTI, E.; SQUARTINI, A. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 106, n. 3, p. 386-393, 2011.
- CARDOZA, Y.J.; HOFSTETTER, R.W.; VEGA, F.E. Insect-Associated microorganisms and their possible role in outbreaks. In: BARBOSA, P.; LETOURNEAU, D.K.; AGRAWAL, A.A. **Insect Outbreaks Revisited**. West Success: Wiley-Blackwell Publishing, 2012. p. 155-174.
- CHAVES, S.; NETO, M.; TENREIRO, R. Insect symbiont systems: From complex relationships to biotechnological applications. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 4, n. 12, p. 1753-1765, 2009.
- CHO, I.; BLASER, M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, Salt Lake City, v. 13, n. 4, p. 260-270, 2012.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R.M.; BISWAS, S.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J.G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

COOK, R.J. Advances in plant health management in the Twentieth century. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 95-116, 2000.

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

CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Documentos 21, 15p.

DARBY, A.C. Symbiosis research as a novel strategy for insect pest control. In: ISHAAYA, I.; HOROWITZ, A.R. **Biorational Control of Arthropod Pests**. New York: Springer, 2009. p. 207-231.

DAUGHTON, C.G.; HSIEH, D.P. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 2, p. 175-184, 1977.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DILLON, R.; CHARNLEY, K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 153, n. 8, p. 503-509, 2002.

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

DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.43, n. 1, p. 17-37, 1998.

DOUGLAS, A.E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 38-47, 2009.

DOUGLAS, A.E. Lessons from studying insect symbioses. **Cell host & Microbe**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 359-367, 2011.

DOWD, P.F. In situ production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic teasts in the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, n. 2, p. 396-400, 1989.

DOWD, P.F. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: BARBOSA P.; KRISCHIK, V.A.; JONES, C.G. **Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions**, New York: John Wiley, 1991. p. 411-440.

DOWD, P.F.; SHEN, S.K. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne* F.). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Chichester, v. 56, n. 3, p. 241-248, 1990.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied microbiology and biotechnology**, Heidelberg, v. 59, n. 2, p. 143-152, 2002.

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

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

FERRARI, J.; DARBY, A.C.; DANIELL, T.J.; GODFRAY, H.C.J.; DOUGLAS, A.E. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. **Ecological Entomology**, Malden, v. 29, n. 1, p. 60-65, 2004.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FUENTES, M.S.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A.; AMOROSO, M.J. Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: Bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 64, n. 6, p. 434-441, 2010.

FUKATSU, T.; HOSOKAWA, T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 389-396, 2002.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação. **Biotechnologia e Meio Ambiente**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 95-118.

GHANIM, M.; KONTSEDALOV, S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. **Pest Management Science**, Chichester, v. 65, n. 9, p. 939-942, 2009.

GILBERT, S.F.; SAPP, J.; TAUBER, A.I. A symbiotic view of life: we have never been individuals. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 87, n. 4, p. 325-341, 2012.

GIOLO, F.P.; GRUTZMCHER, A.D.; GARCIA, M.S.; BUSATO, G.R. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 219-224. 2012.

GRANT, R.J.; DANIELL, T.J.; BETTS, W.B. Isolation and identification of synthetic pyrethroid degrading bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 92, n. 3, p. 534-540, 2002.

HAINE, E.R. Symbiont-mediated protection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 275, n. 1633, p. 353-361, 2008.

HALE, K.A.; PORTWOOD, D.E. The aerobic soil degradation of spinosad - a novel natural insect control agent. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, Philadelphia, v. 31, n. 3, p. 477-484, 1996.

HANSEN, A.K.; JEONG, G.; PAINE, T.D.; STOUTHAMER, R. Frequency of Secondary Symbiont Infection in an Invasive Psyllid Relates to Parasitism Pressure on a Geographic Scale in California. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 23, p. 7531-7535, 2007.

HARRIS H.L.; BRENNAN, L.J.; KEDDIE, B.A.; BRAIG, H.R. Bacterial symbionts in insect: balancing life and death. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 37-53, 2010.

HAYASHI, A.; AOYAGI, H.; KINJYO, K.; YOSHIMURA, T.; TANAKA, H. Development of an efficient method for screening microorganisms by using symbiotic association between *Nasutitermes takasagoensis* and intestinal microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 75, n. 6, p. 1437-1446, 2007.

HOFFMANN, A.A.; MONTGOMERY, B.L.; POPOVICI, J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JOHNSON, P.H.; MUZZI, F.; GREENFIELD, M.; DURKAN, M.; LEONG, Y.S.; DONG, Y.H.; COOK, H.; AXFORD, J.; CALLAHAN, A.G.; KENNY, N.; OMODEI, C.; MCGRAW, E.A.; RYAN, P.A.; RITCHIE, S.A.; TURELLI, M.; O'NEILL, S.L. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, London, v. 476, n. 7361, p. 454-457, 2011.

HONGO, Y.; SATO, T.; NODA, S.; UI, S.; KUDO, T.; OHKUMA, M. Candidatus *Symbiothrix dinenymphae*: bristle-like Bacteroidales ectosymbionts of termite gut protists. **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 9, n. 10, p. 2631-2635, 2007.

IBANEZ, S.; GALLET, C.; DESPRÉS, L. Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. **Toxins**, Sheffield, v. 4, n. 4, p. 228-243, 2012.

INDIRAGANDHI, P.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN M.; POONGUZHALI, S.; KIM, G.H.; SARAVANAN, V.S.; SA, T. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 103, n. 6, p. 2664-2675, 2007.

INGLIS, G.D.; LAWRENCE, A.M.; DAVIS, F.M. Pathogens associated with Southwestern corn borers and Southern corn stalk borers (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1619-1626, 2000.

ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: An Introduction. In: BOURTZIS, K.; MILLER, A. **Insect symbiosis**. Florida: CRC Press, 2003. 368 p.

- JAENIKE, J.; UNCKLESS, R.; COCKBURN, S.N.; BOELIO, L.M.; PERLMAN, S. J. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. **Science**, Washington, v. 329, n. 5988, p. 212-215, 2010.
- JANSON, E.M.; STIREMAN, J.O.; SPRINGER, M.S.; ABBOT, P. Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. **Evolution**, Oxford, v. 62, n. 5, p. 997-1012, 2008.
- JANSSEN, D.B.; DINKIA, I.J.T.; POELAREND, G.J.; TERPSTRA, P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. **Environmental microbiology**, Chichester, v. 7, n. 12, p. 1868-1882, 2005.
- JAROSZ, J. Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects. **Cytobios**, Cambridge, v. 89, n. 357, p. 73-80, 1997.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, R.E. **Mammalian Protein Metabolism**, New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.
- KERGOAT, G.C.; PROWELL, D.P.; LE RUC, B.P.; MITCHELL, A.; DUMASA, P.; CLAMENSA, A.; CONDAMINE, F.L.; SILVAING, J. Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: A case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 65, n. 3, p. 855-870, 2012.
- KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Insect-Microbe Mutualism without Vertical Transmission: a Stinkbug Acquires a Beneficial Gut Symbiont from the Environment Every Generation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 13, p. 4308-4316, 2007.
- KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. In: VAN DIJK, T. **Microbial Ecology Research Trends**. New York: Nova Science Publisher, 2008. p. 39-63.
- KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K.; FUKATSU, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 22, p. 8618-8622, 2012.
- KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 716-721, 2012.
- KOHLWEYER, U.; THIEMER, B.; SCHRADER, T.; ANDRESEN, J.R. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. **FEMS microbiology letters**, Chichester, v. 186, n. 2, p. 301-306, 2006.
- KONTSEDALOV, S.; GOTTLIEB, Y.; ISHAAYA, I.; NAUEN, R.; HOROWITZ, R.; GHANIM, M. Toxicity of spiromesifen to the developmental stages of *Bemisia tabaci* biotype B. **Pest Management Science**, Chichester, v. 65, n. 1, p. 5-13, 2009.

LEORA SOFTWARE, **POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley, 1987. 20p.

LI, M.; WANG, B.; ZHANG, M.; RANTALAINEN, M.; WANG, S.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; SHEN, J.; PANG, X.; ZHANG, M.; WEI, H.; CHEN, Y.; LU, H.; ZUO, J.; SU, M.; QIU, Y.; JIA, W.; XIAO, C.; SMITH, L.M.; YANG, S.; HOLMES, E.; TANG, H.; ZHAO, G.; NICHOLSON, J.K.; LI, L.; ZHAO, L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, n.6, 2117-2122, 2008.

LOGIN, F.H.; HEDDI, A. Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. **Journal of Insect Physiology**, Doetinchem, v. 59, n. 2, p. 232-239, 2012.

MACDONALD, S.J.; THOMAS, G.H.; DOUGLAS, A.E. Genetic and metabolic determinants of nutritional phenotype in an insect-bacterial symbiosis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 2073-2084, 2011.

MAHDHI, A.; KAMEL, C.; FATHI, K.; AMINA, B. Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 107-115, 2010.

MALLICK, K.; BHARATI, K.; BANERJI, A.; SHAKIL, N.A.; SETHUNATHAN, N. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 62, n. 1, p. 48-54, 1999.

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

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 10, p. 1167-1182, 2006.

MASON, K.L.; STEPIEN, T.A.; BLUM, J.E.; HOLT, J.F.; LABBE, N.H.; RUSH, J.S.; RAFFA, K.F.; HANDELSMAN, J. From commensal to pathogen: translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta*. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 2, n. 3, p. 1-7, 2011.

MCMENIMAN, C.J.; LANE, R.V.; CASS, B.N.; FONG, A.W.; SIDHU, M.; WANG, W.F.; O'NEILL, S.L. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, Washington, v. 323, n. 5910, p. 141-144, 2009.

MILLER, S.G.; MILLER, R.D. Infectious *Enterococcus* from *Heliothis virescens* x *H. subflexa* backcross hybrids (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 89, n. 3, p. 420-427, 1996.

MILLER, T.A.; LAMPE, D.J.; LANZON, C.R. Transgenic and paratransgenic insects in crop protection. In: ISHAAYA, I.; HOROWITZ, T.; NAUEN, R. **Insecticides design using advanced technologies**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 87-103.

MIYAZAKI, S.; BOUSH, G.M.; BAERWALD, R.J. Amino acid synthesis by *Pseudomonas melophthora*, bacterial symbiote of *Rhagoletis pomonella* (Diptera). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 513-518, 1968.

MORAN, N.A.; MCCUTCHEON, J.P.; NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 165-190, 2008.

NODA, S.; INOUE, T.; HONGO, Y.; KAWAI, M.; NALEPA, C.A.; VONGKALUANG, C.; KUDO, T.; OHKUMA, M. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in Bacteroidales attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood feeding cockroach. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 8, n. 1, p. 11-20, 2005.

OLIVER, K.M.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12795-12800, 2005.

ÖNNEBY, K.; JONSSON, A.; STENSTRÖM, J. A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide-degrading microorganisms. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2010.

PALMER, K.L.; CARNIOL, K.; MANSON, J.M.; HEIMAN, D.; SHEA, T.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; GEVERS, D.; FELDGARDEN, M.; BIRREN, B. High quality draft genome sequences of 28 *Enterococcus* sp. isolates. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, n. 9, p. 2469-2470, 2010.

PARALES, R.E.; BRUCE, N.C.; SCHMID, A.; WACKETT, L.P. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4699-4709, 2002.

PARK, S.Y.; KIM, K.M.; LEE, J.H.; SEO, S.J.; LEE, I.H. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1861-1869, 2007.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudo com patógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1986. p. 348-373.

PESARO, M.; NICOLLIER, G.; ZEYER, J.; WIDMER, F. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2577-2587, 2004.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 21, n. 4, p. 519-538, 2004.

PRADO, S.S.; ALMEIDA, R.P. Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Chichester, v. 132, n.1, p. 21-29, 2009.

PRADO, S.S.; RUBINOFF, D.; ALMEIDA, R.P. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 99, n. 3, p. 577-585, 2006.

PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, p. 41-65, 1980.

PRIEST, F.G.; DEWAR, S.J. Bacteria and insects. In: PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M. **Applied Microbial Systematics**. Dordrecht: Kluwer academic publisher, 2000. p. 165-202.

PRIYA, N.G.; OJHA A, KAJLA, M.K.; RAJ, A.; RAJAGOPAL, R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. **Public Library of Science**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2012.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, n. 1, p. 537-547, 2002.

ROCKNE, K.J.; REDDY, K.R. Bioremediation of contaminated sites. In: _____ **Invited Theme Paper, International e-Conference on Modern Trends in Foundation Engineering: Geotechnical Challenges and Solutions**. Madras: Indian Institute of Technology, 2003. p. 1-22.

ROE, R.M.; HODGSON, E.; ROSE, R.L.; THOMPSON, D.M.; DEVORSHAK, C.; ANSPAUGH, D.D.; LINDERMAN, R.J.; HARRIS, S.V.; TOMALSKI, M.D. Basic principles and rationale for the use of insect genes in bioremediation: Esterase, phosphotriesterase, cytochrome P 450 and epoxide hydrolase. **Reviews in Toxicology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 169-178, 1998.

ROH, S.W.; NAM, Y.D.; CHANG, H.W.; KIM, K.H.; KIM, M.S.; RYU, J.H.; KIM S.H.; LEE, W.J.; BAE, J.W. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 20, p. 6171-6177, 2008.

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

RUSSELL, R.J.; SCOTT, C.; JACKSON, C.J.; PANDEY, R.; PANDEY, G.; TAYLOR, M.C.; COPPIN, C.W. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolising bacteria versus insecticide resistant insects. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 4, n. 2, p. 225-248, 2011.

SAADEDIN, A.; RESEARCH, A.; SEVILLE, A. The complexities of hydrolytic enzymes from the termite digestive system. **Critical Reviews in Biotechnology**, New York, n. 0, p. 1-8, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.

SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. The Diversity of Insect-bacteria Interactions and its Applications for Disease Control. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Oxfordshire, v. 25, n. 1, p. 203-243, 2008.

SAIKIA, N.; DAS, S.K.; PATEL, B.K.; NIWAS, R.; SINGH, A.; GOPAL, M. Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1. **Biodegradation**, London, v. 16, n. 6, p. 581-589, 2005.

SARMENTO, R.A.; AGUIAR, R.W.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G.; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SASIKALA, C.; JI WAL, S.; ROUT, P.; RAMYA, M. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 3, p. 1301-1308, 2012.

SAUER, S.; LEITE, S.P. Agrarian structure, foreign investment in land, and land prices in Brazil. **Journal of Peasant Studies**, Abingdon, v. 39, n. 3, p. 873-898, 2012.

SCARBOROUGH, C.L.; FERRARI, J.; GODFRAY, H.C.J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. **Science**, Washington, v. 310, n. 5755, p. 1781-1781, 2005.

SCHNEIDER, M.; DORN, A. Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 78, n. 3, p. 135-140, 2001.

SCOTT, C.; PANDEY, G.; HARTLEY, C.J.; JACKSON, C.J.; CHEESMAN, M.J.; TAYLOR, M.C.; PANDEY, R.; KHURANA, J.L.; TEESE, M.; COPPIN, C.W.; WEIR, K.M.; JAIN, R.K.; LAL, R.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 48, n. 1, p. 65-79, 2008.

SEVIM, A.; DEMIRBAG, Z.; DEMIR, I. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Rize, v. 34, p. 333-342, 2010.

SIDDARAMAPPA, R.; RAJARAM, K.P.; SETHUNATHAN, N. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 6, p. 846-849, 1973.

SINGH, B.K.; WALKER, A.; MORGAN, J.A.W.; WRIGHT, D.J. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4855-4863, 2004.

SPOR, A.; KOREN, O.; LEY, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 279-290, 2011.

STARK, J.D.; BANKS, J.E. "Selective" pesticides: are they less hazardous to the environment. **BioScience**, Berkeley, v. 51, n. 11, p. 980-982, 2001.

SU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Symbiont-mediated functions in insect hosts. **Communicative & Integrative Biology**, Austin, v. 6, n. 3, p. e238041-e238047, 2013.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 13, n. 3, p. 510-524, 1996.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TEHARA, S.K.; KEASLING, J.D. Gene cloning, purification, and characterization of a phosphodiesterase from *Delftia acidovorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 504-508, 2003.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. **Biotecnologia**, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

VILANOVA, C.; MARCO, G.; DOMINGUEZ-ESCRIBA, L.; GENOVÊS, S.; SANTANDREU, V.; BATALLER, E.; RAMÓN, D.; PORCAR, M. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 45, p. 288-294, 2012.

VIRÁG, D.; NAÁR, Z.; KISS, A. Microbial toxicity of pesticide derivatives produced with UV-photodegradation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 79, n. 3, p. 356-359, 2007.

VISÔTTO, L.E.; OLIVIERA, M.G.A.; RIBON, A.O.B.; MARES-GUIA, T.R.; GUEDES, R.N.C. Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n. 4, p. 1078-1085, 2009.

VODOVAR, N.; VINALS, M.; LIEHL, P.; BASSET, A.; DEGROUARD, J.; SPELLMAN, P.; BROCCARD, F.; LEMAITRE, B. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, n. 32, p. 11414-11419, 2005.

VON DOHLEN, C.D.; KOHLER, S.; ALSOP, S.T.; MCMANUS, W.R. Mealybug b-proteobacterial endosymbionts contain g-proteobacterial symbionts. **Nature**, London, v. 412, n. 6845, p. 433-436, 2001.

VORBURGER C.; GEHRER, L.; RODRIGUEZ, P. A strain of the bacterial *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. **Biology letters**, London, v. 6, n. 1, p. 109-111, 2010.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WERNEGREEN, J.J. Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 255-262, 2012.

WHITE, J.F.J.; TORRES, M.S. Introduction: Symbiosis, defensive mutualism, and variations on the theme. In:_____. **Defensive Mutualism Microbial Symbiosis**. Florida: CRC Press, 2009. v. 3, cap. 1, p. 3-9.

YOUNG, J.R.; MCMILLIAN, W.W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl treated surfaces. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, n. 2, p. 202-203, 1979.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 77, n. 1, p. 1-11, 2003.

ZHANG, C.; BENNETT, G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 67, n. 5, p. 600-618, 2005.

ZOOK, D. Prioritizing symbiosis to sustain biodiversity: are symbionts keystone species?. **Symbiosis**, Plymouth, v. 4, p. 3-12, 2004.

ZUCCHI, T.D.; ALMEIDA, L.G.; DOSSI, F.C.A.; CÔNSOLI, F.L. Secondary metabolites produced by *Propionicimonas* sp. (ENT-18) induce histological abnormalities in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p. 811-819, 2010.

APÊNDICES

gdh_IIL-Cl25	CCACCAGTTGCCTTTTCCGAAAAAGAAATCCGATCAGAAAAAATCAAAGCGTTAAAAGCT
gdh_IIL-Lc16	CCACCAGTTGCCTTTTCCGAAAAAGAAATCCGATCAGAAAAAATCAAAGCGTTAAAAGCT
gdh_IIL-Luf18	CCACCAGTTGCCTTTTCCGAAAAAGAAATCCGATCAGAAAAAATCAAAGCGTTAAAAGCT
gdh_IIL-Sp24	CCACCAGTTGCCTTTTCCGAAAAAGAAATCCGATCAGAAAAAATCAAAGCGTTAAAAGCT

gdh_IIL-Cl25	ATTCGTATTTATGAAAAAAAAGAAGTCTTAGAAAATTTTGTACGTGGGCAATATGCTGCA
gdh_IIL-Lc16	ATTCGTATTTATGAAAAAAAAGAAGTCTTAGAAAATTTTGTACGTGGGCAATATGCTGCA
gdh_IIL-Luf18	ATTCGTATTTATGAAAAAAAAGAAGTCTTAGAAAATTTTGTACGTGGGCAATATGCTGCA
gdh_IIL-Sp24	ATTCGTATTTATGAAAAAAAAGAAGTCTTAGAAAATTTTGTACGTGGGCAATATGCTGCA

gdh_IIL-Cl25	GGTCAATTAGATGATCAGACATTCAAAGGCTATCGTGAAGAAGACAACGTTGATCCAGAA
gdh_IIL-Lc16	GGTCAATTAGATGATCAGACATTCAAAGGCTATCGTGAAGAAGACAACGTTGATCCAGAA
gdh_IIL-Luf18	GGTCAATTAGATGATCAGACATTCAAAGGCTATCGTGAAGAAGACAACGTTGATCCAGAA
gdh_IIL-Sp24	GGTCAATTAGATGATCAGACATTCAAAGGCTATCGTGAAGAAGACAACGTTGATCCAGAA

gdh_IIL-Cl25	TCAACAACCTGAAACATTTGTTGCTGGAAAATTCACGATCGATAACTTCCGTTGGTCTGGC
gdh_IIL-Lc16	TCAACAACCTGAAACATTTGTTGCTGGAAAATTCACGATCGATAACTTCCGTTGGTCTGGC
gdh_IIL-Luf18	TCAACAACCTGAAACATTTGTTGCTGGAAAATTCACGATCGATAACTTCCGTTGGTCTGGC
gdh_IIL-Sp24	TCAACAACCTGAAACATTTGTTGCTGGAAAATTCACGATCGATAACTTCCGTTGGTCTGGC

gdh_IIL-Cl25	GTACCGTTTTATGTACGGACTGGGAAACGCTTACTGAAAAAGGTACACGAATCAATATC
gdh_IIL-Lc16	GTACCGTTTTATGTACGGACTGGGAAACGCTTACTGAAAAAGGTACACGAATCAATATC
gdh_IIL-Luf18	GTACCGTTTTATGTACGGACTGGGAAACGCTTACTGAAAAAGGTACACGAATCAATATC
gdh_IIL-Sp24	GTACCGTTTTATGTACGGACTGGGAAACGCTTACTGAAAAAGGTACACGAATCAATATC

gdh_IIL-Cl25	GTCTTTAAACAAGTACCTGTCAATGTATTTAAACATCGATCGACGAACCTTGTAATGAT
gdh_IIL-Lc16	GTCTTTAAACAAGTACCTGTCAATGTATTTAAACATCGATCGACGAACCTTGTAATGAT
gdh_IIL-Luf18	GTCTTTAAACAAGTACCTGTCAATGTATTTAAACATCGATCGACGAACCTTGTAATGAT
gdh_IIL-Sp24	GTCTTTAAACAAGTACCTGTCAATGTATTTAAACATCGATCGACGAACCTTGTAATGAT

gdh_IIL-Cl25	CCAACGTTACCACCAAATGTTTTGACTATCTATATTCAACCAACAGAAGGTTTTTCATTT
gdh_IIL-Lc16	CCAACGTTACCACCAAATGTTTTGACTATCTATATTCAACCAACAGAAGGTTTTTCATTT
gdh_IIL-Luf18	CCAACGTTACCACCAAATGTTTTGACTATCTATATTCAACCAACAGAAGGTTTTTCATTT
gdh_IIL-Sp24	CCAACGTTACCACCAAATGTTTTGACTATCTATATTCAACCAACAGAAGGTTTTTCATTT

gdh_IIL-Cl25	ACATTAAATGGAAAAAAGTTGGTCAAGGCTTCGCCACCGATCCAATCAAACCTGGAATAT
gdh_IIL-Lc16	ACATTAAATGGAAAAAAGTTGGTCAAGGCTTCGCCACCGATCCAATCAAACCTGGAATAT
gdh_IIL-Luf18	ACATTAAATGGAAAAAAGTTGGTCAAGGCTTCGCCACCGATCCAATCAAACCTGGAATAT
gdh_IIL-Sp24	ACATTAAATGGAAAAAAGTTGGTCAAGGCTTCGCCACCGATCCAATCAAACCTGGAATAT

gdh_IIL-Cl25	CGCAATAGTGCTGAAATGGTCGAAAATAGTCCTGAAGCGTATGAAAAGCT
gdh_IIL-Lc16	CGCAATAGTGCTGAAATGGTCGAAAATAGTCCTGAAGCGTATGAAAAGCT
gdh_IIL-Luf18	CGCAATAGTGCTGAAATGGTCGAAAATAGTCCTGAAGCGTATGAAAAGCT
gdh_IIL-Sp24	CGCAATAGTGCTGAAATGGTCGAAAATAGTCCTGAAGCGTATGAAAAGCT

APÊNDICE A - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (gdh) das espécies de *Enterococcus mundtii* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), lufenuron (Luf) e spinosad (Sp)

```

gyd_IIL-Cl25      TGGTTGAGGATTAATGACAACATCCACGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTTGACGG
gyd_IIL-Lc16      TGGTTGAGGATTAATGACAACATCCACGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTTGACGG
gyd_IIL-Luf18     TGGTTGAGGATTAATGACAACATCCACGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTTGACGG
gyd_IIL-Sp24      TGGTTGAGGATTAATGACAACATCCACGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTTGACGG
*****

gyd_IIL-Cl25      ACCTCATCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCACGCGCTGCTGCTGCAAAACATCGTTCCTAA
gyd_IIL-Lc16      ACCTCATCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCACGCGCTGCTGCTGCAAAACATCGTTCCTAA
gyd_IIL-Luf18     ACCTCATCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCACGCGCTGCTGCTGCAAAACATCGTTCCTAA
gyd_IIL-Sp24      ACCTCATCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCACGCGCTGCTGCTGCAAAACATCGTTCCTAA
*****

gyd_IIL-Cl25      CTCAACAGGTGCTGCTAAAGCAATTGGTTTGTAGTAATCCCTGAATTGAACGGAAAATTAGA
gyd_IIL-Lc16      CTCAACAGGTGCTGCTAAAGCAATTGGTTTGTAGTAATCCCTGAATTGAACGGAAAATTAGA
gyd_IIL-Luf18     CTCAACAGGTGCTGCTAAAGCAATTGGTTTGTAGTAATCCCTGAATTGAACGGAAAATTAGA
gyd_IIL-Sp24      CTCAACAGGTGCTGCTAAAGCAATTGGTTTGTAGTAATCCCTGAATTGAACGGAAAATTAGA
*****

gyd_IIL-Cl25      CGGAGCTGCTCAACGTGTACCAGTCGCAACTGGTTCATTAACAGAATTAGTTACAGTTCT
gyd_IIL-Lc16      CGGAGCTGCTCAACGTGTACCAGTCGCAACTGGTTCATTAACAGAATTAGTTACAGTTCT
gyd_IIL-Luf18     CGGAGCTGCTCAACGTGTACCAGTCGCAACTGGTTCATTAACAGAATTAGTTACAGTTCT
gyd_IIL-Sp24      CGGAGCTGCTCAACGTGTACCAGTCGCAACTGGTTCATTAACAGAATTAGTTACAGTTCT
*****

gyd_IIL-Cl25      TGATAAAAACGTAACAGTTGATGAAGTAAATGCAGCAATGAAAGAAGCAGCAAACGAATC
gyd_IIL-Lc16      TGATAAAAACGTAACAGTTGATGAAGTAAATGCAGCAATGAAAGAAGCAGCAAACGAATC
gyd_IIL-Luf18     TGATAAAAACGTAACAGTTGATGAAGTAAATGCAGCAATGAAAGAAGCAGCAAACGAATC
gyd_IIL-Sp24      TGATAAAAACGTAACAGTTGATGAAGTAAATGCAGCAATGAAAGAAGCAGCAAACGAATC
*****

gyd_IIL-Cl25      ATACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCAGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Lc16      ATACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCAGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Luf18     ATACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCAGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Sp24      ATACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCAGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
*****

gyd_IIL-Cl25      ATTATTTGATGCTACTCAAACAAAAGTAATGACTG
gyd_IIL-Lc16      ATTATTTGATGCTACTCAAACAAAAGTAATGACTG
gyd_IIL-Luf18     ATTATTTGATGCTACTCAAACAAAAGTAATGACTG
gyd_IIL-Sp24      ATTATTTGATGCTACTCAAACAAAAGTAATGACTG
*****

```

APÊNDICE B - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (gyd) das espécies de *Enterococcus mundtii* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), lufenuron (Luf) e spinosad (Sp)

```

adk_IIL-Cl25      CAGGAGATATGTTTCGTGCAGCTATCAAAAATGAAACAGCTCTTGGCCTGGAAGCAAAGT
adk_IIL-Lc16      CAGGAGATATGTTTCGTGCAGCTATCAAAAATGAAACAGCTCTTGGCCTGGAAGCAAAGT
adk_IIL-Luf18     CAGGAGATATGTTTCGTGCAGCTATCAAAAATGAAACAGCTCTTGGCCTGGAAGCAAAGT
adk_IIL-Sp24      CAGGAGATATGTTTCGTGCAGCTATCAAAAATGAAACAGCTCTTGGCCTGGAAGCAAAGT
*****

adk_IIL-Cl25      CTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAAGTAACAAATGGAATCGTAAAAGAGC
adk_IIL-Lc16      CTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAAGTAACAAATGGAATCGTAAAAGAGC
adk_IIL-Luf18     CTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAAGTAACAAATGGAATCGTAAAAGAGC
adk_IIL-Sp24      CTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAAGTAACAAATGGAATCGTAAAAGAGC
*****

adk_IIL-Cl25      GTTTAGCAGAACCCGATACAGAGAAAGGCTTCTTATTAGATGGCTTTCCTCGTACAATCG
adk_IIL-Lc16      GTTTAGCAGAACCCGATACAGAGAAAGGCTTCTTATTAGATGGCTTTCCTCGTACAATCG
adk_IIL-Luf18     GTTTAGCAGAACCCGATACAGAGAAAGGCTTCTTATTAGATGGCTTTCCTCGTACAATCG
adk_IIL-Sp24      GTTTAGCAGAACCCGATACAGAGAAAGGCTTCTTATTAGATGGCTTTCCTCGTACAATCG
*****

adk_IIL-Cl25      AGCAAGCAGAAGCTCTAGATGCAATGTTAAAAGATTTAAATAAACAAATTGATGCTGTCA
adk_IIL-Lc16      AGCAAGCAGAAGCTCTAGATGCAATGTTAAAAGATTTAAATAAACAAATTGATGCTGTCA
adk_IIL-Luf18     AGCAAGCAGAAGCTCTAGATGCAATGTTAAAAGATTTAAATAAACAAATTGATGCTGTCA
adk_IIL-Sp24      AGCAAGCAGAAGCTCTAGATGCAATGTTAAAAGATTTAAATAAACAAATTGATGCTGTCA
*****

adk_IIL-Cl25      TCGATATCCACGTGGGTGAAGAAGTCTTGTTGAGCGTTTAGCAGGCCGCTTCATTTGCC
adk_IIL-Lc16      TCGATATCCACGTGGGTGAAGAAGTCTTGTTGAGCGTTTAGCAGGCCGCTTCATTTGCC
adk_IIL-Luf18     TCGATATCCACGTGGGTGAAGAAGTCTTGTTGAGCGTTTAGCAGGCCGCTTCATTTGCC
adk_IIL-Sp24      TCGATATCCACGTGGGTGAAGAAGTCTTGTTGAGCGTTTAGCAGGCCGCTTCATTTGCC
*****

adk_IIL-Cl25      GTAAGTGTGGAGCAACTTACCATAAAATTTTCAACCCTACAAAAGTTGAAGACACATGTG
adk_IIL-Lc16      GTAAGTGTGGAGCAACTTACCATAAAATTTTCAACCCTACAAAAGTTGAAGACACATGTG
adk_IIL-Luf18     GTAAGTGTGGAGCAACTTACCATAAAATTTTCAACCCTACAAAAGTTGAAGACACATGTG
adk_IIL-Sp24      GTAAGTGTGGAGCAACTTACCATAAAATTTTCAACCCTACAAAAGTTGAAGACACATGTG
*****

adk_IIL-Cl25      ATCGTTGTGGTGGGCATGAATTCTATCAAAGAGAAGATGATAAACCTGAGACGGTTAAAA
adk_IIL-Lc16      ATCGTTGTGGTGGGCATGAATTCTATCAAAGAGAAGATGATAAACCTGAGACGGTTAAAA
adk_IIL-Luf18     ATCGTTGTGGTGGGCATGAATTCTATCAAAGAGAAGATGATAAACCTGAGACGGTTAAAA
adk_IIL-Sp24      ATCGTTGTGGTGGGCATGAATTCTATCAAAGAGAAGATGATAAACCTGAGACGGTTAAAA
*****

adk_IIL-Cl25      ATCGTTTGCCAGTCAAC
adk_IIL-Lc16      ATCGTTTGCCAGTCAAC
adk_IIL-Luf18     ATCGTTTGCCAGTCAAC
adk_IIL-Sp24      ATCGTTTGCCAGTCAAC
*****

```

APÊNDICE C - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene adenilato quinase (adk) das espécies de *Enterococcus mundtii* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), lufenuron (Luf) e spinosad (Sp)

```

Ddl-1_IIL-Cl25      GGAACCTTGAATATGCCTTATGTTGGTGCGGGTGTATTGACGAGTGCTTGTGCCATGGAT
Ddl-1_IIL-Lc16      GGAACCTTGAATATGCCTTATGTTGGTGCGGGTGTATTGACGAGTGCTTGTGCCATGGAT
Ddl-1_IIL-Luf18     GGAACCTTGAATATGCCTTATGTTGGTGCGGGTGTATTGACGAGTGCTTGTGCCATGGAT
Ddl-1_IIL-Sp24      GGAACCTTGAATATGCCTTATGTTGGTGCGGGTGTATTGACGAGTGCTTGTGCCATGGAT
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      AAGATCATGACAAAATATATTTTACAAGCAGCCGGTGTACCGCAAGTACCTTATGTTCCA
Ddl-1_IIL-Lc16      AAGATCATGACAAAATATATTTTACAAGCAGCCGGTGTACCGCAAGTACCTTATGTTCCA
Ddl-1_IIL-Luf18     AAGATCATGACAAAATATATTTTACAAGCAGCCGGTGTACCGCAAGTACCTTATGTTCCA
Ddl-1_IIL-Sp24      AAGATCATGACAAAATATATTTTACAAGCAGCCGGTGTACCGCAAGTACCTTATGTTCCA
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      GTTTTGAAGAATCAATGGAAGAAAATCCTAAAAAGGTATTTGACCAATGTGAAGGCTCA
Ddl-1_IIL-Lc16      GTTTTGAAGAATCAATGGAAGAAAATCCTAAAAAGGTATTTGACCAATGTGAAGGCTCA
Ddl-1_IIL-Luf18     GTTTTGAAGAATCAATGGAAGAAAATCCTAAAAAGGTATTTGACCAATGTGAAGGCTCA
Ddl-1_IIL-Sp24      GTTTTGAAGAATCAATGGAAGAAAATCCTAAAAAGGTATTTGACCAATGTGAAGGCTCA
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      TTGCTTTATCCGATGTTTCGTGAAACCAGCAAACATGGGGTCAAGCGTAGGGATCACTAAG
Ddl-1_IIL-Lc16      TTGCTTTATCCGATGTTTCGTGAAACCAGCAAACATGGGGTCAAGCGTAGGGATCACTAAG
Ddl-1_IIL-Luf18     TTGCTTTATCCGATGTTTCGTGAAACCAGCAAACATGGGGTCAAGCGTAGGGATCACTAAG
Ddl-1_IIL-Sp24      TTGCTTTATCCGATGTTTCGTGAAACCAGCAAACATGGGGTCAAGCGTAGGGATCACTAAG
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      GCTGAAAATCGAGAAGAATTACAGAATGCCTTAGCAACAGCTTACCAATATGATTACGCT
Ddl-1_IIL-Lc16      GCTGAAAATCGAGAAGAATTACAGAATGCCTTAGCAACAGCTTACCAATATGATTACGCT
Ddl-1_IIL-Luf18     GCTGAAAATCGAGAAGAATTACAGAATGCCTTAGCAACAGCTTACCAATATGATTACGCT
Ddl-1_IIL-Sp24      GCTGAAAATCGAGAAGAATTACAGAATGCCTTAGCAACAGCTTACCAATATGATTACGCT
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      GCCATCGTTGAACAAGGAATTGAAGCACGGGAGATCGAAGTCGCTGTTTTAGGAAATGAA
Ddl-1_IIL-Lc16      GCCATCGTTGAACAAGGAATTGAAGCACGGGAGATCGAAGTCGCTGTTTTAGGAAATGAA
Ddl-1_IIL-Luf18     GCCATCGTTGAACAAGGAATTGAAGCACGGGAGATCGAAGTCGCTGTTTTAGGAAATGAA
Ddl-1_IIL-Sp24      GCCATCGTTGAACAAGGAATTGAAGCACGGGAGATCGAAGTCGCTGTTTTAGGAAATGAA
*****

Ddl-1_IIL-Cl25      GACGTCCGCACGACCTTGCCTGGCGAAGTGGTAAAAGACGTGGCATTTTACGAT
Ddl-1_IIL-Lc16      GACGTCCGCACGACCTTGCCTGGCGAAGTGGTAAAAGACGTGGCATTTTACGAT
Ddl-1_IIL-Luf18     GACGTCCGCACGACCTTGCCTGGCGAAGTGGTAAAAGACGTGGCATTTTACGAT
Ddl-1_IIL-Sp24      GACGTCCGCACGACCTTGCCTGGCGAAGTGGTAAAAGACGTGGCATTTTACGAT
*****

```

APÊNDICE D - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene D-alanine ligase (ddl) das espécies de *Enterococcus mundtii* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), lufenuron (Luf) e spinosad (Sp)

```

gdh_IIL-Cl05      CCGCCAGTGGCTTTTTCTGAAAAAGAATTACGGACGGAAAAAATCAAAGCCTTAAATGCG
gdh_IIL-Lc32      CCGCCAGTGGCTTTTTCTGAAAAAGAATTACGGACGGAAAAAATCAAAGCCTTAAATGCG
gdh_IIL-Sp06      CCGCCAGTGGCTTTTTCTGAAAAAGAATTACGGACGGAAAAAATCAAAGCCTTAAATGCG
gdh_IIL-Dm01      CCGCCAGTGGCTTTTTCTGAAAAAGAATTACGGACGGAAAAAATCAAAGCCTTAAATGCG
*****

gdh_IIL-Cl05      ATCCGTATTTACTCCGAAGAAGAAGTGAACAACACTTCGTTTCGTGGTCAATACGCCAAA
gdh_IIL-Lc32      ATCCGTATTTACTCCGAAGAAGAAGTGAACAACACTTCGTTTCGTGGTCAATACGCCAAA
gdh_IIL-Sp06      ATCCGTATTTACTCCGAAGAAGAAGTGAACAACACTTCGTTTCGTGGTCAATACGCCAAA
gdh_IIL-Dm01      ATCCGTATTTACTCCGAAGAAGAAGTGAACAACACTTCGTTTCGTGGTCAATACGCCAAA
*****

gdh_IIL-Cl05      GGGCAATTAGAAGATAAGGAATTTGCTGGCTACCGAGAAGAAGCCAATGTCGATGAAGAA
gdh_IIL-Lc32      GGGCAATTAGAAGATAAGGAATTTGCTGGCTACCGAGAAGAAGCCAATGTCGATGAAGAA
gdh_IIL-Sp06      GGGCAATTAGAAGATAAGGAATTTGCTGGCTACCGAGAAGAAGCCAATGTCGATGAAGAA
gdh_IIL-Dm01      GGGCAATTAGAAGATAAGGAATTTGCTGGCTACCGAGAAGAAGCCAATGTCGATGAAGAA
*****

gdh_IIL-Cl05      TCGGCAACTGAAACCTTCGTTGCTGGAAAATTCCTAATCGACAACCTCCGCTGGTCCGGC
gdh_IIL-Lc32      TCGGCAACTGAAACCTTCGTTGCTGGAAAATTCCTAATCGACAACCTCCGCTGGTCCGGC
gdh_IIL-Sp06      TCGGCAACTGAAACCTTCGTTGCTGGAAAATTCCTAATCGACAACCTCCGCTGGTCCGGC
gdh_IIL-Dm01      TCGGCAACTGAAACCTTCGTTGCTGGAAAATTCCTAATCGACAACCTCCGCTGGTCCGGC
*****

gdh_IIL-Cl05      GTACCATTTTATGTGCGCAC TGGGAAACGGTTGACGGAAAAAGGCACTCGCATCAACATT
gdh_IIL-Lc32      GTACCATTTTATGTGCGCAC TGGGAAACGGTTGACGGAAAAAGGCACTCGCATCAACATT
gdh_IIL-Sp06      GTACCATTTTATGTGCGCAC TGGGAAACGGTTGACGGAAAAAGGCACTCGCATCAACATT
gdh_IIL-Dm01      GTACCATTTTATGTGCGCAC TGGGAAACGGTTGACGGAAAAAGGCACTCGCATCAACATT
*****

gdh_IIL-Cl05      GTCTTTAAACAAGTCCCAGTCAATGTCTTTAAGCAAGACCTAAATGAACAAAAGCAAATC
gdh_IIL-Lc32      GTCTTTAAACAAGTCCCAGTCAATGTCTTTAAGCAAGACCTAAATGAACAAAAGCAAATC
gdh_IIL-Sp06      GTCTTTAAACAAGTCCCAGTCAATGTCTTTAAGCAAGACCTAAATGAACAAAAGCAAATC
gdh_IIL-Dm01      GTCTTTAAACAAGTCCCAGTCAATGTCTTTAAGCAAGACCTAAATGAACAAAAGCAAATC
*****

gdh_IIL-Cl05      GAGAGTTTGGCACC GAATGTGCTGACGATTTACATTCAACCGACGGAAGGCTTCTCTCTT
gdh_IIL-Lc32      GAGAGTTTGGCACC GAATGTGCTGACGATTTACATTCAACCGACGGAAGGCTTCTCTCTT
gdh_IIL-Sp06      GAGAGTTTGGCACC GAATGTGCTGACGATTTACATTCAACCGACGGAAGGCTTCTCTCTT
gdh_IIL-Dm01      GAGAGTTTGGCACC GAATGTGCTGACGATTTACATTCAACCGACGGAAGGCTTCTCTCTT
*****

gdh_IIL-Cl05      TCCTTGAACGGAAAAGAAATTGGCCAAGGGTTTGAGACATTGCCAGTGAAGCTCGATTAC
gdh_IIL-Lc32      TCCTTGAACGGAAAAGAAATTGGCCAAGGGTTTGAGACATTGCCAGTGAAGCTCGATTAC
gdh_IIL-Sp06      TCCTTGAACGGAAAAGAAATTGGCCAAGGGTTTGAGACATTGCCAGTGAAGCTCGATTAC
gdh_IIL-Dm01      TCCTTGAACGGAAAAGAAATTGGCCAAGGGTTTGAGACATTGCCAGTGAAGCTCGATTAC
*****

gdh_IIL-Cl05      CGAAATAGTACTGAAATCGTCGAAAACACCCCTGAAGCTTACGAAAAACT
gdh_IIL-Lc32      CGAAATAGTACTGAAATCGTCGAAAACACCCCTGAAGCTTACGAAAAACT
gdh_IIL-Sp06      CGAAATAGTACTGAAATCGTCGAAAACACCCCTGAAGCTTACGAAAAACT
gdh_IIL-Dm01      CGAAATAGTACTGAAATCGTCGAAAACACCCCTGAAGCTTACGAAAAACT
*****

```

APÊNDICE E - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (gdh) das espécies de *Enterococcus casseliflavus* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e deltamethrin (Dm)

```

gyd_IIL-C105      TGATTGAGGATTAATGACTACAATCCATGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTAGACGG
gyd_IIL-Lc32      TGATTGAGGATTAATGACTACAATCCATGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTAGACGG
gyd_IIL-Sp06      TGATTGAGGATTAATGACTACAATCCATGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTAGACGG
gyd_IIL-Dm01      TGATTGAGGATTAATGACTACAATCCATGCTTACACAGGTGACCAAATGACTCTAGACGG
*****

gyd_IIL-C105      ACCACACCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCCCGTGCTGCTGCTGCAAACATCGTGCCTAA
gyd_IIL-Lc32      ACCACACCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCCCGTGCTGCTGCTGCAAACATCGTGCCTAA
gyd_IIL-Sp06      ACCACACCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCCCGTGCTGCTGCTGCAAACATCGTGCCTAA
gyd_IIL-Dm01      ACCACACCCTAAAGGTGACTTCCGCCGTGCCCGTGCTGCTGCTGCAAACATCGTGCCTAA
*****

gyd_IIL-C105      CTCAACTGGTGCTGCTAAAGCGATCGGCTTAGTAATCCCAGAATTGAACGGCAAATTAGA
gyd_IIL-Lc32      CTCAACTGGTGCTGCTAAAGCGATCGGCTTAGTAATCCCAGAATTGAACGGCAAATTAGA
gyd_IIL-Sp06      CTCAACTGGTGCTGCTAAAGCGATCGGCTTAGTAATCCCAGAATTGAACGGCAAATTAGA
gyd_IIL-Dm01      CTCAACTGGTGCTGCTAAAGCGATCGGCTTAGTAATCCCAGAATTGAACGGCAAATTAGA
*****

gyd_IIL-C105      TGGTGCTGCTCAACGTGTTTCCTGTTGCAACTGGTTCATTAAGTGAATTAGTTACTGTTCT
gyd_IIL-Lc32      TGGTGCTGCTCAACGTGTTTCCTGTTGCAACTGGTTCATTAAGTGAATTAGTTACTGTTCT
gyd_IIL-Sp06      TGGTGCTGCTCAACGTGTTTCCTGTTGCAACTGGTTCATTAAGTGAATTAGTTACTGTTCT
gyd_IIL-Dm01      TGGTGCTGCTCAACGTGTTTCCTGTTGCAACTGGTTCATTAAGTGAATTAGTTACTGTTCT
*****

gyd_IIL-C105      TGACAAAGAAGTAAGTGAATCAATGCAGCAATGAAAGAAGCTTCAAACGAATC
gyd_IIL-Lc32      TGACAAAGAAGTAAGTGAATCAATGCAGCAATGAAAGAAGCTTCAAACGAATC
gyd_IIL-Sp06      TGACAAAGAAGTAAGTGAATCAATGCAGCAATGAAAGAAGCTTCAAACGAATC
gyd_IIL-Dm01      TGACAAAGAAGTAAGTGAATCAATGCAGCAATGAAAGAAGCTTCAAACGAATC
*****

gyd_IIL-C105      TTACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCTGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Lc32      TTACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCTGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Sp06      TTACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCTGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
gyd_IIL-Dm01      TTACGGTTACAACACAGACGAAATCGTTTCTTCTGATATCGTTGGTATGACTTACGGTTC
*****

gyd_IIL-C105      ATTATTTGATGCAACTCAAACAAAAGTTATGACTG
gyd_IIL-Lc32      ATTATTTGATGCAACTCAAACAAAAGTTATGACTG
gyd_IIL-Sp06      ATTATTTGATGCAACTCAAACAAAAGTTATGACTG
gyd_IIL-Dm01      ATTATTTGATGCAACTCAAACAAAAGTTATGACTG
*****

```

APÊNDICE F - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (gyd) das espécies de *Enterococcus casseliflavus* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e deltamethrin (Dm)

```

adk_IIL-Cl25      ACGTATCGTTGCTGAATACGGTCTTCCTCATATTTCAACAGGCGATATGTTTCGGGCTGC
adk_IIL-Lc32      ACGTATCGTTGCTGAATACGGTCTTCCTCATATTTCAACAGGCGATATGTTTCGGGCTGC
adk_IIL-Sp06      ACGTATCGTTGCTGAATACGGTCTTCCTCATATTTCAACAGGCGATATGTTTCGGGCTGC
adk_IIL-Dm01      ACGTATCGTTGCTGAATACGGTCTTCCTCATATTTCAACAGGCGATATGTTTCGGGCTGC
                    *****

adk_IIL-Cl25      GATGGCGAACGAAACAGAACTAGGCCTTAAAGCAAAATCATAACATGGATCAAGGCGCATT
adk_IIL-Lc32      GATGGCGAACGAAACAGAACTAGGCCTTAAAGCAAAATCATAACATGGATCAAGGCGCATT
adk_IIL-Sp06      GATGGCGAACGAAACAGAACTAGGCCTTAAAGCAAAATCATAACATGGATCAAGGCGCATT
adk_IIL-Dm01      GATGGCGAACGAAACAGAACTAGGCCTTAAAGCAAAATCATAACATGGATCAAGGCGCATT
                    *****

adk_IIL-Cl25      AGTTCCTGATGAGGTTACAAATGGGATCGTTAAAGAACGTTTAGCTGAACCTGATACCGA
adk_IIL-Lc32      AGTTCCTGATGAGGTTACAAATGGGATCGTTAAAGAACGTTTAGCTGAACCTGATACCGA
adk_IIL-Sp06      AGTTCCTGATGAGGTTACAAATGGGATCGTTAAAGAACGTTTAGCTGAACCTGATACCGA
adk_IIL-Dm01      AGTTCCTGATGAGGTTACAAATGGGATCGTTAAAGAACGTTTAGCTGAACCTGATACCGA
                    *****

adk_IIL-Cl25      GAAAGGTTTCTTATTAGATGGTTTTCCTCGTACATTGGATCAAGCAAAAGCGTTAGATGA
adk_IIL-Lc32      GAAAGGTTTCTTATTAGATGGTTTTCCTCGTACATTGGATCAAGCAAAAGCGTTAGATGA
adk_IIL-Sp06      GAAAGGTTTCTTATTAGATGGTTTTCCTCGTACATTGGATCAAGCAAAAGCGTTAGATGA
adk_IIL-Dm01      GAAAGGTTTCTTATTAGATGGTTTTCCTCGTACATTGGATCAAGCAAAAGCGTTAGATGA
                    *****

adk_IIL-Cl25      GATGCTTGCTGACCTTAACAAAAAAGCTTGATGCCGTTATTGATATTCATGTTCTGAAGA
adk_IIL-Lc32      GATGCTTGCTGACCTTAACAAAAAAGCTTGATGCCGTTATTGATATTCATGTTCTGAAGA
adk_IIL-Sp06      GATGCTTGCTGACCTTAACAAAAAAGCTTGATGCCGTTATTGATATTCATGTTCTGAAGA
adk_IIL-Dm01      GATGCTTGCTGACCTTAACAAAAAAGCTTGATGCCGTTATTGATATTCATGTTCTGAAGA
                    *****

adk_IIL-Cl25      AGTTCTTGTTAGAACGTTTAGCCGCGCCGCTTCATGTGCCGCAATTGTGGGGCAACTTATCA
adk_IIL-Lc32      AGTTCTTGTTAGAACGTTTAGCCGCGCCGCTTCATGTGCCGCAATTGTGGGGCAACTTATCA
adk_IIL-Sp06      AGTTCTTGTTAGAACGTTTAGCCGCGCCGCTTCATGTGCCGCAATTGTGGGGCAACTTATCA
adk_IIL-Dm01      AGTTCTTGTTAGAACGTTTAGCCGCGCCGCTTCATGTGCCGCAATTGTGGGGCAACTTATCA
                    *****

adk_IIL-Cl25      TAAATTGTTCAATCCTCCCAAAGAGGAAGGAACATGTGATCGTTGTGGAAGTCATGACTT
adk_IIL-Lc32      TAAATTGTTCAATCCTCCCAAAGAGGAAGGAACATGTGATCGTTGTGGAAGTCATGACTT
adk_IIL-Sp06      TAAATTGTTCAATCCTCCCAAAGAGGAAGGAACATGTGATCGTTGTGGAAGTCATGACTT
adk_IIL-Dm01      TAAATTGTTCAATCCTCCCAAAGAGGAAGGAACATGTGATCGTTGTGGAAGTCATGACTT
                    *****

adk_IIL-Cl25      CTACCAGCGTGAAGATG
adk_IIL-Lc32      CTACCAGCGTGAAGATG
adk_IIL-Sp06      CTACCAGCGTGAAGATG
adk_IIL-Dm01      CTACCAGCGTGAAGATG
                    *****

```

APÊNDICE G - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene adenilato quinase (adk) das espécies de *Enterococcus casseliflavus* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e deltamethrin (Dm)


```

Ddl-1_IIL-Cl05      CATCGCCGCACGTTTTTCTTTTTCATAAAAAGCTAACCGCTCACTAAGCTCTTTTTCTAA
Ddl-1_IIL-Sp06      CATCGCCGCACGTTTTTCTTTTTCATAAAAAGCTAACCGCTCACTAAGCTCTTTTTCTAA
Ddl-1_IIL-Dm01      CATCGCCGCACGTTTTTCTTTTTCATAAAAAGCTAACCGCTCACTAAGCTCTTTTTCTAA
Ddl-1_IIL-Lc32      CATCGCCGCACGTTTTTCTTTTTCATAAAAAGCTAACCGCTCACTAAGCTCTTTTTCTAA
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      TTGCGTTCGCTTCAAGTTTTCTTGATTTTCACTTCTTTTTTCGCTTCTTTGATTGTCAG
Ddl-1_IIL-Sp06      TTGCGTTCGCTTCAAGTTTTCTTGATTTTCACTTCTTTTTTCGCTTCTTTGATTGTCAG
Ddl-1_IIL-Dm01      TTGCGTTCGCTTCAAGTTTTCTTGATTTTCACTTCTTTTTTCGCTTCTTTGATTGTCAG
Ddl-1_IIL-Lc32      TTGCGTTCGCTTCAAGTTTTCTTGATTTTCACTTCTTTTTTCGCTTCTTTGATTGTCAG
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      CTGGTATTTCTTTTCCGCATCAGCGGTTATTTTGTGAGTTAAACGTGTAATATCAGACAT
Ddl-1_IIL-Sp06      CTGGTATTTCTTTTCCGCATCAGCGGTTATTTTGTGAGTTAAACGTGTAATATCAGACAT
Ddl-1_IIL-Dm01      CTGGTATTTCTTTTCCGCATCAGCGGTTATTTTGTGAGTTAAACGTGTAATATCAGACAT
Ddl-1_IIL-Lc32      CTGGTATTTCTTTTCCGCATCAGCGGTTATTTTGTGAGTTAAACGTGTAATATCAGACAT
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      TCACTTTTCCCTCCTCTTAATTCAAGACAAGCAAGAAGGAAATAACGAACCCTAAAATAC
Ddl-1_IIL-Sp06      TCACTTTTCCCTCCTCTTAATTCAAGACAAGCAAGAAGGAAATAACGAACCCTAAAATAC
Ddl-1_IIL-Dm01      TCACTTTTCCCTCCTCTTAATTCAAGACAAGCAAGAAGGAAATAACGAACCCTAAAATAC
Ddl-1_IIL-Lc32      TCACTTTTCCCTCCTCTTAATTCAAGACAAGCAAGAAGGAAATAACGAACCCTAAAATAC
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      AATACGTTTCCATCATCGCTACCAAGATAATTCCCTTTGGTCACATGTTCTGGTTTTTTGG
Ddl-1_IIL-Sp06      AATACGTTTCCATCATCGCTACCAAGATAATTCCCTTTGGTCACATGTTCTGGTTTTTTGG
Ddl-1_IIL-Dm01      AATACGTTTCCATCATCGCTACCAAGATAATTCCCTTTGGTCACATGTTCTGGTTTTTTGG
Ddl-1_IIL-Lc32      AATACGTTTCCATCATCGCTACCAAGATAATTCCCTTTGGTCACATGTTCTGGTTTTTTGG
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      CTAAAATCTGCATCGCAGCACTTGCGGCACGTCCTTGCCATTTTCCGGCTACGATCGCTG
Ddl-1_IIL-Sp06      CTAAAATCTGCATCGCAGCACTTGCGGCACGTCCTTGCCATTTTCCGGCTACGATCGCTG
Ddl-1_IIL-Dm01      CTAAAATCTGCATCGCAGCACTTGCGGCACGTCCTTGCCATTTTCCGGCTACGATCGCTG
Ddl-1_IIL-Lc32      CTAAAATCTGCATCGCAGCACTTGCGGCACGTCCTTGCCATTTTCCGGCTACGATCGCTG
                      *****

Ddl-1_IIL-Cl05      TTAATGCGATTGGCAATGAAGCAATAAACAAGTACAATCCGCGATCGGAATGAG
Ddl-1_IIL-Sp06      TTAATGCGATTGGCAATGAAGCAATAAACAAGTACAATCCGCGATCGGAATGAG
Ddl-1_IIL-Dm01      TTAATGCGATTGGCAATGAAGCAATAAACAAGTACAATCCGCGATCGGAATGAG
Ddl-1_IIL-Lc32      TTAATGCGATTGGCAATGAAGCAATAAACAAGTACAATCCGCGATCGGAATGAG
                      *****

```

APÊNDICE H - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene D-alanine ligase (ddl) das espécies de *Enterococcus casseliflavus* isoladas de populações de *S. frugiperda* resistentes a chlorpyrifos ethyl (Cl), lambda-cyhalothrin (Lc), spinosad (Sp) e deltamethrin (Dm)