Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização das comunidades de microrganismos associados ao mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Crambidae e Noctuidae)

John Jairo Saldarriaga Ausique

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

Piracicaba
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

John Jairo Saldarriaga Ausique
Engenheiro Agrônomo

Caracterização das comunidades de microrganismos associados ao mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Crambidae e Noctuidae)

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

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

Piracicaba
2009

DEDICATÓRIA

A **Dios**, por ser bordón a mi cansancio,
sandalias para mis pies descalzos y
sabiduría en cada instante de mi vida;

A mi madre, **Blanca Aurora**, por eternizar su alma
en lo profundo de la mía;

A mi sobrina, **Nadezhka**,
por ser la luz que ilumina mi camino;

A cada persona con quien he compartido,
por que con un suspiro, un parpadeo, una mirada, una palabra,
hacen parte del libro de mi vida,
que escribo día a día.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua força, sabedoria, infinito amor e benção na minha vida e na da minha familia.

A minha avô Ana e minha irmã Viviana, por serem parte da estrutura da minha vida, por seu conselhos e por cada instante de felicidade que como família temos.

Ao Brasil, pelo maravilhoso país que é, pelas pessoas de grande coração que nele moram, pela sua música, comida e costumes apaixonantes.

Ao Professor Italo Delalibera Júnior, pelo incentivo e oportunidade na realização desde projeto. Por ter transmitido seu conhecimento, parte do seu tempo e por ter confiado na minha aprendizagem.

Ao Fundo de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financiero para a realização deste trabalho.

A cordenação do PPG em Entomología e Acarologia e à Escola Superior de Agrícultura "Luíz de Queiroz" – ESALQ-USP por me conceder a oportunidade de realizar este projeto.

Ao Professor Gilberto J. de Moraes, pelo apoio incondicional, os conselhos e por seu esmero na transmissão do seu conhecimento, que nos faz crescer e nos realizarmos como pessoas.

Aos professores Ane H. de Medeiros, Daniel S. de Moura e Fernando Cônsoli, por me ensinar com sua disciplina, exemplo e por me mostrar que não há coisas impossíveis quando se faz com alegria e dedicação.

Ao professor Marcio Lambais, pelo apoio e ensinamentos recebidos na realização desta pesquisa.

A professora Aline Kleiner, pelo apoio na pesquisa e pela permissão de uso das instalações do laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ-USP).

Ao Vitalis Wafula Wekesa, pela sua amizade, apoio e pelo exelente exemplo como cientista.

A Daiane Heloise Nunes, por me ensinar que bons amigos são difíceis de encontrar, mais difíceis ainda de deixar e impossíveis de esquecer.

A Renata A. Simões, por abrir seu coração e sempre ter mantido a sua mão pronta para ser o meu apoio na hora certa.

A Christiane Miller, por ser um ótimo exemplo para mim, pela sua amizade e pela felicidade que transmite às outras pessoas.

As mocinhas Lorena Nunes, Erika Pessoa e Angelina Marcominni, pela amizade incondicional e por ter compartido os melhores momentos da minha vida no Brasil.

A Osmar Arias e Edgar Gaona, pela amizade que vai além do tempo e a distância.

A Gisele Nunes, pela amizade, os ensinamentos e por ter sido um pedacinho de chão quando precisei pisar forte, e, um pedacinho de céu quando precisei sonhar.

Ao Adriano Lucheta, por sua bondade de servir, orientar e transmitir sua experiência e conhecimento. Pela amizade e apoio nos momentos dificeis

Aos amigos do laboratório de Microbiologia de Solos, pelos momentos de trabalho, companherismo e diversão: Rafael Dutra, Kelly Silva, Elisa Matos, Vivian Carvalho, Gisele Monteiro, Eder da Costa, Joze Correa, Winston Franz Ruiz, Wladimir Rosignolo e Alice Cassetari.

Ao Carlão Vildoso, pela amizade, orientação na pesquisa e pelos bons churrascos ao lado dos amigos da republica.

A Marisse Suzuki, por me escolher como seu amigo e por dedicar parte do seu tempo para me manter sempre presente na sua vida.

A Janaina Lamezon e Eveline Calderan, pelo ótimo trabalho, companherismo e apoio na realização do trabalho no laboratório de Patologia de Artrópodes (ESALQ-USP)

As meninas Colombianas Sandra Montenegro, Silvia Barrera, Marisela Solarte, Eleonora Zambrano e Maryeimy Varon, por ter trazido parte da alegria, dos costumes, da comida, da música do nosso país, na nossa passagem acadêmica pelo Brasil.

"Hay hombres que luchan un día y son buenos,
hay hombres que luchan un año y son mejores,
y los hay que luchan toda la vida.
Ellos son... Los imprescindibles"

Bertolt Brecht

SUMÁRIO

RESUMO 11

ABSTRACT 13

LISTA DE FIGURAS 15

LISTA DE TABELAS 19

1 INTRODUÇÃO 21

REFERÊNCIAS 31

2 BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO MESÊNTERO DE *Spodoptera frugiperda* E *Diatraea saccharalis* E CAPACIDADE DESTAS EM DEGRADAR CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA 37

Resumo 37

abstract 38

2.1 Introdução 38

2.2 Desenvolvimento 42

2.2.1 Material e métodos 42

2.2.1.1 Coleta das lagartas 42

2.2.1.1.1 *D. saccharalis* 42

2.2.1.1.2 *S. frugiperda* 44

2.2.1.2 Dissecação das lagartas 44

2.2.1.3 Isolamento de bactérias cultiváveis do trato digestivo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* 44

2.2.1.4 PCR e sequenciamento das bactérias cultiváveis 45

2.2.1.5 Análises das seqüências do rRNA 47

2.2.1.6 Avaliação *in vitro* da produção de enzimas por microrganismos com a capacidade de degradar substratos celulolíticos, hemicelulolíticos e lignoliticos 48

2.2.1.6.1 Meio basal (MB) 48

2.2.1.6.2 Atividade celulolítica 48

2.2.1.6.3 Atividade hemicelulolítica 49

2.2.1.6.4 Atividade Lignolitica 49

2.2.1.6.5 Produção enzimática em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar 49

2.2.1.7 Escala estimativa para avaliação da atividade enzimática 50

2.3 Resultados 50

2.3.1 Isolamento 50

2.3.2 Identificação das bactérias cultiváveis por sequenciamento 51

2.3.3 Degradação enzimática de celulose, hemicelulose e lignina 55

2.4 Discussão 67

Referências 68

3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DO MESÊNTERO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E *DIATRAEA SACCHARALIS* 72

Resumo 72

Abstract 73

3.1 Introdução 74

3.2 Desenvolvimento 75

3.2.1 Material e métodos 75

3.2.1.1 Origem das lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* 75

3.2.1.2 Extração de DNAs 76

3.2.1.3 Amplificação do gene 16s rRNA e análise por DGGE 77

3.2.1.4 Construção das bibliotecas de clones da região V1-V3 do rRNA 16S de bactérias 78

3.2.1.5 Extração de plasmídeos 78

3.2.1.6 Sequenciamento utilizando “Big Dye Terminator” 79

3.2.1.7 Análises das seqüências do rRNA 79

3.2.2 Resultados 80

3.2.2.1 Estrutura das comunidades de bactérias do mesêntero de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* 80

3.2.2.2 Sequenciamento do rRNA 16S de bactérias 86

3.2.2.3 Estimativa de riqueza, de diversidades e comparações múltiplas das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias 90

3.2.2.4 Distâncias evolutivas das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias 94

3.3 Discussão 134

Referências 137

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO MESÊNTERO DE *Diatraea saccharalis* E *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE E NOCTUIDAE)

O primeiro passo para entender as funções da microbiota do trato digestivo na biologia dos insetos consiste na identificação dos membros destas comunidades. Neste trabalho, as bactérias presentes no mesêntero de lagartas da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, provenientes de diferentes localidades, espécies ou variedades de plantas hospedeiras, foram identificadas por isolamentos em meio de cultura TSA (Triptona de Soja Agar) e por técnicas moleculares que independem do cultivo dos microrganismos. As lagartas de *D. saccharalis* foram coletadas em nove variedades de cana-de-açúcar nos municípios paulistas de Bocaina, Tanabi e Luís Antônio. *S. frugiperda* foram coletadas diretamente no campo em milho em Piracicaba-SP e populações de campo e de laboratório foram também alimentadas com dieta artificial, milho, algodão, sorgo e arroz. Foram utilizadas 90 lagartas de *D. saccharalis* e 40 de *S. frugiperda* sendo a microbiota de cada lagarta avaliada individualmente. As bactérias isoladas foram testadas quanto à capacidade de degradação de celulose, hemicelulose, lignina e bagaço de cana. A caracterização molecular foi realizada por DGGE (Gel de eletroforese em gradiente desnaturante) usando-se a região 16S do RNA ribossômico amplificado de DNA metagenômico extraído do mesêntero de 57 lagartas de *D. saccharalis* e 26 de *S. frugiperda*. Posteriormente, 6 destas amostras de DNA metagenômico de cada uma das espécies de insetos foram clonadas e as 12 bibliotecas de clones foram sequenciadas. A comunidade de bactérias cultiváveis das duas espécies de insetos é composta por representantes dos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. A afiliação filogenética das seqüências das bibliotecas de clones de rRNA 16S revelou a ocorrência, além destes filos, de Bacteroidetes em *D. saccharalis* e Bacteroidetes e Acidobacteria em *S. frugiperda*. Somente bactérias isoladas de *D. saccharalis* apresentaram resposta positiva nos testes de degradação *in vitro* para celulose, hemicelulose, lignina e bagaço de cana. A capacidade destes microrganismos de degradar celulose foi maior do que hemicelulose e poucos produziram enzimas para degradar lignina. Somente duas bactérias apresentaram resposta positiva aos testes de degradação para todas estas fontes de carbono. As seqüências de rRNA 16S destas se agrupam com representantes de *Phyllobacterium trifolii* e *Bacillus subtilis*. O maior número de sequências de bactérias cultiváveis pertence aos gêneros *Bacillus* (26,4 e 32.4% em *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, respectivamente), *Enterococcus* (12,1 e 13%) e *Microbacterium* (18 e 12%). As análises das seqüências obtidas do DNA metagenômico revelaram que *Klebsiella* esteve presente em todas as amostras analisadas de *D. saccharalis*. As comunidades de bactérias em *S. frugiperda* apresentaram maior variação em função do alimento. Entretanto, *Ralstonia* e *Hydrogenophilus* estiveram presentes na maioria das lagartas. As variações das estruturas das comunidades bacterianas de *S. frugiperda* e de *D. saccharalis* estão diretamente relacionadas com a origem das populações e o tipo de alimentação dos insetos. A presença constante de algumas bactérias na

maioria dos insetos indica que estas possam ser indispensáveis, exercendo alguma função vital para o inseto ou que apresentam alguma relação vantajosa para o hospedeiro.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Broca da cana-de-açúcar; Lagarta-do-cartucho-do-milho; Microbiota intestinal; Bagaço de cana; Enzimas lignocelulolíticas

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE MIDGUT BACTERIAL COMMUNITIES OF *Diatraea saccharalis* AND *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE E NOCTUIDAE)

The identification of members of the microbe communities is the first step to understand their roles on insect biology. We have characterized the midgut bacterial community of fifth ínstar caterpillars of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, and of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, through isolation on tryptic soy agar medium and through culture-independent molecular techniques. *D. saccharalis* caterpillars were collected on nine sugarcane varieties in Bocaina, Tanabi and Luís Antônio cities in São Paulo State. *S. frugiperda* were collected directly from corn fields in Piracicaba-SP and field and laboratory populations were reared on artificial diet, corn, cotton, sorghum and rice. Ninety *D. saccharalis* caterpillars and 40 *S. frugiperda* caterpillars were used. The microbiota community of each caterpillar was evaluated individually. The ability of bacterial isolates to degrade cellulose, hemicellulose, lignin and sugarcane bagasse was assessed. The molecular analyses were based on Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S ribosomal RNA sequences amplified from metagenomic DNA extracted from 57 individual midgut of *D. saccharalis* and 26 from *S. frugiperda*. Latter, 6 of these metagenomic DNA of each insect species were cloned and the 12 clone libraries were sequenced. The cultivable bacterial community of these two insect species is composed by representatives of the phyla Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria. The phylotypes from the clone libraries of 16S rRNA were comprised by Bacteroidetes in *D. saccharalis* and Bacteroidetes and Acidobacteria in *S. frugiperda*, besides the three phyla found by culturing. Only bacteria isolated from *D. saccharalis* had ability to degrade cellulose, hemicelluloses, lignin and sugarcane bagasse in the *in vitro* tests. The ability to degrade cellulose was more common than the ability to degrade hemicelullose and just a few isolates had the ability to degrade lignin. The only two bacteria presenting a positive response to degradation of all carbon sources were clustered with *Phyllobacterium trifolii* and *Bacillus subtilis*. The greatest number of cultivable bacteria sequences belongs to genera *Bacillus* (26.4 and 32.4%, in *D. saccharalis* and *S. frugiperda*, respectively), *Enterococcus* (12.1 and 13%) and *Microbacterium* (18 and 12%). Sequence analysis from metagenomic DNA revealed the genera *Klebsiella* in all samples from *D. saccharalis*. Bacterial community varied according to *S. frugiperda* host plant; however, both *Ralstonia* and *Hydrogenophilus* genera were present in the digestive tracts of insects from most host plants. Community structure variation of *S. frugiperda* and *D. saccharalis* is related directly to insect population origin and type of insect food source. The constant presence of some bacteria in the majority of insects indicates that those microorganisms might either be indispensable, playing a vital role to the insect, or have some symbiotic or commensal relation with the insect.

Keywords: Microbial diversity; Fall armyworm; Sugarcane borer; Gut microbes; Sugarcane bagasse; Lignocellulolytic enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Distribuição geográfica dos locais de coleta das lagartas de *Diatraea saccharalis*, em regiões canavieira do Estado de São Paulo 43

Figura 2.2 (A) Coletas em campo, (B) Busca de lagartas no interior do caule da cana, (C-D) Processamento do material no laboratório, (E) Dissecação de lagartas, (F) Obtenção do mesêntero e plaqueamento de microrganismos em placas de Petri (Capela de fluxo laminar), (G) Colônia pura e (H-I) Observação das características ao microscópio 46

Figura 2.3 Bactérias isoladas do mesêntero de *Diatraea saccharalis* (características morfológicas das colônias puras)..... 51

Figura 2.4 Frequências relativas de sequências de rRNA 16S de bactérias cultiváveis nos diferentes filos (A) e classes de Proteobacteria (B) obtidas do mesêntero de *Diatraea saccharalis* (1) e *Spodoptera frugiperda* (2)..... 53

Figura 2.5 Frequência relativa de bactérias cultivaveis identificadas por seqüências de rRNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* (A) e *Spodoptera frugiperda* (B)..... 54

Figura 2.6 Afiliação filogenética de sequências de rRNA 16S de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* pela comparação com a base de dados NCBI usando o software MEGAN..... 56

Figura 2.7 Degradação de substratos lignocelulolíticos por enzimas produzidas por microrganismos obtidos do mesêntero de *Diatraea saccharalis*. Círculo central delimita área da colônia e círculo externo delimita o halo de inibição..... 59

Figura 3.1 Amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes plantas e dieta artificial, após separadção por DGGE. Alimento/Origem lagarta. M = Marcador. 1,2,3 = Foram utilizadas três lagartas por localidade 82

Figura 3.2 Amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactéria amplificados de DNA metagenômico do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em cana-de-açúcar e *Spodoptera frugiperda* coletada em Milho (Amostra[1]/Cidade[2]/Variedade[3]) após separação por DGGE 83

Figura 3.3 Agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes locais e plantas, separados por DGGE 84

Figura 3.4 Agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar e *Spodoptera frugiperda* (amostras circundadas por □) coletas em milho, com base na separação por DGGE. As variedades de mesma cor são provenientes de uma mesma localidade sendo Luís Antônio (Marrom), Bocaína (Preto), Tanabi (Vermelho) e Piracicaba (Verde). As linhas de mesma cor agrupam mesmas variedades coletadas em locais diferentes ..... .85

Figura 3.5 Afiliação filogenética dos amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharaslis* pela comparação das sequências com a base de dados NCBI usando o software MEGAN. Di (*D. saccharalis*), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ta (Tanabi/SP), Ca (cana-de-açúcar)..... 87

Figura 3.6 Afiliação filogenética dos amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* pela comparação das sequências com a base de dados NCBI usando o software MEGAN. Sp (*S. frugiperda*), Al (Algodão), Arr (Arroz), Mi (Milho), So (Sorgo)..... 88

Figura 3.7 Frequência relativa de seqüências de RNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por filos de bactéria..... 89

Figura 3.8 Frequência relativa de seqüências de RNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por filos de bactéria..... 89

Figura 3.9 Análise de rarefação de filotipos obtidos das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis.* As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos. Di (*D. saccharalis*), Ta (Tanabi/SP), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ca (Cana-de-açúcar) 92

Figura 3.10 Análise de rarefação de filotipos obtidos das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda.* As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos. Sp (*S. frugiperda*), Pi (Piracicaba/SP), Mi (Milho), Arr (Arroz), Al (Algodão), So (Sorgo) 93

Figura 3.11 Número de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas obtidos das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar em quatro cidades do Estado de São Paulo. A. (Piracicaba – SP81-3250/Bocaina – RB83-5054), B. (Luís Antônio/Bocaina/Tanabi – RB83-5054), C. (Luís Antônio – RB85-5453/RB83-5054), D. (Tanabi – RB83-5054/RB86-7515) Barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). Di (*D. saccharalis*), Ta (Tanabi/SP), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ca (Cana-de-açúcar) 95

Figura 3.12 Número de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas, obtidos das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda*, coletadas em Piracicaba/SP que alimentaram-se de diferentes plantas. A. (Milho – Pioneer 30F90/DowAgroScience 2B710), B. (Algodão – IAC25RMD©/IAC25RMD), C. (Sorgo - 822/Arroz – SCSBRS5112), D. (Milho – DowAgroScience 2B710/Algodão – IAC25RMD/Sorgo – 822/Arroz - SCSBRS5112) Barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). Sp (*S. frugiperda*), Pi (Piracicaba/SP), Mi (Milho), Arr (Arroz), Al (Algodão), So (Sorgo). (c) Lagartas descendente de Adultos de criação..... 96

Figura 3.13 Frequência relativa de seqüências de rRNA 16S obtidas no mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por classes de Proteobacteria 97

Figura 3.14 Frequência relativa de seqüências de rRNA 16S obtidas no mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por classes de Proteobacteria 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Hidrólise *in vitro* de celulose, hemicelulose e lignina por bactérias isoladas do mesêntero de *Diatraea saccharalis* 57

Tabela 2.2 Composição das comunidades de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Diatraea saccharalis* identificadas por seqüências de rRNA 16S..... 60

Tabela 2.3 Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* identificadas por sequências de rRNA 16S..... 64

Tabela 3.1 Estimativas da riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* coletadas em campo 98

Tabela 3.2 Comparações múltiplas da diversidade das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis e Spodoptera frugiperda* coletadas em campo..... 99

Tabela 3.3 Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S 100

1 INTRODUÇÃO

O tubo digestivo é a maior região de contato entre os insetos e o meio ambiente. Por isso, é excelente alvo para tentativas de controle de pragas fitófagas de interesse econômico. As comunidades de microrganismos no trato digestivo de insetos variam de simples a complexas. Funções importantes têm sido atribuídas aos microrganismos presentes no tubo digestivo. Algumas possíveis funções relacionadas à nutrição incluem digestão de celulose e lignina, fixação de nitrogênio, reciclagem de ácido úrico, metanogênese e acetogênese a partir de H_2 e CO_2 (BRIDGES, 1981; OHKUMA; KUDO, 1996; AYRES et al., 2000).

Estudos mostram que a eliminação dos microrganismos, geralmente resulta na redução do desenvolvimento e mortalidade dos insetos hospedeiros, sugerindo assim que os microrganismos são importantes para o desenvolvimento normal e crescimento do inseto. Simbiontes podem detoxificar compostos de plantas (DOWD, 1992) contribuindo para quebrar a resistência de plantas (KROKENE; SOLHEIM, 1998). Outras funções são a prevenção da entrada de bactérias e fungos patogênicos e a produção de semioquímicos importantes nas interações entre insetos, sendo estes, em alguns casos, usados como feromônios de agregação (BRAND et al., 1975). Entretanto, para a grande maioria das espécies de insetos-praga nada se conhece sobre a diversidade e o papel da microbiota do intestino, como é o caso de duas importantes pragas no Brasil: *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (ROE, 2010, In press).

Estes insetos pertencem à Ordem Lepidoptera, que é o segundo maior grupo em número de espécies, com mais de 150.000 espécies, atrás apenas da Ordem Coleóptera. As lagartas fitófagas representam um componente importante do hábitat terrestre. Muitas espécies de Lepidoptera têm um impacto significante na sociedade humana, tendo um papel benéfico como polinizadores e fontes de alimento para outros animais ou negativo como pragas na agricultura e silvicultura. Um caso especial é o bicho-da-seda, *Bombix mori*, criado para produção de seda (sericultura), sendo esta uma das indústrias mais importantes por muitos anos em mais de 30 países, especialmente na Ásia (China, Japão, Coréia, a

Tailândia, Índia), Europa (França, Itália, Rússia, Romênia, e Bulgária), e na América do sul (Brasil) (ROE, 2010 In press).

B. mori ainda permanece como um dos insetos mais utilizado em estudos genéticos moleculares e genômica estrutural e funcional. *Manduca sexta* foi o primeiro inseto utilizado, como modelo nos Estados Unidos para muitos estudos fundamentais nas áreas de imunidade inata, olfação e neurobiologia, endocrinologia, e bioquímica. Avanços em ferramentas moleculares e técnicas genômicas e de criação em massa fizeram dos lepidópteros uma escolha como sistema modelo de pesquisa (ROE, 2010 In press).

Atualmente, este grupo de insetos tem sido objeto de estudos que podem resultar em importantes descobertas para a agricultura e a indústria, como a necessidade urgente em achar novos métodos de controle de lepidópteros-praga, desvendando processos biológicos fundamentais. Neste contexto, na última década foram descobertos microrganismos que auxiliam no manejo ou podem controlar o desenvolvimento dos insetos.

Outras linhas de pesquisa com Lepidopteros visam o entendimento dos mecanismos de resistência a inseticidas, resposta imune, exploração das interações polydnavirus/parasitóides/Lepidopteros indução de doença nas plantas, neurobiologia, etc. O sequenciamento do genoma de lepidópteros e seus microrganismos certamente possibilitarão novas abordagens científicas num futuro próximo.

D. saccharalis é a principal praga de cana-de-açúcar no Brasil. Esta espécie é provavelmente originária das Américas Central e do Sul (SGRILLO, 1979), mas apresenta atualmente uma ampla distribuição geográfica. As fêmeas ovipositam, preferencialmente, na parte dorsal das folhas. As lagartas recém eclodidas raspam as folhas e quando atingem o segundo ínstar penetram no colmo, abrindo galerias (PARRA, 1993). Além dos prejuízos diretos causados como perda de peso, morte das gemas e aberturas de galerias nos colmos, a broca causa prejuízos indiretos ainda mais significativos, devido à penetração de microrganismos (especialmente os fungos *Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) causadores de podridões, que degradam a sacarose diminuindo a pureza do caldo e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento da produção de açúcar (GALLO et al., 2002). Outro efeito causado pelos microrganismos que contaminam o caldo é a

concorrência com leveduras na assimilação dos açúcares, levando à diminuição na produção de álcool e queda no rendimento fermentativo.

Os prejuízos diretos podem ser causados em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Uma infestação no início da cultura (canas de até quatro meses de idade) pode danificar a região meristemática da planta (gema apical) causando o sintoma conhecido como “coração morto”, resultando em falhas nos canaviais (BRAGA, 2001). Já em plantas adultas, os danos provocados causam brotações laterais, enraizamento aéreo, perdas de peso, afinamento e quebra do colmo, redução de entrenós e morte da planta, o que leva a uma acentuada queda da produção (PARRA, 1993).

Devido ao hábito críptico, o controle químico de *D. saccharalis*, além de ser oneroso, torna-se inviável já que esta passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, ficando difícil o contato com inseticidas (GALLO et al., 2002). O controle varietal desta praga também não tem sido uma opção viável. O controle biológico com o parasitóide *Cotesia flavipes* é eficiente, mas não atinge a totalidade das lagartas, permanecendo um resíduo não controlado. Estudos de transformações genéticas da cana com genes que codificam inibidores de proteinases ou a toxina Cry1Ab do *Bacillus thuringiensis* (Bt) podem ser uma opção viável de manejo de *D. saccharalis* (FALCO; SILVA-FILHO, 2003; BRAGA et al., 2003), mas a eficiência destas táticas de controle ainda precisa ser confirmada e disponibilizada.

O Brasil é, atualmente, o maior produtor de açúcar de cana e de álcool combustível que tem se firmado como alternativa renovável e pouco poluente ao petróleo. O mercado sucroalcooleiro movimenta cerca de 12,7 bilhões de reais por ano com vendas de açúcar, álcool, aguardente e subprodutos da cana (O Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE, 2008), por constituir um mercado de expressão na economia brasileira, preocupações com a qualidade e a produtividade são constantes no setor.

S. frugiperda, conhecida também como lagarta-do-cartucho-do-milho, lagarta-militar ou lagarta-dos-milharais, é a principal praga da cultura do milho (CRUZ, 1995) e causa prejuízos econômicos consideráveis a uma série de culturas como cana-de-açúcar e

algodão (DEGRANDE, 1998), arroz (BOTTON et al., 1998; PEREIRA; CALAFIORI, 1989), amendoim (ISIDORO; DE ALMEIRA; PEREIRA, 1997), soja (MOSCARDI; KASTELIC, 1985), sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997), trigo (TAKAHASSHI et al., 1980), alfafa, abóbora, batata, couve, espinafre, feijão, repolho e tomate (CRUZ; MONTEIRO, 2004). *S. frugiperda* ocorre em quase todo o continente americano, mas, não apresenta mecanismos de diapausa e, portanto, não é capaz de sobreviver continuamente em regiões de clima temperado.

Na cultura do algodão, principalmente nas regiões produtoras dos cerrados, as injúrias causadas por *S. frugiperda* podem ser diagnosticadas desde a emergência até a fase de maturação. As lagartas recém eclodidas desta praga raspam o parênquima foliar, enquanto as lagartas pequenas e médias, por sua vez, geralmente, raspam a epiderme das brácteas dos botões florais, flores e maçãs antes de perfurarem estas estruturas reprodutivas. Desde modo, *S. frugiperda* pode causar sérios prejuízos à produção em decorrências dos danos causados às maçãs do algodão (DEGRANDE, 1998).

A diferença na preferência alimentar entre *D. saccharalis* e *S. frugiperda* e o conhecimento do processo digestivo e nutricional destes insetos são questões científicas interessantes. A caracterização da diversidade de microrganismos do trato digestivo pode fornecer subsídios para elucidar algumas destas questões. O trato digestivo pode ainda ser um nicho para prospecção de novos microrganismos e enzimas que podem auxiliar na decomposição de várias moléculas. Embora alguns insetos produzam celulases, acredita-se que os microrganismos do tubo digestivo tenham um papel importante na quebra desta de lignina e celulose, especialmente em insetos cuja dieta é pobre em nitrogênio e rica em fibras.

Estudos recentes mostraram que bactérias celulolíticas estão presentes em espécies de cerambicídeos, mas, não em espécies de escolitídeos (DELALIBERA; HANDELSMAN; RAFFA, 2005; VASANTHAKUMAR et al., 2007), embora as espécies estudadas desenvolvam-se em troncos de árvores. A dieta das espécies investigadas é significativamente diferente, sendo que os cerambicídeos se alimentam exclusivamente de madeira e os escolitídeos de seiva e fungo. Desta forma, aquelas espécies que se alimentam de substrato rico em lignocelulose podem conter microrganismos com características

desejáveis para incorporação em processos industriais, objetivando a decomposição de resíduos ricos em celulose. Celulose é um constituinte importante de resíduos lignocelulósicos renováveis, como o bagaço de cana, uma importante fonte com potencial para produção de glicose, para alimentação animal e produção de álcool combustível. Uma importante limitação no uso de materiais lignocelulósicos é o alto custo da produção de celulases (GADGIL et al., 1995). Vários microrganismos são capazes de sintetizar celulases, mas muito poucos têm demonstrado alto potencial industrial (GUPTA; MADAMWAR, 1997), sendo um dos motivos a dificuldade da hidrólise da lignina.

Além da importância econômica de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, estes insetos são modelos interessantes para o estudo da participação da microbiota do tubo digestivo em importantes aspectos fisiológicos e ecológicos dos seus hospedeiros. *D. saccharalis* alimenta-se de um número restrito de plantas hospedeiras enquanto *S. frugiperda* é um inseto polífago. *D. saccharalis* é sensível à proteína Cry1Ac inserida em plantas transgênicas (BRAGA et al., 2003), assim como a inibidores de proteinase do tipo Bowman Birk e Kunitz (POMPERMAYER et al., 2003). Por outro lado, *S. frugiperda* não é susceptível a Cry1Ac e é capaz de adaptar-se, fisiologicamente, a estes inibidores (PAULILLO et al., 2000).

O trato digestivo de insetos pode ser uma importante fonte de novos microrganismos e genes com potencial de utilização industrial e farmacêutica. O trato digestivo de alguns insetos apresenta câmaras com características distintas de pH, nível de oxigênio e populações de microrganismos que podem funcionar como reatores; contribuindo para produção de energia e decomposição de material lignocelulósico, como observado em cupins e besouros que vivem no tronco de arvores e se alimentam de material rico em celulose. Estes microrganismos podem ter utilização, por exemplo, na produção de glicose a partir de bagaço de cana, para produção de etanol.

As bactérias florescem dentro destes organismos em habitats naturais caracterizados por amplas flutuações de diferentes fatores como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes. As bactérias adquiriram um grau alto de plasticidade nas suas respostas fisiológicas às mudanças do ambiente. Assim, a expressão dos genes relacionados com a produção de enzimas é diretamente influenciada pelas mudanças ambientais onde a bactéria

se desenvolve e resulta em variações drásticas da atividade enzimática (HERBERT, 1961; ELLWOOD; TEMPEST, 1969; MELLING; BROWN, 1975).

Estes mecanismos reguladores podem operar ao nível do citoplasma bacteriano, controlando a atividade enzimática envolvida, segundo a natureza da molécula da enzima e o substrato onde os microrganismos estão crescendo (MONOD; CHANGEUX; JACOB, 1963). Este tipo de controle é útil para os microrganismos por ter a capacidade de regular a síntese das enzimas a nível genético, e poder controlar a produção de acordo com as condições do ambiente. Isto é alcançado, através de mecanismos reguladores como indução, repressão (JACOB; MONOD, 1961) e repressão catabólica (MAGASANIK, 1961), evitando uma produção e gasto de energia desnecessário.

A técnica de crescimento contínuo em meio de cultura permite vislumbrar estas variações na produção das enzimas, permitindo mostrar a pressão seletiva de diferentes isolados, um crescimento e produção enzimática em ambientes simulados. Em geral, isto permite uma maior compreensão do comportamento microbiano num contexto ecológico, sendo que a maioria dos trabalhos que usam o crescimento contínuo de microrganismos nas mesmas condições ambientais em situações diferentes obtém uma resposta do organismo às condições particulares. Porém, a transição entre um estado e outro é um passo fisiológico importante nos microrganismos, que pode permitir induzir a produção de enzimas de interesse (CARLSSON; ELANDER, 1973; ELLWOOD; HUNTER; LONGYEAR, 1974).

A prospecção da produção de enzimas por microrganismos tem grande potencial e esta diretamente relacionada com a mudança da dependência de recursos não renováveis de alto custo como o petróleo, (LYND et al., 1991). Com a obtenção de combustíveis alternativos, podem-se diminuir as emissões de gás carbônico, responsável por mais da metade das alterações que desencadearam a mudança climática. Conversão bioquímica de madeira ou resíduos agrícolas em etanol, isto parece ser um das opções mais eficientes por utilizar todos os componentes básicos da biomassa, que resultam num combustível que pode ser misturado com gasolina (etanol - gasolina: 15 - 85%), sendo que este novo sistema pode utilizar a infra-estrutura do combustível de transporte atual.

Pré-tratamento de substratos lignocelulolíticos, é essencial para a hidrólise enzimática eficiente, por causa das várias barreiras físicas e químicas que inibem, acentuadamente, a acessibilidade do substrato celuloso pelas enzimas degradadoras. Pré-tratamento a vapor e hidro-termólise eram dois dos métodos usados no pré-tratamento para prover a recuperação da maioria da hemicelulose derivada do açúcar, afração fácil da lignina pela extração de álcali e a produção de um resíduo de celulose que era, prontamente, hidrolisado através de enzimas celulolíticas. A maioria dos métodos de pré-tratamento resultou em um aumento dos rendimentos de glicose enzimática, porém, ao comparar a efetividade do pré-tratamento, baseado em dados de literatura de grupos diferentes, é difícil, pelo uso de vários substratos celulolíticos (BELTRAME et al., 1991).

O custo de enzimas usado para a sacarificação de resíduos celulolíticos, ainda é a parte mais cara de um processo de bio-conversão global baseado em hidrólise enzimática e, como resultado, atenção considerável tem sido dada ao uso de enzimas obtidas de microrganismos para a sacarificação de substratos lignocelulolíticos no pré-tratamento. Embora, ainda não haja nenhum mecanismo claro do mecanismo pelo qual estas enzimas promovem a degradação enzimática. Estas enzimas permitem aproveitar materiais como a lignina, que é o componente da madeira, com o conteúdo de calor alto (26.3 MJ, kg de OD) e contribui com 16-33% do peso da biomassa. A recuperação de lignina e sua utilização é crítica e a viabilidade econômica da produção de etanol, sendo que, com aproximadamente 1 kg de lignina é co-produzido um litro de etanol por um processo de hidrólise enzimática. O impacto positivo de co-produção, até mesmo se só uma fração de lignina disponível é utilizada, é significante (MEISTER, 1996).

Por outro lado, um grande avanço nos estudos da ecologia microbiana foi dado com a aplicação de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA total extraídos diretamente de ambientes naturais, sem necessidade de cultivar microrganismos (MUYZER; SMALLA, 1998; ARMANN; LUDWIG, 2000; ØVERÅS, 1997; MUYZER; WAAL; UITTERLINDER, 1993; ZHOU et al., 2004, KEMP; ALLER, 2004). Os estudos moleculares tornaram-se possíveis a partir de Pace et al., (1986), pioneiros em análises de comunidades microbianas utilizando informações de seqüências de nucleotídeos do gene

que codificam o RNA ribossômico 16S (rDNA), um gene muito conservado, encontrado em todas as células procariotas.

Uma das técnicas utilizadas para avaliar as estruturas das comunidades microbianas, através da variabilidade das seqüências de rDNA 16S, é o DGGE (Gel de eletroforese em gradiente desnaturante), método desenvolvido por Muyzer, Wall e Uitterlinder (1993). O DGGE consiste na separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, obtidos por amplificação de uma região específica de um gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de uréia e formamida. O padrão de migração desses fragmentos (amplicons) no gel é resultado da composição de nucleotídeos dos mesmos e seu teor G+C (LAMBAIS et al., 2005). A técnica de DGGE não é suficiente para determinar e identificar diretamente as espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al., 2006). Para tanto, é necessário fazer a excisão do amplicon do gel e seqüenciá-lo (LAMBAIS et al., 2005).

O sequenciamento do rDNA 16S a partir de amostras ambientais tem contribuído para o conhecimento da diversidade e da estrutura das comunidades de procariotos nos mais diferentes ambientes (SINGLETON, et al., 2001; LAMBAIS et al., 2005; KEMP; ALLER, 2004), revelando que a diversidade microbiana é muito maior do que se imaginava (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; PACE, 1997; ZHOU et al., 2004; KEMP; ALLER, 2004). A análise de comunidades microbianas, pode ser realizada através do sequenciamento de clones de rDNA 16S, que se baseia na amplificação de um fragmento específico do rDNA 16S, a partir do DNA metanogênico, utilizando-se iniciadores específicos: clonagem desses amplicons em vetores apropriados e sequenciamento dos insertos. Umas das limitações da utilização de PCR para obtenção de clones representativos de uma comunidade é a amplificação preferencial de algumas subpopulações mais abundantes em detrimento das menos abundantes. Esta técnica, que possibilita a estimativa da diversidade microbiana de um ambiente, tem permitido a identificação de parâmetros ambientais (poluição, manejo agrícola, etc.) que afetam essa diversidade (NÜBEL et al., 1999).

As informações geradas a partir do sequenciamento de rDNA 16S representam uma grande quantidade de dados que precisa ser processada com auxílio de algoritmos específicos (LAMBAIS et al., 2005), que podem ser utilizados para diferentes tipos de

análises. A avaliação da diversidade e a comparação de comunidades de procariotos são baseadas no grau de similaridade entre seqüências de rDNA 16S, as quais são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) ou filotipos (NÜBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). Normalmente seqüências de rDNA 16S com similaridades maiores do que 97% são consideradas como sendo da mesma espécie, muito embora, esse nível de similaridade não tenha consenso na literatura (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; KEMP; ALLER, 2004; NÜBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). A estimativa da diversidade baseada em OTUs deve ser cautelosamente interpretada, já que os níveis de similaridade entre as seqüências de rDNA 16S para definição de OTUs não são consensuais. No entanto, o uso de UTOs é apropriado para comparar riqueza relativa quando se avalia seqüências de rDNA 16S de uma mesma região ou de mesmo tamanho (STACH et al., 2003).

Informações geradas a partir do sequenciamento de genes de rDNA 16S, podem ser comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (GeneBank do NCBI) para determinação do organismo com seqüência mais similar e suas possíveis funções no ambiente do qual foram obtidas (LAMBAIS et al., 2005), e o Ribossomal Database Project II, o qual permite a determinação das relações filogenéticas das seqüências de rDNA 16S obtidas com seqüências depositadas. Por meio dessas seqüências, também é possível comparar comunidades microbianas de ambientes diferentes. Para isso foi criado o programa S-LibShuff (HTTP://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-LibShuff.html), o qual foi utilizado para determinar as dissimilaridades entre duas ou mais bibliotecas de rDNA 16S (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004).

Métodos paramétricos e não-paramétricos vêm sendo muito utilizados para estimar a riqueza de espécies microbianas em amostras ambientais (BOHHANNAN; HUGHES, 2003; GASTON, 1996; CHAO; SHEN; HWANG, 2006; SHEN; CHAO; LIN, 2003). Modelos paramétricos são muito eficientes para avaliar a abundância relativa de UTOs em amostras relativamente grandes. Por tanto, este método é recomendado para estimar diversidade de microrganismos que são dominantes necessitando de grandes quantidades de dados para suportar os modelos de abundância. Em contraste, métodos não-paramétricos foram desenvolvidos para estimar diversidade a partir de pequenas amostras da comunidade considerando as espécies raras, presentes uma ou duas vezes por amostra e não depende do

conhecimento prévio do tipo de distribuição de freqüência de ocorrência dos microrganismos (KEMP; ALLER, 2004).

Os estimadores não-paramétricos mais utilizados para avaliar a diversidade de espécies microbianas são o Chaol e o ACE (Abundance-Based Coverage Estimator). O primeiro utiliza o número de espécies raras para estimar a riqueza de UTOs (BOHANNMAN; HUGHES, 2003), considerando os filotipos que apareceram uma ou duas vezes dentro de uma biblioteca determinada. O segundo separa as espécies em grupos raros e abundantes e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade não-conhecida (CHAO; LEE, 1992), estimando o número total de filotipos em um ambiente. Este estimador é recomendado para amostras que contém uma maior abundância de indivíduos da mesma espécie (KEMP; ALLER, 2004). A riqueza de espécies é um dos componentes dos índices de diversidade que é utilizado para compreensão do funcionamento de uma comunidade complexa. Os índices de diversidade consistem nas relações entre o número de espécies que compõem a comunidade e o número de indivíduos de cada população (MARGALEF, 1958).

Foram objetivos deste trabalho a Identificação dos microrganismos associados ao tubo digestivo de larvas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, caracterizando através de métodos microbiológicos tradicionais e por métodos moleculares as populações de microrganismos associados e identificar aqueles que possuem a capacidade para degradar deferentes fontes de carbono na tentativa de determinar a sua função na digestão destes insetos e o potencial para utilização na decomposição de resíduos ricos em lignocelulose.

Referências

ARMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA- targered nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.

AYRES, M.P.; WILKENS, R.T.; RUEL, J.J.; LOMBARDERO, M.J.; VALLERY, E. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. **Ecology,** Washington, DC, v. 81, n. 8, p. 2198-2210, 2000.

BELTRAME, P.L.; CARNITI, P.; VISCIGLIO, A.; FOCHER, B.; MARZETTI, A. Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Bioresource Technology,** Essex, v. 39, p. 165-172, 1991.

BOHHANNAN, B.J.M.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282-287, 2003.

BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1997) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v. 27, p. 207-212, 1998.

BRAGA, D.P.V. **Caracterização de duas variedades de cana de açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína cry1A(B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera : Crambidae)**. 2001. 71p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, Philadelphia, v. 5, p.209-222, 2003.

BRAND, J.M.; BRACKE, J.W.; MARKOVETZ, A.J.; WOOD, D.L.; BROWNE, L.E. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. **Nature**, London, v. 254, p. 136-137, 1975.

BRIDGES, J.R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. **Microbial Ecology,** New York, v. 7, p. 131-137, 1981.

CARLSSON, J.; ELANDER, B. Regulation of dextransucrase formation by *Streptococcus sanguis*. **Caries Research**, Basel, v.7, p. 89-101, 1973.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of Laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 117-128, 2006.

COORDENAÇÃO BNDES e CGEE. Bioetanol de Cana-de-açucar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 2008. cap. 6, p. 151-169. Disponível em: http://www.bioetanoldecana.org. Acesso em : 16 set. 2009

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivares e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do Sorgo. **Anais de Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v.26, p. 407-410, 1997.

CRUZ, I. **A lagarta do cartucho do milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; MONTERO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*.** Sete Lagoas: EMBRAPA-Milho e Sorgo, 2004. 4p. (Comunicado técnico, 98.).

DELALIBERA, Jr. I.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae)**. Environmental Entomology,** College Park, v. 34, p. 541-547, 2005.

DEGRANDE, P.E. **Guia prática de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados: UFM, 1998. 60p.

DOWD, P.F. Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifyinenzymes. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 9, p. 149-161, 1992.

ELLWOOD, D.C.; TEMPEST, D.W. Control of Teichoic Acid and Teichuronic Acid Biosyntheses in Chemostat Cultures of Bacillus subtilis var. niger. **Biochemistry Journal**, London, v. 111, p. 1-5, 1969.

ELLWOOD, D.C.; HUNTER, J.L.; LONGYEAR, V.M.C. Growth of Streptococcus mutans in a chemostat. **Archives Oral Biology**, London, v. 19, p. 659-664, 1974.

FALCO, M.C.; SILVA FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in trangenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.41, p. 761-766. 2003.

GADGIL, N.J.; DAGINAWALA, H.F.; CHAKRABARTI, T; KHANNA, P. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 10, p. 942-946, 1995.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA, N.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.B.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN,

J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO. C. **Manual de entomologia agrícola**. 10.ed. Piracicaba: FEALQ. 2002. 920p.

GASTON, K.J. Species richness: measure and measurement. In: GASTON, K. J., **Biodiversity:** A biology of numbers and difference. Cambridge: England: Blackwell, 1996. p. 77-113.

GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, New York, v. 13, n. 4, p. 166-169. 1997.

HERBERT, D. **Symposium Society for General Microbiology Proceedings**, Marlborough, v. 11, p. 391-416, 1961.

ISIDORO, R.; DE ALMEIRA, R.P.; PEREIRA, J.O.V. Consumo foliar de *Spodoptera frigiperda* em amendoim cultivares Tatu e CNPA BR-1. **Revista de Oleagionosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.1, p. 37-42, 1997.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal Molecular Biology**, Boston, v. 3, p. 318-356, 1961.

JOYNT, J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C.H. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 51, p. 209-219, 2006.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us, **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 47, p. 161-177, 2004.

KROKENE, P.; SOLHEIM, H. Pathogenicity of four blue - stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 39-44, 1998.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. chap. 4. p. 43-84.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 8228-8235, 2005.

LYND, L.R; CUSHMAN, J.H.; NICHOLS, R.J; WYMAN, C.E. Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass. **Science**, Washington DC, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323, 1991.

MARGALEF, R. Information theory in ecology. **Genetic Systematic**, New York, v.3, p. 36-71, 1958.

MAGASANIK, B. Catabolite Repression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 26 p. 249-256, 1961.

MEISTER, J.J. Chemical Modification of Lignin. In: DAVID, N.; HON, S. **Chemical modifications of lignocellulosic material.** New York: Marcel Dekker, 1996. chap 5. p. 129-157.

MELLING, J.; BROWN, A. Sensitivity of *Pseudomonus aeruginosa* to Polymyxin B sulphate and EDTA: Role of the Divalent Cation of the Growth Medium. **Society for General Microbiology Proceedings**, Marlborough, v. 3, p. 68-69, 1975.

MONOD, J.P.; CHANGEUX; JACOB, F. Allosteric proteins and cellular control systems. **Journal of Molecular Biology**, Boston, v. 6, p. 306–329, 1963.

MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. 1985. Ocorrência de vírus depoliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja, PR. In: **EMBRAPA. Centro Nacionalde Pesquisa de Soja. Resultados de pesquisa de soja**. Londrina. SC. Brasil. 1984/85. p.128. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 15).

MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of degradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 422-443, 1999.

OHKUMA, M; KUDO, T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environment Microbiology,** Washington, DC, v. 62, p. 461-468, 1996.

ØVERÅS, L; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromitic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCRamplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 1-55, 1986.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, DC, v. 276, p. 734-740, 1997.

PARRA, J.R.P. Controle das principias pragas da cana de açúcar. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA. E.M. de (Ed.). **Produção de cana de açúcar**. Piracicaba: FEALQ. 1993. p. 184-197.

PAULILLO, L.C.; LOPES, R.A.; PLÍNIO, T.C.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA FILHO, M.C. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, 892–896, 2000.

PEREIRA, M.C.C.F.; CALAFIORI, M.H. Prejuízos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) na cultura do arroz (Oriza sativa L.). **Ecosistema**, Espirito Santo do Pinhal, v. 14, p.193-196, 1989.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 109, p.217-224, 2003.

ROE, A.D.; WELLER, S.J.; BAIXERAS, J.; BROWN, J.; CUMMINGS, M.P.; DAVIS, D.R.; KAWAHARA, A.Y.; PARR, C.S.; REGIER, J.C.; RUBINOFF, D.; SIMONSEN,T.J; WAHLBERG, N.; ZWICK, A. Evolutionary framework for Lepidoptera model systems. In: GOLDSMITH, M.R.; MAREC F. (Ed.) **Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera.** Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010. Unpublished. chap. 1, p. 1-19. In press.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Interaction of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n.9, p. 5485-5492, 2004.

SGRILLO, R.B. **Desenvolvimento de modelo matemático para população da broca da cana de açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974) e simulação da técnica do indivíduo estéril. 1979**. 189p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.

SHEN, T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, n. 3, p. 798-804, 2003.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, AND WHITMAN, W.B Quantitative comparisons of 16S r RNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; MASSON, D.G.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine

sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 6189-6200, 2003.

TAKAHASSHI, M.K.; NAKANO, O.; ORSI, J.R. Avaliação de danos causados por Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidóptera – Noctuidae) em cultura de trigo. **Solo**, Piracicaba, v.72, p.43-44, 1980.

VASANTHAKUMAR, A.; CARDOZA, Y.; DELALIBERA Jr., I.; SCHLOSS, P.D. HANDELSMAN, J.; KLEPZIG, K. D.; RAFFA, K. F. Gut Bacteria of Bark and Wood Boring Beetles In: **WORKSHOP ON GENETICS OF BARK BEETLES AND ASSOCIATED MICROORGANISMS**,3., 2007. Asheville, North Carolina, USA: Proceedings Fort Collins: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, CO, 2007. p.49–51.

ZHOU, J.; XIA, B.; HUANG, H.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J. M. Microbial Diversity and Heterogeneity in Sandy Subsurface Soils. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, DC, v.70, n.3, p. 1723-1734, 2004.

2 BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO MESÊNTERO DE *Spodoptera frugiperda* E *Diatraea saccharalis* E CAPACIDADE DESTAS EM DEGRADAR CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

Resumo

A diversidade de bactérias do mesêntero da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* e da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae e Noctuidae) foi determinada por isolamento em meio de cultura TSA (Triptona de Soja Agar) e sequenciamento parcial da região 16S do RNA ribossômico. As lagartas de *D. saccharalis* foram coletadas nas variedades de cana-de-açúcar SP83-2847, SP83-5054, RB84-5210, RB86-7515, RB93-5744, RB72-454, SP81-3250, SP91-1049, RB86-5035 nos municípios paulistas de Bocaina, Tanabi e Luís Antônio e *S. frugiperda* oriundas dos híbridos de milho Pioneer 30F90 e DowAgroScience 2B710, de Piracicaba. Foram utilizadas 10 lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* por variedade de cana totalizando 90 lagartas e 20 de *S. frugiperda* por variedade de milho, totalizando 40 lagartas, sendo a microbiota de cada lagarta avaliada individualmente. As bactérias isoladas foram testadas quanto à capacidade de degradação de celulose, hemicelulose, lignina e bagaço de cana. Foram isoladas 140 colônias de bactérias de *D. saccharalis* e 108 de *S. frugiperda* que resultaram na identificação de 59 e 52 unidades taxonômicas operacionais (UTO), respectivamente. A comunidade bacteriana das duas espécies de insetos foi composta na maioria por representantes de Firmicutes e também por Proteobacteria e Actinobacteria. O maior número de sequências de bactérias cultiváveis pertence aos gêneros *Bacillus* (26,4 e 32.4%, em *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, respectivamente) *Enterococcus* (12,1 e 13%) e *Microbacterium* (18 e 12%). Somente bactérias isoladas de *D. saccharalis* apresentaram resposta positiva nos testes de degradação *in vitro* para celulose, hemicelulose, lignina e bagaço de cana. Somente duas bactérias apresentaram resposta positiva nos testes de degradação para todas estas fontes de carbono. Estas apresentam seqüência de rRNA 16S semelhantes a *Phyllobacterium trifolii* e *Bacillus subtilis*. A capacidade destes microrganismos de degradar celulose foi maior do que hemicelulose e poucos produziram enzimas para degradar lignina. As bactérias que apresentaram a maior capacidade de degradação de celulose (halos de inibição ≥ 2cm) são agrupadas próximo a *Microbacterium paraoxydans e Bacillus licheniformis.*

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho-do-milho; Broca da cana-de-açúcar; Microbiota intestinal; Bagaço de cana; Lignina; Hemicelulose; Celulose

2 MIDGUT CULTURABLE BACTERIA FROM *Spodoptera frugiperda* AND *Diatraea saccharalis* AND THEIR ABILITY TO DEGRADE CELLULOSE, HEMICELLULOSE AND LIGNIN

Abstract

Midgut bacterial diversity from fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and from sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) was determined by isolation on the Tryptic Soy Agar medium (STA) and identified by partial sequencing of the 16S ribosomal RNA region. *D. saccharalis* caterpillars were collected from sugarcane varieties SP83-2847, SP83-5054, RB84-5210, RB86-7515, RB93-5744, RB72-454, SP81-3250, SP91-1049, RB86-5035 from the following cities of São Paulo state: Bocaina, Tanabi and Luís Antônio. *S. frugiperda* caterpillars were collected from Piracicaba, SP feeding on corn, varieties Pioneer 30F90 and DowAgroScience 2B710. Ten *D. saccharalis* caterpillars from the fifth instar were used per sugarcane variety, totaling 90 caterpillars. Twenty *S. frugiperda* caterpillars on the fifth instar were used per corn variety, totaling 40 caterpillars. The microbiota community of each caterpillar was evaluated individually. The ability of bacterial isolates to degrade cellulose, hemicellulose, lignin and sugarcane bagasse was determined. From *D. saccharalis* and *S. frugiperda* bacteria community, 140 and 108 colonies were isolated, resulting in the identification of 59 and 52 operational taxonomic units (OTU), respectively. The bacterial community of both insect species is composed mainly by Firmicutes representatives and also by Proteobacteria and Actinobacteria. The greatest number of cultivable bacteria sequences belongs to genera *Bacillus* (26.4 and 32.4%, in *D. saccharalis* and *S. frugiperda*, respectively), *Enterococcus* (12.1 and 13%) and *Microbacterium* (18 and 12%). Only bacteria isolated from *D. saccharalis* had ability to degrade cellulose, hemicelluloses, lignin and sugarcane bagasse in the *in vitro* tests. The only two bacteria presenting a positive response to degradation of all carbon sources were clustered with *Phyllobacterium trifolii* and *Bacillus subtilis*. The ability to degrade cellulose was more common than the ability to degrade hemicelullose and just a few isolates had the ability to degrade lignin. The bacteria presenting the greatest ability to degrade cellulose, shown by inhibition halos greater than 2 cm, clustered with sequences closely related to the species *Microbacterium paraoxydans* and *Bacillus licheniformis*

Keywords: Fall armyworm; Sugarcane borer, Gut microbes, Sugarcane bagasse, Lignin, Hemicellulose; Cellulose

2.1 Introdução

A diversidade da microbiota intestinal dos insetos pode ser bastante variável, com alguns insetos apresentando uma comunidade simples, composta de poucas espécies até comunidades bastantes complexas. A riqueza de espécies e a abundancia relativa destas, provavelmente está

diretamente ralacionada com a estrutura do trato digestivo, o pH, a condição redox, o hábito alimentar e as enzimas digestivas relacionadas (BIGNELL, 1995). O trato digestivo constitui um reservatório enorme e quase inexplorado de relações simbióticas complexas, que podem permitir a compreensão de processos bioquímicos e fisiológicos nos insetos (STEINHAUS, 1960), abrigando microrganismos que resultam da sua exposição ao ambiente externo, os quais podem ser transientes, crescer ou ser digeridos por enzimas e excretados (WALKER et al., 1999). Podem também ter uma associação duradoura, exercendo funções importantes na nutrição, desevolvimento, resistência a patógenos e reprodução do hospedeiro (DILLON & DILLON, 2004).

A adequação dos métodos para estimar a diversidade da microbiota vai depender da complexidade das comunidades. Em geral, a diversidade dos microrganismos cultiváveis é menor que a dos não cultiváveis. Técnicas moleculares são fundamentais para a identificação dos organismos não cultiváveis e trouxeram um grande avanço no entendimento das interações que ocorrem em comunidades complexas (WALKER et al., 1999). Esta diversidade é determinada pela riqueza e abundância relativa (equitatividade) de espécies. Estes fatores refletem pressões seletivas que amoldam os microrganismos presentes no trato digestivo, os quais constituem um reservatório enorme e quase inexplorado de relações simbióticas. O entendimento destas relações podem permitir a compreenção de processo bioquímico e fisiológico dos insetos. Desta forma, é necessário que os microrganismos sejam estudados dentro de um contexto ecológico como importantes componentes do sistema (STEINHAUS, 1960).

Dentro dos estudos de funcionalidade da microbiota, está bem estabelecida a relação entre espiroquetas que fornecem carbono, nitrogênio e a energia necessária para a nutrição de cipins via acetogênese e fixação de nitrogênio (BREZNAK et al., 2002). A degradação microbiana de compostos aromáticos de plantas pode ocorrer no trato intestinal de cupins e pode contribuir com o requerimento de carbono e energia para o inseto (BRUNE et al., 1995). Enzimas digestivas de alguns insetos podem ser derivadas da microbiota, porém existem poucos estudos que mostram a contribuição da produção de enzimas pelos microrganismos no trato digestivo nos insetos (DILLON; DILLON, 2004).

Em Lepidópteros, devido à falta de estruturas especializadas e ao fluxo rápido do alimento, alguns pesquisadores acreditam que a contribuição na nutrição e digestão pelos microrganismos

seja pouca (BIGNELL; EGGLETON, 1995). Em contra posição, Cambell (1990), afirma que os microrganismos exercem uma função fundamental, já que o perfil metabólico da digestão dos insetos pode se definir pelas suas relações simbióticas com microrganismos, podendo contribuir na transformação de macromoléculas em nutrientes essenciais. Assim, faz-se necessária uma caracterização da microbiota intestinal aeróbica e anaeróbicas usando técnicas convencionais e moleculares, permitindo conhecer a diversidade de gêneros presentes. No caso das principais espécies bacterianas cultiváveis que são capazes de produzir proteases, o crescimento em meio de cultura permite isolar, identificar e caracterizá-las (BRENNAN et al 2004).

Enzimas são necessárias para degradação da parede celular dos tecidos, como é o caso da celulose, que é o componente principal das plantas e por isso é o material orgânico mais abundante na natureza. A maioria dos materiais celulolíticos contém três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Estas moléculas são quebradas pela ação de um grande diversidade de bactérias e fungos que as utiliza como fonte de energia (GOKSØYR, et al., 1975).

A celulose é um polímero linear de 8000-12000 unidades de glicose, dispostas em moléculas paralelas mantidas unidas por pontes de hidrogênio. Estas fibras são, além disso, cristalinas e na madeira estão revestidas por lignina. Não só o tipo de acoplamentos, mas também a composição biológica inteira e faz deste um bom material estrutural que dá força e rigidez à planta. Porém, são exatamente estas propriedades que tornam as plantas resistentes ao ataque enzimático e a descomposição de materiais lignocelulolíticos (HAMADA et al., 1999).

A procura por novas matérias-primas renováveis para a produção de energia e comida gerou um grande interesse na hidrólise enzimática de materiais lignocelulolíticos. A vantagem principal desta hidrólise enzimática é que a reação pode ser levada a cabo em condições relativamente moderadas; não requerendo temperaturas e pressões altas ou valores de pH extremos. Também o processo é mais específico, sem a decomposição dos açúcares produzidos (STERNBERG e DORVAL, 1979).

Entretanto, a tarefa de desenvolver um processo biotecnológico economicamente viável para a produção de açúcares fermentáveis a partir de celulose não é fácil. Não obstante, pesquisa intensiva durante os últimos anos conduziu a uma maior comprenção da bioquímica da hidrólise

enzimática da celulose. Embora alguns detalhes ainda não sejam compreendidos, as características principais do processo são conhecidas.

A hidrólise microbiana da celulose nativa é determinada por três tipos de enzimas, endo 1,4-β-D-glucanase, exo-1,4-β-D–glucanase, e β-glicosidases (HAMADA et al., 1999; GOKSØYR et al., 1975) que atuam de forma complementar. Alguns microrganismos excretam quantias grandes de enzimas celulolíticas em meio de cultura, outros, ainda crescendo em celulose, excretem pouca ou nenhuma enzima no meio de cultura. No caso de enzimas que agem em substratos macromoleculares insolúveis como a celulose, as enzimas devem ser excretadas para fora da bactéria, ou podem estar ligadas à superfície de célula. Embora muitas espécies de bactérias possam sintetizar enzimas celulolíticas, só algumas são eficientes o bastante para serem de interesse industrial.

Uma série de bactérias celulolíticas Gram-positivas e Gram-negativas tem sido estudadas, em especial algumas espécies aeróbicas como *Myxobacteria, Actinomycetes, Pseudomonas* e anaeróbias facultativas como *Bacillus* e *Cellulomonas.* Uma bactéria amplamente estudada é a *Cellulomonas uda* (SRINIVASAN, 1975). Observações microscópicas de culturas desta bactéria, mostraram que ela liga-se firmemente às fibras de celulose, o que sugere que as enzimas celulolíticas são liberadas pelo contato da bactéria com o material.

A hidrólise enzimática da hemicelulose é mais fácil que a da celulose e a lignina. A hemicelulose e celulose são moléculas muito grandes para serem utilizadas como fonte energética direta para os microrganismos. Acredita-se que moléculas intermediárias menores possam ter um papel importante na ativação dos genes das hemicelulases (ARO; PAKULA; PENTILLA, 2005).

Nas espécies *Aspergillus nidulans* e *Trichoderma reesei*, observou-se que a presença das hemicelulose (xilana, arabinana, e manana), assim como outros componentes derivados de açúcares de cadeia longa, como galactose e manose provocam a alta produção de hemicelulases (MARGOLLES-CLARK; ILME; PENTTILA, 1997). Já no caso da lignina, em geral, a expressão de genes lignolíticos é induzida pela restrição de alguns nutrientes como nitrogênio, carbono ou enxofre. Assim, acredita-se que a expressão destes genes é vista como resposta ao estresse de nutrientes.

Diante disto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota cultivável do trato digestivo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* e inferir sobre o potencial destes na degradação de celulose, hemicelulose, lignina e bagaço de cana.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Coleta das lagartas:

2.2.1.1.1 *D. saccharalis*

Coletas de lagartas foram realizadas entre fevereiro e março de 2008, nas seguintes cidades do estado de São Paulo: Tanabi (Usina Guarani – Açúcar e Álcool), Bocaina (Usina Santa Cândida – Açúcar e Álcool Ltda.) e Luís Antônio (Central Energética Moreno Açúcar e Álcool Ltda.) (Figura 2.1). Dentro de cada localidade, foram selecionados para amostragem, campos com variedades diferentes de cana (Figura 2.2 A). As coletas foram feitas com o apoio do pessoal responsável pelo monitoramento de pragas para determinação do momento adequado para liberação do parasitóide *Cotesia flavipes* e aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Controle Biológico), nas áreas plantadas com cana-de-açúcar. Desta forma, evitou-se áreas onde eram feitas aplicações de produtos químicos para controle de pragas, o que poderia influenciar o conteúdo e as características da microbiota no trato digestivo.

Foram amostradas áreas representativas das variedades de cana: SP83-2847 (6 meses após o terceiro corte), SP83-5054 (12 meses após o primeiro corte), RB84-5210 (12 meses após o primeiro corte) e SP79-1011 (8 meses após o quinto corte) em Bocaina/SP; RB86-7515 (2 meses após o segundo corte), RB83-5054 (5 meses após o terceiro corte), RB93-5744 (13 meses após o primeiro corte), RB72-454 (6 meses após o primeiro corte) e RB85-5453 em Tanabi/SP; SP800185 (9 meses após o terceiro corte), RB83-5054 (10 meses após o segundo corte), SP81-3250 (11 meses após o sétimo corte), RB72-454 (7 meses após o sexto corte), RB72-2025 (12 meses após o terceiro corte), SP91-1049 (10 meses após o segundo corte), RB86-7515 (5 meses após o quarto corte), RB86-5035 (6 meses após o quinto corte) RB85-5453 (4 meses após o sétimo corte), RB83-5054 (3 meses após o primeiro corte) em Luís Antônio/SP.

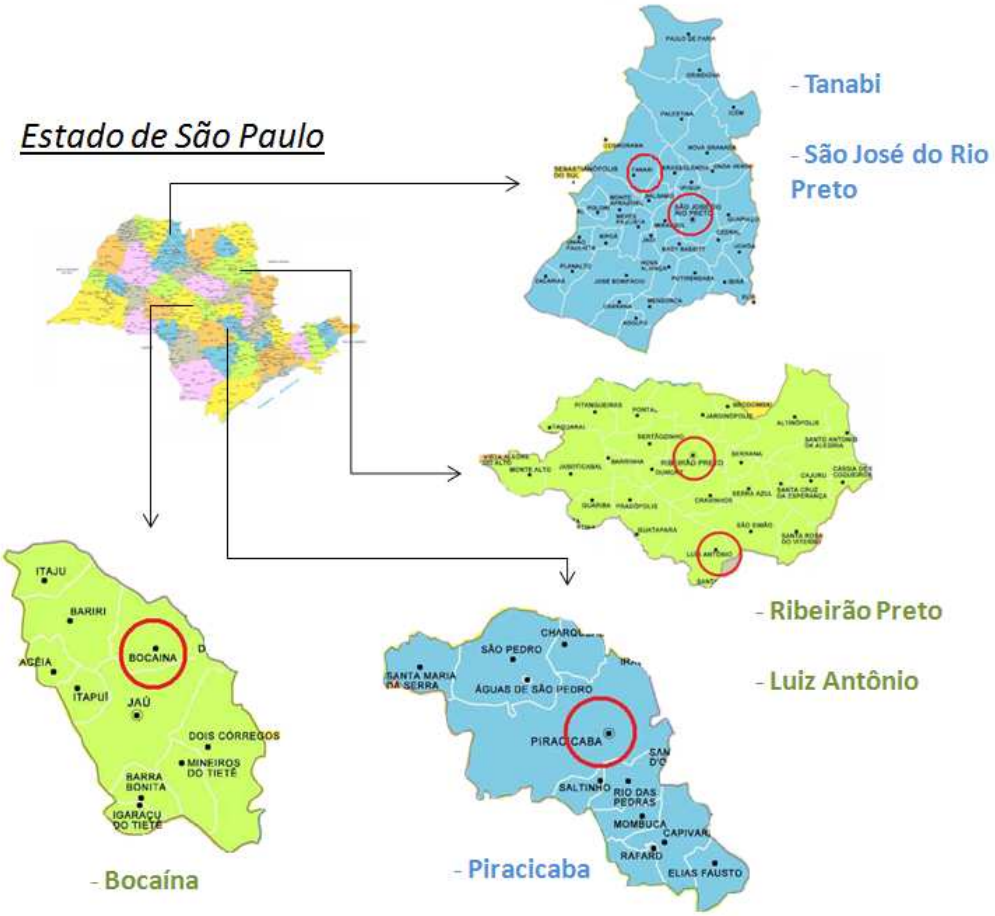


Figura 2.1 - Distribuição geográfica dos locais de coleta das lagartas de *Diatraea saccharalis*, em regiões canavieira do Estado de São Paulo

Em cada talhão, foram coletadas lagartas de *D. saccharalis* nos ínstares finais de desenvolvimento que foram mantdas em isopor com gelo no campo (Figura 2.2 B). Em laboratório, selecionou-se as lagartas de quinto ínstar, estimado pela medição da cápsula cefálica, sendo que aproximadamente 50% destas foram armazenadas junto com os toletes de cana para mantê-las vivas para isolamento dos microrganismos e os outros 50% foram transferidos para recipientes com álcool 70% para serem usadas nos estudos moleculares (DGGE e biblioteca de clones).

2.2.1.1.2 *S. frugiperda*

Foram realizadas coletas de lagartas de *S. frugiperda* nos ínstares finais de desenvolvimento na fazenda Areão da ESALQ – USP, em Piracicaba/SP em plantas de milho híbridos Pioneer 30F90 e DowAgroScience 2B710 no mês de março de 2008. Em laboratório, foram selecionadas as que se encontravam no quinto ínstar por meio da medição da cápsula cefálica. As lagartas coletadas em milho Pioneer 30F90 foram utilizadas diretamente para isolamento e também armazendas para estudos moleculares e as coletadas em DowAgroScience 2B710 foram usadas somente nos estudos moleculares.

2.2.1.2 Dissecação das lagartas

As lagartas foram processadas no laboratório (Figura 2.2 C) logo após a coleta para evitar a rápida decomposição do substrato alimentar pela ação de microrganismos como *Fusarium moliniforme* e *Colletotrichum falcatum* em cana (Figura 2.2 D). Dez lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* das variedades de cana-de-açúcar SP83-2847, SP83-5054, RB84-5210, RB86-7515, RB93-5744, RB72-454, SP81-3250, SP91-1049, RB86-5035 (90 lagartas no total) e 20 lagartas de *S. frugiperda* das plantas de milho da ESALQ (Pioneer 30F90 e DowAgroScience 2B710) (40 lagartas em total); foram desinfectadas superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio 2% por um minuto (Figura 2.2 E)

Após a esterilização superficial, os insetos passaram por três lavagens sequenciais em água destilada estéril para a retirada do excesso de hipoclorito de sódio. Os insetos foram dissecados dentro de uma câmara de fluxo laminar usando tesouras de dissecação finas e pinças (Figura 2.2 F). O mesêntero foi então colocado em tubos de microcentrífuga de 1,5mL contendo 900µL de solução de NaCl 0,5% estéril. O mesêntero foi macerado com um micro-pistilo de plástico para retirar os microrganismos da parede do tubo digestivo.

2.2.1.3 Isolamento de bactérias cultiváveis do trato digestivo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*

Os microrganismos cultiváveis foram obtidos após diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-6}) e inoculação de 100µL em meio TSA – Triptona de Soja Agar, que é um meio geral para isolamento de microrganismos. As placas de Petri foram incubadas à 28ºC em câmara climatizada tipo B.O.D. de três a sete dias (cuja variação dependeu da taxa de crescimento dos microrganismos presentes). Após diversos re-isolamentos, colônias puras foram obtidas (Figura

2.2 G). As bactérias do mesêntero de cada lagarta foram categorizadas com base na morfologia das colônias (forma, elevação, opacidade, pigmentação, etc.) e por meio de observações microscópicas (Figura 2.2 H-I), e então quantificadas nas maiores diluições contáveis para cada morfotipo. Pelo menos uma colônia de cada morfotipo de cada inseto foi armazenada a -20°C ou -80ºC em tubos tipo Eppendorf de 1,5mL, contendo 500µL de solução de glicerina 17%. Todos os morfotipos diferentes e alguns morfotipos semelhantes entre as diferentes lagartas foram identificados por sequenciamento parcial da região do rRNA 16S.

2.2.1.4 PCR e sequenciamento das bactérias cultiváveis

Depois de realizada a extração do DNA das colônias puras dos microrganismos com o Kit *InstaGene* Genomic DNA, seguindo recomendações do fabricante, foi feita a amplificação por PCR utilizando os iniciadores universais de eubactéria 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). Para as reações de PCR de 50µL foram adicionados os seguintes ingredientes: 20µL de DNA, 1,5µL de cada iniciador (primer – 0,3µM), 1µL dNTPs (0,2mM), 0,5µL de Taq polimerase (2,5 unidades) e 5µL de tampão (1X) para Taq DNA Polimerase (10mM Tris-HCl - pH 8,4) (50mM KCl), 1,5µL de $MgCl_2$ (1,5mM) e 19µL de água mili-q. As condições das reações foram: 95°C por 3 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 1,5 min, e extensão final a 72°C por 10 min.

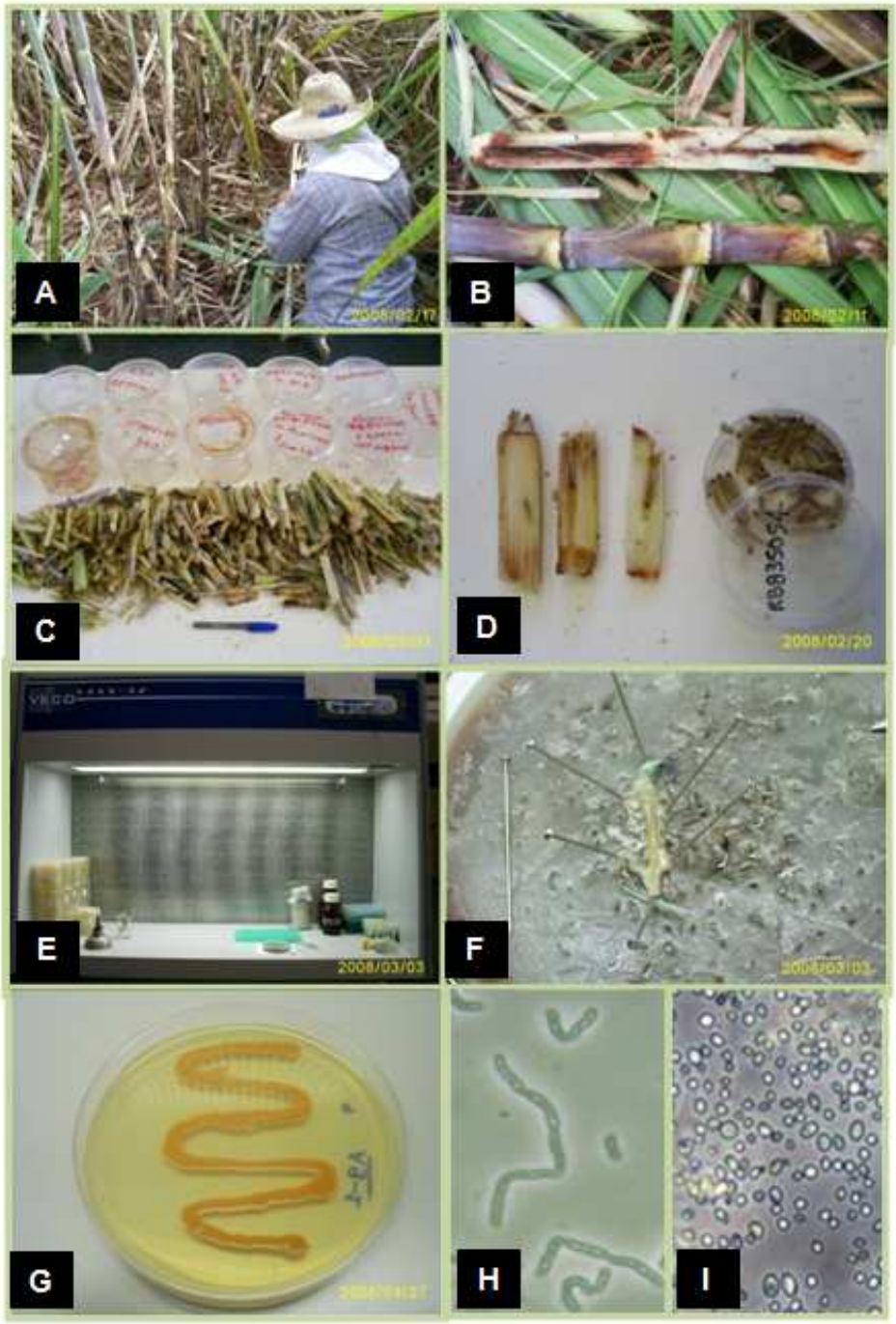


Figura 2.2 - (A) Coletas em campo, (B) Busca de lagartas no interior do caule da cana, (C-D) Processamento do material no laboratório, (E) Dissecação de lagartas, (F) Obtenção do mesêntero e plaqueamento de microrganismos em placas de Petri (Capela de fluxo laminar), (G) Colônia pura e (H-I) Observação das características ao microscópio

Para a confirmação da amplificação por PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% na voltagem de 100V (7,5V/cm), juntamente com o marcador molecular Low Range 100pb DNA Ladder (Norgen®). Os produtos de PCR foram purificados usando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®).

Em seguida foi realizado o sequenciamento da região amplificada usando apenas o iniciador UN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). As reações de sequenciamento foram feitas no Laboratório de Biotecnologia Agrícola da ESALQ-USP no aparelho 3100 Genetic Analyzer.

2.2.1.5 Análises das seqüências do rRNA

As sequências obtidas dos fragmentos de rRNA 16S das bactéria foram analisadas pelo programa PhredPhrap (EWING; GREEN, 1998), removendo-se as seqüências do vetor e as bases de baixa qualidade. Somente sequências contendo qualidade >20, apresentando 1 erro a cada 100 bases lidas, foram consideradas para análises posteriores. A afiliação taxonômica das seqüências foi feita comparando-se as seqüências de rRNA 16S com as seqüências depositadas no Ribossomal Database Project (http:// rdp.cme.msu.edu) (versão 9.42), utilizando-se o programa RDPquery http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdpquery.htm) e o software MEGAN (HUSON et al., 2007).

O número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foi determinado utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004). Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X 1.83 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) com os parâmetros "gap-opening penalty" de 10.0 e "gap-extention penalty" de 0,1. O alinhamento foi utilizado para calcular uma matriz de distância evolutiva pelo DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de Jukes-Cantor (CHAO; SHEN–http://evolutiongenetics.washington.edu/phyilip.html).

As estimativas de riqueza de UTOs, considerando distância evolutiva de 0.03 para definição de UTOs, foram feitas pelo programa SPADE, utilizando os métodos não-paramétricos ACE (Abundance-based Coverage Estimator) e Chaol (CHAO; SHENhttp://chao.stat.nthu.edu.com). Os índices de diversidade de Shannon e recíproco de

Simpson e a cobertura de amostragem também foram determinados utilizando-se o programa SPADE.

2.2.1.6 Avaliação *in vitro* da produção de enzimas por microrganismos com a capacidade de degradar substratos celulolíticos, hemicelulolíticos e lignoliticos

Todos os morfotipos que foram isolados e identificados de cada lagarta de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* nas diferentes variedades e localidades foram testados quanto à capacidade de degradação de celulose, hemicelulose e lignina (como fontes de carbono). Os microrganismos foram inoculadas em placas de Petri com meio basal (MB) + suplemento (fonte de carbono). Cada vez que os ensaios de degradação foram conduzidos incluiu-se um microrganismo controle cuja capacidade de degração do substrato testados era conhecida. O microrganismo utilizado como controle para degradação de celulose foi *Bacillus pumilus – Cepa CL16* (Lima, et al., 2005.) e para a degradação de celulose e hemicelulose foi usado *Trichoderma reesei* (HENRISSAT et al., 1985). Todos os testes foram feitos em triplicata.

2.2.1.6.1 Meio basal (MB)

O meio base usado é composto por solução convencional de sais 4,3 g/Lt (Murashige Sigma M5524) + 2% de Agar + substrato para avaliação da atividade enzimática (celulose, hemicelulose ou lignina) e pH 7,0.

2.2.1.6.2 Atividade celulolítica

No meio MB, foi incluído 0,5% de celulose (Carboximetilcelulose, baixa viscosidade SIGMA-ALDRICH), inoculando-se os diferentes microrganismos, sendo estes deixados em crescimento por 18 horas a 37°C em câmara climatizada tipo B.O.D. Após o crescimento de cada microrganismo neste meio, a placa foi submetida a uma coloração com vermelho do congo 0,1% por 15 minutos, depois lavada várias vezes com cloreto de sódio 1M, preenchida depois com ácido acético 5% por 30 segundos e finalmente feita uma lavagem final com cloreto de sódio 1M EDTA por três horas (GAMUNDI et al., 1989).

O ensaio mostra a atividade das β-D-Glucanases usando um substrato solúvel (carboximetil celulose) em água. Após adição do vermelho do congo, o meio adquire a cor característica do corante, e depois das sucessivas lavagens, é possível visualizar a zona de

hidrólise (zona sem cor) pela presença de um halo diáfano ao redor da colônia. As zonas de hidrólise se estabilizam inundando as colônias com a solução de ácido acético, que muda a cor do meio (celulose – degradada) para azul violáceo (GAMUNDI et al., 1989).

2.2.1.6.3 Atividade hemicelulolítica

No meio MB foi adicionado 0,2% de hemicelulose (Xilano, Birchwood. SIGMA ALDRICH), inoculando-se em cada placa os microrganismos, sendo deixados em crescimento por 18 horas a 37°C em luz contínua em câmara climatizada tipo B.O.D. Após o crescimento de cada microrganismo neste meio, a placa foi inundada com uma solução de iodo 2% e os xilanos não degradados adquirem uma coloração escura, no entanto, a região da hemicelulose degradada, manifesta-se com um halo bem definido, claro e diáfano, ao redor da colônia (GAMUNDI et al., 1989).

2.2.1.6.4 Atividade Lignolitica

No meio MB foi fornecido 1% de lignina comercial (Lignina alcalina, SIGMA-ALDRICH), inoculando-se os diferentes microrganismos, sendo estes deixados em crescimento por 18 horas a 37°C na luz em câmara climatizada tipo B.O.D. Após o crescimento de cada microrganismo neste meio, a placa foi inundada com uma solução de $FeCl_3$ (1%) e $K_3Fe(CN)_6$ numa proporção de 1:1, deixando-se no escuro por 15 minutos. A lignina não degradada fica de uma cor azul-esverdeado; no entanto, a desfenilização do produto se vislumbra como uma região de cor amarelo-verde ao redor e abaixo da colônia (GAMUNDI et al., 1989).

2.2.1.6.5 Produção enzimática em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar

O meio de verificação da produção enzimática usado foi composto por 2% de bagaço de cana moído e peneirado (1,19 mm) como única fonte de carbono e 1,6% de Agar. Foram selecionados para estudo apenas os microrganismos que apresentaram os maiores índices de degradação para celulose, hemicelulose e lignina. Os microrganismos foram mantidos em crescimento por 18 horas a 37°C na luz em câmara climatizada tipo B.O.D. Para visualização da degradação de lignina no bagaço foi adicionado no meio Guaiacol 2% (CINÉTICA), como indicador de atividade enzimática lignolítica. A oxidação do guaiacol em tetraguaiacol gera um halo de hidrolise claro (BOERGE, 1997). Já para avaliação da atividade de celulose e

hemicelulose no meio com bagaço, foram adicionados 10 ml da solução de 5 % de iodo e 10% de iodeto de potássio. Estes indicadores reagem com celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos (amido, glicogênio e dextrinas) (HANKIN et al., 1975).

2.2.1.7 Escala estimativa para avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi quantificada de acordo com o tamanho da zona de degradação (hidrólise ou oxidação) segundo adaptação da escala proposta por NAZARENO et al., (2008). O diâmetro do halo de degradação foi medido em três posições da colônia. A média de três medições por colônia de três colônias de cada morfotipo foi então calculada.

Parâmetros de quantificação (adaptado de Nazareno et al., 2008)

Diâmetro da zona de hidrólise* (Cm)	Sigla
Forte (≥ 2)	†††
Moderada (< 2 e > 1)	††
Fraca (≤ 1)	†
Igual ao tamanho da colônia	=
Sem hidrólise	-
Sem crescimento da bactéria no meio	θ

2.3 Resultados

2.3.1 Isolamento

Foram obtidas colônias puras dos microrganismos classificadas de acordo as suas características morfológicas (Figura 2.3). A densidade de microrganismos obtidos da região mesêntero de *D. saccharalis* variou de 1.900 a 1.370.000 unidades formadoras de colônias (UFC), já em *S. frugiperda* ocorreu uma variação ainda maior, de 133.000 a 7.360.000 UFC. O número de morfotipos de microrganismos cultiváveis por lagarta de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* provenientes do campo variou de 4 a 11 e 3 a 16, respectivamente.

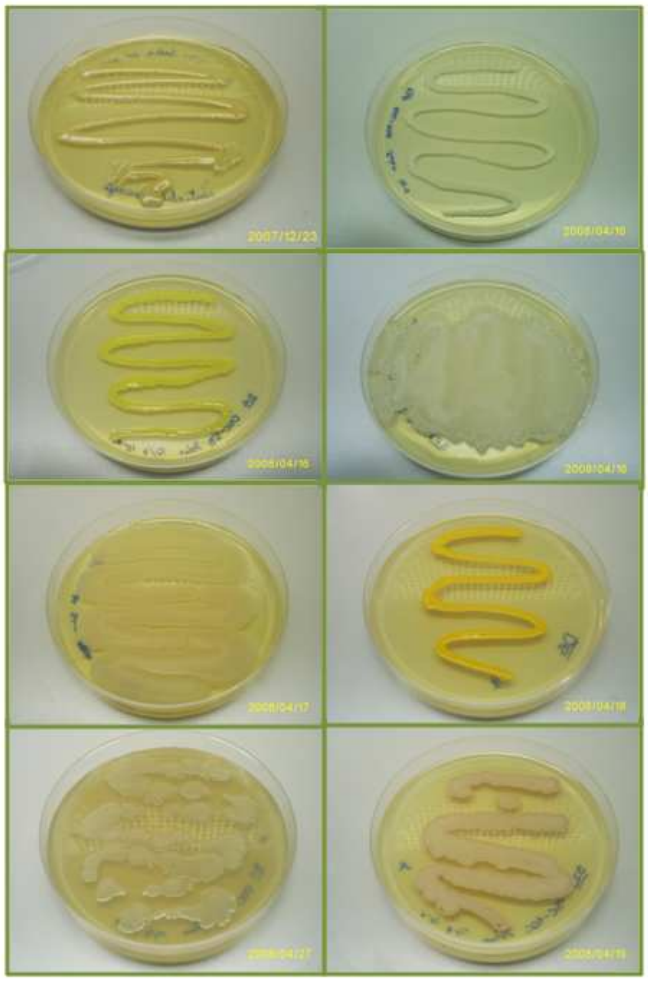


Figura 2.3 - Bactérias isoladas do mesêntero de *Diatraea saccharalis* (características morfológicas das colônias puras)

2.3.2 Identificação das bactérias cultiváveis por sequenciamento

As bactérias isoladas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* pertencem aos filos Proteobacteria, Firmucutes e Actinobacteria, sendo que Firmicutes representa 59,6% de todas as seqüências avaliadas de *D. saccharalis* e 49,3% das seqüências de *S. frugiperda* (Figura 2.4). Da mesma forma, a proporção de representantes do Filo Proteobacteria foi semelhante entre as duas espécies, sendo que mais de 70% destas seqüências classificadas na Classe Gamaproteobacteria seguido por Alfaproteobacteria e poucos representantes de Betaproteobacteria. A diversidade de bactérias cultiváveis encontradas em *D. saccharalis* foi maior do que em *S. frugiperda*. Em *D. saccharalis*, o maior número de sequências de bactérias cultiváveis pertence aos gêneros *Bacillus* (26,4%), *Enterococcus* (12.1%) e *Microbacterium* (18%). Em *S. frugiperda*, foi encontrado

predominantemente espécies de *Bacillus* (32.4%), *Enterococcus* (13%), *Microbacterium* (12%) (Figura 2.5).

Na figura 2.6 se observa que bactérias da família *Enterococcacea* e do gênero *Klebsiella* estiveram presentes no trato digestivo tanto de *D. saccharalis* quanto de *S. frugiperda*. Já dentro da família *Microbacteriaceae*, a distribuição dos gêneros foi claramente dividida, onde o gênero *Microbacterium* esteve presente só em *D. saccharalis* e o gênero *Leucobacter* só em *S. frugiperda*.

A riqueza de UTOs (D=0,03) das seqüências das bactérias cultiváveis obtidas de *D. saccharalis* foi de 59 e para *S. frugiperda* de 52, essas UTOs representam 42,1% do total de 140 seqüências e 48,1% do total de 108 seqüências, respectivamente. O índice de diversidade e a estimativa de riqueza foram calculados apenas para comparações estatísticas através do intervalo de confiança (95% de probabilidade) e revelou que estes parâmetros para bactérias cultiváveis (dados não apresentados) foram semelhantes para as duas espécies de insetos.

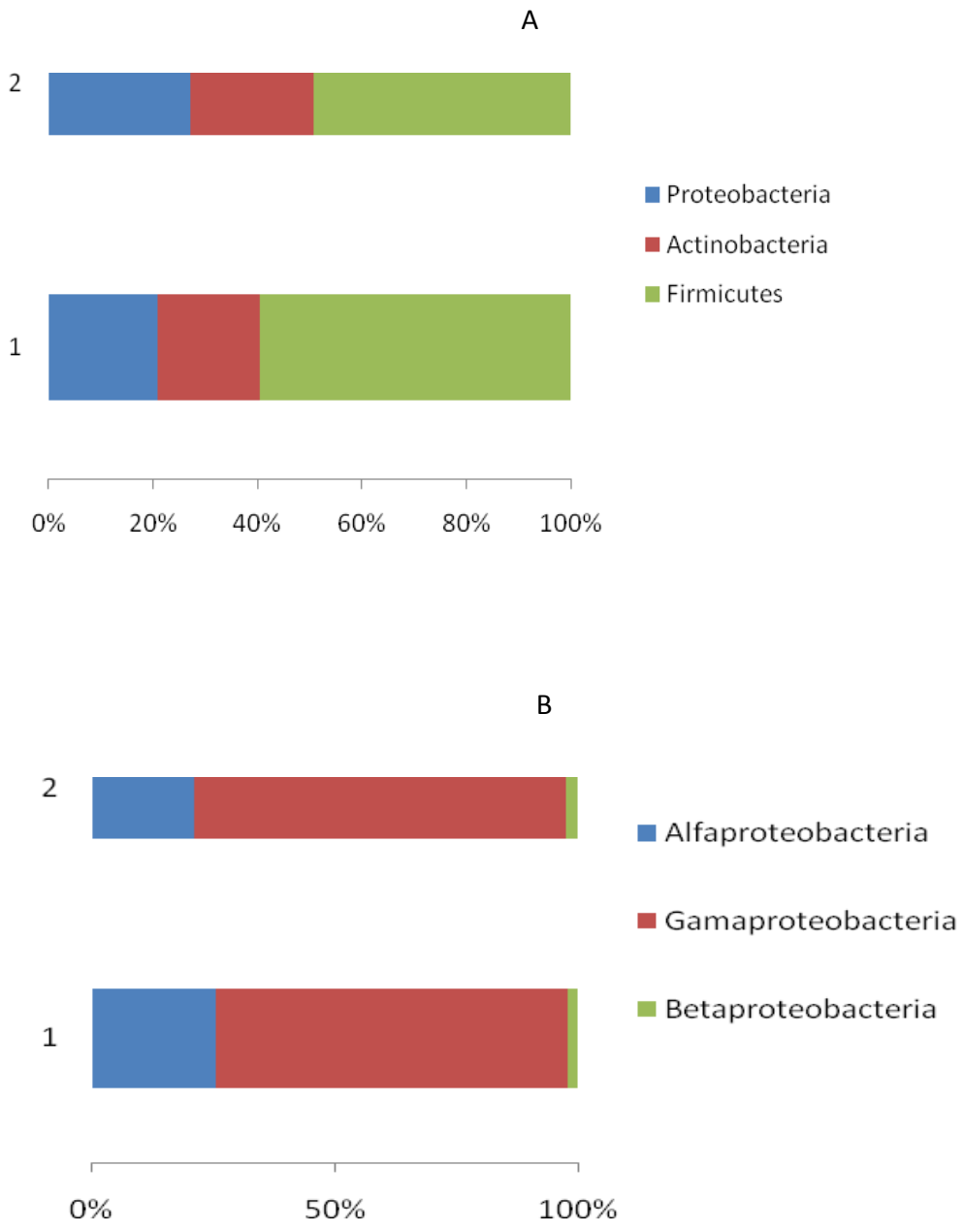
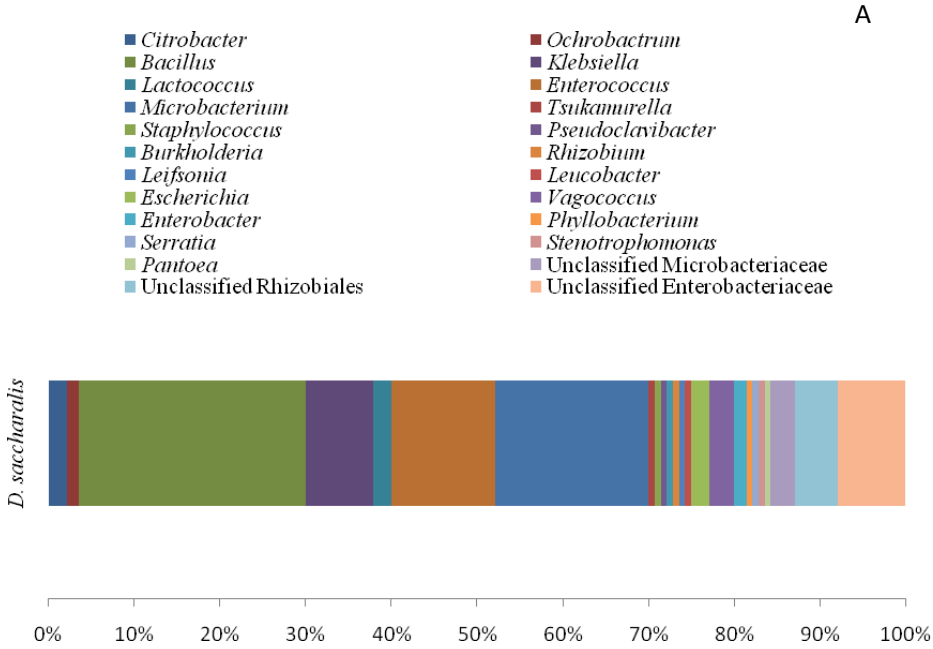


Figura 2.4 – Frequências relativas de sequências de rRNA 16S de bactérias cultiváveis nos diferentes filos (A) e classes de Proteobacteria (B) obtidas do mesêntero de *Diatraea saccharalis* (1) e *Spodoptera frugiperda* (2)



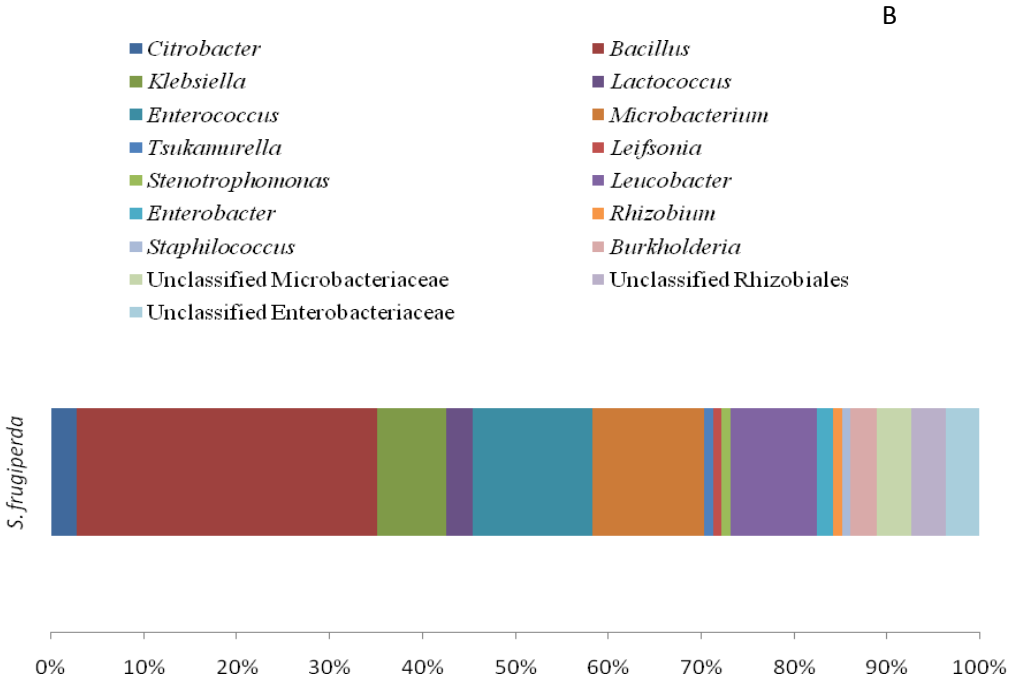


Figura 2.5 - Frequência relativa de bactérias cultivaveis identificadas por seqüências de rRNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* (A) e *Spodoptera frugiperda* (B)

2.3.3 Degradação enzimática de celulose, hemicelulose e lignina

Das 140 colônias de bactérias isoladas do trato digestivo de *D. sacharalis*, 26 consiguiram degradar algum dos substratos acrescidos ao meio como fonte de carbono (celulose, hemicelulose e lignina) (Tabela 2.1 e Tabela 2.2). Destas, 12 apresentaram um halo de degradação maior do que o tamanho da colônia (Figura 2.7). A capacidade destes microrganismos de degradar celulose foi maior do que hemicelulose e poucos produziram enzimas para degradar lignina. As bactérias que apresentaram a maior capacidade de degradação de celulose, com halos de inibição ≥ 2 cm, apresentam sequência de rRNA 16S semelhantes a *Microbacterium paraoxydans* e *Bacillus licheniformis*. Bactérias agrupadas próximo a *M. paraoxydans*, *Bacillus sp*., e *Bacillus thuringiensis* apresentaram uma degradação moderada de hemicelulose e as únicas bactérias que degradaram lignina foram identificadas como próximas a *Bacillus pumilus* e *Bacillus sp*. com uma fraca atividade enzimática (Tabela 2.1). Um isolado próximo a *Bacillus sp*., apresentou digestão de celulose, hemicelulose e lignina. Para o bagaço de cana, as únicas bactérias que apresentaram uma resposta positiva para o teste enzimático de lignina, apresentando hidrólise apenas na área da colônia, apresentaram sequências semelhantes a *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. paraoxidans* e *P. trifolli*

Nenhuma das 108 bactérias isoladas do trato digestivo de *S. frugiperda* (Tabela 2.3) apresentaram resultados positivos nas avaliações *in vitro* para produção enzimática quando celulose, hemicelulose e lignina e bagaço de cana foram adicionados ao meio de cultura.

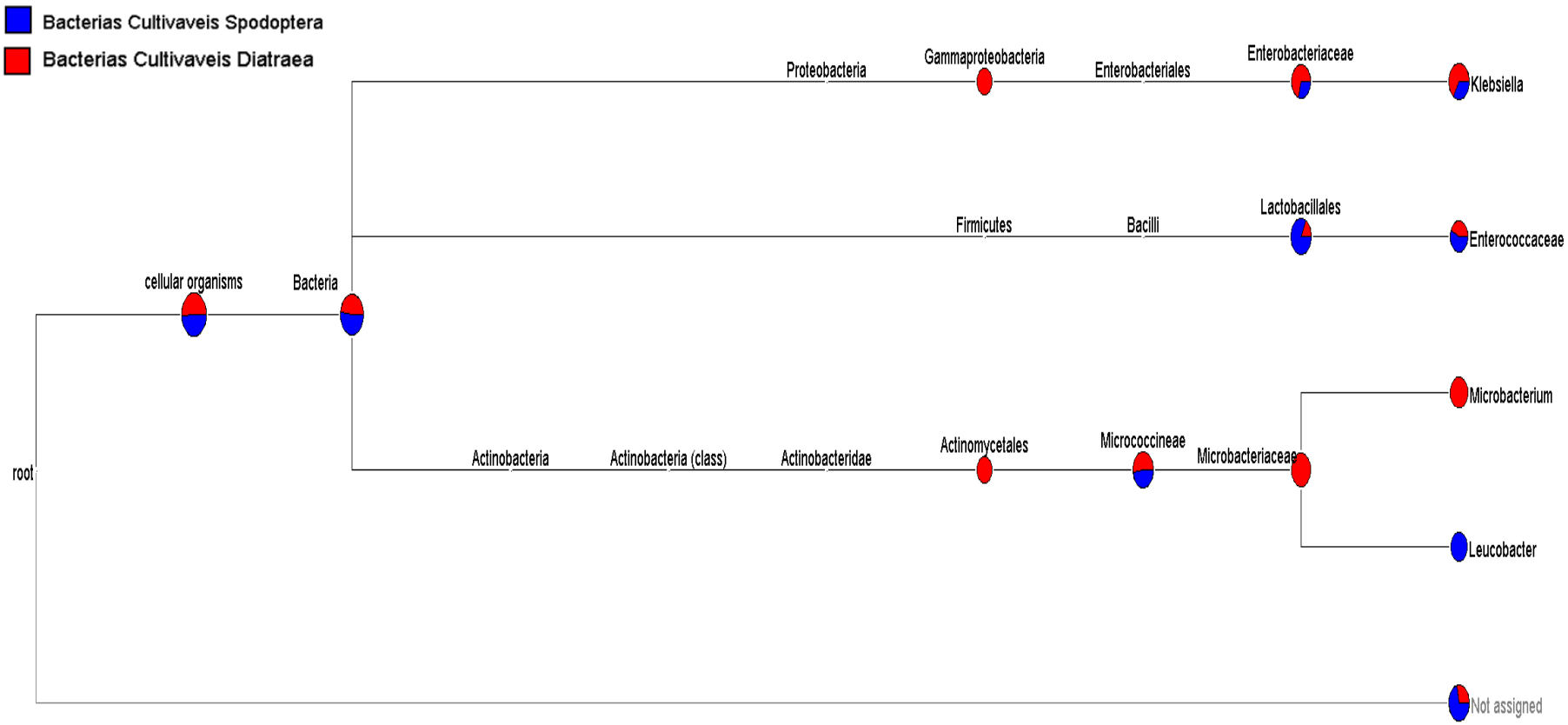


Figura 2.6 - Afiliação filogenética de sequências de rRNA 16S de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* pela comparação com a base de dados NCBI usando o software MEGAN

Tabela 2.1 Hidrólise *in vitro* de celulose, hemicelulose e lignina por bactérias isoladas do mesêntero de *Diatraea saccharalis*

Continua

Isolado	Afiliação filogenética	Celulose	Hemicelulose	Lignina
133	*Pantoea agglomerans*	=	-	-
115	*Escherichia coli*	=	-	=
136	*Ochrobactrum anthropi*	†	†	=
126	*Bacillus cereus*	†††	††	=
34	*Leifsonia sp.*	-	-	ϴ
7	*Bacillus cereus*	-	-	=
2	*Vagococcus sp.*	-	-	=
130	*Ochrobactrum anthropi*	-	-	ϴ
139	*Bacillus licheniformis*	†††	-	
48	*Lactobacillus plantarum*	-	††	-
6	*Enterococcus casseliflavus*	†	††	-
23	*Bacillus subtilis*	†	††	-
72	*Ochrobactrum antrhopi*	-	-	-
25	*Bacillus pumilus*	-	-	-
1	*Citrobacter farmeri*	=	††	
33	*Bacillus subtilis*	†	†	=
30	*Bacillus subtilis*	†††	††	
87	*Enterobacter hormaechei*	-	-	-
89	*Escherichia vulneris*	-	-	=
100	*Bacillus cereus*	-	††	
131	*Ochrobactrum grignonense*	-	-	-
8	*Enterococcus casseliflavus*	-	-	=
28	*Enterococcus italicus*	-	-	=
11	*Microbacterium testaceum*	-	-	=
52	*Stenotrophomonas maltophilia*	=	-	=
82	*Enterobacter sp.*	-	-	-
71	*Bacillus subtilis*	††	†††	=
56	*Bacillus pumilus*	†	†	=
43	*Bacillus cibi*	-	-	=
83	*Bacillus subtilis*	†	††	=
121	*Pseudoclavibacter helvolus*	-	-	-
112	*Enterococcus casseliflavus*	-	-	ϴ
27	*Phyllobacterium trifolii*	†	†	=
137	*Bacillus subtilis*	†	=	=
129	*Bacillus sp.*		-	
102	*Bacillus cereus*	†	†	-
85	*Bacillus thuringiensis*	†††	††	

Tabela 2.1 Hidrólise *in vitro* de celulose, hemicelulose e lignina por bactérias isoladas do mesêntero de *Diatraea saccharalis*

Conclusão

Isolado	Afiliação filogenética*	Celulose	Hemicelulose	Lignina
55	*Leifsonia aquatica*	-	-	-
132	*Bacillus pumilus*	=	-	-
51	*Bacillus cereus*	-	-	-
45	*Bacillus subtilis*	†	-	-
68	*Bacillus licheniformis*	-	-	-
66	*Microbacterium esteraromaticum*	=	†	-
49	*Bacillus cereus*	=	-	-
124	*Serratia marcescens*	=	-	ϴ
106	*Microbacterium paraoxydans*	=	-	=
118	*Microbacterium sp.*	=	-	=
90	*Enterobacter aerogenes*	-	-	ϴ
99	*Escherichia blattae*	-	-	-
113	*Microbacterium paraoxydans*	†††	††	ϴ
60	*Bacillus amyloliquefaciens*	-	-	=
41	*Bacillus cereus*	=	†	ϴ
122	*Bacillus sp.*	††	††	†
96	*Microbacterium paraoxydans*	†††	-	
88	*Bacillus thuringiensis*	†	††	
53	*Bacillus subtilis*	=	-	=
54	*Leucobacter iarius*	=	-	=
76	*Enterococcus gilvus*	-	=	=
57	*Bacillus licheniformis*	†††	†	=
110	*Ochrobactrum anthropi*	-	-	=
120	*Klebsiella oxitoca*	-	-	=
84	*Pantoea ananatis*	-	†	=
109	*Bacillus pumilus*	-	-	-
101	*Bacillus pumilus*	=	-	=
114	*Bacillus amyloliquefaciens*	=	-	=
104	*Bacillus pumilus*	=	-	-
103	*Bacillus subtilis*	=	†	-
40	*Vagococcus sp.*	-	-	-
42	*Bacillus pumilus*	††	-	†
123	*Bacillus subtilis*	†	†	-

*Afiliação filogenética dos microrganismos feita pelo NCBI (Similaridade acima de 97%)
Diâmetro da zona de hidrólise: ††† Forte (≥ 2cm), †† Moderada (< 2 e > 1cm), † Fraca (≤1cm), = igual ao tamanho da colônia, - nenhuma degradação, θ nenhum crescimento do microrganismo.

Figura 2.7 - Degradação de substratos lignocelulolíticos por enzimas produzidas por microrganismos obtidos do mesêntero de *Diatraea saccharalis*. Círculo central delimita área da colônia e círculo externo delimita o halo de inibição

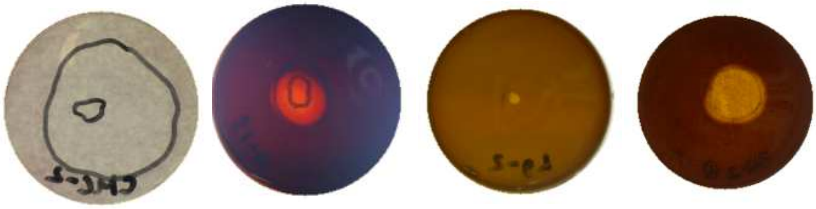
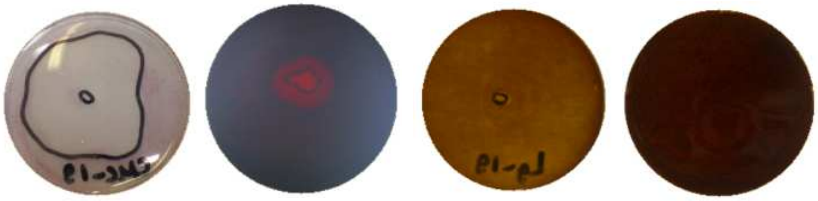
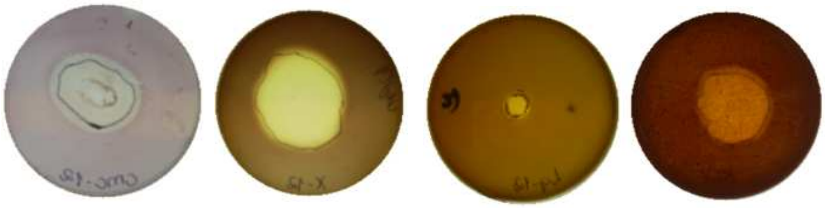
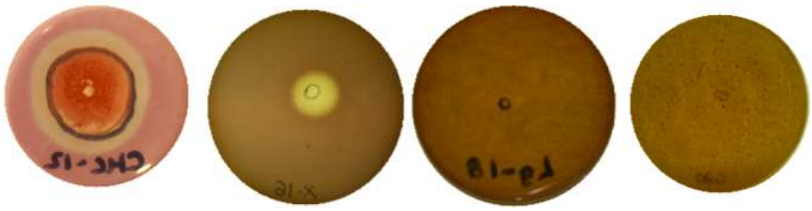
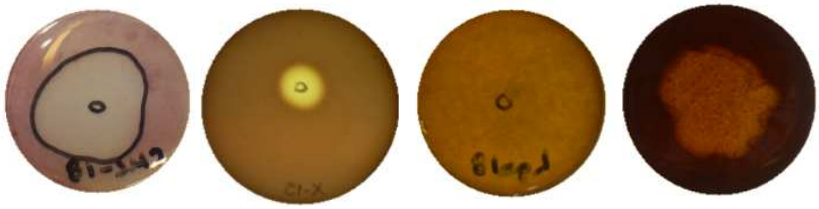
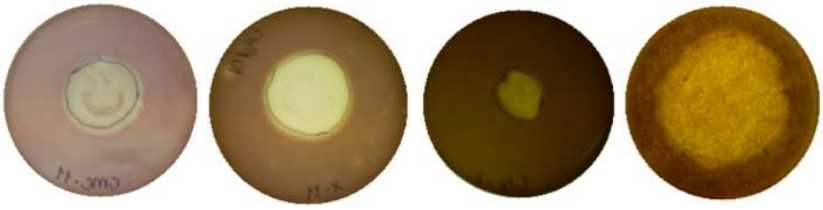
Isolado	**Afiliação filogenética**	**Substrato avaliado**			
		Celulose	**Hemicelulose**	**Lignina**	**Bagaço de cana**
10	*Bacillus cereus*				
21	*Bacillus subtilis*				
3	*Bacillus subtilis*				
62	*Bacillus thuringiensis*				
93	*Microbacterium paraoxydans*				
107	*Phyllobacterium trifolii*				

Tabela 2.2 – Composição das comunidades de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Diatraea saccharalis* identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continua

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
1	S000402904	1.26e-160	94	*Citrobacter*	
2	S000483704	0.00e+00	99	*Vagococcus*	
3	S000382403	0.00e+00	98	*Bacillus*	
4	S000387413	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Drancourt et al., 2001
5	S000430947	0.00e+00	99	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
6	S000437463	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
7	S000398710	0.00e+00	98	*Bacillus*	
8	S000407856	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
9	S000407856	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
10	S000388289	0.00e+00	98	*Bacillus*	
11	S000392953	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
12	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
13	S000026008	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen; He,. np 2007
14	S000141549	0.00e+00	94	Microbacteriaceae	
15	S000390575	0.00e+00	96	*Tsukamurella*	
16	S000437463	0.00e+00	94	*Enterococcus*	Fonty et al., 2007
17	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
18	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
19	S000334993	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
20	S000426019	1.26e-138	93	*Microbacterium*	
21	S000362580	0.00e+00	97	*Bacillus*	
22	S000344930	3.16e-170	96	Rhizobiales	
23	S000494966	0.00e+00	99	*Bacillus*	
24	S000333359	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
25	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
26	S000430947	0.00e+00	98	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
27	S000009662	0.00e+00	98	*Phyllobacterium*	
28	S000437463	0.00e+00	95	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
29	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
30	S000388289	0.00e+00	97	*Bacillus*	
31	S000402904	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
32	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
33	S000482230	0.00e+00	98	*Bacillus*	
34	S000436545	0.00e+00	98	*Leifsonia*	
35	S000141549	0.00e+00	95	Microbacteriaceae	
36	S000394170	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005

Tabela 2.2 – Composição das comunidades de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Diatraea saccharalis* identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
37	S000392953	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
38	S000478875	5.01e-166	93	*Enterococcus*	Lawes et al., 1994
39	S000478990	5.01e-137	93	*Enterococcus*	Manero; Blanch, 2002
40	S000483704	0.00e+00	99	*Vagococcus*	
41	S000416000	3.16e-154	96	*Bacillus*	
42	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
43	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
44	S000392953	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
45	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
46	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	
47	S000141549	0.00e+00	96	Microbacteriaceae	
48	S000437463	0.00e+00	97	*Lactococcus*	Ouoba et al., np 2008
49	S000483704	0.00e+00	95	*Bacillus*	
50	S000448048	2.51e-87	89	*Microbacterium*	
51	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
52	S000484401	0.00e+00	99	*Stenotrophomonas*	Luna et al., np 2008
53	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
54	S000324194	0.00e+00	97	*Leucobacter*	Somvanshi et al., 2006
55	S000009662	0.00e+00	98	*Leifsonia*	
56	S000495033	2.51e-171	93	*Bacillus*	
57	S000382403	0.00e+00	98	*Bacillus*	
58	S000333366	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
59	S000441081	5.01e-94	90	Enterobacteriaceae	
60	S000482230	0.00e+00	99	*Bacillus*	
61	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
62	S000398710	0.00e+00	97	*Bacillus*	
63	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Chopade et al., np 2007
64	S000418563	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Heylen et al., np 2006
65	S000387415	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Babu; Pandian; np 2004
66	S000484140	3.16e-116	91	*Microbacterium*	
67	S000026008	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
68	S000362578	0.00e+00	98	*Bacillus*	
69	S000247308	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
70	S000133483	5.01e-70	86	*Enterococcus*	Ueki et al., np 2007
71	S000494966	0.00e+00	99	*Bacillus*	
72	S000009662	0.00e+00	98	*Ochrobactrum*	
73	S000441075	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
74	S000483704	0.00e+00	99	*Vagococcus*	

Tabela 2.2 – Composição das comunidades de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Diatraea saccharalis* identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
75	S000402904	0.00e+00	98	*Citrobacter*	Mbengue et al., np 2003
76	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
77	S000448048	0.00e+00	95	*Microbacterium*	
78	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
79	S000334993	5.01e-150	94	*Microbacterium*	
80	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
81	S000248958	2.51e-151	94	*Microbacterium*	
82	S000378084	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
83	S000482230	0.00e+00	98	*Bacillus*	
84	S000407856	0.00e+00	98	*Pantoea*	Purohit et al., np 2003
85	S000494966	0.00e+00	96	*Bacillus*	
86	S000141549	0.00e+00	96	Microbacteriaceae	
87	S000440928	2.51e-25	89	*Enterobacter*	
88	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
89	S000495034	2.51e-155	95	*Escherichia*	
90	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
91	S000344930	0.00e+00	97	Rhizobiales	
92	S000438943	5.01e-61	97	*Staphylococcus*	
93	S000021091	2.51e-68	88	*Microbacterium*	
94	S000430947	0.00e+00	98	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
95	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
96	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
97	S000418562	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
98	S000418563	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Heylen et al., np 2006
99	S000362522	0.00e+00	95	*Escherichia*	
100	S000362580	0.00e+00	98	*Bacillus*	
101	S000411538	0.00e+00	98	*Bacillus*	
102	S000398710	0.00e+00	98	*Bacillus*	
103	S000392895	0.00e+00	94	*Bacillus*	
104	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
105	S000417566	5.01e-63	85	*Burkholderia*	
106	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
107	S000011610	0.00e+00	98	*Phyllobacterium*	
108	S000437463	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
109	S000278713	1.26e-73	85	*Bacillus*	
110	S000009662	0.00e+00	97	*Ochrobactrum*	
111	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
112	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003

Tabela 2.2 – Composição das comunidades de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Diatraea saccharalis* identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
113	S000392953	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
114	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
115	S000398710	0.00e+00	99	*Escherichia*	
116	S000344930	0.00e+00	99	Rhizobiales	
117	S000384829	2.51e-93	89	Enterobacteriaceae	Nochi et al., np 2007
118	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
119	S000387415	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
120	S000026008	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
121	S000382403	0.00e+00	98	*Pseudoclavibacter*	
122	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
123	S000437463	0.00e+00	99	*Bacillus*	Ouoba et al np 2008
124	S000453137	0.00e+00	98	*Serratia*	Wang, np 2009
125	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
126	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
127	S000026008	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
128	S000418563	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	
129	S000382403	1.00e-179	94	*Bacillus*	
130	S000410307	0.00e+00	97	*Ochrobactrum*	
131	S000011610	2.51e-149	90	*Ochrobactrum*	
132	S000483885	0.00e+00	98	*Bacillus*	
133	S000483704	0.00e+00	98	*Pantoea*	
134	S000333359	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
135	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
136	S000483704	0.00e+00	97	*Ochrobactrum*	
137	S000483704	0.00e+00	97	*Bacillus*	
138	S000441075	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	Heylen et al., np 2006
139	S000483885	0.00e+00	99	*Bacillus*	
140	S000483704	0.00e+00	98	*Vagococcus*	

[1] Número de acesso no banco de dados RDP. [2] Expectation-value. [3] Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. [4] Taxon definido com o programa RDP classifier. [5] Autores do trabalho no qual se originou a sequência de maior similaridade.

Tabela 2.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* identificadas por sequências de rRNA 16S.

Continua

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
1	S000402904	1.26e-160	94	*Citrobacter*	
2	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
3	S000382403	0.00e+00	98	*Bacillus*	
4	S000387413	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Drancourt et al., 2001
5	S000430947	0.00e+00	99	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
6	S000437463	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
7	S000398710	0.00e+00	98	*Bacillus*	
8	S000407856	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
9	S000407856	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
10	S000388289	0.00e+00	98	*Bacillus*	
11	S000392953	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
12	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
13	S000026008	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
14	S000141549	0.00e+00	94	Microbacteriaceae	
15	S000390575	0.00e+00	96	*Tsukamurella*	
16	S000437463	0.00e+00	94	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
17	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
18	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
19	S000334993	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
20	S000426019	1.26e-138	93	*Microbacterium*	
21	S000362580	0.00e+00	97	*Bacillus*	
22	S000344930	3.16e-170	96	Rhizobiales	
23	S000494966	0.00e+00	99	*Bacillus*	
24	S000333359	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
25	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
26	S000430947	0.00e+00	98	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
27	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
28	S000437463	0.00e+00	95	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
30	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
31	S000388289	0.00e+00	97	*Bacillus*	
32	S000402904	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
33	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
34	S000482230	0.00e+00	98	*Bacillus*	
35	S000436545	0.00e+00	98	*Leifsonia*	
36	S000141549	0.00e+00	95	Microbacteriaceae	

Tabela 2.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* identficadas por sequências de rRNA 16S

Continuação

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
37	S000394170	0.00e+00	99	*Klebsiella*	
38	S000392953	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
39	S000478875	5.01e-166	93	*Enterococcus*	Mold et al., 1994
40	S000478990	5.01e-137	93	*Enterococcus*	Manero; Blanch,. 2002
41	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
42	S000416000	3.16e-154	96	*Bacillus*	
43	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
44	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
45	S000392953	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
46	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
47	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	
48	S000141549	0.00e+00	96	Microbacteriaceae	
49	S000437463	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Ouoba et al., np 2008
50	S000483704	0.00e+00	95	*Bacillus*	
51	S000448048	2.51e-87	89	*Microbacterium*	
52	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
53	S000484401	0.00e+00	99	*Stenotrophomonas*	Luna et al., np 2008
54	S000398710	0.00e+00	99	*Bacillus*	
55	S000324194	0.00e+00	97	*Leucobacter*	Somvanshi et al., 2006
56	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
57	S000495033	2.51e-171	93	*Bacillus*	
58	S000382403	0.00e+00	98	*Bacillus*	
59	S000333366	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
60	S000333366	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
61	S000441081	5.01e-94	90	Enterobacteriaceae	
62	S000482230	0.00e+00	99	*Bacillus*	
63	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
64	S000398710	0.00e+00	97	*Bacillus*	
65	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Chopade B.A. et al., np 2007
66	S000418563	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Heylen, np 2006
67	S000387415	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ganesh; Pandian, np 2004
68	S000484140	3.16e-116	91	*Microbacterium*	
69	S000026008	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
70	S000362578	0.00e+00	98	*Bacillus*	
71	S000247308	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
72	S000133483	5.01e-70	86	*Enterococcus*	Ueki et al., np 2007
73	S000494966	0.00e+00	99	*Bacillus*	

Tabela 2.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* identficadas por sequências de rRNA 16S

Conclução

Isolado	Nº de acesso[1]	E-value[2]	ID(%)[3]	Afiliação filogenética[4]	Autor[5]
74	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
75	S000441075	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
76	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
77	S000402904	0.00e+00	98	*Citrobacter*	Mbengue et al., np 2003
78	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
79	S000448048	0.00e+00	95	*Microbacterium*	
80	S000009662	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
81	S000334993	5.01e-150	94	*Microbacterium*	
82	S000344930	0.00e+00	98	Rhizobiales	
83	S000248958	2.51e-151	94	*Microbacterium*	
84	S000378084	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
85	S000482230	0.00e+00	98	*Bacillus*	
86	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
87	S000494966	0.00e+00	96	*Bacillus*	
88	S000141549	0.00e+00	96	Microbacteriaceae	
89	S000440928	2.51e-25	89	*Rhizobium*	
90	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	
91	S000495034	2.51e-155	95	*Bacillus*	
92	S000407856	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Purohit et al., np 2003
93	S000344930	0.00e+00	97	Rhizobiales	
94	S000438943	5.01e-61	97	*Staphylococcus*	
95	S000021091	2.51e-68	88	*Microbacterium*	
96	S000430947	0.00e+00	98	*Lactococcus*	Ennahar et al., 2003
97	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Rasche et al., np 2005
98	S000009662	0.00e+00	98	*Microbacterium*	
99	S000418562	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
100	S000418563	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Heylen et al., np 2006
101	S000362522	0.00e+00	95	*Bacillus*	
102	S000362580	0.00e+00	98	*Bacillus*	
103	S000411538	0.00e+00	98	*Bacillus*	
104	S000398710	0.00e+00	98	*Bacillus*	
105	S000392895	0.00e+00	94	*Bacillus*	
106	S000483704	0.00e+00	99	*Bacillus*	
107	S000417566	5.01e-63	85	*Burkholderia*	
108	S000483704	0.00e+00	98	*Bacillus*	

[1] Número de acesso no banco de dados RDP. [2] Expectation-value. [3] Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. [4] Taxon definido com o programa RDP classifier. [5] Autores do trabalho no qual se originou a sequência de maior similaridade.

2.4 Discussão

As estruturas das comunidades de bactérias cultiváveis isoladas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* apresentaram várias similaridades. Todos os isolados pertencem aos filos Proteobacteria, Firmucutes e Actinobacteria, sendo que Firmicutes representa a maioria das seqüências avaliadas de *D. saccharalis* e metade das sequências de *S. frugiperda.* Da mesma forma, a proporção de representantes das classes dentro do Filo Proteobacteria foi semelhante entre as duas espécies. Nas duas espécies, o maior número de sequências de bactérias cultiváveis pertence aos gênero *Bacillus*. *Enterococcus* e *Microbacterium* também foram abundantes nas duas espécies. Os índices de diversidade e estimativas de riqueza não revelaram diferenças significativas entre as comunidades de bactérias de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.

Uma grande variação na densidade de microrganismos foi observada na região do mesêntero de *D. saccharalis* e variações ainda maiores foram detectadas em *S. frugiperda*. Estas variações têm sido documentadas em outros insetos e pode estar relacionada à quantidade e tipo de alimento consumido, ao estágio do processo digestivo e variações fisiológicas das lagartas, pois em um período anterior à ecdise as lagartas cessam a ingestão de alimento, repercutindo em redução na densidade de microrganismos.

Vinte e seis isolados de bactérias oriundas do trato digestivo de *D. saccharalis* conseguiram degradar algum dos substratos acrescidos ao meio de cultura como fonte de carbono (celulose, hemicelulose e lignina). Por outro lado, nenhuma bactéria isolada do trato digestivo de *S. frugiperda* apresentou resultados positivos nas avaliações *in vitro* para produção enzimática na presença destes substratos. As lagartas de *D. saccharalis* desenvolvem-se dentro dos colmos de cana-de-açúcar que são altamente ricos em materiais lignocelulolíticos, diferentemente de *S. frugiperda* que se alimentam de folhas e outros tecidos tenros das plantas. Isto poderia indicar que *D. saccharalis* utiliza um alimento de baixa qualidade nutricional por apresentar componentes estruturais de difícil digestão. Nas nossas observações, nas dissecações do trato digestivo de *D. saccharalis,* não foram observadas fibras de celulose na região do mesêntero o que pode sugerir que a digestão deste material é extremamente eficiente no inseto, podendo ter o auxílio da microbiota, ou que este inseto não ingere as fibras “selecionando” o caldo da cana, o que ainda não foi

reportado para Lepidóptera. Embora alguns insetos produzam lignocelulases, acredita-se que os microrganismos do tubo digestivo tenham um papel importante na quebra de lignina e celulose, especialmente em insetos cuja dieta é pobre em nitrogênio e rica em fibras. Bactérias que degradam celulose e hemicelulose têm sido isoladas do trato digestivo de insetos que apresentam dietas ricas em substratos celulolíticos como cupins (Saxena et al. 1993, Varma et al. 1994, Schäfer et al. 1996, Wenzel et al. 2002), baratas (Cruden and Markovetz 1979) e besouros cerambicídeos, mas não em escolitídeos que se alimentam de material pobre em lignocelulose (Delalibera et al. 2005).

O trato digestivo de insetos pode ser uma importante fonte para prospecção de novos microrganismos e enzimas com potencial de utilização na decomposição de material rico em lignocelulose. Outros microrganismos, especialmente aqueles adaptados a alimentar-se da cana-de-açúcar, como é o caso de *D. saccharalis*, podem ter utilização na produção de glicose a partir de bagaço de cana para produção de etanol.

Referências

ARO, N; PAKULA, T; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.

BIGNELL, D.E.; EGGLETON, P. On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera, Termitidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 42, p. 57-69, 1995.

BRENNAN, Y., CALLEN, W.N., CHRISTOFFERSEN, L., DUPREE, P., GOUBET, F., HEALEY, S., HERNÁNDEZ, M., KELLER, M., LI, K., PALACKAL, N., SITTENFELD, A., TAMAYO, G., WELLS, S., HAZLEWOOD, G.P., MARTHUR, E.J., SHORT, J.M., ROBERTSON, D.E.; STEER, B.A. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 3609–3617, 2004.

BREZNAK, J.A. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 42, p.13-18, 2002.

BRUNE, A.; MIAMBI, E.; BRESNAK, J. A. Roles of oxygen and the intestinal microflora in the metabolism of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds by termites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, p. 2688-2695, 1995.

CAMPBELL, B.C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. **Insect-plant interactions**. Boca Raton: CRC Press, 1990. v.1. p. 1-44.

CRUDEN, D.L.; MARKOVETZ, A.J. Carboxymethylcellulose descomposition by intestinal bacteria of cockcroaches. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, p. 369-372, 1979.

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

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoultella gen. nov., with description of Raoultella ornithinolytica comb. nov., Raoultella terrigena comb. nov. and Raoultella planticola comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 925-932, 2001.

ENNAHAR, S.; CAI, Y.; FUJITA, Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 444-451, 2003.

EWING, B; GREEN, B. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genoma Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FONTY, G.; JOBLIN, K.; CHAVAROT, M.; ROUX, R.; NAYLOR, G.; MICHALLON, F. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, p. 6391-6403, 2007.

GOKSØR, J.; EIDSÅ, G.; ERIKSEN, J.; OSMUNDSVÅG, K. In: BAILEY, M.; ENARI, M.T.; LINKO, M. In: **SYMPOSIUM ON ENZYMATIC HYDROLISYS OF CELLULOSE.** Helsinky: SITRA, 1975. p. 217.

HAMADA, N.; FUSE, N.; SHIMOSAKA, M.; KODAIRA, R.; AMANO, Y; KANDA, T. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 10, p. 942-946, 1999.

HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHÜLEIN, M. Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose. **Nature BioTechnology**, London, v. 3, p. 722 – 726, 1985.

HUSON, D.H.; AUCH, A.F.; QI, J.; SCHUSTER, S.C. MEGAN Analysis of metagenomic data. **Genome Research**, Woodbury, v. 17, p. 377–386, 2007.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LIMA, O.A; QUECINE, C.A; FUNGARO, M.H; ANDREOTE, F.D; MACCHERONI Jr.W; ARAÚJO, W.L; SILVA-FILHO, M.C; PIZZIRANI-KLEINER, A.A; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of a β-1,4-endoglucanase from a endophytic B*acillus*

pumilus strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68 p. 57-65, 2005.

MOLD LAWES, A.; WHITE, B.A.; VERCOE, P.E. **Study of a bacteriophage as a potential gene transfer system for a ruminal bacterium and identification of the host bacteria.** Thesis, University of Illinois, 1994. p. 190.

MARGOLLES-CLARK, E; ILME, M; PENTTILA, M. Expression patterns of tem hemicellulase genes of the filamentous *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, p. 167-179, 1997.

NAZARENO, C.M.; ROCCA, M.; BALATTI, P.A.; TALA, C. Scutia buxifolia leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity. **Mycologia**, New York, v. 44, p. 400-407, 2008.

SAXENA, S.; BAHADUR, J.; VARMA, A. Cellulose and hemicellulose degrading bactéria from térmite gut and mound soils of India. **India Jouernal Microbiology,** Maharashtra**, v.** 33, p. 55-60, 1993.

SCHÄFER, A.; KONRAD, R.; KUHNIGK, T.; KÄMPFER, P.; HERTEL, H.; KÖNIG, A. Hemicellulose-degrading bacteria and yeast from the termite gut. **Journal Applied Bacteriology**, Amsterdam, v. 80, p. 471-478, 1996.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistic: **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SOMVANSHI, V.S.; LANG, E.; SCHUMANN, P.; PUKALL, R.; KROPPENSTEDT, R.M.; GANGULY, S.; STACKEBRANDT, E. Providencia vermicola sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode Steinernema thermophilum. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p.629-633, 2006.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York**,** v. 21, p 181-191, 1979.

SRINIVASAN, V.R. Production of bio-proteins, from cellulose. **Symposium on Enzymatic Hydrolisys of Cellulose.** Helsinky: SITRA, 1975. p. 393.

STEINHAUS, E.A. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. **Archives of Bacteriological Reviews**, New York, v 24, p. 365-373, 1960.

THOMPSON, J.D; HIGGINS, D.J; GIBSON, T.J. ClustalW- improving the sensitivity of regressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matix choice. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VARMA, A.; KOLLI, B.K.; PAUL, J.; SAXENA, S.; KÖNIG. H. Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts: a survey on the present state of art. **FEMS Microbiology. Reviews**, Oxford, v. 15, p. 9-28, 1994.

WALKER, A.J., GLEN, D.M.; SHEWRY, P.R. Bacteria associated with the digestive system of the slug Deroceras reticulatum are not required for protein digestion. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.1387-1394, 1999.

WENZEL, M.; SCHONIG, I.; BERCHTOLD, M.; KAMPFER, P.; KONIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite Zootermopsis augusticollis. **Journal Applied Microbiology**, New York, v. 92, p. 32-40, 2002.

3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DO MESÊNTERO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E *DIATRAEA SACCHARALIS*

Resumo

Os microrganismos presentes no tubo digestivo dos insetos podem desempenhar importantes funções na biologia dos hospedeiros como na nutrição, na detoxificação de compostos de defesas das plantas, na prevenção da infecção por patógenos e na produção de semioquímicos importantes nas interações de insetos. O primeiro passo para entender as funções da microbiota do trato digestivo na biologia dos insetos consiste na identificação dos membros destas comunidades. Neste trabalho, as bactérias presentes no mesêntero de lagartas de quinto ínstar da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, provenientes de diferentes localidades e diferentes espécies ou variedades de plantas hospedeiras, foram identificadas usando técnicas moleculares que independem do cultivo dos microrganismos. A caracterização foi realizada por DGGE (Gel de eletroforese em gradiente desnaturante) usando-se a região 16S do RNA ribossômico amplificado de DNA metagenômico extraído do mesêntero de 57 lagartas de *D. saccharalis* e 26 de *S. frugiperda* e sequenciamento de 6 bibliotecas de clones de rRNA 16S de cada espécie. A análise das comunidades bacterianas de *S. frugiperda* por DGGE sugere que as variações das estruturas das comunidades estão diretamente relacionadas com a origem das populações de insetos e o tipo de alimentação do inseto. As comunidades de bactérias de lagartas oriundas de criação em laboratório e alimentadas com dieta artificial, milho e algodão formaram um agrupamento hierárquico com maior similaridade entre estas comunidades em comparação às amostras de lagartas obtidas em campo e alimentadas com algodão, sorgo e arroz. As análises dos agrupamentos hierárquicos dos amplicons de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *D. saccharalis* indicaram uma maior similaridade das comunidades em função do local de coleta (amostras de uma mesma região) do que em função da variedade de cana-de-açúcar. As comunidades de bactérias do trato digestivo de *D. saccharalis* são compostas por membros dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, sendo Proteobacteria o filo predominante, representando até 100% das seqüências de algumas lagartas. A afiliação filogenética das seqüências de *D. saccharalis* revelou que o gênero *Klebsiella* esteve presente em todas as amostras analisadas. No trato digestivo de *S. frugiperda* foram encontradas sequências de rRNA 16S dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Acidobacteria, sendo os dois primeiros os que apresentaram o maior número de representantes. As comunidades de bactérias variaram em função da planta que a lagarta se alimentou. Entretanto, *Ralstonia* e *Hydrogenophilus* estiveram presentes em insetos que se alimentaram da maioria das plantas hospedeiras avaliadas. A presença constante de alguns microrganismos na maioria dos insetos indica que estes possam ser indispensáveis, podendo exercer alguma função vital para o inseto ou que tenham alguma outro tipo de relação simbiótica ou comensal com o hospedeiro.

Palavras-chave: Diversidade Microbiana; Mesêntero; Broca da cana-de-açúcar, Lagarta-do-cartucho-do-milho; Digestão; DGGE; rRNA 16s

3 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Diatraea saccharalis* AND *Spodoptera frugiperda* MIDGUT BACTERIAL COMMUNITY

Abstract

The microorganisms inhabiting the digestive tube of insects might play important roles on insect biology, nutrition, detoxification of plant defense compounds, protection from pathogen infection and on the production of semiochemicals used on insect interactions. The identification of members of microorganism community is the first step to understand their roles on insect biology. We have characterized the midgut bacterial community of 57 fifth instar caterpillars of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* and of 26 fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, through culture-independent analysis based on Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and on sequencing six 16S ribosomal RNA clone libraries of each species. Caterpillars were sampled from different locations and from different host plant species or varieties. DGGE results suggest that community structure variation is related directly to insect population origin and type of insect food source. Bacterial community from laboratory-reared caterpillars fed to artificial diet, corn and cotton had formed and hierarchical group that had more similarity within the group than when compared to caterpillars collected from the field and fed to cotton, sorghum and rice. The field locations where the caterpillars were sampled had more effect on bacterial community diversity than the sugarcane varieties, based on hierarchical clustering of 16S rRNA analysis. The bacterial community of *D. saccharalis* midgut is composed by members of phyla Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria. Proteobacteria is the most comum phylum, representing up to 100% of 16S rRNA sequences in some caterpillars. The genera *Klebsiella* was present in all samples. In the midgut of *S. frugiperda* we have found 16S rRNA sequences belonging to phyla Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Acidobacteria. Proteobacteria and Firmicutes were the most representatives. Bacterial community varied according to *S. frugiperda* host plant; however, both *Ralstonia* and *Hydrogenophilus* genera were present in digestive tracts of insects from most host plants. The constant presence of some bacteria in the majority of insects indicates that those microorganisms might either be indispensable, playing a vital hole to the insect, or have some symbiotic or commensal relation with the insect.

Keywords: Microbial diversity; Midgut bacteria; Sugarcane borer; Fall armyworm; Digestion; DGGE; 16S rRNA

3.1 Introdução

O intestino dos insetos é habitado por uma grande diversidade de microrganismos como resultado de sua exposição contínua ao meio externo e de uma longa história evolutiva entre microrganismos e hospedeiros (STEINHAUS, 1960). A contribuição da microbiota na nutrição, no desenvolvimento e exclusão competitiva de microrganismos patogênicos tem sido reportada na literatura em diversos trabalhos (WIGGLESWORTH, 1929; BREZNAK, 1982; CAMPBELL, 1990; DILLON E DILLON, 2004). O estudo das comunidades de microrganismos presentes em insetos que apresentam hábitos alimentares específicos, é importante para o entendimento da capacidade e plasticidade dos microrganismos para se adaptar e explorar as regiões do trato digestivo dos insetos, e de como estas podem interferir na biologia dos hospedeiros. (BENEMANN, 1973; BREZNAK et al., 1973).

A dificultade central nos estudos de ecologia de microrganismos no trato digestivos dos insetos, é associar a diversidade microbiana com suas funções, bem como a comprenssão das relações entre a diversidade genética e a estrutura destas comunidades (NANNIPIERI ET AL., 2003). O desenvolvimento de técnicas moleculares que independem do cultivo dos microrganismos e das ferrementas de bioinformática permitiram a caracterização de uma diversidade microbiana desconhecida e da sua organização no ambiente onde foram coletadas (LAMBAIS et al., 2005).

Uma das técnicas muito utilizadas para avaliar as estruturas das comunidades microbianas, através da variabilidade das sequências de rDNA 16S, é o DGGE (Gel de eletroforese em gradiente desnaturante), método desenvolvido por Muyzer, Wall e Uitterlinder em 1993 (MUYZER; WALL; UITTERLINDER, 1993). O DGGE consiste na separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, obtidos por amplificação de uma região específica de um gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de uréia e formamida. O padrão de migração desses fragmentos (amplicons) no gel é resultado da composição de nucleotídeos dos mesmos e seu teor G+C (LAMBAIS et al., 2005). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para detectar as variações das comunidades microbianas em diferentes ambientes (PENNANEN; PAAVOLAINEN; HANTULA, 2001), a influência das acções antrópicas como a presença de fungicidas (THIRUP; JOHNSEN; WINDING, 2001; SIGLER; TURCO, 2002), fertilizantes orgânicos e

inorgânicos (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003) e a plantas transgênicas (HEUER; SMALLA, 1999). Embora PCR-DGGE seja de alta resolução (MYERS et al., 1985; MYERS; MANIATIS; LERMAN, 1987) e permita a comparação rápida de um grande número de amostras, revelando a dinâmica das comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998), esta técnica não é suficiente para determinar e identificar diretamente as espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al., 2006). Desta forma, a composição de biblioteca de clones cujos insertos são fragmentos gerados por amplificação de DNA metagenômico, de amostras selecionadas previamente por PCR-DGGE, permite uma análise mais refinada das amostras de interesse e a identificação das seqüências dos organismos que compõem as comunidades.

Neste estudo, a microbiota do trato digestivo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foi caraterizada pela técnica do PCR-DGGE e pela construção de bibliotecas de clones da região 16S rRNA de bactérias.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Origem das lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*

A diversidade de bactérias do mesêntero de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foi analisada através do sequenciamento da região V1-V3 do rRNA 16S, amplificada a partir de DNA metagenômico do trato digestivo. Com o objetivo de fazer uma cobertura das amostras estudadas e corroborar a hipótese da similaridade da comunidade de bactérias de acordo com a origem geográfica dos locais de coleta das lagartas, foram analisadas as amostras de lagartas de *D. saccharalis* coletadas em cana-de-açúcar de diferentes variedades. Foram utilizadas lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* coletadas nas variedades de cana-de-açúcar SP83-2847, RB83-5054, SP79-1011, RB84-5210 (Bocaina/SP - Usina Santa Cândida “Açúcar e Álcool Ltda”); RB86-7515, RB83-5054, RB93-5744, RB72-454, RB85-5453 (Tanabí/SP - Usina Guarani Açúcar e Álcool); SP80-0185, RB83-5054, SP81-3250, SP81-3250, RB72-454, SP91-1049, RB86-7515, RB85-5453 (Luiz Antônio/SP - Central Energética Moreno Açúcar e Álcool Ltda.); RB83-5054, SP81-3250 (Piracicaba/SP - ESALQ/USP) e de criação em dieta artificial do

laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Para cada localidade e variedade de cana-de-açúcar foram utilizadas amostras isoladas de três lagartas, exceto por SP81-3250 de Piracicaba que foram usadas 5 lagartas.

Para *S. frugiperda*, a diversidade de bactérias foi avaliada utilizando o DNA metagenômico do mesêntero de lagartas obtidas em campo e em laboratório e que foram criadas em diferentes plantas. Foram utilizadas lagartas de quinto ínstar coletadas diretamente em plantas de milho híbrido Pioneer 30F90 (15A, 15B, 15C, 15D, 15E). Ovos de *S. frugiperda* também coletados em plantas de milho (Híbrido Pioneer 30F90) na fazenda Areão em Piracicaba/SP foram levados para o laboratório e colocados em placas de Petri médias até a eclosão das lagartas. Posteriormente as lagartas neonatas foram individualizadas em tubos de criação de vidro e cada lote de lagartas recebeu um tipo de alimento, consistindo de folhas coletadas em campo, de arroz SCSBRS5112 (I1, I2, I3), algodão IAC25RMD (G1, G2, G3) e sorgo 822 (J1, J2, J3). Lagartas oriundas de criação em laboratório foram alimentadas com folhas de algodão, variedade IAC25RMD© (F1, F2, F3), milho híbrido 2B-710 (H1, H2, H3), sorgo 822 (K1, K2, K3) e em dieta artificial (PARRA, 1996) (L1, L2, L3).

3.2.1.2 Extração de DNAs

A diversidade das comunidades bacterianas associadas ao trato digestivo das lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foi analisada via DGGE e sequenciamento de biblioteca de clones da região 16S RNA. Para isto, a região média do trato digestivo (mêsentero) foi dissecada e o DNA metanogenómico extraído com o “Fast DNA kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Em microtubos contendo granada finamente moída, foi adicionado 0,5 g de amostra, 978 µL de tampão fosfato e 122 µL de tampão MT. Os tubos foram agitados entre 30 s e 4 m s^{-1} em um homogenizador FP120 FastPrep Cell Disruptor (Q-Biogene). Em seguida, foram centrifugados por 1 minuto a 13000 g. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos. A essas soluções adicionou-se 250 µL de Tampão PPS e os tubos foram agitados 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 g e o sobrenadante coletado e transferido para microtubos limpos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 minutos por inversão. Em seguida, os tubos foram incubados por 3 minutos a 37°C. A matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter, Q-Biogene) e centrifugada por 2 minutos a 13000 g. A matriz foi lavada com 500 µL de solução

SEWS, e o filtro centrifugado duas vezes por 2 minutos a 13000 g. Após 5 minutos de incubação, à temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de água ultra pura ao filtro e centrifugou-se por mais 2 minutos a 13000 g. A solução de DNA foi transferida para um tubo limpo e o DNA foi quantificado após eletroforese em gel de agarose 1% e comparação com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder-Invitrogen). A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com "Syber Green" (Amersham Biociences, São Paulo, Brasil).

3.2.1.3 Amplificação do gene 16s rRNA e análise por DGGE

A amplificação da região V3 do rRNA 16S de bactéria foi feita em reação de PCR contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 0,2 mM dNTP, 3 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Gibco), 10 ng de DNA total, 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores 338FGC (5′- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3′) e un518r (ATT ACC GCG GCT GCT GG), água Mili-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 92°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, 72°C por 10 minutos.

Os produtos da reação de amplificação (amplicons) foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR Green (Molecular Probes) utilizando-se um densitômetro a laser 'FluorImager SI' (Armersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Os amplicons do rRNA foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida (37,5:1; m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15% a 55%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 60° C e 200 V constantes por 3 horas, em um sistema DCode (BioRad), utilizando-se solução tampão 0,5X TAE. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de ácido acético 10% por 10 min., metanol 50% por 10 min. e SYBR Green (Molecular Probes) 1: 10.000 (v:v) por 30 minutos, utilizando-se um agitador horizontal. Entre cada solução o gel foi lavado 3 vezes com água por 5 minutos. A imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se um densitômetro à laser FluorImager e o programa

Fragment Analysis (Amersham Biosciences). A riqueza de amplicons (As) foi determinada com base no número de bandas com diferentes valores de migração relativa, detectadas após varredura.

A similaridade entre as estruturas de comunidades de bactérias foi determinada com base na presença ou ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando o programa Diversity Database para determinação da riqueza de amplicons (Ra), com base no número total de bandas detectáveis, em função da diversidade da microbiota do trato digestivo e do tipo de planta e das variedades onde foram coletados os insetos. O agrupamento hierárquico foi realizado através do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples ("simple matching"), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

3.2.1.4 Construção das bibliotecas de clones da região V1-V3 do rRNA 16S de bactérias

Foram selecionadas amostras que continham a maior quantidade de amplicons nas amostras avaliadas pelo DGGE e os amplicons da região V1–V3 do rRNA 16S obtidos foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). A reação de ligação foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM DDT, 1 mM ATP, 5% polietilenoglicol-PEG) e 3 U de T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 4°C durante a noite. Em seguida, os produtos da reação de ligação foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por meio de choque térmico. As células transformadas foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB-ágar) contendo 50 µg mL^{-1} ampicilina e 20 µg mL^{-1} X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosideo). As bactérias contendo plasmídeos recombinantes foram cultivadas em meio LB líquido contendo amplicilina (50 µg mL^{-1}) durante 22 horas a 38°C.

3.2.1.5 Extração de plasmídeos

O meio de cultura líquido contendo as bactérias, foi centrifugado a 4000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O "pellet" obtido foi lavado com uma solução tampão composta de 25mM Tris-HCl (pH 8,0), EDTA (pH 8,0) e 50 mM glicose. Em seguida, uma solução contendo 1% SDS e 0,2N NaOH foi adicionada e a suspensão incubada em gelo por 10 minutos. Uma solução contendo acetato de potássio 3M e ácido acético glacial 10% foi

adicionada e misturada por inversão. A suspensão foi incubada por 10 minutos em gelo e centrifugada a 4000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa contendo 15 µg de RNase A e incubado a 37°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 4000 g a 4°C por 45 minutos. A lavagem do DNA foi realizada por 5 minutos com etanol 70%. O "pellet" foi ressuspendido em 80 µL de água ultra pura esterilizada. O DNA foi quantificado através de espectrofotometria a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes) utilizando-se densitômetro a laser "FluorImager SI" (Armersham).

3.2.1.6 Sequenciamento utilizando "Big Dye Terminator"

Uma alíquota contendo de 200-500 ng de DNA plasmidal, 10 pmol dos iniciadores M13F ou M13R, 2,0 µl de Dyemanic ET Terminator (Amersham Biosciences), 2,0 µL de tampão Save Money (200 mM Tris-HCL pH 9,0 e 5 mM $MgCL_26H_20$) e água ultrapura para um volume final de 10 µL, foi utilizado para a reação de sequenciamento. A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), os produtos de PCR foram precipitados com isopropanol e incubados no escuro por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este processo foi realizada a centrifugação e a lavagem do "pellet" com etanol 70%, que então foi seco no escuro, por no mínimo 2 horas, ressuspendido em formamida e desnaturado a 96°C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático o ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.2.1.7 Análises das seqüências do rRNA

Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento dos clones de rRNA 16S de bactérias foram analisados através do programa PhredPhrap (EWING; GREEN, 1998), para remoção de seqüências do vetor e as bases de baixa qualidade, somente seqüências contendo qualidade >20, apresentando 1 erro a cada 100 bases lidas, foram consideradas para análises posteriores. A afiliação taxonômica das seqüências foi feita comparando-se as seqüências de rRNA 16S com as seqüências depositadas no Ribossomal Database Project (HTTP:// rdp.cme.msu.edu) (versão 9.42), utilizando-se o programa RDPquery http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdpquery.htm).

O número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foi determinado utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004). Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 1.83 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) com os parâmetros “gap-opening penalty” de 10.0 e “gap-extention penalty” de 0,1. O alinhamento foi utilizado para calcular uma matriz de distância evolutiva através do DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de Jukes-Cantor (CHAO; SHEN – http://evolutiongenetics.washington.edu/phyilip.html).

As estimativas de riqueza de UTOs, considerando distância evolutiva de 0.03 para definição de UTOs, foram feitas pelo programa SPADE, utilizando métodos não-paramétricos ACE (Abundance-based Coverage Estimator) e Chaol (CHAO; SHEN – http://chao.stat.nthu.edu.com). Os índices de diversidade de Shannon e Recíproco de Simpson e a cobertura de amostragem também foram determinados utilizando-se o programa SPADE.

As bibliotecas de rRNA 16S foram comparadas utilizando-se o programa S-Libshuff (SINGLETON et al., 2001) (http:/www.arches.uga.edu/~whitman/libshuff.html), o qual determina o nível de probabilidade de duas bibliotecas serem diferentes entre si com base em curvas de coberturas homóloga e heteróloga. Para a atribuição taxonômica foi utilizado o software MEGAN (HUSON et al., 2007), comparando o conjunto de DNA com a base de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) estimada pela comparação com as seqüências conhecidas das bases de dados para resumir e ordenar taxonomicamente os resultados, fornecendo uma saída gráfica e estatística para a comparação de diferentes conjuntos de dados.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Estrutura das comunidades de bactéria do mesêntero de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*

Na figura 3.1 é apresentada a separação dos amplicons de rRNA de bactérias presentes no trato digestivo de lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* oriundas de geração de adultos de campo e laboratório e na figura 3.2 a separação dos amplicons de rRNA de bactéria presente no trato digestivo de lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* coletadas em campo e separadas por DGGE. A análise do gel de *S. frugiperda*, indicou que as três repetições de cada material avaliado encontram-se agrupadas hierarquicamente (Figura 3.3), sugerindo que as

variações das estruturas das comunidades esta diretamente relacionada com o tipo de alimentação que o inseto ingere. Neste contexto, a avaliação das amostras L1, L2, L3 (Dieta artificial), H1, H2, H3 (Milho), F1, F2, F3 (Algodão), que foram obtidas de lagartas descendentes de adultos de criação artificial no Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), apresentaram-se agrupadas, mostrando maior similaridade entre estas comunidades em comparação às amostras de lagartas obtidas em campo G1, G2, G3 (algodão), J1, J2, J3 (sorgo) e, I1, I2, I3 (arroz) que apresentaram uma maior distância indicando maior variabilidade. Somente as amostras K1, K2, K3 (sorgo), provenientes das lagartas descendentes de adultos de criação, não teve a mesma tendência apresentada acima, ou seja, uma das amostra (K1) apresentou maior similaridade com as lagartas mantidas em dieta artificial e as outras duas amostras formaram um agrupamento com as lagartas coletadas em plantios de algodão.

Na análise do gel de DGGE das amostras de campo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* (Figura 3.4) pelo agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactérias, observa-se uma maior similaridade das comunidades de bactérias no trato digestivo em função do local de coleta (amostras de uma mesma região) do que em função da variedade de cana-de-açúcar (fonte de alimentação). Esta afirmação é apoiada pela avaliação do agrupamento hierárquico das amostras no centro do cluster, onde prevaleceu a similaridade das lagartas de *D. saccharalis* (cana-de-açúcar RB835054 e SP813250) e *S. frugiperda* (Milho Pioneer 30F90) que foram coletadas em campo na cidade de Piracicaba/SP. Este resultado é interessante pelo fato de serem lagartas de espécies e hábitos alimentares diferentes. Poucas amostras de *D. saccharalis* não agruparam no mesmo cluster com as repetições de mesma localização geográfica.

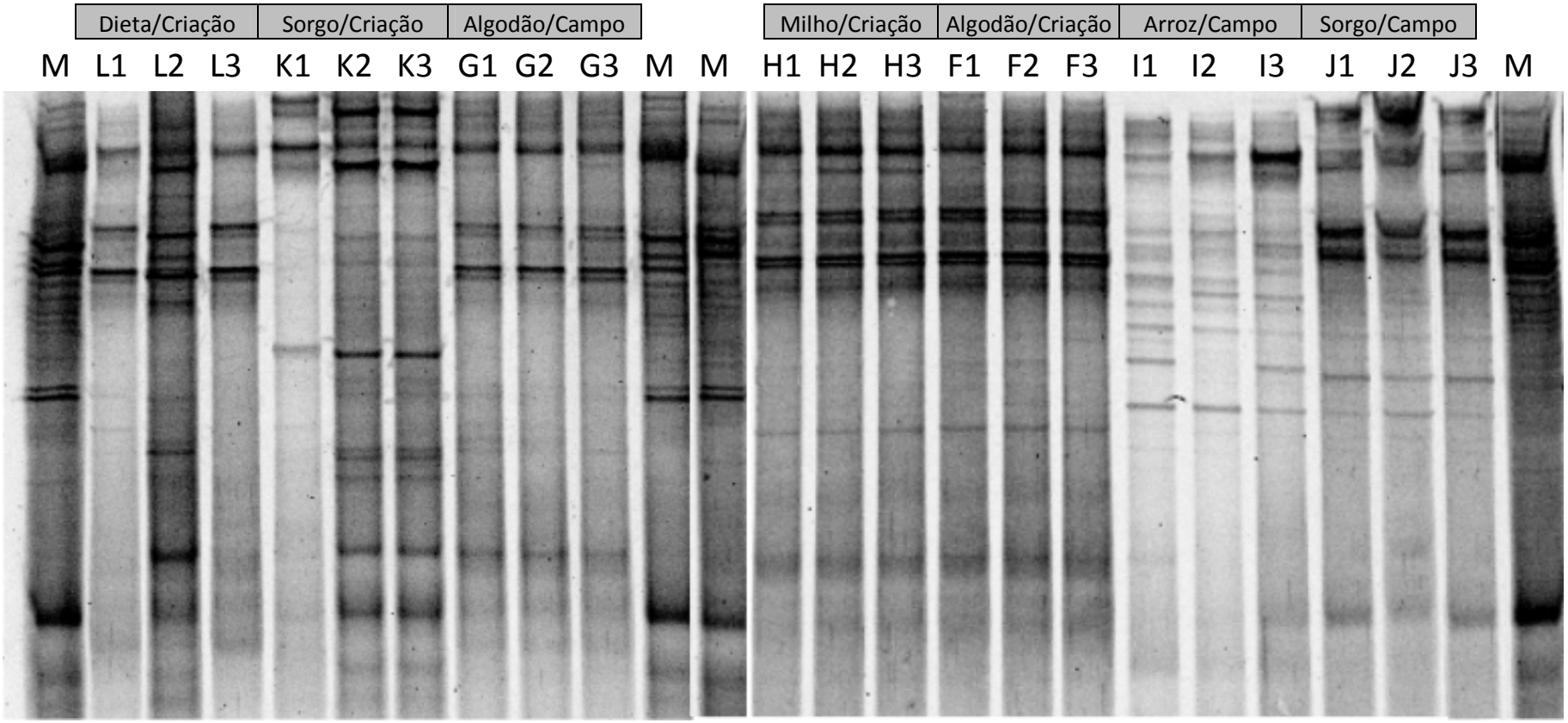


Figura 3.1 - Amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes plantas e dieta artificial, após separadção por DGGE. Alimento/Origem lagarta. M = Marcador. 1,2,3 = Foram utilizadas TREs lagartas por localidade

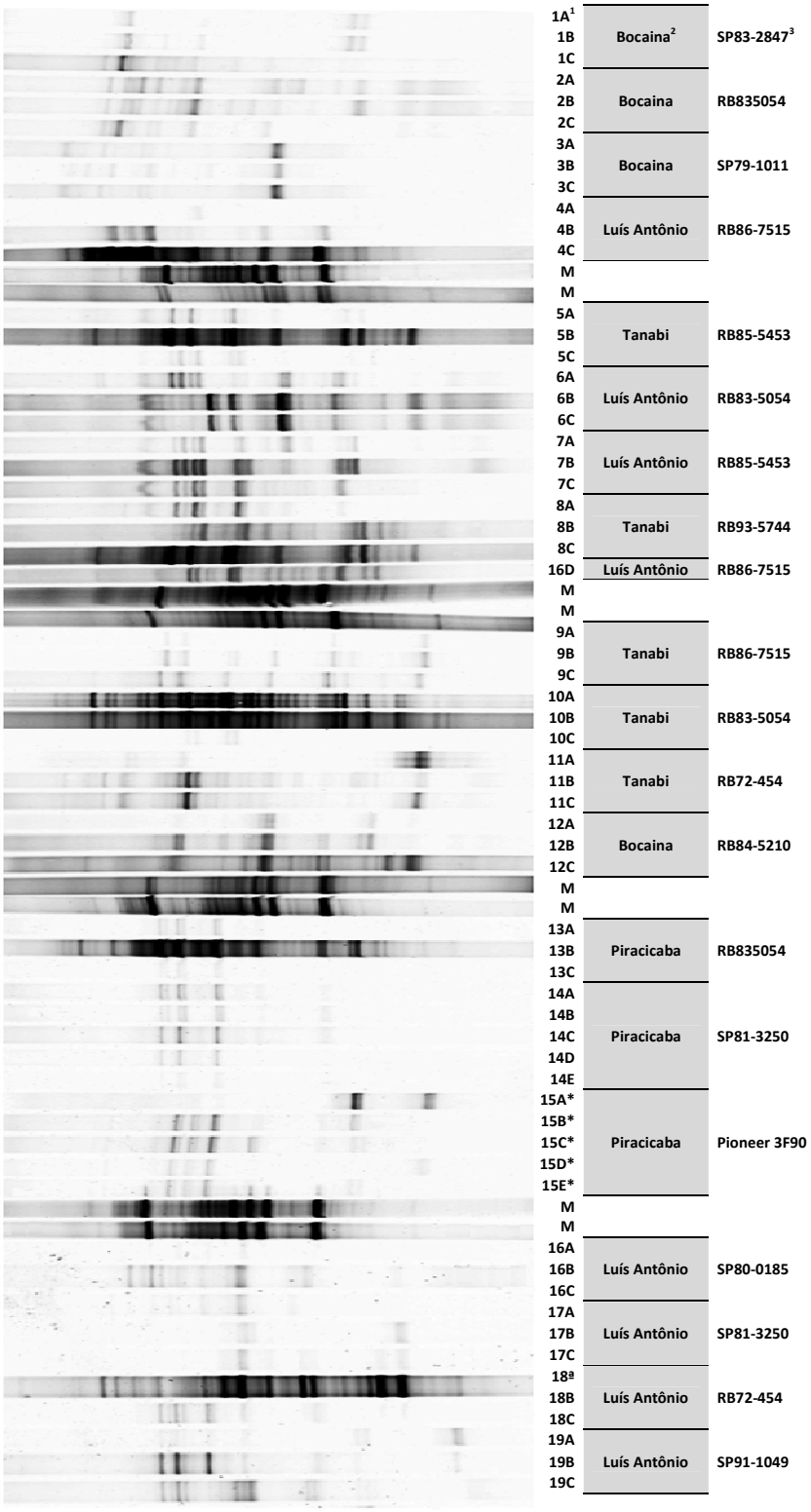


Figura 3.2 - Amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias amplificados de DNA metagenômico do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em cana-de-açúcar e *Spodoptera frugiperda*[*] coletada em Milho (Amostra[1]/Cidade[2]/Variedade[3]) após separação por DGGE

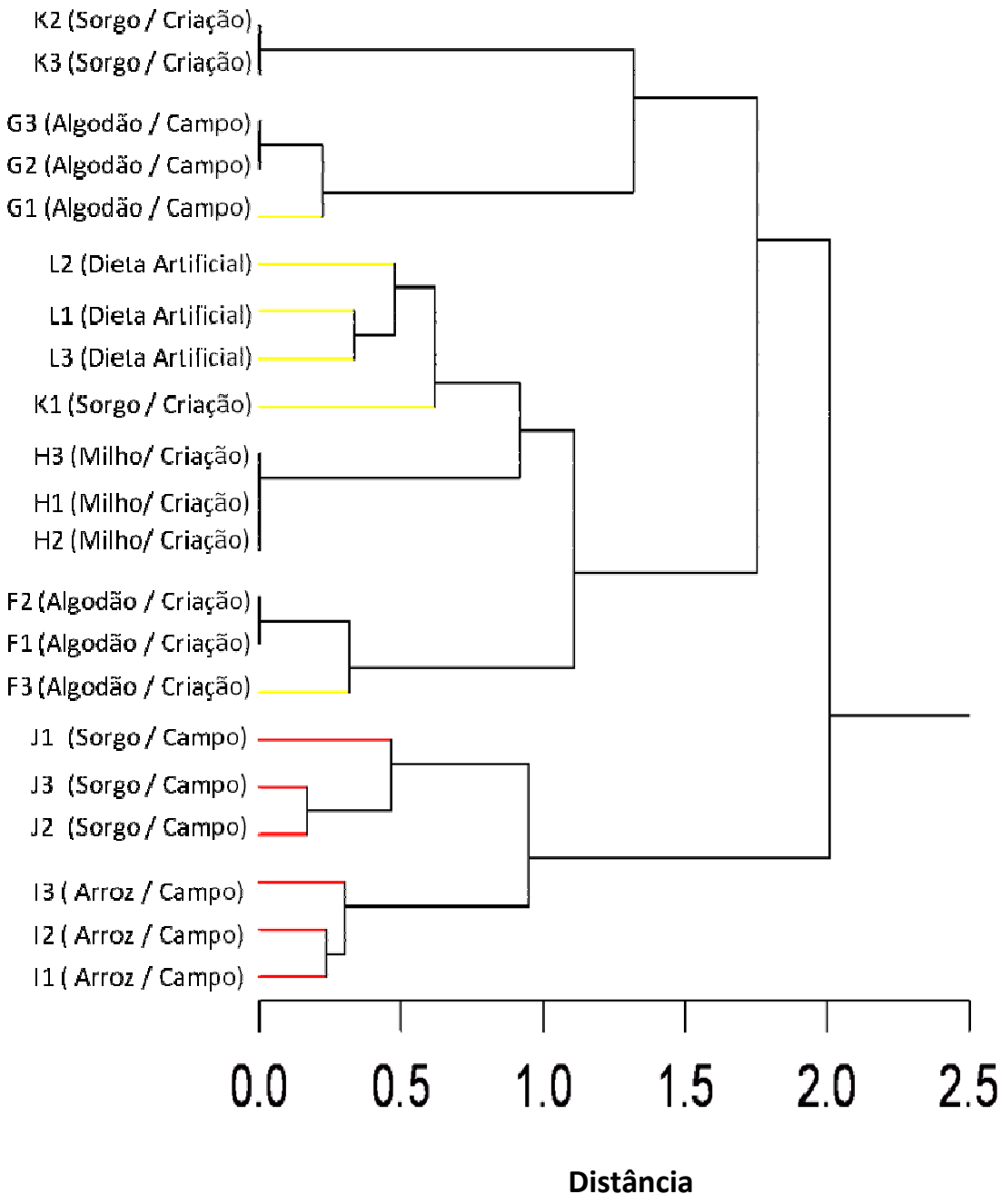


Figura 3.3 - Agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactéria do mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes locais e plantas, separados por DGGE.

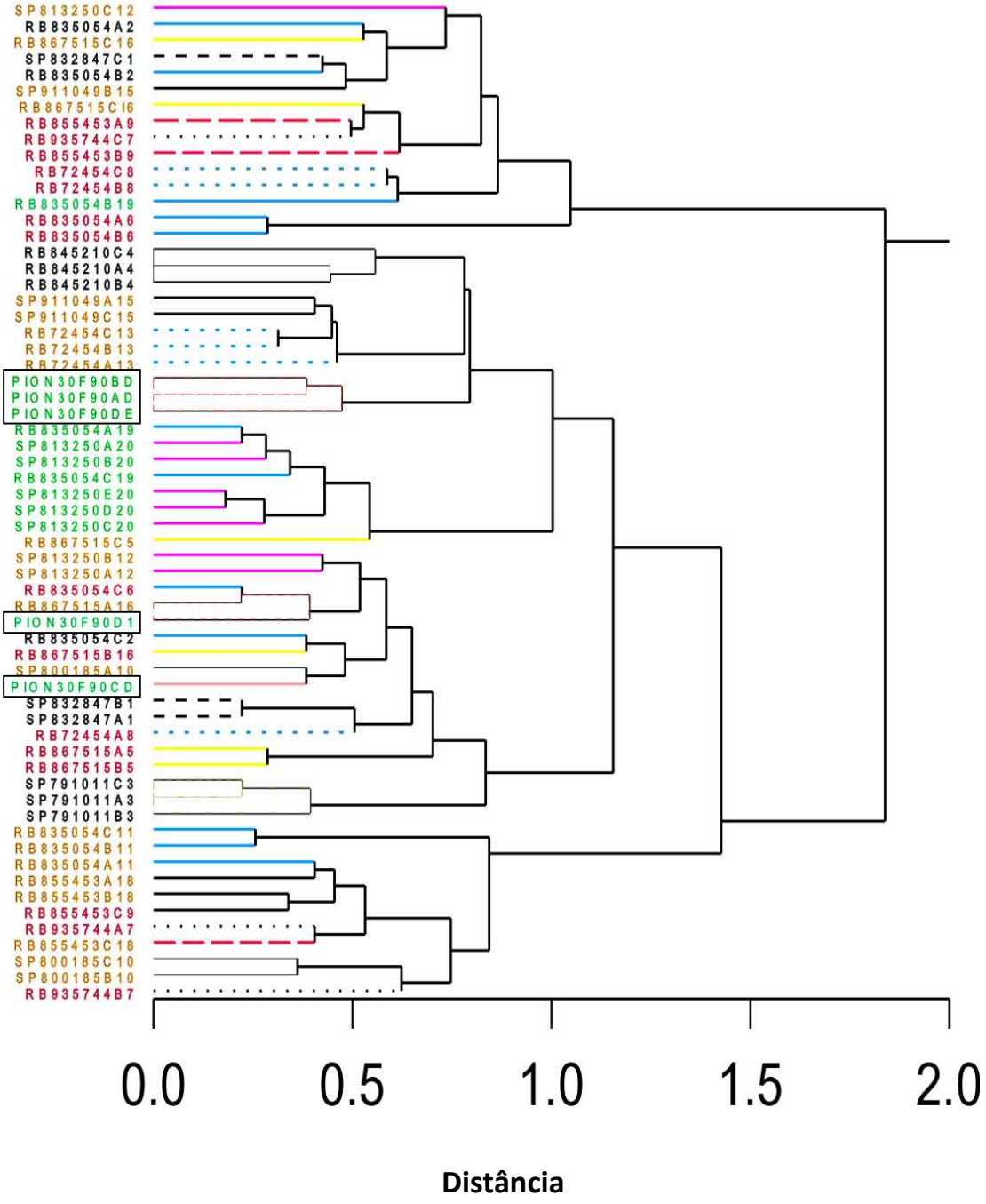


Figura 3.4 - Agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar e *Spodoptera frugiperda* (amostras circundadas por □) coletas em milho, com base na separação por DGGE. As variedades de mesma cor são provenientes de uma mesma localidade sendo Luís Antônio (Marrom), Bocaína (Preto), Tanabi (Vermelho) e Piracicaba (Verde). As linhas de mesma cor agrupam mesmas variedades coletadas em locais diferentes.

3.2.2.2 Sequenciamento do rRNA 16S de bactérias

As comunidades de bactérias do trato digestivo de *D. saccharalis* são compostas predominantemente por membros dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Acidobacter (Figura 3.5). Proteobacteria foi o filo predominante, representando 87,5%, 98,7%, 100%, 100%, 95,1% e 100% do total das seqüências analisadas nas lagartas coletadas nas variedades de cana SP813250 (Piracicaba), RB855453 (Luís Antônio), RB8350 54 (Luís Antônio), RB835054 (Bocaina), RB835054 (Tanabi), e RB867515 (Tanabi), respectivamente (Figura 3.7).

A afiliação filogenética das seqüências de *D. saccharalis* revelou que o gênero *Klebsiella* esteve presente em todas as amostras analisadas (Figura 3.5). Por outro lado, seqüências de representantes da família *Sphingomonadaceae* e dos gêneros *Sphigobacterium* e *Holophaga* só foram encontradas nas amostras coletadas em Piracicaba (SP813250) e *Roseomonas* somente nas amostras coletadas em Luís Antônio (RB855453). *Acinetobacter* e *Hydrogenophilus* foram encontradas em proporções similares nos materiais coletados em Luís Antônio (RB835054), Piracicaba (SP813250) e Tanabi (RB835054).

No trato digestivo de *S. frugiperda* foram encontradas sequências de rRNA 16S dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Fibrobacteres (Figura 3.6), sendo os dois primeiros os que apresentaram o maior número de representantes. Das seqüências analisadas, 33,3% (Milho/Pioneer30F90), 63,9% (Sorgo/822), 36,2% (Arroz/SCSBRS5112) pertenciam ao filo Firmicutes e 88,3% (Algodão/IAC25RMD), 72,3 % (Milho/DowAgroScience 2B710) e 96,5% (Algodão/IAC25RMD) a Proteobacteria (Figura 3.8).

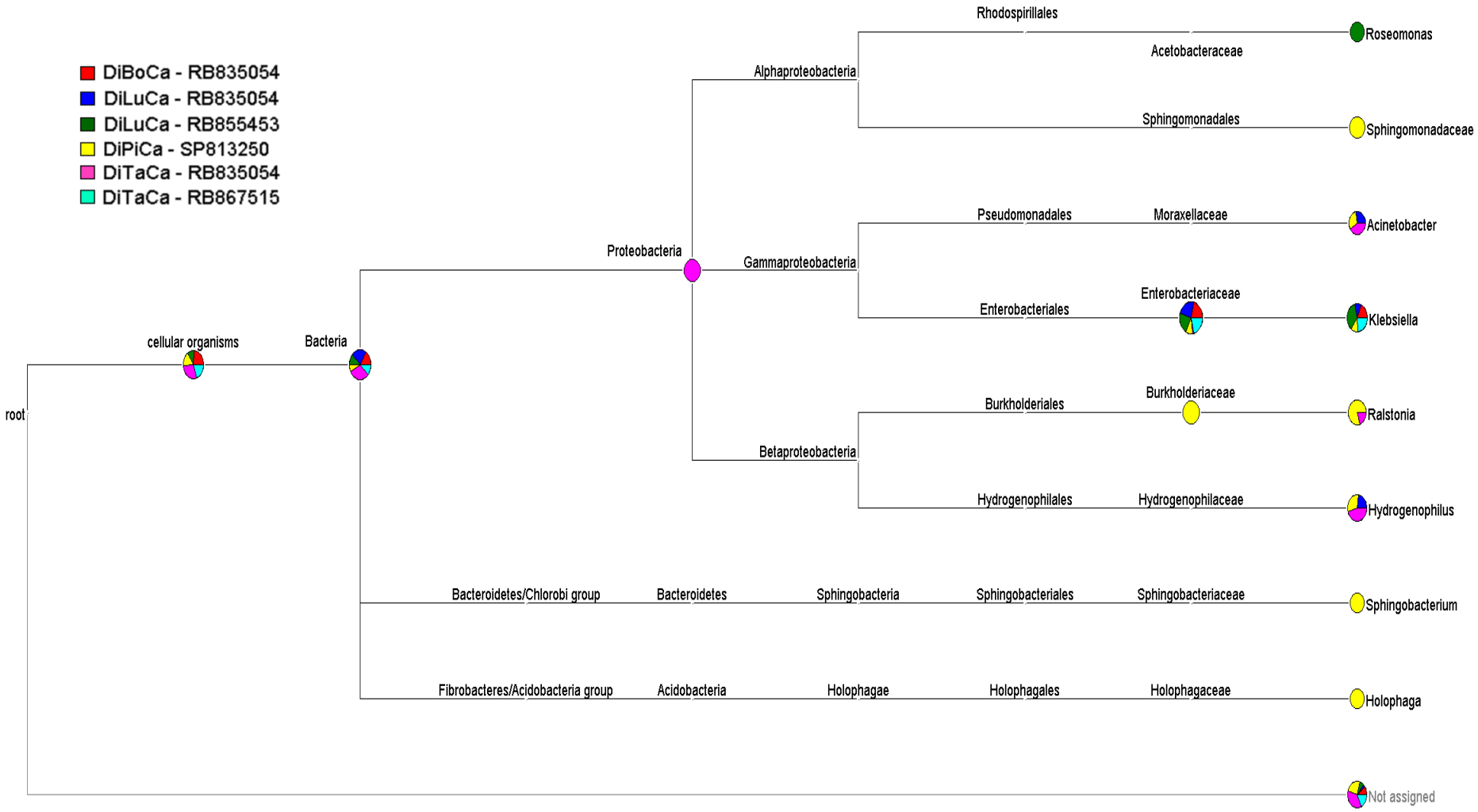


Figura 3.5 - Afiliação filogenética dos amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharaslis* pela comparação das sequências com a base de dados NCBI usando o software MEGAN. Di (*D. saccharalis*), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ta (Tanabi/SP), Ca (cana-de-açúcar)

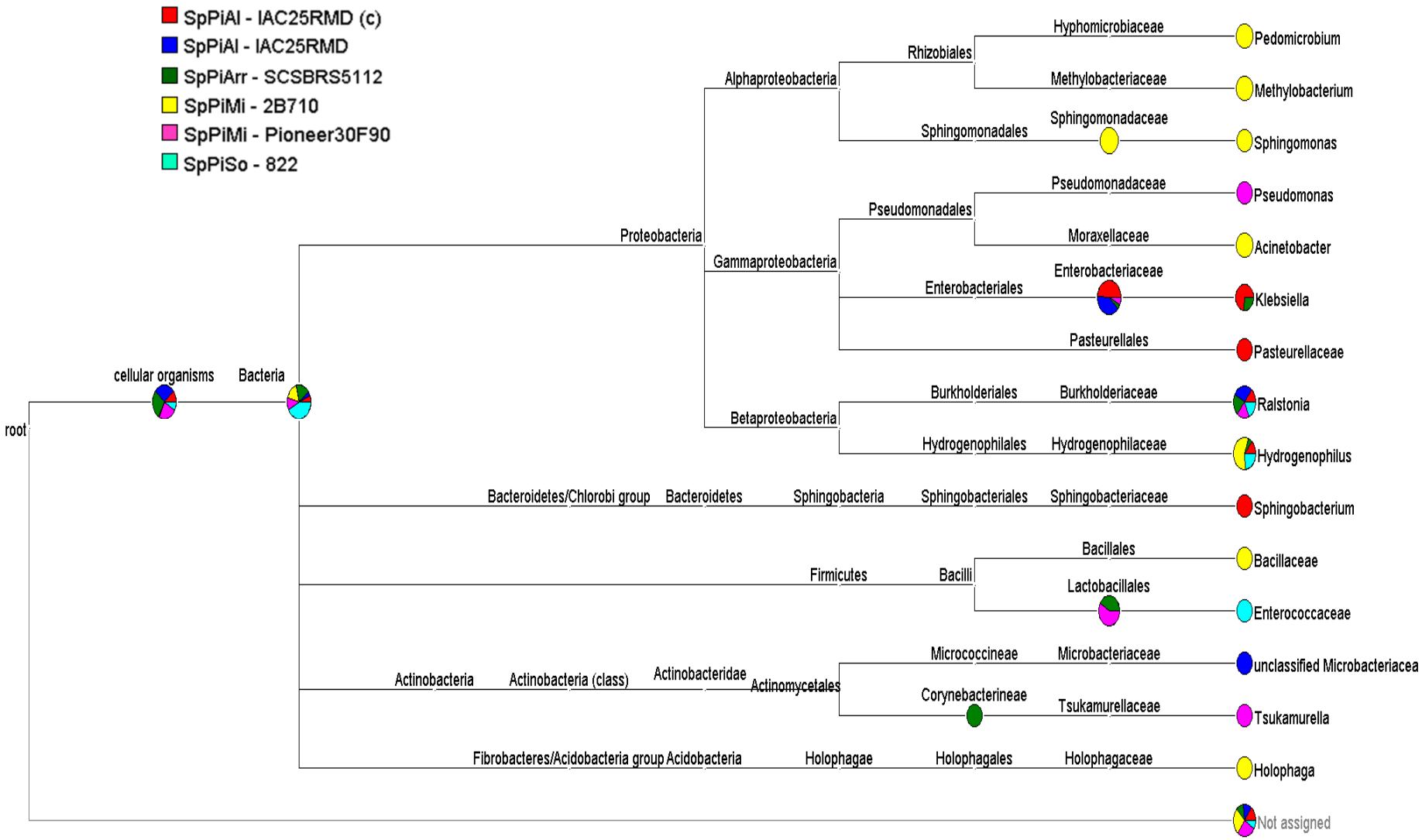
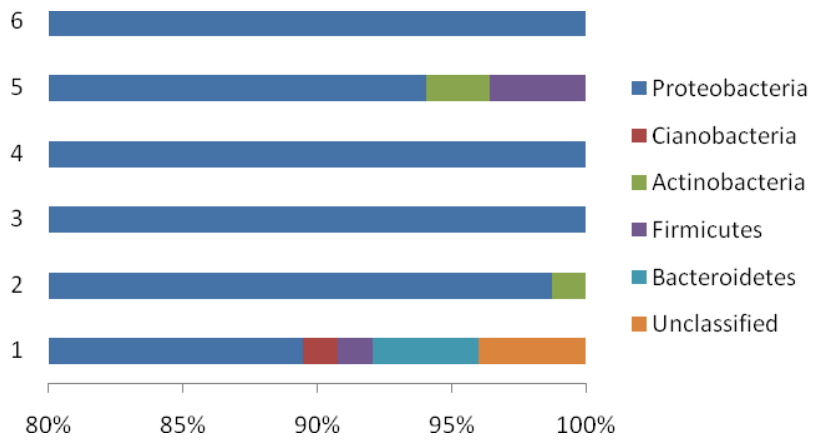
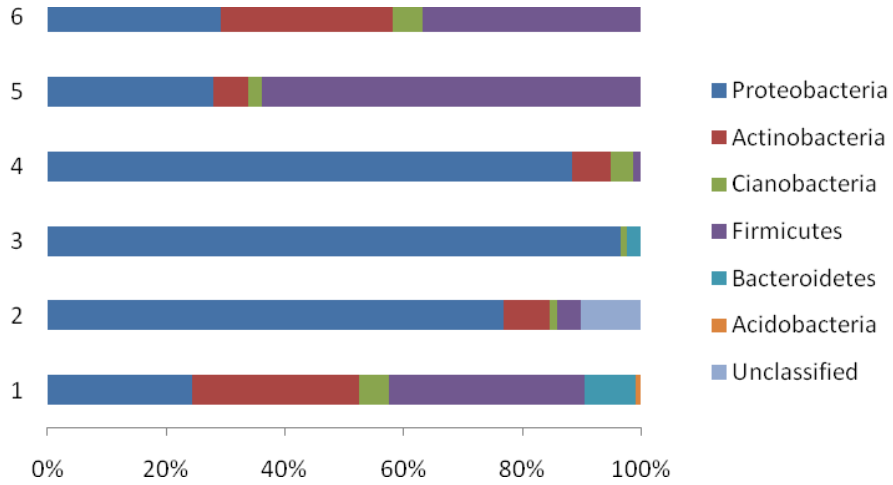


Figura 3.6 - Afiliação filogenética dos amplicons da região V3 do rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *Spodoptera frugiperda* pela comparação das sequências com a base de dados NCBI usando o software MEGAN. Sp (*S. frugiperda*), Al (Algodão), Arr (Arroz), Mi (Milho), So (Sorgo)



	Cidade	Variedade
1	Piracicaba	SP81-3250
2	Luís Antônio	RB85-5453
3	Luís Antônio	RB83-5054
4	Bocaina	RB83-5054
5	Tanabi	RB83-5054
6	Tanabi	RB86-7515

Figura 3.7 - Frequência relativa de seqüências de RNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por filos de bactéria.



	Planta	Variedade
1	Milho	Pioneer (30F90)
2	Milho	2B-710
3	Algodão	IAC-25RMD ©
4	Algodão	IAC-25RMD
5	Sorgo	822
6	Arroz	SCSBRS5112

Figura 3.8 – Frequência relativa de seqüências de RNA 16S obtidas do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por filos de bactéria

A afiliação filogenética das seqüências de *S. frugiperda*, apresenta uma distribuição característica que varia em função da planta que a lagarta se alimentou (Figura 3.6). Representantes da família Bacillaceae e dos gêneros *Pedomicrobium*, *Methyllobacterium*, *Sphigomonas*, *Acinetobacter* e *Holophaga* somente foram encontrados no híbrido 2B710 (DowAgroScience) de milho e *Pseudomonas* e *Tsukaneurella* somente foram observados no híbrido 30F90 (Pioneer). Pasteurellacea, Microbacteriacea e Sphigobacteriaceae somente foram encontradas no trato digestivo de lagartas em algodão. *Klebsiella* mostrou-se presente somente em algodão (IAC25RMD) e arroz (SCSBRS5112), assim como Enterococcaceae em sorgo (822). Finalmente, *Ralstonia* e *Hydrogenophilus* estiveram presentes em insetos que se alimentaram de todas as plantas hospedeiras avaliadas.

3.2.2.3 Estimativa de riqueza, de diversidades e comparações múltiplas das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias

Na tabela 3.1 estão apresentados os índices de diversidade, a estimativa de número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e estimativa de cobertura (ECA), considerando-se a distância evolutiva de 0,03 para a definição de UTOs. A riqueza das comunidades microbianas de *D. saccharalis* variou de 40,6 a 111,6 OTUs pelo método de ACE e 35,1 a 86,0 OTUs pelo método Chao1. A estimativa de riqueza de UTOs, através dos métodos não paramétricos ACE e Chao1 e curva de rarefação mostrou que houve uma menor riqueza de UTOs (intervalo de confiança de 95% de probabilidade) nas lagartas de *D. saccharalis*, coletadas na variedade de cana-de-açúcar RB85-5453 em Luís Antônio, do que as coletadas em Bocaina na variedade RB83-5054 e em Tanabi (variedade RB83-5054), (Figura 3.9). Os valores de índice de Shannon e Recíproca do índice de Simpson, revelaram uma menor diversidade na microbiota bacteriana de lagartas coletadas em Tanabi (variedade RB86-7515) em relação a todos os outros locais e variedades. O mesmo foi obtido pelo índice I/D, exceto que neste índice não foi detectado diferença com as lagartas de Luís Antônio variedade RB85-5453.

A riqueza das comunidades microbianas de *S. frugiperda* variou de 22,0 a 87,7 OTUs pelo método de ACE e 19,5 a 74,7 OTUs pelo método Chao1 e curva de rarefação. A diversidade observada em sorgo foi menor do que no milho 2B-710 que por sua vez teve uma menor diversidade do que em algodão IAC-25RMD(c). Não houve diferença na riqueza de bactérias entre as lagartas alimentadas em outras plantas. A amplitude nos índices de diversidade foi maior

em *S. frugiperda* do que em *D. saccharalis*. A diversidade de bactérias nas lagartas alimentadas em sorgo foi menor do que em todas outras plantas exceto em arroz. A diversidade em arroz foi menor do que em algodão e no milho variedade 2B-710. As lagartas em algodão e no milho 2B-710 apresentaram ainda uma diversidade maior de bactérias do que quando no milho Pioneer 30F90 (Figura 3.10).

Em geral, a cobertura de amostragem dos clones das bibliotecas foi alto em todas as amostras, apresentando o menor valor para *D. saccharalis* (65%) coletada em cana-de-açúcar da variedade RB835054 (Tanabi/SP) e o valor máximo para *S. frugiperda* (94%) coletada em sorgo da variedade 822 (Piracicaba/SP).

A tabela 3.2 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas usando o software S-LIBSHUFF. Os resultados mostraram que houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre as comunidades de bactérias de *D. saccaralis* de diferentes variedades de cana-de-açúcar de uma mesma localidade (Luís Antônio – variedades RB835054 e RB855453 e Tanabi – variedades RB835054 e RB867515). Da mesma forma, observou-se diferença estatística entre os materiais quando coletados numa mesma variedade de cana-de-açucar, RB867515, em diferentes cidades (Luís Antônio/Tanabi/Bocaina) e entre comparações de amostras onde a cidade e a variedade eram diferentes (Bocaina - RB835054 e Luís Antônio RB855453). As únicas semelhanças que foram detectadas ocorreram entre as comunidades de bactérias de *D. saccharalis* coletadas na variedade SP81-3250 em Piracicaba com RB855453 em Luís Antônio e com RB867515 em Tanabi.

No caso de *S. frugiperda*, as comunidades também diferiram na maioria das comparações entre as lagartas alimentadas em diferentes plantas hospedeiras. As únicas semelhanças observadas foram entre a microbiota de lagartas alimentadas em milho Pioneer 30F90 com a microbiota de lagartas alimentadas com arroz SCSBRS5112 e com sorgo, também entre lagartas criadas em Algodão e lagartas coletadas em algodão em Piracicaba, e finalmente entre aquelas alimentadas em sorgo e em arroz.

As comunidades de bactérias do trato digestivo de *S. frugiperda* criadas em laboratório alimentadas de algodão IAC-25RMD foi estatisticamente semelhante as comunidades em *D. saccharalis* coletadas em Piracicaba (SP81-3250) e as coletadas em Luís Antônio (RB855453).

Também foram semelhantes as comunidades de *S. frugiperda* coletadas em plantios de Algodão em Piracicaba e aquelas de *D. saccharalis* coletadas em Piracicaba na variedade SP81-3250.

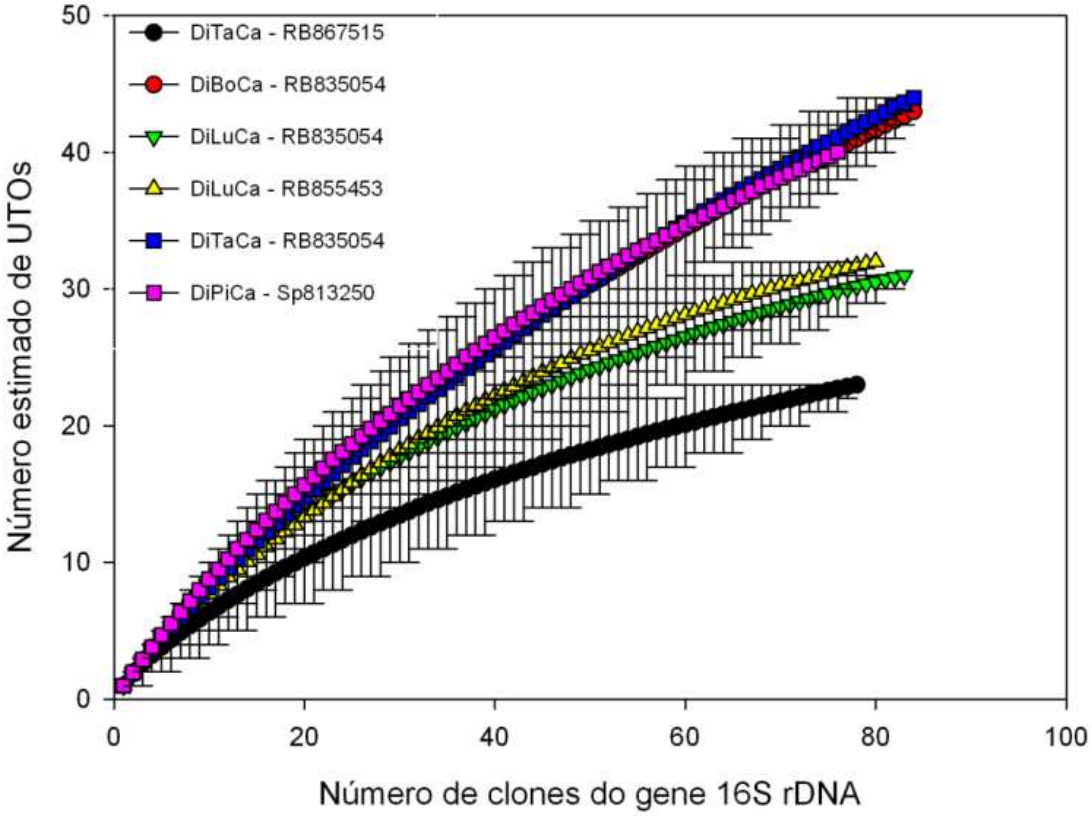


Figura 3.9 - Análise de rarefação de filotipos obtidos das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis.* As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos. Di (*D. saccharalis*), Ta (Tanabi/SP), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ca (Cana-de-açúcar)

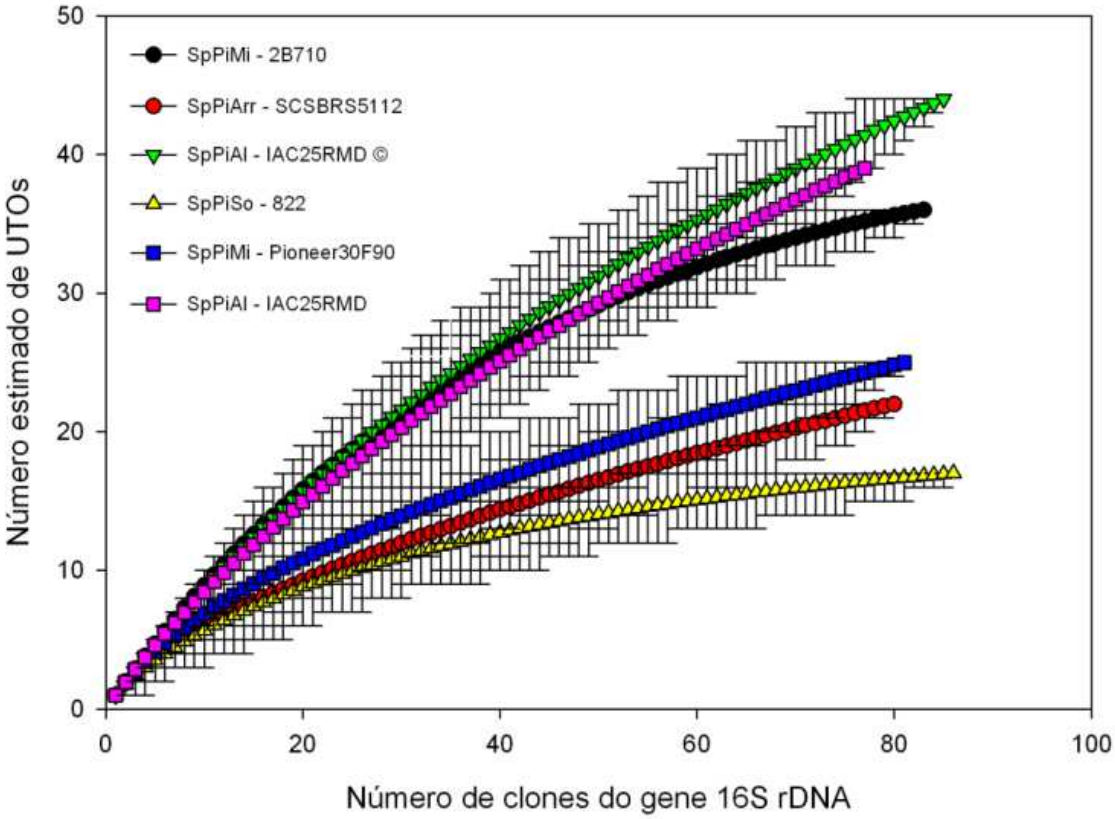


Figura 3.10 - Análise de rarefação de filotipos obtidos das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda.* As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos. Sp (*S. frugiperda*), Pi (Piracicaba/SP), Mi (Milho), Arr (Arroz), Al (Algodão), So (Sorgo)

3.2.2.4 Distâncias evolutivas das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias

Na figura 3.11 é apresentado o número de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas da comunidade de bactérias componente das bibliotecas de rRNA 16S do trato digestivo de larvas de quinto ínstar de *D. saccharalis* coletadas em cana-de-açúcar. A estimativa de riqueza de UTOs nas lagartas coletadas em Piracicaba na variedade SP813250 é maior do que em RB835054 coletado em Bocaina/SP (Figura 3.11.A). Não houve diferença na riqueza entre as comunidades bacterianas de *D. saccharalis* na variedade RB835054 entre cidades de Luís Antônio e Bocaina, mas estas tiveram uma riqueza menor do que as lagartas na mesma variedade em Tanabi (Figura 3.11.B). Nas comparações das lagartas amostradas em duas variedades diferentes de cana-de-açúcar (RB85-5453 e RB83-5054), obtidas na cidade de Luís Antônio, a diferença estatística se evidencia a partir da distância evolutiva 0.1 (Figura 3.11.C), sendo o mesmo comportamento observado na comparação entre lagartas alimentadas nas variedades RB83-5054 e RB86-7515 em Tababi/SP (Figura 3.11.D).

Diferentemente, observa-se na figura 3.12, que as distâncias evolutivas da comunidade de bactérias do trato digestivo de lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* alimentadas de diferentes plantas são muito menores. Nas duas variedade de milho (Pioneer 30F90 e DowAgroScience 2B710), a diferença estatística em relação à riqueza de UTOs somente é observada a partir da distância evolutiva 0.3 (Figura 3.12.A). Por outro lado, não houve diferença estatística quando a microbiota de lagartas de campo e de criação foram comparadas numa mesma variedade de algodão (IAC25RMD) (Figura 3.12.B). Na comparação da riqueza de UTOs quando a fonte de alimento para as lagartas foi arroz (SCSBRS5112) e sorgo (822), a diferença estatística evidenciou-se desde as menores distâncias evolutivas calculadas (Figura 3.12.C). Finalmente, na comparação das distâncias evolutivas nos quatro casos avaliados (milho-DowAgroScience 2B710, algodão-IAC25RMD, arroz–SCSBRS5112 e sorgo-822), não observou-se diferença estatística ao longo das distâncias evolutivas calculadas para as três primeiras plantas utilizadas como fonte de alimentação, só no caso do sorgo (822) que apresentou uma menor diversidade desde as menores distâncias evolutivas (Figura 3.12.D).

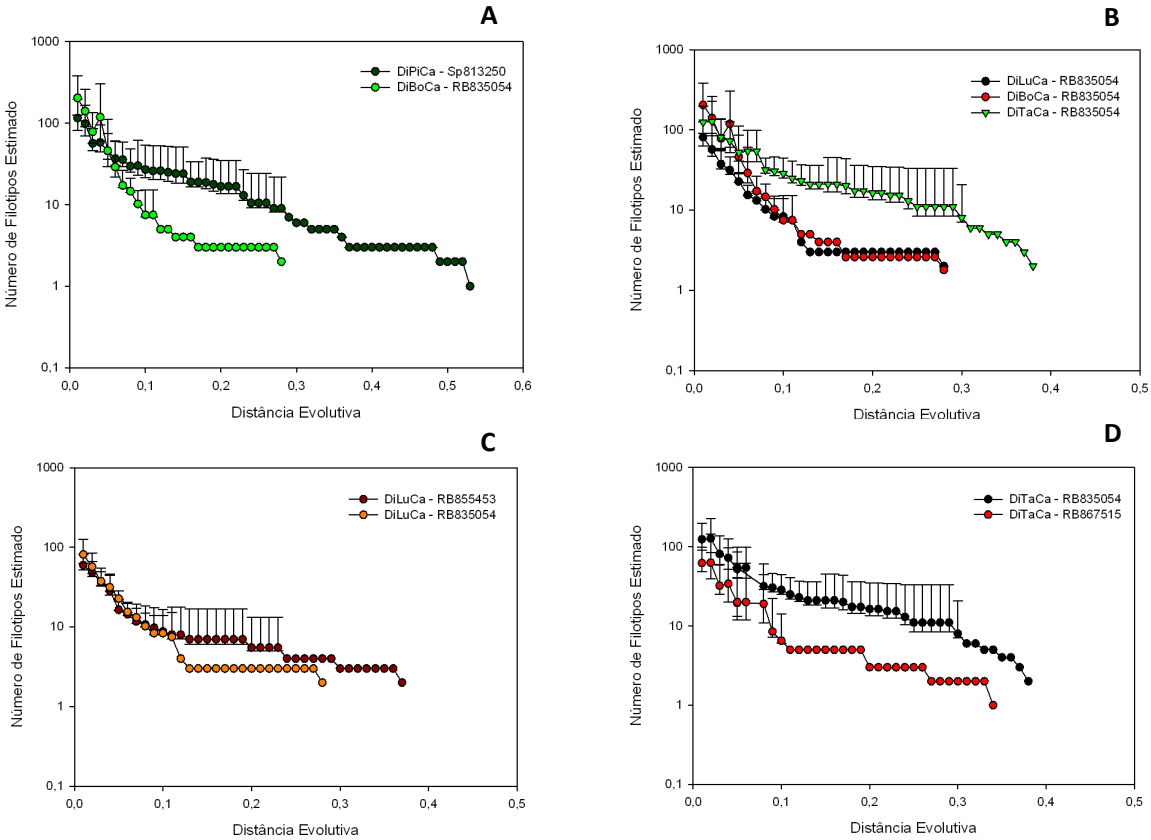


Figura 3.11 - Número de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas obtidos das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar em quatro cidades do Estado de São Paulo. A. (Piracicaba – SP81-3250/Bocaina – RB83-5054), B. (Luís Antônio/Bocaina/Tanabi – RB83-5054), C. (Luís Antônio – RB85-5453/RB83-5054), D. (Tanabi – RB83-5054/RB86-7515). Barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). Di (*D. saccharalis*), Ta (Tanabi/SP), Bo (Bocaina/SP), Lu (Luís Antônio/SP), Pi (Piracicaba/SP), Ca (Cana-de-açúcar)

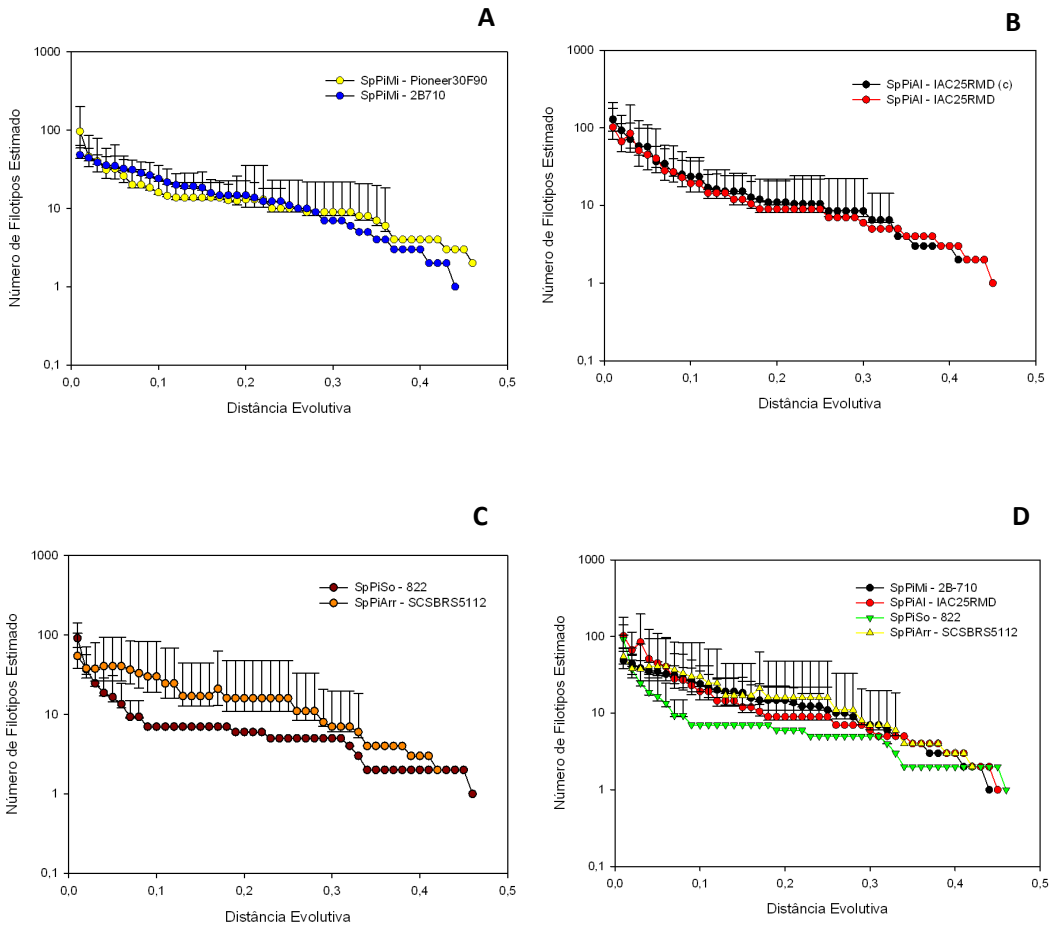
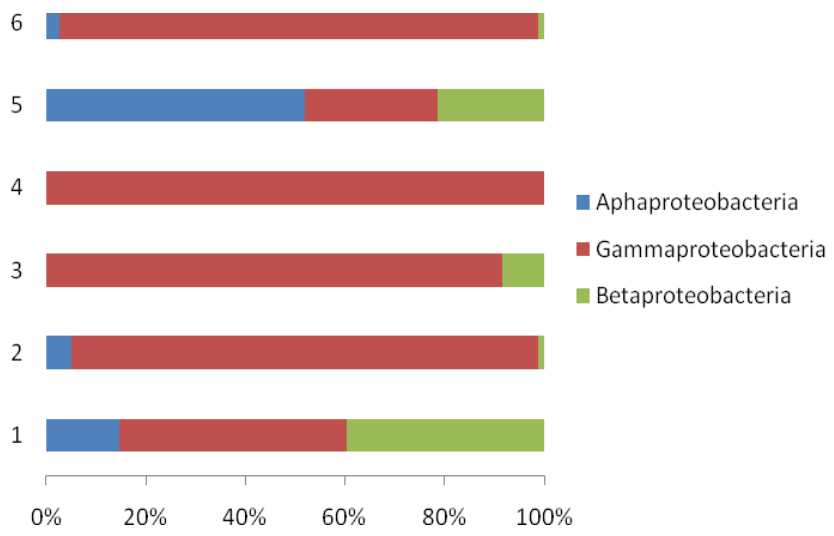
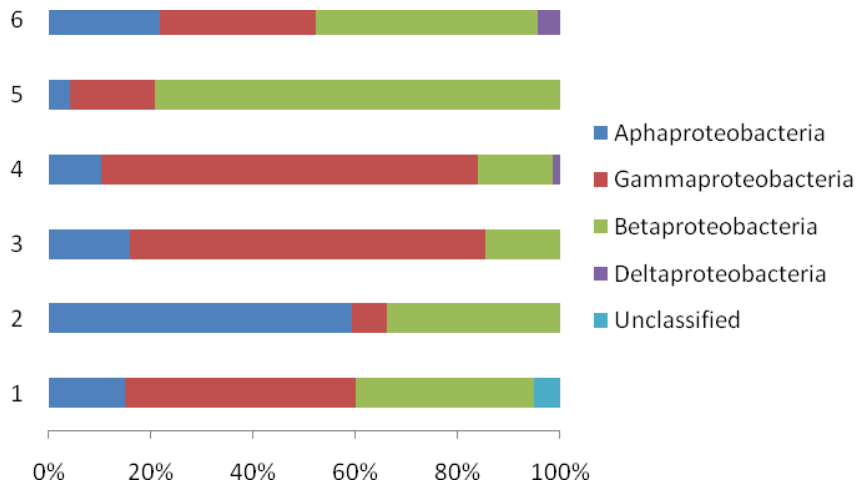


Figura 3.12 - Número de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas, obtidos das bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda*, coletadas em Piracicaba/SP que alimentaram-se de diferentes plantas. A. (Milho – Pioneer 30F90/DowAgroScience 2B710), B. (Algodão – IAC25RMD©/IAC25RMD), C. (Sorgo - 822/Arroz – SCSBRS5112), D. (Milho – DowAgroScience 2B710/Algodão – IAC25RMD/Sorgo – 822/Arroz - SCSBRS5112). Barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). Sp (*S. frugiperda*), Pi (Piracicaba/SP), Mi (Milho), Arr (Arroz), Al (Algodão), So (Sorgo). (c) Lagartas descendente de Adultos de criação



	Cidade	Variedade
1	Piracicaba	SP81-3250
2	Luís Antônio	RB85-5453
3	Luís Antônio	RB83-5054
4	Bocaina	RB83-5054
5	Tanabi	RB83-5054
6	Tanabi	RB86-7515

Figura 3.13 - Frequência relativa de seqüências de rRNA 16S obtidas no mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por classes de Proteobacteria



	Planta	Variedade
1	Milho	Pioneer (30F90)
2	Milho	2B-710
3	Algodão	IAC-25RMD ©
4	Algodão	IAC-25RMD
5	Sorgo	822
6	Arroz	SCSBRS5112

Figura 3.14 - Frequência relativa de seqüências de rRNA 16S obtidas no mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes locais e variedades de cana-de-açúcar e classificadas por classes de Proteobacteria

Tabela 3.1 – Estimativas da riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* coletadas em campo

						Estimativa de Riqueza de UTOs		**Índices de Diversidade**		
Lagarta	**Cidade**	**Planta**	**Variedade**	**NS[a]**	**NU[b]**	**ACE**	**Chao1**	**Shannon[c]**	**1/D [d]**	**ECA[e]**
D. saccharalis	Piracicaba	Cana-de-açúcar	SP81-3250	76	40	69.6 (53.2; 106.4)	58.6 (46.7; 91.7)	3.421 (3.242; 3.600)	21.88 (15.97; 34.734)	0.71
D. saccharalis	Luís Antônio	Cana-de-açúcar	RB85-5453	80	32	43.1 (36.2; 61.6)	37.1 (33.3; 51.7)	2.999 (2.753; 3.245)	10.36 (6.572; 24.408)	0.85
D. saccharalis	Luís Antônio	Cana-de-açúcar	RB83-5054	83	31	45.2 (36.4; 68.6)	38.7 (33.1; 58.5)	3.084 (2.903; 3.265)	16.06 (12.643; 22.0)	0.84
D. saccharalis	Bocaina	Cana-de-açúcar	RB83-5054	84	43	97.0 (66.0; 166.4)	83.5 (58.2; 150.9)	3.412 (3.216; 3.608)	19.821 (14.247; 32.52)	0.68
D. saccharalis	Tanabi	Cana-de-açúcar	RB83-5054	84	44	111.6 (68.6; 169.0)	86.0 (60.3; 152.2)	3.327 (3.087; 3.568)	14.112 (8.602; 39.246)	0.65
D. saccharalis	Tanabi	Cana-de-açúcar	RB86-7515	78	23	40.6 (28.6; 78.5)	35.1 (26.0; 71.3)	2.411 (2.125; 2.696)	5.664 (3.893; 8.033)	0.86
S. frugiperda	Piracicaba	Milho	Pioneer (30F90)	81	25	51.6 (34.0; 104.0)	44.6 (30.4; 95.8)	2.637 (2.408; 2.866)	9.175 (6.510; 15.537)	0.83
S. frugiperda	Piracicaba	Milho	2B-710	83	36	44.1 (38.9; 59.0)	39.1 (36.7; 49.9)	3.432 (3.313; 3.551)	26.595 (22.61; 32.29)	0.88
S. frugiperda	Piracicaba	Algodão	IAC-25RMD ©	85	44	87.7 (63.7; 140.9)	74.7 (55.7; 125.0)	3.490 (3.313; 3.667)	22.935 (16.675; 36.724)	0.69
S. frugiperda	Piracicaba	Algodão	IAC-25RMD	77	39	83.0 (57.8; 141.7)	71.0 (50.6; 127.5)	3.314 (3.111; 3.518)	18.241 (13.422; 28.465)	0.68
S. frugiperda	Piracicaba	Sorgo	822	86	17	22.0 (18.2; 37.8)	19.5 (17.4; 32.6)	2.114 (1.856; 2.371)	4.605 (3.278; 7.735)	0.94
S. frugiperda	Piracicaba	Arroz	SCSBRS5112	80	22	49.6 (30.6; 110.4)	43.1 (27.5; 103.3)	2.316 (2.051; 2.582)	6.083 (4.22; 10.91)	0.84

[a] Número de seqüências, [b] Número de UTOs determinado pelo DOTUR, [c]Estimador de máxima semelhança, [d]Recíproca do índice de Simson (Estimador de máxima semelhança), [e]Estimativa de cobertura de amostragem). Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95% de probabilidade.
D= 0.03

Tabela 3.2 - Comparações múltiplas da diversidade das bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de bactérias do mesêntero de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis e Spodoptera frugiperda* coletadas em campo.

Lagarta	**Cidade**	**Planta**	**Variedade**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D. saccharalis	Piracicaba	Cana-de-açúcar	SP81-3250	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	0.2321	0.0025	0.0001	0.0003
D. saccharalis	Luís Antônio	Cana-de-açúcar	RB85-5453	0.0020	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.2083	0.0000	0.0000	0.0000
D. saccharalis	Luís Antônio	Cana-de-açúcar	RB835054	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D. saccharalis	Bocaina	Cana-de-açúcar	RB835054	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D. saccharalis	Tanabi	Cana-de-açúcar	RB835054	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D. saccharalis	Tanabi	Cana-de-açúcar	RB86-7515	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0004	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
S. frugiperda	Piracicaba	Milho	Pioneer (30F90)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0246
S. frugiperda	Piracicaba	Milho	2B-710	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
S. frugiperda	Piracicaba	Algodão	IAC-25RMD ©	0.2842	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	-	0.0002	0.0000	0.0000
S. frugiperda	Piracicaba	Algodão	IAC-25RMD	0.0080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045	-	0.0000	0.0000
S. frugiperda	Piracicaba	Sorgo	822	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0081	0.0000	0.0000	0.0001	-	0.0057
S. frugiperda	Piracicaba	Arroz	SCSBRS5112	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1256	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	-

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 1 (*D. saccharalis*, Piracicaba/SP, Cana-de-açúcar - SP81-3250) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
9B08	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
9B10	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9B11	S000474503	0.00e+00	98	*Acinetobacter*	
9C03	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
9D03	S000394508	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	
9D06	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9D12	S000418562	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
9E0b2	S000474503	0.00e+00	99	*Acinetobacter*	
9F01	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9G03	S000426636	0.00e+00	98	Bacillaceae	
9G04	S000467865	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
9G06	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	
9G09	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9G11	S000467865	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
9G12	S000400134	5.01e-159	93	*Achromobacter*	Peng,. np 2007
9H01	S000100946	2.51e-180	94	Bacteria	
9H02	S000251860	7.94e-143	96	Flexibacteraceae	
9H03	S000475426	0.00e+00	98	Deferribacterales	
9H04	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	
9H05	S000482243	0.00e+00	94	*Sphingomonas*	
9H06	S000100946	2.51e-180	94	Bacteria	
9H07	S000413178	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
9H08	S000413182	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
9H09	S000142268	1.26e-162	93	Bacteria	
9H10	S000457912	1.26e-177	94	*Sphingomonas*	
9H11	S000426021	0.00e+00	95	*Methylobacterium*	
9H12	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
9A02	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Hiroishi et al., np 2005
9A03	S000402726	0.00e+00	94	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9A04	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
9A05	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
9A06	S000366962	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Singh et al., 2004
9A07	S000402726	0.00e+00	96	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9A08	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Hiroishi et al., np 2005
9A09	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
9A10	S000111343	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ley et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
9A11	S000129264	3.16e-166	93	Rhizobiales	
9A12	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B01	S000437485	0.00e+00	94	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B02	S000402726	0.00e+00	95	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9B03	S000398883	0.00e+00	96	Rhizobiales	
9B04	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B05	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9B06	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B07	S000403065	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
9B09	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
9B12	S000403065	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
9C01	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
9C02	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9C04	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9H12	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
9A02	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Hiroishi et al., np 2005
9A03	S000402726	0.00e+00	94	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9A04	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
9A05	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
9A06	S000366962	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Singh et al., 2004
9A07	S000402726	0.00e+00	96	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9A08	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Hiroishi et al., np 2005
9A09	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
9A10	S000111343	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
9A11	S000129264	3.16e-166	93	Rhizobiales	Taubel et al., 2009
9A12	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B01	S000437485	0.00e+00	94	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B02	S000402726	0.00e+00	95	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9B03	S000398883	0.00e+00	96	Rhizobiales	
9B04	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B05	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9B06	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9B07	S000403065	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
9B09	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
9B12	S000403065	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
9C01	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
9C02	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9C04	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
9C05	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9C07	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9C08	S000487836	0.00e+00	98	*Burkholderia*	
9C09	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
9C10	S000381739	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
9C12	S000381739	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
9D04	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9D05	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
9D07	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9D08	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9D09	S000389520	0.00e+00	95	*Legionella*	Lo Presti et al., 2001
9D10	S000431973	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
9D11	S000437521	0.00e+00	99	*Burkholderia*	
9E01	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9E07	S000398883	0.00e+00	96	Rhizobiales	
9E08	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9E09	S000333362	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	Mesbah et al., 2007
9F08	S000402726	0.00e+00	95	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9F10	S000437521	0.00e+00	99	*Burkholderia*	
9F11	S000111343	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
9G01	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9G02	S000333360	0.00e+00	95	*Citrobacter*	
9G05	S000492345	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Oliveira; Barbosa, np 2009
9G07	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
9G08	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
9G10	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 2 (*D. saccharalis*, Luís Antônio/SP, Cana-de-açúcar - RB85-5453 Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
4A01	S000492345	5.01e-178	93	*Klebsiella*	
4A03	S000349351	0.00e+00	96	*Roseateles*	
4A04	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Zhu et al., 2003
4A05	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Zhu et al., 2003
4A06	S000492345	5.01e-178	93	*Klebsiella*	
4A07	S000482536	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Jha; Kumar, np 2009
4A08	S000482536	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Jha; Kumar, np 2009
4A10	S000482536	0.00e+00	96	*Klebsiella*	
4A11	S000482536	0.00e+00	96	*Klebsiella*	
4B01	S000456520	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Pornwiroon et al., 2007
4B02	S000456520	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Pornwiroon et al., 2007
4B06	S000386029	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Dunn; Stabb, 2005
4B07	S000385873	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Mayilraj; Saini, np 2007
4B11	S000410098	2.51e-04	88	*Enterobacteriaceae*	
4B12	S000386029	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Dunn; Stabb, 2005
4C03	S000484371	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
4C07	S000456484	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
4C08	S000484371	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
4C09	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4C10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4C11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4C12	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4D01	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Niu et al., np 2003
4D03	S000402934	0.00e+00	97	*Muricoccus*	
4D04	S000111343	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Liu et al., np 2009
4D05	S000492345	0.00e+00	97	*Klebsiella*	,Chang et al., 2008
4D07	S000402934	0.00e+00	97	*Muricoccus*	
4D09	S000322870	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shrivastava; Kumar, np 2007
4D10	S00021091	0.00e+00	97	*Microbacterium*	Zinniel et al., 2002
4E07	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4E09	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4E11	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4F06	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F08	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F09	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G03	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
4G04	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4G08	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G09	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Grice et al., 2009
4G10	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G11	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4H05	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4B03	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4B04	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4B05	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4B08	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4B09	S000387364	0.00e+00	95	*Raoultella*	
4B10	S000387415	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
4C05	S000389831	0.00e+00	96	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
4C06	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4D02	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4D06	S000111343	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Maknojia et al., np 2006
4D08	S000387415	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Maknojia et al., np 2006
4D11	S000090678	0.00e+00	97	*Klebsiella*	
4D12	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4E01	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4E04	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4E05	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4E06	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4E08	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4E10	S000389831	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
4E12	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4F04	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F05	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F07	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4F10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G01	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G02	S000381739	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Lima et al., np 2009
4G05	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4G06	S000381739	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lima et al., np 2009
4G07	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
4G12	S000381739	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lima et al., np 2009
4H03	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4H04	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
4H07	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4H08	S000437485	0.00e+00	94	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008
4H09	S000437485	0.00e+00	94	*Klebsiella*	Fouts et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 3 (*D. saccharalis*, Luís Antônio/SP, Cana-de-açúcar - RB83-5054) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
3A01	S000139224	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3A02	S000418561	0.00e+00	93	Enterobacteriaceae	
3A03	S000139224	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3A07	S000437466	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
3A10	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3B02	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3B03	S000437466	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
3B06	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3B07	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3B08	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3B09	S000356224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3C01	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3C02	S000356224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3C05	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
3C07	S000133722	0.00e+00	96	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3C08	S000402904	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
3D01	S000133722	0.00e+00	96	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3D05	S000139224	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3D06	S000387214	0.00e+00	97	*Serratia*	
3D07	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3D08	S000139224	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3D09	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3E05	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3E08	S000379232	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
3E11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3F02	S000333359	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3F03	S000333359	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3F04	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3F05	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
3F06	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3F07	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3F10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3F11	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3F12	S000133722	0.00e+00	95	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3G01	S000133722	0.00e+00	95	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3G02	S000009798	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
3G04	S000406018	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	Lima et al., np 2009

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
3G06	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3G07	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3G08	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3G09	S000480846	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
3G10	S000378082	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
3G11	S000378082	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
3H02	S000139224	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
3H04	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3H07	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3H08	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3H10	S000009798	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
3A04	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3A05	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3A06	S000010520	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
3A08	S000010520	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
3A09	S000403065	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
3A11	S000403065	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
3B01	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3B04	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3B05	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3B10	S000468964	0.00e+00	96	*Acinetobacter*	
3B11	S000468964	0.00e+00	96	*Acinetobacter*	
3B12	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3C04	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3C06	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3C09	S000437466	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
3C10	S000413178	5.01e-175	95	*Hydrogenophilus*	
3C11	S000333359	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	
3C12	S000379232	0.00e+00	94	Enterobacteriaceae	
3D02	S000372480	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
3D03	S000483227	0.00e+00	94	Enterobacteriaceae	
3D04	S000129139	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3D10	S000372480	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3D11	S000333359	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
3D12	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3E01	S000437466	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
3E04	S000413179	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
3E06	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
3E07	S000133722	0.00e+00	96	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3E09	S000379232	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
3E10	S000402904	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
3E12	S000413179	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
3F08	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
3G03	S000133722	0.00e+00	95	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
3G05	S000333359	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
3G12	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 4 (*D. saccharalis*, Bocaina/SP, Cana-de-açúcar - RB83-5054) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
2A01	S000402904	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
2A02	S000402904	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
2A04	S000437563	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	Lambais et al., 2006
2A06	S000402904	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
2A07	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2A08	S000437466	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2A09	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2A11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2B02	S000333366	0.00e+00	94	Enterobacteriaceae	
2B03	S000139224	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2B04	S000402904	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
2B05	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2B09	S000333359	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
2B11	S000139224	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2C02	S000381739	0.00e+00	94	*Enterobacter*	
2C04	S000392891	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Liu et al., np 2009
2C06	S000406018	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Lima et al., np 2009
2C09	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2C11	S000406018	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Lima et al., np 2009
2D01	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2D03	S000139224	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2D04	S000418563	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	Lambais et al., 2006
2D07	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2D09	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2D10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2D11	S000414895	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
2D12	S000457942	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
2E01	S000385873	0.00e+00	93	*Klebsiella*	
2E02	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2E03	S000418560	0.00e+00	96	*Klebsiella*	
2E04	S000139224	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
2E08	S000385757	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
2E09	S000414895	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
2E11	S000385757	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
2F02	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2F03	S000456484	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
2F04	S000467861	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
2F05	S000456484	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
2F07	S000418562	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
2F09	S000437466	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2F10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2G01	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2G03	S000418563	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	Lambais et al., 2006
2G05	S000457942	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
2G06	S000406021	0.00e+00	97	*Klebsiella*	
2G07	S000333359	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
2G11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2H01	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2H04	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2H07	S000133722	0.00e+00	99	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2A03	S000133722	0.00e+00	96	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2A05	S000437466	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2A10	S000437466	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2B01	S000385873	2.51e-173	93	*Klebsiella*	
2B06	S000009798	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
2B07	S000387415	0.00e+00	94	*Klebsiella*	
2B08	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2B10	S000386029	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
2C01	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2C03	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2C05	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2C08	S000333359	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
2C10	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2C12	S000379232	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
2D05	S000385501	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	
2D06	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2D08	S000385501	0.00e+00	93	Enterobacteriaceae	
2E05	S000333366	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
2E06	S000009798	0.00e+00	99	*Enterobacter*	
2E07	S000333366	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
2E10	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
2F01	S000133722	0.00e+00	97	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2F06	S000278364	0.00e+00	95	Enterobacteriaceae	
2F08	S000434872	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por sequências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
2G02	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2G04	S000333359	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
2G08	S000043796	0.00e+00	97	*Acinetobacter*	
2G09	S000484377	0.00e+00	97	*Klebsiella*	
2G10	S000133722	0.00e+00	96	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
2H02	S000427636	0.00e+00	95	*Serratia*	
2H03	S000333359	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
2H05	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2H06	S000437466	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
2H09	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 5 (*D. saccharalis*, Tanabi/SP, Cana-de-açúcar - RB83-5054) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
5A03	S000410883	0.00e+00	97	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5A04	S000378078	0.00e+00	94	*Enterobacter*	Grice et al., 2009
5A06	S000402726	0.00e+00	93	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
5A11	S000402726	0.00e+00	93	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
5B01	S000434944	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	Min; Tian, np 2009
5B03	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5B07	S000434673	3.16e-105	89	*Thermovenabulum*	
5C07	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5C08	S000020181	3.16e-166	94	*Bosea*	Greub et al., 2004
5C11	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5C12	S000410881	0.00e+00	96	*Aminobacter*	Phung et al., 2004
5D01	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5D03	S000020181	0.00e+00	96	*Bosea*	Greub et al.,. 2005
5D05	S000020181	0.00e+00	96	*Bosea*	Greub et al., 2005
5D08	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5D11	S000441078	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	Niu et al., 2006
5E03	S000456519	0.00e+00	95	*Pseudomonas*	Yu et al., 2005
5E05	S000366925	1.26e-175	96	Rhizobiales	
5E07	S000128483	0.00e+00	96	*Acinetobacter*	Grice et al., 2009
5E08	S000260335	0.00e+00	97	*Clostridium*	Collins et al., 1995
5E09	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5E10	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5E11	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5F02	S000020715	0.00e+00	95	*Bosea*	Craig et al., np 2008
5F04	S000413179	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5F05	S000020715	0.00e+00	95	*Bosea*	Craig et al., np 2008
5F07	S000437783	0.00e+00	97	Rhizobiales	
5F09	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5F11	S000437783	0.00e+00	97	Rhizobiales	
5G02	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5G03	S000410883	0.00e+00	96	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5G05	S000413182	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5G07	S000257856	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
5G08	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5G10	S000406018	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
5G11	S000413182	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5H01	S000403065	1.26e-153	95	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
5H02	S000261185	1.00e-175	95	*Bosea*	Craig, et al., np 2008
5H04	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5H05	S000410883	0.00e+00	95	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5H08	S000403065	1.26e-153	95	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
5H09	S000378081	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Liu; Long, np 2006
5H10	S000333366	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	Vieira Santos et al., np 2009
5A02	S000437585	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
5A05	S000403065	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
5A07	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5A08	S000444161	0.00e+00	96	*Pseudomonas*	Larcher, np 2008
5A09	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5A10	S000366925	0.00e+00	97	Rhizobiales	
5B02	S000403065	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
5B04	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5B05	S000510883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5B06	S000250133	0.00e+00	97	*Microbacterium*	
5B08	S000437585	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
5B09	S000378081	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Liu; Long, np 2006
5B10	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5C01	S000468964	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	Barbe et al., 2005
5C02	S000385779	0.00e+00	97	*Acinetobacter*	Militon et al., np 2008
5C03	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5C05	S000366925	0.00e+00	99	Rhizobiales	
5C06	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5C09	S000413178	3.16e-157	93	*Hydrogenophilus*	
5C10	S000437566	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ovesen et al., np 2002
5D02	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5D04	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5D06	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5D07	S000395296	0.00e+00	97	Gammaproteobacteri	Burke et al., 2008
5D09	S000430557	6.31e-175	95	*Bosea*	
5D10	S000455864	2.51e-131	95	*Enterobacter*	
5D12	S000513179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5E01	S000410883	0.00e+00	97	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5E02	S000403065	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
5E04	S000485390	0.00e+00	96	*Staphylococcus*	Grice et al., 2009
5E06	S000410883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5F03	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5F06	S000489863	0.00e+00	96	*Acinetobacter*	Grice et al., 2009

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
5F08	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
5F10	S000456519	0.00e+00	99	*Pseudomonas*	
5G06	S000510883	0.00e+00	99	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5G09	S000366925	0.00e+00	99	Rhizobiales	
5H03	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006
5H06	S000492355	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2005
5H07	S000410883	0.00e+00	98	*Devosia*	Maknojia et al., np 2006

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 6 (*D. saccharalis*, Tanabi/SP, Cana-de-açúcar - RB86-7515) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
12A08	S000333366	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	Donachie et al., np 2003
12B03	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12B05	S000387414	0.00e+00	98	*Klebsiella*	
12B07	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12B09	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
12B10	S000457942	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
12C02	S000456519	0.00e+00	98	*Pseudomonas*	Sengupta; Haldar, np 2009.
12C06	S000387414	0.00e+00	98	*Klebsiella*	
12C10	S000437466	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12C11	S000133722	0.00e+00	99	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
12D01	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12D02	S000377183	0.00e+00	98	*Acinetobacter*	Barbe et al., 2004
12D03	S000377183	0.00e+00	98	*Acinetobacter*	Barbe et al., 2004
12D04	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12D09	S000021104	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
12D11	S000381739	0.00e+00	99	*Enterobacter*	Grice et al.,2009
12E01	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12E.03	S000139224	0.00e+00	99	*Enterobacter*	
12E.05	S000456519	0.00e+00	95	*Pseudomonas*	Sengupta; Haldar, np 2009
12E.6	S000106913	7.94e-155	94	Rhizobiales	
12E08	S000138633	0.00e+00	94	Enterobacteriaceae	
12E10	S000381739	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Grice et al., 2009
12E11	S000480846	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
12E12	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F04	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F05	S000398873	0.00e+00	97	Alcaligenaceae	
12F07	S000133722	0.00e+00	98	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
12F09	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F11	S000379232	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
12G01	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12G04	S000376894	0.00e+00	94	*Pseudomonas*	
12G05	S000387414	0.00e+00	98	*Klebsiella*	
12G06	S000106913	0.00e+00	99	Rhizobiales	
12G08	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12G09	S000333366	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
12G10	S000381739	0.00e+00	99	*Enterobacter*	Sengupta; Haldar, np 2009
12G11	S000133722	0.00e+00	99	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
12H06	S000468964	0.00e+00	98	*Acinetobacter*	
12H09	S000379232	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
12A01	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12A06	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12A07	S000387414	0.00e+00	97	*Klebsiella*	
12A09	S000379232	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
12A10	S000379232	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
12B02	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12B04	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12B06	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12B08	S000437466	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12B11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12C01	S000492345	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Boucher et al., 2009
12C03	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12C07	S000387414	0.00e+00	98	*Klebsiella*	
12C08	S000381739	0.00e+00	99	*Enterobacter*	Grice et al., 2009
12C09	S000133722	0.00e+00	98	*Citrobacter*	Asis; Adachi, np 2008
12C12	S000111343	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12D05	S000387414	0.00e+00	98	*Klebsiella*	
12D06	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12D10	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12D12	S000418562	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
12E02	S000456519	0.00e+00	99	*Pseudomonas*	Sengupta; Haldar, np 2009
12E04	S000483992	0.00e+00	96	*Acinetobacter*	Speck et al., np 2008
12E09	S000431973	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
12E13	S000111343	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12F01	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12F02	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F03	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F06	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F08	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F10	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12F12	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12G02	S000111343	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12G03	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12G07	S000456520	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Noghabi et al., np 2007
12G12	S000111343	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Ley et al., 2008
12H05	S000456519	0.00e+00	98	*Pseudomonas*	Sengupta; Haldar, np 2009

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
12H10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Gao et al., np 2008
12H11	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Ley et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 7 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Milho - PIONEER-30F90) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
11A01	S000106913	0.00e+00	97	Rhizobiales	
11A02	S000326366	1.26e-162	93	Sphingobacteriales	
11A03	S000106913	0.00e+00	100	Rhizobiales	
11A04	S000127030	0.00e+00	97	*Enterococcus*	
11A07	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
11A08	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
11A11	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11B02	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11B07	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11B09	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
11B11	S000434409	0.00e+00	98	*Pseudomonas*	
11C04	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
11C07	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
11C09	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Shen; He. et al., np 2007
11C10	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Shen; He. et al., np 2007
11C12	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
11D01	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11D02	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen et al., np 2007
11D05	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11D07	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
11D12	S000326366	5.01e-165	93	Sphingobacteriales	
11E04	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11E05	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11E06	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
11E07	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
11E08	S000450628	0.00e+00	99	Proteobacteria	Jing et al., np 2008
110E09	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11E11	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
11E12	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11F01	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
11F02	S000456483	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	Lambais et al., 2006
11F03	S000402726	0.00e+00	100	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
11F04	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
11F07	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
11F08	S000437598	2.51e-130	95	*Dysgonomonas*	Lehman et al., 2009
11F09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11G03	S000428252	0.00e+00	96	*Enterococcus*	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
11G06	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11G08	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
11G09	S000437521	0.00e+00	99	*Burkholderia*	
11G11	S000478875	0.00e+00	100	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11H01	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
11H02	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
11H04	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11H06	S000428252	0.00e+00	97	*Enterococcus*	
11H07	S000475426	0.00e+00	97	Deferribacterales	
11H09	S000425967	0.00e+00	99	*Tsukamurella*	
11A06	S000424746	2.51e-174	94	*Corynebacterium*	
11A10	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11A12	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11B01	S000402726	0.00e+00	97	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
11B03	S000446937	0.00e+00	96	Flavobacteriaceae	
11B04	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11B05	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11B08	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11B10	S000437485	0.00e+00	100	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
11B12	S000326366	5.01e-156	93	Sphingobacteriales	
11C01	S000407856	0.00e+00	97	*Enterococcus*	
11C02	S000450626	0.00e+00	94	Deferribacterales	
11C03	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11C05	S000450626	0.00e+00	97	Deferribacterales	
11C08	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11C11	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Shen; He, np 2007
11D03	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
11D04	S000450626	0.00e+00	97	Deferribacterales	
11D08	S000267875	0.00e+00	98	*Corynebacterium*	
11D09	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
11D10	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
11E01	S000450626	0.00e+00	97	Deferribacterales	
11E02	S000456464	0.00e+00	98	*Pseudomonas*	
1103	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11F06	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11F10	S000127030	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
11G02	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
11G04	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
11G07	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filogenética	Autor
11G10	S000437598	5.01e-128	95	*Dysgonomonas*	Lehman et al., 2009
11H03	S000450626	0.00e+00	97	Deferribacterales	
11H08	S000351834	3.16e-92	88	*Starkeya*	
11H10	S000326366	5.01e-165	93	Sphingobacteriales	
11H11	S000425967	0.00e+00	99	*Tsukamurella*	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 8 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Milho - 2B-710) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Afiliação filigenética	Autor
6A04	S000403065	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
6A07	S000403065	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
6A10	S000403065	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
6A11	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6A12	S000403065	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
6B02	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6B05	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6B08	S000142268	1.00e-160	93	Bacteria	
6B11	S000142268	1.00e-160	93	Bacteria	
6B12	S000142268	1.00e-160	93	Bacteria	
6C04	S000347900	0.00e+00	97	*Pedomicrobium*	
6C06	S000457912	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6C07	S000354089	0.00e+00	95	*Acidobacterium*	
6C08	S000475426	0.00e+00	96	Deferribacterales	
6C10	S000413178	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
6C11	S000347900	0.00e+00	97	*Pedomicrobium*	
6D01	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
6D05	S000340692	0.00e+00	97	*Anaerobaculum*	
6D06	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
6D10	S000326366	3.16e-148	92	Sphingobacteriales	
6D11	S000413178	0.00e+00	95	*Hydrogenophilus*	
6E01	S000326366	3.16e-148	92	Sphingobacteriales	
6E05	S000142268	2.51e-164	93	*Bacteria*	
6E06	S000142268	2.51e-164	93	*Bacteria*	
6E07	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6E10	S000413178	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
6E12	S000347900	0.00e+00	97	*Pedomicrobium*	
6F03	S000426636	0.00e+00	98	Bacillaceae	Nogi et al., np 2000
6F04	S000426021	0.00e+00	95	*Methylobacterium*	
6F05	S000457912	1.26e-177	94	*Sphingomonas*	
6F06	S000142268	1.26e-162	93	Bacteria	
6F09	S000413182	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6F12	S000413178	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	
6G01	S000100946	2.51e-180	94	Bacteria	
6G02	S000482243	0.00e+00	94	*Sphingomonas*	
6G06	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
6G08	S000475426	0.00e+00	98	Deferribacterales	
6G10	S000251860	7.94e-143	96	Flexibacteraceae	
6G12	S000100946	2.51e-180	94	Bacteria	
6H01	S000467865	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6H03	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6H05	S000467865	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6H07	S000426636	0.00e+00	98	Bacillaceae	Nogi et al., np 2000
6H12	S000413179	0.00e+00	96	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6A01	S000129264	1.00e-135	92	Rhizobiales	Wanget et al., 2008
6A02	S000469012	0.00e+00	95	*Methylobacterium*	
6A05	S000129264	1.00e-135	92	Rhizobiales	Wang et al., 2008
6A06	S000138899	1.00e-141	93	*Sphingomonas*	
6A08	S000469012	0.00e+00	95	*Methylobacterium*	
6A09	S000402353	1.26e-165	90	Deltaproteobacteria	Yan et al., np 2009
6D03	S000450626	0.00e+00	96	Deferribacterales	
6D04	S000456519	0.00e+00	96	*Pseudomonas*	
6D07	S000138899	3.16e-160	92	*Sphingomonas*	
6D08	S000138899	3.16e-160	92	*Sphingomonas*	
6D12	S000138899	3.16e-160	92	*Sphingomonas*	
6E02	S000326432	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6E03	S000129264	3.16e-166	93	Rhizobiales	Wang et al., 2008
6E04	S000358512	0.00e+00	95	Rhizobiales	Roose-Amsaleg et al., np 2003
6E08	S000129264	3.16e-166	93	Rhizobiales	Wang et al., 2008
6E09	S000326432	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6E11	S000326432	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6F01	S000326432	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
6F07	S000341990	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	
6F08	S000341990	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	
6F10	S000441454	0.00e+00	97	Rhizobiales	
6F11	S000341990	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	
6G03	S000413179	0.00e+00	94	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6G04	S000326418	3.16e-166	94	*Methylobacterium*	
6G05	S000347806	0.00e+00	97	*Sphingomonas*	Berg et al., 2009
6G07	S000129264	1.26e-165	92	Rhizobiales	Wang et al., 2008
6G09	S000326418	3.16e-166	94	*Methylobacterium*	
6G11	S000413179	0.00e+00	94	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
6H02	S000347806	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	Berg et al., 2009
6H04	S000347806	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	Berg et al., 2009

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 9 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Arroz – SCSBRS5112) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
8A01	S000392891	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Liu et al., np 2009
8A02	S000406018	0.00e+00	97	*Enterobacteriaceae*	Lima et al., np 2009
8A03	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8A04	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
8A05	S000139224	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
8A06	S000418563	0.00e+00	98	*Enterobacteriaceae*	Lambais et al., 2006
8A07	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Ovesen et al., np 2002
8A12	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8B01	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8B03	S000414895	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Dunn; Stabb, 2005
8B04	S000457942	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
8B05	S000385873	0.00e+00	93	*Klebsiella*	
8B06	S000418560	0.00e+00	96	*Klebsiella*	
8C05	S000456548	1.00e-157	93	*Xanthomonadaceae*	
8C10	S000456312	0.00e+00	98	*Sphingomonas*	
8D02	S000349351	0.00e+00	96	*Roseateles*	
8D03	S000444871	0.00e+00	97	*Ralstonia*	De Baere et al., 2001
8D04	S000395419	0.00e+00	98	*Haemophilus*	
8G09	S000349351	0.00e+00	96	*Roseateles*	
8G10	S000444871	0.00e+00	97	*Ralstonia*	De Baere et al., 2001
8G12	S000395419	0.00e+00	98	*Haemophilus*	
8H02	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8H05	S000333360	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
8H06	S000392891	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Liu et al., np 2009
8H07	S000334994	0.00e+00	99	*Enterobacteriaceae*	
8H08	S000406018	0.00e+00	97	*Enterobacteriaceae*	Lima et al., np 2009
8H09	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8H10	S000139224	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
8H11	S000139224	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
8H12	S000407826	0.00e+00	96	*Agrococcus*	Lee, 2008
8A08	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8B07	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8B08	S000437466	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
8B09	S000387364	0.00e+00	95	*Raoultella*	
8B10	S000387415	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
8B11	S000090678	0.00e+00	97	*Klebsiella*	
8B12	S000389831	0.00e+00	96	*Rhizobium*	
8C01	S000437466	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
8C02	S000437485	0.00e+00	96	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8C03	S000111343	0.00e+00	96	*Klebsiella*	
8C04	S000387415	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
8C06	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8C07	S000403065	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
8C08	S000403065	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
8C09	S000381739	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
8C11	S000403065	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
8C12	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
8D01	S000403065	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
8D05	S000468755	0.00e+00	96	*Sphingobacterium*	
8D06	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8D07	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8D08	S000437485	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8D09	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8D10	S000381739	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
8D11	S000381739	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
8D12	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Babu; Pandian., np 2004
8E01	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8E02	S000437466	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Babu; Pandian, np 2004
8E03	S000437485	0.00e+00	95	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8E04	S000398883	0.00e+00	96	*Rhizobiales*	
8E05	S000402726	0.00e+00	95	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
8E06	S000437485	0.00e+00	94	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8E06	S000437485	0.00e+00	97	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
8E11	S000129264	3.16e-166	93	*Rhizobiales*	Taubel et al., 2009

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
8E12	S000358512	0.00e+00	95	*Rhizobiales*	Roose-Amsaleg, np 2003
8F01	S000326432	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
8F02	S000341990	0.00e+00	95	*Acinetobacter*	
8F03	S000441454	0.00e+00	97	*Rhizobiales*	
8F04	S000413179	0.00e+00	94	*Hydrogenophilus*	
8F05	S000347806	0.00e+00	97	*Sphingomonas*	
8F07	S000129264	1.26e-165	92	*Rhizobiales*	
8F08	S000326418	3.16e-166	94	*Methylobacterium*	
8F12	S000347806	0.00e+00	95	*Sphingomonas*	
8G01	S000456493	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
8G02	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Kwon et al., 2005
8G03	S000346310	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Hoffmann; Roggenkamp, np 2001
8G04	S000346310	0.00e+00	96	*Enterobacter*	Hoffmann; Roggenkamp, np 2001
8G05	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Hoffmann; Roggenkamp, np 2001
8G06	S000333360	0.00e+00	95	*Citrobacter*	
8G07	S000431973	0.00e+00	98	*Enterobacteriaceae*	Heylen et al., np 2006
8G08	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	Hoffmann; Roggenkamp, np 2001
8G11	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
8H01	S000333362	0.00e+00	96	*Enterobacteriaceae*	Zhu et al., 2002
8H03	S000398883	0.00e+00	96	*Rhizobiales*	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 10 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Algodão - IAC-25RMD) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
1A03	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Park et al 2000
1A05	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
1A07	S000402726	0.00e+00	96	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1A09	S000366962	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
1A10	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
1B02	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
1B04	S000402726	0.00e+00	94	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1B06	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
1C01	S000475426	0.00e+00	96	Deferribacterales	
1C02	S000430586	0.00e+00	96	*Pseudomonas*	Minillo et al., 2001
1C04	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1C06	S000475426	0.00e+00	98	Deferribacterales	
1C08	S000421625	0.00e+00	94	*Acinetobacter*	Chopade et al., np 2007
1C12	S000333360	0.00e+00	95	*Citrobacter*	
1D02	S000456493	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
1D09	S000473495	0.00e+00	98	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
1D10	S000346310	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
1D11	S000346310	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
1E03	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
1E04	S000333360	0.00e+00	95	*Citrobacter*	
1E08	S000431973	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
1E09	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
1E10	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1F03	S000333362	0.00e+00	96	Enterobacteriaceae	
1F04	S000398883	0.00e+00	96	Rhizobiales	
1F05	S000402726	0.00e+00	95	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1F07	S000353423	0.00e+00	97	Bradyrhizobiaceae	
1F09	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1G03	S000346310	0.00e+00	95	*Enterobacter*	
1G04	S000346310	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
1G08	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
1H03	S000495213	0.00e+00	95	Proteobacteria	
1H06	S000333360	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
1H08	S000333360	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
1A01	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
1A02	S000366962	0.00e+00	97	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
1A04	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
1A06	S000346310	0.00e+00	97	*Enterobacter*	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
1A08	S000402726	0.00e+00	97	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1B05	S000437521	0.00e+00	99	*Burkholderia*	Wang et al., 2007
1B07	S000402726	0.00e+00	97	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1B09	S000333362	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
1B10	S000470789	0.00e+00	99	*Bradyrhizobium*	Kwon, 2005
1C03	S000333360	0.00e+00	99	*Citrobacter*	
1C05	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1C07	S000402726	0.00e+00	97	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1C09	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
1C10	S000346310	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
1C11	S000477937	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
1D01	S000333360	0.00e+00	96	*Citrobacter*	
1D03	S000366962	0.00e+00	99	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
1D04	S000366962	0.00e+00	99	*Enterobacter*	Lambais et al., 2006
1D05	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1D06	S000333362	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
1D08	S000333362	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
1D12	S000475426	5.01e-141	90	Deferribacterales	
1E01	S000367749	3.16e-179	94	Enterobacteriaceae	
1E02	S000472962	1.26e-180	94	*Rhizobium*	Chueire et al., 2002
1E05	S000346310	0.00e+00	99	*Enterobacter*	
1E06	S000375985	0.00e+00	97	*Acinetobacter*	Chopade et al., np 2007
1E07	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1F01	S000333362	0.00e+00	97	Enterobacteriaceae	
1F06	S000475426	0.00e+00	98	Deferribacterales	
1F08	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1F10	S000346310	0.00e+00	99	*Enterobacter*	
1G01	S000333360	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
1G05	S000439171	0.00e+00	99	*Pseudonocardia*	
1G06	S000346310	0.00e+00	99	*Enterobacter*	
1G07	S000333360	0.00e+00	97	*Citrobacter*	
1G09	S000334994	0.00e+00	99	Enterobacteriaceae	
1G10	S000407826	0.00e+00	96	*Agrococcus*	Lee, 2008
1H02	S000346310	0.00e+00	96	*Enterobacter*	
1H04	S000333366	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
1H05	S000333360	0.00e+00	98	*Citrobacter*	
1H07	S000475426	0.00e+00	98	Deferribacterales	
1H09	S000407826	0.00e+00	96	*Agrococcus*	Lee, 2008
1H10	S000345580	0.00e+00	95	*Acetivibrio*	

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 11 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Sorgo -822) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
10A02	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A03	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A04	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A07	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10A08	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10A09	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A10	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A11	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B08	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B10	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B12	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	
10C02	S000413179	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10C05	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	
10C06	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
10C07	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10C09	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
10C10	S000413179	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10C12	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D02	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D03	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D04	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D05	S000403606	0.00e+00	95	Actinomycetales	
10D06	S000478875	0.00e+00	100	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D07	S000442905	0.00e+00	98	Enterobacteriaceae	
10D08	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D12	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E03	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E04	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E06	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E07	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E08	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E09	S000484106	0.00e+00	99	*Ralstonia*	
10E11	S000320226	0.00e+00	98	*Hydrogenophilus*	
10E12	S000402726	0.00e+00	97	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10F01	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10F03	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
10F07	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10F08	S000413179	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10F09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10F10	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10F11	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G01	S000403065	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	Lopez-Garcia et al., 2003
10G02	S000478875	0.00e+00	96	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G03	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G04	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G05	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10G09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G10	S000426021	0.00e+00	97	*Methylobacterium*	Kuffner et al., np 2009
10G11	S000484106	0.00e+00	98	*Ralstonia*	
10G12	S000403606	0.00e+00	95	Actinomycetales	Dees; Ghiorse, 2001
10H01	S000413179	0.00e+00	97	*Hydrogenophilus*	Portillo et al., 2008
10H03	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H04	S000478875	0.00e+00	97	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H05	S000134004	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H06	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H07	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
10H11	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10A01	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10A12	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B02	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B03	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B06	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10B07	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10C01	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
10C03	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
10C04	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10C08	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10C11	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10D01	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10D10	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10D11	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E02	S000378082	0.00e+00	97	*Enterobacter*	
10E05	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
10E10	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10E13	S000378074	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Do et al., np 2007
10F02	S000378074	0.00e+00	95	*Enterobacter*	Do et al., np 2007
10F04	S000402726	0.00e+00	98	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
10F05	S000478875	0.00e+00	96	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10F06	S000478875	0.00e+00	96	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G07	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10G08	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H02	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H08	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H09	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003
10H10	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	Zhu et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Biblioteca de clones n° 12 (*S. frugiperda*, Piracicaba/SP, Arroz – CSBRS5112) Continua

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
7A01	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7A05	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7A07	S000127030	0.00e+00	97	*Enterococcus*	
7A09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7A11	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7B07	S000439825	0.00e+00	99	*Ralstonia*	
7B08	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C01	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C02	S000354089	0.00e+00	97	*Acidobacterium*	
7C03	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C04	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C05	S000432087	0.00e+00	97	*Corynebacterium*	
7C07	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7C10	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C12	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
7D02	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
7D03	S000106913	0.00e+00	99	Rhizobiales	
7D05	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7D06	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
7D08	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7D10	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7D12	S000456484	0.00e+00	98	*Enterobacter*	
7E05	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7E11	S000461371	0.00e+00	97	*Devosia*	Che et al., np 2008
7F02	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7F03	S000322870	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Kapley; Purohit, np 2005
7F06	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7F11	S000437485	0.00e+00	98	*Klebsiella*	Frank et al., 2007
7G01	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7G02	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7G04	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7G05	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7G06	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Continuação

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
7G07	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7G08	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
7G10	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
7H02	S000413179	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
7H03	S000495129	0.00e+00	98	*Rhizobium*	
7H04	S000413179	0.00e+00	99	*Hydrogenophilus*	
7H10	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7H11	S000428252	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7B02	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
7B03	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
7B04	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
7B05	S000450626	0.00e+00	100	Deferribacterales	
7B06	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7B09	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7B10	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7B11	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7B12	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C06	S000428252	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7C08	S000465609	0.00e+00	99	*Acinetobacter*	
7C09	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7C11	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7D01	S000478875	0.00e+00	98	*Enterococcus*	
7D04	S000424746	6.31e-177	94	*Corynebacterium*	
7D07	S000457912	0.00e+00	99	*Sphingomonas*	
7D09	S000456529	0.00e+00	99	*Rhizobium*	
7D11	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7E01	S000489750	0.00e+00	96	Firmicutes	Hartmann, Widmer, 2006
7E02	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7E03	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7E04	S000402726	0.00e+00	96	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003
7E06	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7E07	S000387415	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Boye; Hansen, np 1998.
7E08	S000402726	0.00e+00	99	*Ralstonia*	Schoenfeld et al., 2003

Tabela 3.3 – Composição das comunidades de bactérias do mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* obtidas de DNA metagenômico e identificadas por seqüências de rRNA 16S

Conclusão

Clones	Best Hit ID	E-value	ID(%)	Classificação	Autor
7E09	S000424746	6.31e-177	94	*Corynebacterium*	
7E10	S000450626	0.00e+00	97	Deferribacterales	
7E12	S000437521	0.00e+00	97	*Burkholderia*	
7F01	S000450628	0.00e+00	97	Proteobacteria	Jing et al., np 2008
7F04	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7F05	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7F07	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7F08	S000425967	0.00e+00	99	*Tsukamurella*	
7F09	S000478875	0.00e+00	99	*Enterococcus*	
7F10	S000492345	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Babu; Pandian., np 2004
7F12	S000492345	0.00e+00	99	*Klebsiella*	Babu; Pandian., np 2004
7G03	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	
7H05	S000450626	0.00e+00	98	Deferribacterales	
7H06	S000450626	0.00e+00	99	Deferribacterales	

3.3 Discussão

As bactérias presentes no mesêntero de lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* provenientes de diferentes localidades e diferentes espécies ou variedades de plantas hospedeiras foram identificadas por meio de técnicas moleculares que independem do cultivo dos microrganismos, com o objetivo de complementar as análises feitas por isolamento em meio de cultura (capítulo 2). Variações importantes foram observadas entre os resultados obtidos pelo isolamento dos microrganismos cultiváveis e os obtidos por sequenciamento de clones. A maioria das bactérias isoladas em meio de cultura tanto de *S. frugiperda* quanto de *D. saccharalis* pertence ao filo Firmicutes, sendo o gênero *Bacillus* o mais abundante. Entretanto, Firmicutes foi obtido de clones de *D. saccharalis* somente na variedade RB83-5054 proveniente de Tanabi e em baixa porcentagem dos clones seqüenciados. Já nos clones de *S. frugiperda,* bactérias pertencentes a esse filo foram encontradas em porcentagens consideráveis em apenas duas populações (sorgo e arroz). *Bacillus* somente foi encontrado em uma amostra de *S. frugiperda* (milho 2B710) e não foi identificado nos clones de *D. saccharalis.* Proteobacteria e Actinobacteria foram detectados pelos dois métodos de caracterização da microbiota em diferentes proporções. Estas diferenças podem ter ocorrido por diferentes fatores, como: método de extração de DNA, capacidade de crescimento em meio de cultivo dos grupos dominantes e amplificação diferencial das seqüências de rRNA 16S nas reações de PCR. Por exemplo, é conhecido que bactérias do gênero *Bacillus* são mais resistentes à degradação da parede celular (lise) na maioria dos métodos de extração de DNA. Nas extrações a partir de DNA metagenômico estes podem ser obtidos em menores quantidades mesmo sendo abundantes no tubo digestivo. Desta forma, os três métodos usados nesse estudo: isolamento *in vitro*, DGGE e sequenciamento da biblioteca de clones, são complementares e permitem uma melhor determinação da diversidade microbiana intestinal.

A análise da comunidade bacteriana de *S. frugiperda* por DGGE sugere que a variação da estrutura das comunidades está diretamente relacionada com a origem das populações e tipo de alimento consumido pelo inseto. Da mesma forma, observou-se uma grande variação na densidade e abundância relativa de bactérias que pode estar relacionada à quantidade e tipo de alimento consumido, ao estágio do processo digestivo e variações fisiológicas das lagartas, pois em um período anterior à ecdise as lagartas cessam a ingestão de alimento repercutindo em redução na densidade de microrganismos.

As comunidades bacterianas de lagartas oriundas de criação em laboratório alimentadas com dieta artificial, e natural (milho e algodão) formaram um agrupamento hierárquico com maior similaridade, comparadas às amostras de lagartas oriundas de população de campo e alimentadas com algodão, sorgo e arroz. As análises dos agrupamentos hierárquicos dos amplicons de rRNA 16S de bactérias do mesêntero de *D. saccharalis* indicaram uma maior similaridade das comunidades em função do local de coleta (amostras de uma mesma região) do que em função da variedade de cana-de-açúcar. As bactérias do trato digestivo de insetos podem ser constitutivas, patógenos oportunistas ou simplesmente serem adquiridas temporariamente durante a alimentação. Fatores como condições ambientais, tipo de solo e manejo agronômico da cultura, podem induzir variações na microbiota dos insetos.

As comunidades de bactérias do trato digestivo de *D. saccharalis* são compostas por membros dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, sendo Proteobacteria o filo predominante. A afiliação filogenética das seqüências de *D. saccharalis* revelou que o gênero *Klebsiella* esteve presente em todas as amostras analisadas. Os dados sugerem que *Klebsiella* devem ser bactérias constitutivas, podendo exercer alguma função importante para o inseto tendo alguma relação vantajosa para o hospedeiro. Entretanto, as bactérias encontradas somente em algumas das áreas amostradas, podem ser caracterizadas como microrganismos transientes, relacionados às características específicas da região e importantes para suprir algumas necessidades particulares.

No trato digestivo de *S. frugiperda* foram encontradas seqüências de rRNA 16S dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Acidobacteria, sendo os dois primeiros os mais abundantes. As comunidades de bactérias variaram em função da planta hospedeira, entretanto, *Ralstonia* e *Hydrogenophilus* estiveram presentes em insetos que se alimentaram da maioria das plantas avaliadas. A presença constante de alguns microrganismos na maioria dos insetos indica que estes possam ser indispensáveis, exercendo alguma função vital para o inseto ou desempenhando alguma relação simbiótica ou comensal vantajosa para o hospedeiro. Embora tenha sido avaliado um número pequeno de amostras de *S. frugiperda* coletadas em campo, as análises indicam que a diversidade de bactérias neste inseto foi maior de que em *D. saccharalis* e que existe uma maior variação da comunidade bacteriana em *S. frugiperda* em função da planta hospedeira. Isto pode indicar que exista em *S. frugiperda* uma associação entre o hábito alimentar polífago e a diversidade e plasticidade microbiana. Os

microrganismos podem auxiliar na superação das dificuldades inerentes às características fisiológicas de cada espécie de planta hospedeira e os compostos vegetais de defesa produzidos pela herbivoría, provendo enzimas, alterando o pH, produzindo vitaminas, etc. que viabilizam o processo de digestão.

Devido à variedade de habitat onde os insetos se desenvolvem, e aos microambientes presentes no seu trato digestivo, não é surpresa encontrar variação na comunidade de bactérias de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* em diferentes plantas e regiões. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos feitos em cupins (YANG et al., 2005). A estrutura, atividade e variação temporal das comunidades microbianas do trato digestivo dos insetos é determinada por complexas interações do ambiente físico, ciclo sazonal e a biologia do hospedeiro. Estes microrganismos desenvolveram diferentes tipos de associações mutualistas, comensalistas e patogênicas com os insetos, podendo alguns deles ser transmitidos de geração para geração. As vantagens da microbiota para o hospedeiro já foi demonstrada para alguns insetos. Em cupins, que prosperam numa dieta rica em lignocelulose e possuem no intestino regiões adaptadas para abrigar uma microbiota com funcionalidades específicas, a fermentação microbiana é responsável pela produção de grande quantidade de energia e nutrientes para o hospedeiro.

A elevada cobertura de amostragem dos clones das bibliotecas em todas as amostras indica que a comunidade de microrganismos do trato digestivo desses insetos é reduzida conseguindo obter uma boa cobertura em comparação ao que acontece quando é feita uma avaliação dos microrganismos presentes em amostras de solo, por exemplo, onde a cobertura pode chegar a 20-30%. A diversidade de microrganismos em insetos pode variar desde comunidades extremamente simples até complexas.

A diversidade de bactérias do mesêntero de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* apresentaram muitas similaridades. Na análise comparativa das amostras de campo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* pelo agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de bactérias por DGGE, observou-se uma maior similaridade das comunidades de bactérias no trato digestivo em função do local de coleta. Por exemplo, observou-se uma alta similaridade das lagartas de *D. saccharalis* (cana-de-açúcar RB835054 e SP813250) e *S. frugiperda* (Milho Pioneer 30F90) que foram coletadas em campo na cidade de Piracicaba/SP. Este resultado é interessante pelo fato de serem lagartas de espécies e hábitos alimentares diferentes. A caracterização da estrutura microbiana desses insetos é de grande importância agrícola, pois pode fornecer subsídios para o

desenvolvimento de técnicas inovadoras que podem ser somadas ao manejo integrado dessas pragas nas culturas onde estas ocorrem causando prejuízos.

Referências

BARBE, V.; VALLENET, D.; FONKNECHTEN, N.; KREIMEYER, A.; OZTAS, S.; LABARRE, L.; CRUVEILLER, S.; ROBERT, C.; DUPRAT, S.; WINCKER, P.; ORNSTON, L.N.; WEISSENBACH, J.; MARLIERE, P.; COHEN, G.N.; MEDIGUE, C . Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 5766-5779, 2004.

BERG, K.A.; LYRA, C.; SIVONEN, K.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; TUOMI. P.; RAPALA, J. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. **ISME Journal**, London, v. 3, p. 314-325, 2009.

BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U.; RAI. A.N. Cyanobacterial associations. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. **Associative Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 2003. p. 257-301.

BREZNAK J.A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. **Annual Review of Microbiology** Palo Alto, v. 36, p. 323–343, 1982.

BURKE, D.J.; DUNHAM, S.M.; KRETZER, A.M. Molecular analysis of bacterial communities associated with the roots of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) colonized by different ectomycorrhizal fungi. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, p. 299-309, 2008.

CAMPBELL, B.C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. **Insect-plant interactions**. Boca Raton: CRC Press, 1990. v.1. p. 1-44.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassifiation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.1, p. 7-76, 2002.

CHANG, J.Y.; ANTONOPOULOS, D.A.; KALRA, A.; TONELLI, A.; KHALIFE, W.T.; SCHMIDT, T.M.; YOUNG V.B. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 197, p. 435-438, 2008.

CHUN, J.; BAE, K.S.; MOON, E.Y.; JUNG, S.O.; LEE, H.K.; KIM, S.J. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderate halophilic actinomycete isolated from a saltern. **International Journal of Systematic and Evolutionary Mycrobiology**, Reading, v. 50, p. 1909-1913, 2000.

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A.E. The phylogeny of the

genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Mycrobiology**, Reading, v. 44, p. 812-826, 1994.

DE BAERE, T.; STEYAERT, S.; WAUTERS, G.; DE VOS, P.; GORIS, J.; COENYE, T.; SUYAMA, T.; VERSCHRAEGEN, G.; VANEECHOUTTE, M. Classification of Ralstonia pickettii biovar 3/'thomasii' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as Ralstonia mannitolytica sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Mycrobiology**, Reading, v, 51, p. 547-558, 2001

DEES, P.M.; GHIORSE, W.C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 207-216, 2001.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects. Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 49, p. 71–92, 2004.

DUNN, A.K.; STABB, E.V. Culture-Independent Characterization of the Microbiota of the Ant Lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 8784-8794, 2005.

EWING, B; GREEN, B. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genoma Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FOUTS, D.E.; TYLER, H.L.; DEBOY, R.T.; DAUGHERTY, S.; REN, Q.; BADGER, J.H.; DURKIN, A.S.; HUOT, H.; SHRIVASTAVA, S.; KOTHARI, S.; DODSON, R.J.; MOHAMOUD, Y.; KHOURI, H.; ROESCH, L.F.; KROGFELT, K.A.; STRUVE, C.; TRIPLETT, E.W.; METHE B.A. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetic**, Stanford, v. 4 n. 7, E1000141, 2008.

FRANK, D.; AMAND, A.; FELDMAN, R.; BOEDEKER, E.; HARPAZ, N.; PACE, N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciencies of the United Stated of America**, Stanford, v. 104, p. 13780-13785, 2007.

FRIEDRICH, M.W.; SCHMITT-WAGNER, D.; LUEDERS, T.; BRUNE, A. Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4880–4890, 2001.

GAO, B; GUPTA, R.S. Conserved indels in proteins sequence that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Reading, v 55, p. 2401-2412, 2005.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. 2001. A road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M; GARRITY, G.M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag KG, 2001. v. 1, p. 119-116.

GIBBONS, N.E.; MURRAY, R.G.E. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 28, p.1–6, 1978.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.37, p. 189-216, 1983.

GRICE, E.A.; KONG, H.H.; CONLAN S.; DEMING C.B.; DAVIS J.; YOUNG A.C.; BOUFFARD G.G.; BLAKESLEY R.W.; MURRAY P.R.; GREEN E.D.; TURNER M.L.; SEGRE J.A. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. **Science**, Washington, DC, v. 324, p. 1190-1192, 2009.

GREUB, G.; La SCOLA, B.; RAOULT, D. Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v, 10, p. 470-477, 2004.

HARTMANN, M.; WIDMER, F. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 7804-7812, 2006.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.

HUSON, D.H.; AUCH, A.F.; QI, J.; SCHUSTER, S.C. MEGAN Analysis of metagenomic data. **Genome Research**, Woodbury, v. 17, p. 377–386, 2007.

KWON, S.W.; PARK, J.Y.; KIM, J.S.; KANG, J.W.; CHO, Y.H.; LIM, C.K.; PARKER, M.A.; LEE, G.B. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 263-270, 2005.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. chap. 4. p. 43-84.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LEHMAN, R.M.; LUNDGREN, J.G.; PETZKE, L.M. Bacterial Communities Associated with the Digestive Tract of the Predatory Ground Beetle, *Poecilus chalcites*, and Their Modification

by Laboratory Rearing and Antibiotic Treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57 p. 349-358, 2009.

LEE, S.D. *Agrococcus jejuensis* sp. nov., isolated from dried seaweed. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2297-2300, 2008.

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

LOPEZ-GARCIA, P.; DUPERRON, S.; PHILIPPOT, P.; FORIEL, J.; SUSINI, J.; MOREIRA, D. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 961-976, 2003.

Lo PRESTI, F.; RIFFARD, S.; MEUGNIER, H.; REYROLLE, M.; LASNE, Y.; GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BENSON, R.F.; BRENNER, D.J.; STEIGERWALT, A.G.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Legionella gresilensis sp. nov. and Legionella beliardensis sp. nov., isolated from water in France. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1949-1957, 2001.

MACY, J.M. The biology of gastrointestinal Bacteroides. **Annual Review of Microbiology,** Palo Alto, v. 33, p. 561–594, 1984.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 453-461, 2003.

MESBAH, N.M.; ABOU-EL-ELA, S.H.; WIEGEL, J. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the wadi an natrun, Egypt. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, p. 598-617, 2007.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; MANIATIS, T.; LEMAN, L.S. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 13, p, 3111-3129, 1985.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 501-527, 1987.

MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, DC, v.59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NIU, S.Q.; FUKUSHIMA, J.; YING, J.; ISHIKAWA, Y.; UEDA, T.; MATSUMOTO, S. Analysis of bacterial community structure in the natural circulation system wastewater bioreactor by using a 16S rRNA gene clone library. **Microbiology and Immunology,** Tokyo**,** v. 50, p. 937-950, 2006.

ØVERÅS, L; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromitic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCRamplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3 ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1996**.**137p.

PENNANEN, T.; PAAVOLAINEN, L.; HANTULA, J. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 697-699, 2001.

PHUNG, N.T.; LEE, J.; KANG, K.H.; CHANG, I.S.; GADD, G.M.; KIM, B.H. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. **FEMS Microbiological Letters,** Reading, v. 233, p. 77-82, 2004.

PORNWIROON W.; FOIL L.D.; MACALUSO K.R. Comparative microbiota of Rickettsia felis-uninfected and -infected colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis.* **ISME Journal**, London, v. 1, p. 394-402, 2007.

PORTILLO, M.C; SAIZ-JIMENEZ, C.; GONZALEZ, J.M. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of ‘‘white colonizations’’ in the Altamira Cave, Spain. **Research in Microbiology,** Paris**,** v. 160, v. 41-47, 2009**.**

RAI, A.N.; SÖDERBÄCK, E.; BERGMAN. B. Tansley Review No. 116, Cyanobacterium-plant symbioses. **New Phytology**, Lancaster, v. 147, p. 449–481, 2000.

RAI, A.N.; BERGMAN, B.; RASMUSSEN. U. **Cyanobacteria in Symbiosis**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 2002.

RAGSDALE P.A. Synthesis and function of the Actinomyces naeslundii T14V type 1 fimbriae require the expression of additional fimbria-associated genes. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 6, p. 2629-2639, 1997.

SALYERS, A.A. Bacteroides of the human lower intestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 38 p. 293–313, 1984.

SCHMITT-WAGNER, D.; FRIEDRICH, M.; WAGNER, B.; BRUNE, A. Axial dynamics, stability, and interspecies similarity of bacterial community structure in the highly compartmentalized gut of soil-feeding termites (Cubitermes spp.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v, 69, p. 6018–6024, 2003.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistic: **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SCHOENFELD J.; HEUER H.; VAN ELSAS J.D.; SMALLA K. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of fliC fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69 n. 12, p. 7248-7256, 2003.

SHAH, H.N.; COLLINS, M.D. Proposal to restrict the genus Bacteroides (Castellani and Chalmers) to Bacteroides fragilis and closely related species. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 39, p. 85–87, 1989.

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

SIGLER, W.V.; TURCO, R.F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, Washington, DC, v. 21, p. 107-118, 2002.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L; WHITMAN, W.B Quantitative comparisons of 16S r RNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

STEINHAUS, E.A. The importance of environmental factors in the insect- microbe ecosystem. **Bacteriological Review**, New York, v. 24, p. 365–73, 1960.

TAUBEL, M.; RINTALA, H.; PITKARANTA, M.; PAULIN, L.; LAITINEN, S.; PEKKANEN, J.; HYVARINEN, A.; NEVALAINEN, A. The occupant as a source of house dust bacteria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 124, p. 834-840. 2009.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas spp*. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicideimazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 1147 – 1153, 2001.

THOMPSON, J.D; HIGGINS, D.J; GIBSON, T.J. ClustalW- improving the sensitivity of regressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matix choice. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

Van TRAPPEN, S.; VANDECANDELAERE, I.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. Gillisia limnaea gen. nov., sp. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae isolated from a microbial mat in Lake Fryxell, Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 445–448, 2004.

WANG, Y.; BRUNE, A.; ZIMMER, M. Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 61, p. 141-152, 2007.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J; FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 6, p. 143-151, 1985.

YANG, H.; SCHMITT-WAGNER, D.; STINGL, U.; BRUNE, A. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the in the termite gut (Reticulitermes santonensis). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n.7, p. 916–932, 2005.

ZHU X.Y.; LUBECK J.; KILBANE J.J. II. Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 5354-5363, 2003.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo