

FABIENE MARIA DE JESUS

**NICHO TRÓFICO DE GRILOS DE SERRAPILHEIRA FLORESTAL:
UMA ANÁLISE UTILIZANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E
NITROGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

J58n
2015

Jesus, Fabiene Maria de, 1984-

Nicho trófico de grilos de serrapilheira florestal : uma
análise utilizando isótopos estáveis de carbono e nitrogênio /
Fabiene Maria de Jesus. – Viçosa, MG, 2015.
viii, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Carlos Frankl Sperber.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nicho (Ecologia). 2. Ecossistemas. 3. Grilo - Mata
Atlântica. 4. Carbono - Isótopos. 5. Hidrogênio - Isótopos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Doutorado em Ecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 581.7

FABIENE MARIA DE JESUS

**NICHO TRÓFICO DE GRILOS DE SERRAPILHEIRA FLORESTAL:
UMA ANÁLISE UTILIZANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E
NITROGÊNIO**

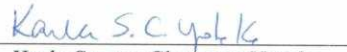
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de setembro de 2015.


Paulo Felipe Cristaldo


Sabrina da Silva Pinheiro de Almeida


José Henrique Schoereder


Karla Suemy Clemente Yotoko


Carlos Frankl Sperber
(Orientador)

A vida é feita de reencontros, e como é bom reencontrar pessoas que um dia de alguma forma fizeram parte de nossas vidas. Dedico esta tese a minha família e a todos os meus amigos de alma, reencontrados na vida acadêmica, pois sem eles eu não teria força, alegria e entusiasmo necessários para dar forma às minhas ideias, projetos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Biologia Geral, e do PPG em Ecologia, por todo apoio, infraestrutura e fonte de conhecimento.

Aos órgãos de fomento: CAPES pela bolsa de Doutorado, CAPES, FAPEMIG e CNPq pela aprovação do projeto SISBIOTA. Esse financiamento foi essencial à realização de todos os trabalhos apresentados nesta tese.

Ao Professor Dr. Carlos Frankl Sperber pela amizade, confiança, orientação, oportunidade de crescimento profissional e acima de tudo pessoal. O suporte técnico, científico e financeiro oferecido também foi essencial. MUITÍSSIMO obrigada! És um grande amigo.

Aos meus Coorientadores: Marcelo Ribeiro Pereira e Cassiano Souza Rosa que me orientaram do início ao fim da escrita. Obrigada pela imensa parceria e ajuda em todos os momentos: coletas, análises estatísticas, comemorações, distrações, tristezas... Enfim, são verdadeiros coautores de todos os trabalhos concluídos e à concluir.

Aos proprietários das áreas particulares e aos responsáveis junto aos órgãos ambientais por permitirem e ajudarem nas coletas. Em especial ao Waldomiro de Paula Lopes, Analista Ambiental - Parque Nacional do Caparaó e Laurielen Gurgel Pacheco, Monitora ambiental do P.E. Serra do Brigadeiro.

A todos os integrantes do Laboratório de Ecologia de Formigas, Lab. de Ecologia Vegetal, LabEcol, e em especial ao LabOrt. (Laboratório de Orthoptera) e àqueles não vinculados a laboratórios, que me auxiliaram nas várias etapas desse projeto desde o início até os dias atuais. Sozinho ninguém realiza!

Aos amigos e estagiários, Ênio Henrique Viana Araújo, Geanne Carla Ripani Rodrigues e ao Thiago Bigonha. Além da ajuda nas coletas, criação e manutenção dos grilos, eles me ensinaram a compartilhar o conhecimento e aprendizagem, a ter motivação, a ver novos horizontes e novas possibilidades.

A todos os amigos reencontrados na vida acadêmica. Vocês fazem parte dessa história. Tenham certeza de que tudo ficou mais fácil e prazeroso pela simples existência de cada um. Já estou com saudades! Não irei citar nomes, pois cada um sabe exatamente o quanto é especial e representa na minha vida e na construção deste sonho! Obrigada...

À minha família, pelo amor, compreensão, amparo, conforto, ensinamentos, por tudo que sou. Amo vocês. E, por último e não menos especial, ao grande e pequeninos amores da minha vida, Mozim (Rafael Alves Narciso), Micalatéia, Mel, Sofia e Júlia. Mozim, obrigada por ser meu amigo, parceiro e enamorado. Te amo. Obrigada por me fazerem entender o que é o amor incondicional.

Querido Deus, neste momento não quero pedir, quero somente agradecer!

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
ESTRUTURA DA TESE	5
ARTIGO 1: Métodos de preservação alteram os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio em grilos (Orthoptera: Grylloidea). (Preservation methods alter carbon and nitrogen stable isotope values in crickets (Orthoptera: Grylloidea). <i>Artigo publicado em setembro de 2015 na revista PLOs ONE: 10(9): e0137650. doi: 10.1371/journal.pone.0137650)</i>	6
ARTIGO 2: Efeito da dieta na composição isotópica de grilos (Orthoptera: Grylloidea). <i>Artigo a ser submetido na revista Rapid Communications in Mass Spectrometry em formato de Carta ao Editor.</i>	41
ARTIGO 3: Partição de nicho trófico entre grilos (Orthoptera: Grylloidea) de serrapilheira florestal. <i>Artigo científico a ser submetido na revista Functional Ecology.</i>	54
CONCLUSÃO GERAL	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

JESUS, Fabiene Maria. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2015.
Nicho trófico de grilos de serrapilheira florestal: uma análise utilizando isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Orientador: Carlos Frankl Sperber.
Coorientadores: Marcelo Ribeiro Pereira e Cassiano Sousa Rosa.

Vários mecanismos propostos por ecólogos teóricos buscam elucidar os processos envolvidos na coexistência de espécies em comunidades biológicas. Dentre esses mecanismos destacam-se aqueles que preveem a coexistência de espécies sendo facilitada por uma partição de recursos, associando processos competitivos à teoria de nicho. Assim, a coexistência e as interações entre as espécies têm sido investigadas por meio dos conceitos de nicho postulados e revisados por diversos estudiosos. Alguns autores têm proposto uma abordagem metodológica e tecnológica relativamente nova baseada em análise de isótopos estáveis (AIE), que pode ser utilizada para medir algumas das muitas dimensões dos nichos ecológicos.

Neste contexto, a utilização da AIE em tecidos animais está permitindo descrever nichos isotópicos, cujos eixos em um espaço multidimensional seriam diferentes assinaturas isotópicas (por exemplo, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$). A utilidade da AIE reside no fato de que os tecidos em expansão apresentam grandes variações temporais de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ que refletem diretamente a gama de recursos alimentares consumidos e isotopicamente contrastantes ao longo do tempo. No entanto, estudos que utilizam AIE para estimar nicho trófico exigem o conhecimento de alguns fatores que podem alterar os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em tecidos animais, tais como: (i) os tipos de preservação que as amostras são submetidas antes da análise; (ii) o fracionamento isotópico que ocorre em tecidos de consumidores com relação a sua dieta. Neste contexto, esta tese apresenta três capítulos. No primeiro capítulo, nosso objetivo foi estabelecer uma metodologia que preservasse amostras de grilos para posterior AIE sem que houvesse alterações nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$. Para isso, nós comparamos amostras de grilos recém processadas (controle) com amostras submetidas a dois métodos de preservação: físico (congelamento) e químico (etanol comercial e combustível) por 15 e 60 dias. Nossos resultados indicam que todos os métodos de preservação testados alteram pelo menos um dos valores isotópicos dos grilos quando comparado com o controle. Assim, recomendamos o uso de material recém-processado para AIE em grilos. No segundo capítulo, nosso principal

objetivo foi avaliar como se dá o fracionamento dos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em corpos de grilos alimentados com dieta artificial e com isso fornecer informações de base para interpretar resultados de nicho trófico baseados na AIE de grilos em comunidades biológicas. Para isso, estimamos os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de indivíduos de três espécies de grilos alimentados com dieta artificial, e comparamos com os valores isotópicos da dieta artificial. Estimamos também os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em corpos de grilos alimentados em campo (dieta natural desconhecida). Nós demonstramos que a AIE é uma ferramenta promissora para investigar a posição trófica dos grilos de serrapilheira, uma vez que temos estimativas do quanto o ^{15}N varia nos grilos com relação à sua dieta. E por último, no terceiro capítulo descrevemos o nicho trófico da comunidade de grilos, avaliando a partição de nicho entre espécies coocorrentes de grilos. Encontramos evidências de que a coexistência de espécies de grilos em comunidades naturais envolve partição de recursos alimentares. O local de forrageamento influenciou diretamente no uso da dieta e conseqüentemente na posição trófica dos grilos, os quais apresentaram até três níveis tróficos quando avaliados em um contexto global da dieta. Essa partição é evidenciada pelos diferentes valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados nos corpos dos grilos. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ evidenciam que os grilos utilizam recursos alimentares com origem em plantas C_3 . Finalmente, encontramos evidências de estreitamento do nicho trófico à medida que aumenta o número de espécies coocorrentes.

ABSTRACT

JESUS, Fabiene Maria. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2015.
Trophic niche of forest litter-dwelling crickets: an analysis using stable isotopes of carbon and nitrogen. Adviser: Carlos Frankl Sperber. Co-advisers: Marcelo Ribeiro Pereira and Cassiano Sousa Rosa.

Several mechanisms proposed by theoretical ecologists try to determine the processes involved in the coexistence of species in biological communities. Among these mechanisms include those which predict the species coexistence is facilitated by a partition of resources, associating competitive processes to niche theory. Thus, the coexistence and interactions among species have been investigated by niche concepts postulated and reviewed by many scientists. Some authors have proposed a relatively new methodological and technological approaches based stable isotope analysis (hereafter, SIA), that can be used for measure a few of the many dimensions of ecological niches. In this context, the use of SIA on animal tissues is allowing describing isotopic niches, whose axes in a multidimensional space would be different isotopic signatures (e.g. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). The usefulness of SIAs lies in the fact that the continuously growing tissues record temporal variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ that directly reflect the range of isotopically contrasting food resources consumed over time. However, studies using SIA to estimate trophic niche requires knowledge of some factors that can change the isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in animal tissues such as: (i) the types of preservation that the samples are subjected before analysis; (ii) the isotopic fractionation that occur in consumer tissues with regard to your diet. In this context, this thesis has three chapters. In the first chapter, our goal was to establish the best methodology for preserving forest litter-dwelling crickets for later SIA analysis without altering in the values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. In this regard, we compare crickets freshly processed (control) and samples subjected to two preservation methods: physical (freezing) and chemical (commercial and fuel ethanol) for 15 and 60 days. Our results indicate that all tested preservation methods alter at least one of the isotopic values of the crickets when compared with the control. We therefore recommend the use of freshly processed material for SIA in crickets. In the second chapter, our main objective was to evaluate the isotopic fractionation of ^{13}C and ^{15}N associated with converting artificial diet into consumer cricket bodies and thus basic information has to be

given in order to interpret the trophic niche crickets, based on SIA. In this regard, we estimate the isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ individuals of three species of crickets fed on artificial diet and compared with the isotopic values of the artificial diet. Also estimated the isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ found in bodies of crickets fed the field (unknown natural diet). We demonstrate that the SIA is a promising tool to investigate the trophic position of crickets, since estimate the isotopic fractionation of ^{13}C and ^{15}N in cricket bodies. Finally, in the third chapter we describe the trophic niches of crickets communities, evaluating the niche partition among coocorrentes species. We found evidence that the coexistence of species of crickets in natural communities involves partitioning of food resources. The foraging site directly influenced the use of diet and consequently on the trophic position of crickets, which submitted up to three trophic levels when evaluated in a global context of the diet. This partition is evidenced by the different $\delta^{15}\text{N}$ values found in the bodies of crickets. The $\delta^{13}\text{C}$ values show that crickets uses food resources originating from C_3 plants. Finally, we find evidence of narrowing of trophic niche as you increase the number of coocorrentes species.

INTRODUÇÃO GERAL

Vários mecanismos propostos por ecólogos teóricos buscam elucidar os processos envolvidos na coexistência de espécies em comunidades naturais (Chesson 2000; Giacomini 2007; Allesina & Levine 2011). A partilha de recursos alimentares tem sido descrita como um desses processos, evocando, na maioria das vezes, processos competitivos associados à teoria de nicho (Abrams 1983; Tilman 1988; Wilson 1990; Tilman & Pacala 1993; Chase & Leibold 2003; Svanback & Schluter 2012; Correa & Winemiller 2014). O conceito de nicho ecológico foi criado por Grinnell (1917), com ênfase em variáveis ambientais em larga escala, e reinterpretado por Elton (1927), que considerou nicho como a posição, ou papel, do organismo no ecossistema (Elton 1927; MacArthur & Levins 1967). Aqui adotamos uma visão pragmática, em que o nicho é quantificado através da descrição de suas dimensões (Hutchinson 1957; Tilman 1982), com distinção entre o nicho fundamental e realizado. O nicho fundamental ou potencial (Hutchinson 1957) descreve o espaço como um hipervolume n-dimensional, que consiste de uma série de variáveis climáticas e bióticas, em que, na ausência de competição, a espécie é capaz de persistir indefinidamente (McGill et al. 2006). No entanto, as interações bióticas, incluindo competição, relações simbióticas e predação, desempenham importante papel no delineamento das porções de nichos fundamentais, alimentares e geográficos, que são os chamados "nichos realizados", ou ocupados, dada a influência de outras espécies, e não sendo possível uma sobreposição total destas porções (Soberon 2007).

Alguns autores (Bearhop et al. 2004; Newsome et al. 2007; Layman et al. 2007a; Jackson et al. 2011) têm proposto uma tecnologia relativamente nova baseada em análise de isótopos estáveis (AIE), que pode ser utilizada para medir algumas das muitas dimensões dos nichos ecológicos. O uso de isótopos estáveis para explorar nichos tróficos é facilitado pela existência de uma variedade de assinaturas isotópicas que distinguem os elementos dentro e entre teias alimentares (Newsome et al. 2007). Dentre esses isótopos, o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ são os isótopos estáveis mais frequentemente utilizados em estudos de ecologia trófica (Post 2002). Assume-se que o fator de discriminação para o carbono varia de 0‰ a 1‰, ao longo da cadeia alimentar (Peterson & Fry 1987), servindo para determinar as

fontes de carbono usadas por consumidores (Vander Zanden & Rasmussen 2001; Post 2002) e o nitrogênio possui um fator de discriminação que aumenta entre 2‰ e 5‰, a cada nível trófico (Peterson & Fry 1987; De Niro & Epstein 1981; Hobson & Clark 1992b; Bearhop et al. 2002), empregado por ecologistas para estimar posição trófica dos animais em teias alimentares.

O delineamento dos espaços de nichos isotópicos (eixos $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) e as medidas de sobreposição interespecífica desses nichos podem fornecer um meio para quantificar nichos tróficos em comunidades naturais e inferir sobre o quão semelhante são as dietas entre espécies coocorrentes (Wang et al. 2004; Ercoli et al. 2014). Alguns autores acreditam que esta ferramenta pode ser utilizada para prever o potencial para a coexistência ou exclusão competitiva das espécies que se alimentam dos mesmos recursos alimentares (Araújo & Guisan 2006). Isso porque a variação isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nos indivíduos de cada espécie pode ser utilizada como uma medida de amplitude de forrageamento, além de definir os limites do nicho isotópico ocupado (Layman et al. 2007a; Jackson et al. 2011, Ercoli et al. 2014; Syvaranta et al. 2013).

Em serrapilheiras de florestas neotropicais, os grilos são importantes componentes na base de cadeias alimentares, fornecendo um fluxo significativo de energia através da predação por animais de níveis tróficos superiores como aves (Hau, Wikelski & Wingfield 2000), répteis (Unrine et al. 2007), anfíbios, outros artrópodes etc. (Kupfer et al. 2006). Os grilos são considerados, na grande maioria, como onívoros, com base em sua aceitação de grande variedade de materiais orgânicos em laboratório (Walker & Masaki 1989; FMJ observação pessoal), análise de conteúdo do todo digestivo (Castner & Fowler 1984) e observações em campo (Desutter-Grandcolas 1995). Assim, é razoável pensar que, sendo grilos de serrapilheira florestal, eles têm acesso a fontes de recursos alimentares de origem vegetal ou animal, até material vivo ou morto. Essa observação inviabiliza o uso de técnicas tradicionais (observações diretas e análise de conteúdo estomacal ou fecal) para avaliar a amplitude de dieta de grilos. Além de não refletirem adequadamente a quantidade de nutrientes assimilados nos tecidos em escala temporal (Bolnick et al. 2003), estas técnicas estão limitadas à identificação de grandes grupos taxonômicos (restos animais ou vegetais) presentes dentre os itens alimentares (Gangwere 1961; Gonçalves 2004), não sendo capazes de identificar, por exemplo,

o consumo de organismos mortos ou em decomposição (detritivoria). Por outro lado, a AIE de tecidos animais ou do corpo inteiro refletem a sua história alimentar do animal, não se restringindo a itens recém ingeridos (Fry 2006), sendo portanto, a ferramenta mais adequada, atualmente, para avaliar o nicho trófico de muitos organismos.

Entretanto estudos que utilizam AIE para estimar nicho trófico exigem o conhecimento de alguns fatores que podem alterar os valores isotópicos em tecidos animais, além da dieta. Um destes fatores se refere aos tipos de preservação que as amostras são submetidas antes da AIE. Os isótopos estáveis só podem ser usados como indicadores da dieta de um organismo, se a composição isotópica de amostras analisadas corresponde exatamente ao do organismo no campo, sem agregação de isótopos a partir de qualquer outra fonte. Como o processamento da amostra para AIE necessita de acesso a instalações de laboratório, as amostras muitas vezes não podem ser analisadas em campo (Carabel et al. 2009; Kaehler & Pakhomoy 2001, Hobson et al. 1997), devendo antes ser recolhidas e armazenadas para posterior análise. Se a técnica de preservação escolhida alterar os valores isotópicos, os resultados da AIE podem ser indevidamente interpretados. Uma alternativa preferível seria evitar totalmente a preservação das amostras, através da realização de análises isotópicas imediatamente após a coleta de campo (Ponsard & Amlou 1999), no entanto, a coleta de grilos é feita, muitas vezes, em regiões remotas, longe de laboratórios bem equipados. Sendo o processamento rápido, portanto, inviável no campo, destacando a necessidade de técnicas de preservação dos espécimes a fim de evitar a decomposição da amostra e subsequente alteração dos resultados das AIE.

Outro fator que deve ser compreendido antes da utilização das AIE para interpretações de nicho trófico é o fracionamento isotópico que ocorre nos tecidos de consumidores com relação a sua dieta. A este respeito, sabe-se que a razão de isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) dos animais reflete um equilíbrio entre a ingestão desses isótopos através da alimentação e perda através da respiração e excreção. Os tecidos dos consumidores terão sempre mais do isótopo raro (^{13}C e ^{15}N) do que a sua dieta, por que a respiração é preferencial ao ^{12}C e a excreção ao ^{14}N (Wehi & Hicks 2010). A variação no fracionamento trófico depende do fracionamento da dieta nos tecidos animais, do *turnover* (taxa de

renovação celular) de cada tecido, do tipo de recurso alimentar consumido (Post 2002; McCutchan et al. 2003; Vanderklift & Ponsard 2003; Spence & Rosenheim 2005; Caut et al. 2009), entre outros.

Embora a compreensão dos efeitos fisiológicos dos tecidos animais nos valores de isótopos estáveis tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos devido a um aumento no número de estudos de dieta controlada (Hobson & Clark 1992a, b; Caut et al. 2009; Hilderbrand et al. 1996; Haramis et al. 2001; Pearson et al. 2003; Gratton & Forbes 2006), o número destes trabalhos com invertebrados de pequeno porte ainda é pequeno, principalmente com insetos. Embora se saiba que os valores isotópicos de consumidores sofrem um fracionamento em comparação com os valores isotópicos de sua dieta (McCutchan et al. 2003; Caut et al. 2009), uma quantificação desse fracionamento espécie-específico é essencial para uma maior precisão na estimativa de níveis tróficos. Particularmente para grilos de serrapilheira, cujo estudo da dieta em campo é geralmente dificultado pelo seu tamanho pequeno e características peculiares (hábito noturno, ágeis, respondem fortemente às vibrações da serrapilheira e se camuflam com facilidade) (Desutter-Grandcolas 1995; Sperber et al. 2007), análises de isótopos estáveis (AIE) podem ser reveladoras.

Nesse trabalho, descrevemos os nichos tróficos de grilos de serrapilheira em escala local e avaliamos se há partição de nicho trófico entre as espécies que coocorrem em serrapilheira de floresta tropical. Para isso, realizamos no primeiro capítulo um teste para saber qual o melhor método de preservação de amostras de grilos para posterior AIE sem que houvesse alterações nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$; no segundo capítulo avaliamos como se dá o fracionamento dos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em corpos de grilos alimentados com dieta artificial. OS resultados destes estudos forneceram informações de base para interpretar os resultados de nicho trófico baseados na AIE de grilos em comunidades biológicas, que foi o terceiro capítulo.

ESTRUTURA DA TESE

A tese está estruturada em três artigos científicos:

Artigo I: Preservation methods alter carbon and nitrogen stable isotope values in crickets (Orthoptera: Grylloidea) – *Artigo publicado em setembro de 2015 na revista PLoS ONE: 10(9): e0137650. doi: 10.1371/journal.pone.0137650*

Artigo II: Efeito da dieta na composição isotópica de grilos (Orthoptera: Grylloidea) – *Artigo a ser submetido na revista Rapid Communications in Mass Spectrometry.*

Artigo III: Partição de nicho trófico entre grilos (Orthoptera: Grylloidea) de serrapilheira florestal – *Artigo científico a ser submetido na revista Functional Ecology.*

ARTIGO 1: Métodos de preservação alteram os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio em grilos (Orthoptera: Grylloidea). (Preservation methods alter carbon and nitrogen stable isotope values in crickets (Orthoptera: Grylloidea). *Artigo publicado em setembro de 2015 na revista PLOs ONE: 10(9): e0137650. doi: 10.1371/journal.pone.0137650*)

Preservation methods alter carbon and nitrogen stable isotope values in crickets (Orthoptera: Grylloidea)

Fabiene M. Jesus^{1*}, Marcelo R. Pereira², Cassiano S. Rosa³, Marcelo Z. Moreira⁴, Carlos F. Sperber¹

¹Programa de Pós-graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

²Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Biologia, Alegre, ES, Brazil.

³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus Iturama, Curso de Ciências Biológicas, Iturama, MG, Brazil.

⁴Laboratório de Ecologia Isotópica, Centro de Energia Nuclear na Agricultura| CENA/USP, Piracicaba, SP, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: fabienneuab@gmail.com

Abstract

Stable isotope analysis (SIA) is an important tool for investigation of animal dietary habits for determination of feeding niche. Ideally, fresh samples should be used for isotopic analysis, but logistics frequently demands preservation of organisms for analysis at a later time. The goal of this study was to establish the best methodology for preserving forest litter-dwelling crickets for later SIA analysis without altering results. We collected two cricket species, *Phoremia* sp. and *Melolopsis doucasae*, from which we prepared 70 samples per species, divided among seven treatments: (i) freshly processed (control); preserved in fuel ethanol for (ii) 15 and (iii) 60 days; preserved in commercial ethanol for (iv) 15 and (v) 60 days; fresh material frozen for (vi) 15 and (vii) 60 days. After oven drying, samples were analyzed for $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ values, N(%), C(%) and C/N atomic values using continuous flow isotope ratio mass spectrometry. All preservation methods tested, significantly impacted $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and C/N atomic values. Chemical preservatives caused $\delta^{13}\text{C}$ enrichment as great as 1.5‰, and $\delta^{15}\text{N}$ enrichment as great as 0.9‰; the one exception was *M. doucasae* stored in ethanol for 15 days, which had $\delta^{15}\text{N}$ depletion up to 1.8‰. Freezing depleted $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ by up to 0.7‰ and 2.2‰, respectively. C/N atomic values decreased when stored in ethanol, and increased when frozen for 60 days for both cricket species. Our results indicate that all preservation methods tested in this study altered at least one of the tested isotope values when compared to fresh material (controls). We conclude that only freshly processed material provides adequate SIA results for litter-dwelling crickets.

Introduction

The growing utilization of stable isotope analysis has helped set a rigorous empirical and theoretical basis for ecological studies of nutrient flow and trophic linkages^[1-4]. The relationships among different stable carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, expressed as $\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, expressed as $\delta^{15}\text{N}$) isotopes are widely used to investigate dietary habits of animals in order to determine their respective feeding niches^[5-11]. Stable isotopes are naturally available in the environment and are

ingested while feeding, thus an animal's isotopic composition is indicative of its feeding habits throughout life ^[12, 13]. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios can thus be used to identify consumer reliance on primary producers with different photosynthetic pathways, namely C_3 , C_4 , or CAM ^[14, 15]. A combination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios is commonly used in animal studies to identify dietary composition, and to establish trophic position within both marine and terrestrial food webs ^[16–18]. Stable Isotope Analyses (SIA) has been used for studies of a broad scope of organisms, from unicellular phyto- and zooplankton ^[19], to seaweed ^[20, 21], higher plants ^[22], and several animal groups, including spiders ^[23], grasshoppers ^[7], termites ^[11], ants ^[2], flies ^[24], and vertebrates, including quail, sheep ^[25], and turtles ^[26], among others. To our knowledge, there has been no previous SIA studies in the context of cricket (Grylloidea) ecology.

Crickets are the most common Orthoptera in neotropical forest litter ^[27], which is the most productive and biodiverse stratum in these forests ^[28]. Knowledge of tropical forest invertebrates, especially neotropical crickets, is sparse. Neotropical cricket ecology is a recent field of study ^[29, 30], and to advance knowledge in this area a better understanding of cricket diet and feeding habits (i.e., beyond their general classification as ‘omnivorous’) ^[31] is needed. Although we know that crickets may feed on a range of items including plants, animals, and both living and dead organisms, we do not yet have data regarding feeding niche partitioning or variation. Stable isotope studies have strong potential as a tool for providing a more detailed picture of cricket feeding habits.

Stable isotopes may only be used as indicators of an organism's diet if the isotope composition of analyzed samples corresponds exactly to that of the organism in the field, without aggregation of isotopes from any other source. Because sample processing for SIA relies on access to laboratory facilities, samples often cannot be analyzed in the field ^[20, 21, 25], and must instead be collected and stored for later analysis. If the chosen preservation technique alters isotopic values, then the SIA results may be improperly interpreted. A preferable alternative would be to avoid sample preservation altogether, by performing isotope analyses immediately after field collection ^[24], however, cricket collection is often done in remote regions, away from well-equipped labs. Rapid processing is thus unfeasible

in the field, highlighting the need for specimen preservation techniques that avoid sample decomposition and subsequent alteration of SIA results.

Because litter crickets are easily startled and flee in response to substrate vibration ^[32], live (manual) capture is difficult. Passive sampling techniques are used to solve this limitation, commonly via pitfall traps filled with killing solution ^[30, 33]. This and other passive sampling methods are essential for studies at large spatial and temporal scales, or in studies that test local environmental drivers of biodiversity (i.e., factors that influence biodiversity, such as soil moisture, vegetation structure, resource availability), and should minimize researcher interference. Pitfall traps without killing solution do capture live crickets, but many can escape the trap. No-kill traps may also enable mesofaunal predators to feed on the intended study organisms (C.F. Sperber, pers. obs.).

Many types of killing solutions have been tested for efficiency in pitfall sampling, such as water and detergent ^[34], formaldehyde and ethylene glycol ^[33, 34], salt brines ^[35] and acetic acid ^[36]. However, ethanol solutions are considered as the most effective for cricket sampling due to rapid killing, which prevents escape ^[33, 37], and effective preservation of DNA ^[38, 39]. Ethanol solutions are also the most common preservation method in cricket taxonomic collections (e.g. Souza-Dias 2015). For field sampling, Szinwelski et al. ^[39] recommended substitution of ethanol fuel as killing agent in place of commercial ethanol, because the former is cheaper, logistically less cumbersome, and also preserves DNA.

Despite its effectiveness for preservation of whole cricket specimens and of cricket DNA, it remains questionable whether ethanol is an adequate preservation medium for cricket SIA. Ethanol is a lipophilic organic compound and thus could solubilize lipid compounds, altering the carbon isotope signature ^[2, 40]. Several studies have examined preservation effects on stable isotope ratios ^[19, 26, 41], with inconsistent results. For example, preservation in ethanol changes the isotope signature for some aquatic and marine organisms, including some species of fish, mollusk, seaweed, zooplankton, and anemone, but does not impact the isotope signatures of aquatic insects ^[19]. The unsuitability of ethanol has been challenged for vertebrates and invertebrates ^[19], as studies of ethanol-stored tissues of quail, sheep ^[25], turtles ^[26], insects ^[42] and macroinvertebrates ^[40] showed no changes in carbon isotope signature.

Samples subjected to organic solvents may have altered carbon isotopic signals due to loss of dissolved lipids and gain of solvent constituent carbon. By removing lipids, which are naturally highly depleted of ^{13}C and rich in ^{12}C) ^[43], ethanol may increase the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sample values, thus amplifying the ^{13}C signal. Carbon from ethanol preservatives might also be incorporated into the cricket bodies, altering the isotopic signals. Fuel ethanol is distinct from commercial ethanol because it is a complex mixture of flammable liquid and volatile hydrocarbons derived from petroleum, with carbonic chains varying from 4 to 12 carbon atoms as well as oxygenates and nitrogen compounds ^[44]; these additional components can alter $\delta^{15}\text{N}$ isotope signals. Thus, a priori knowledge of how preservation methodologies interact with different sample types and the resulting impact on isotopic values is essential.

Viable alternatives to ethanol preservation may include freezing when immediate drying is not possible, but not all studies have considered the potential impacts of this method on stable isotope ratios. Among the studies that have tested effects of freezing, some found significant and even strong impacts on stable carbon and nitrogen isotope values ^[40, 45, 46], while others found none ^[21, 47].

Studies of the effects of different preservation methods (including freezing) on stable carbon and nitrogen values have produced highly variable results for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, ranging from no impact to over 2‰ difference between stored samples and controls ^[19, 45, 48]. Changes in carbon and nitrogen isotope values may be species-specific ^[20], and there may even be intra-specific differences ^[49] related to characteristics such as body size, cuticle thickness, or life stage-dependent changes in the proportion of fat reserves. Knowledge of how preservation methodologies interact with different sample types and the resulting impact on isotopic values is essential. Only then can we correctly interpret information regarding trophic ecology from isotope data based on preserved samples.

The aim of this study was to identify the best methodology for preservation of forest litter-dwelling crickets for later stable isotope evaluation. We compared the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope values of freshly dried crickets with those preserved via freezing or chemical storage, for either 15 or 60 days prior to

analysis. If the preservation methods are appropriate for these organisms, then SIA results should not differ between freshly dried and preserved cricket samples.

We expected that samples preserved in ethanol (both fuel and commercial) would vary in isotopic carbon and nitrogen values compared to controls. Further, we anticipated that the distance of carbon and nitrogen isotope values in ethanol, compared to control samples, should increase with storage time. Finally, we expected that frozen samples, which are not subjected to chemical compounds, should not differ from freshly processed material.

Materials and Methods

Collection of crickets

We collected two species of forest litter cricket (Orthoptera: Grylloidea), *Phoremia* sp. (Trigonidiidae: Nemobiinae) (S1A Fig.) and *Mellopsis doucasae* Mews & Sperber, 2010 (Phalangopsidae: Luzarinae) (S1B Fig.). These species are not endangered or protected. They occur in Atlantic forest remnants in the region of Viçosa, Minas Gerais state, southeastern Brazil, where the dominant vegetation type is secondary (regrowth) seasonal semi-deciduous montane forest ^[50]. Forest litter crickets have been observed feeding on fruits, arthropods and leaves (C.F. Sperber, pers. obs.). We chose these species because although they share the same microhabitat, *Phoremia* sp. is diurnal and *M. doucasae* is nocturnal (M.R. Pereira, pers. obs.). They are also phylogenetically distant ^[51, 52], thus we expected that they should present different isotopic signals.

Collections were carried out from the 4th to 19th July 2013. Crickets were collected manually (live capture) on leaf litter using wide-mouth (15 cm diameter) jars. Collections were done daily for about four hours per day, until we gathered approximately 1000 individuals. All collections were done in a 60 ha semideciduous Atlantic forest remnant, called “Mata da Biologia”, on the Campus of the Federal University of Viçosa, Viçosa, MG (S 20°45’30”—W 42°51’50”). No specific permissions were required to collect insects in the area at the time of the study. Our group has general authorization to collect insects in the entire Brazilian territory via a Permanent License for Collection of Zoological Material, provided

by the Brazilian Institute of the Environment and Natural Resources (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis—IBAMA) for CFS, number 553948. Species determination was done with the aid of a specialist (Marcelo R. Pereira); voucher specimens were deposited in the Orthoptera collection of the Orthoptera Laboratory in the General Biology Department, (Coleção de Orthoptera do Laboratório de Orthoptera, Departamento de Biologia Geral), affiliated with the Regional Museum of Entomology at the Federal University of Viçosa (Museu Regional de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa—UFVB), Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Crickets were brought to the laboratory, provided with water on a dampened piece of cotton, and kept alive and unfed for two days in order to empty the digestive tract.

Preservation and processing

After two days of food deprivation, crickets were killed by exposure to -20°C for up to 20 min. As soon as the crickets stopped moving, they were taken out of the refrigerator, so as to prevent freezing them. This killing method aimed to prevent suffering while avoiding freezing of the samples. After killing, each cricket was rinsed with distilled water, to wash dirt and particles attached to the cricket's body surface, and stored in glass vials in pooled samples of eight *Phoremia* sp. adults or four *M. doucasae* immature, totaling 70 samples for each species. Life stages were selected as available in the field. These samples were divided equally among seven treatments for a total of 10 sample replicates per treatment, as follows: (i) freshly processed (controls); (ii) preserved in fuel ethanol for 15 days; (iii) preserved in fuel ethanol for 60 days; (iv) preserved in 92.8% (96° GL) commercial ethanol for 15 days; (v) preserved in 92.8% (96° GL) commercial ethanol for 60 days; (vi) fresh material frozen for 15 days; (vii) fresh material frozen for 60 days. All glass vials used in the ethanol treatments were properly closed and stored at room temperature, and protected from light and heat. Immediately after killing (controls) or after preservation period, the samples were oven-dried in open glass vials at 60°C for 72 hours. After drying, each pooled sample was ground and sieved (100 μm mesh) separately, prior to isotope analysis, so as to achieve complete homogenization of each sample. Therefore, individual

insects of each sample were ground together and analyzed as a homogenized batch. After finishing homogenization of each sample, all laboratory tools were detergent-washed, rinsed and dried, before processing the next sample.

Stable isotope analysis

We performed continuous flow isotope ratio mass spectrometry (CF-IRMS) for sample analysis using a Delta Plus mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to a Carlo Erba CHN 1110 elemental analyzer (Thermo Scientific). Analyses were performed at the Isotope Ecology Laboratory at the Center for Nuclear Energy in Agriculture, CENA, University of São Paulo (Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura—CENA, University of São Paulo, São Paulo), São Paulo state, Brazil. Briefly, organic matter (i.e., milled cricket samples) was converted into gas by fully dry combustion, generating N₂ and CO₂, which were then purified in the elemental analyzer through a chromatographic separation column in ultrapure helium carrier, and sequentially admitted to the mass spectrometer by means of an interface (Conflo II, Thermo Scientific). The ¹⁵N/¹⁴N and ¹³C/¹²C isotope ratios were evaluated after separation of molecules according to isotope mass, and finally compared to the calibrated gas ratios using Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) limestone and atmospheric nitrogen as international standards for δ¹³C and δ¹⁵N, respectively. These working standards were calibrated using NBS-19 and NBS-22, and AIEA-N1 and IAEA-N₂ as reference materials and the estimated analytical precision of these measurements was 0.1‰ for carbon and 0.2‰ for nitrogen based on the standard deviation of WS replicates during the runs. Results are expressed in “delta” notation (δ¹³C, δ¹⁵N) in parts per thousand (‰) as relative deviations of the isotope ratios compared to standards, using the following formula:

$$\delta X = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) * 1000$$

where R_{sample} and R_{standard} are the ¹³C/¹²C and ¹⁵N/¹⁴N ratios for the sample and international standards, respectively. X represents the “heavy” isotopes ¹³C or ¹⁵N. The δX values denote isotopic enrichment or depletion relative to the standard;

a more positive “ δ ” value is isotopically enriched, meaning that the sample contains proportionally more of the “heavy” stable isotope (^{13}C or ^{15}N). The weight percentages of carbon and nitrogen output from the instrument mentioned above were converted to C/N atomic values.

Statistical analyses

We used analyses of variance (ANOVA) with preservation method as an explanatory factor. We ran an independent analysis for each response variable ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, %C, %N and C/N) by adjusting generalized linear models (GLM). Modeling was performed using R ^[53], with normal error distribution confirmed by residual analysis.

We evaluated which factor levels (preservation methods) were significantly different through contrast analysis, by aggregating levels and comparing change in deviance ^[54]. If the aggregated level did not significantly alter the deviance explained by the model, the levels were pooled together (amalgamated), simplifying the model. We repeated this procedure until attaining a minimum adequate model for each response variable ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, %C, %N and C/N) by stepwise omission of non-significant terms.

Adequate preservation methods should result in stable isotope signatures that do not differ from freshly processed material. We interpreted any differences between preserved and freshly processed material as an indication of altered isotope signature due to inadequate preservation methods. We evaluated storage time effects on SIA values by comparing samples preserved in the same solution types, independent of control results.

Results

Evaluation of external morphology of both frozen samples and those preserved in ethanol (fuel and commercial) revealed no signs of decomposition by the end of the experiment (60 days). However, most preservation methods altered $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ and C/N values in both species compared to controls (Figs. 1 and 2, Table 1, sequences of statistical model simplifications for contrast analyses are

presented in S1 Table and S2 Table). Although the effects of preservation method on isotope values differed between species (Figs. 1 and 2), total content of C, N, and C/N atomic values were similar (Table 1).

$\delta^{15}\text{N}$ values

The $\delta^{15}\text{N}$ values of freshly processed samples (controls) for *Phoremia* sp. did not differ from samples submitted to four of the preservation methods (both frozen samples (i.e., 15 and 60 days) and samples preserved for 60 days in fuel or commercial ethanol) ($P > 0.07$; S1 Table), however values did differ from samples preserved for 15 days in both commercial and fuel ethanol ($F_{1,68} = 40.35$, $P < 0.0001$, Fig. 1a). For samples preserved in ethanol for 15 days, there was mean enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ up to 0.9‰ compared to all other preservation methods and controls (Fig. 1a; Table 1). For *M. doucasae*, $\delta^{15}\text{N}$ values from all preservation methods were significantly depleted compared to controls ($F_{2,67} = 26.23$, $P < 0.0001$, Fig. 2a; results of contrast analyses in S2 Table), with mean depletion $\leq 2.2\text{‰}$ (Fig. 2a; Table 1).

$\delta^{13}\text{C}$ values

$\delta^{13}\text{C}$ values of preserved *Phoremia* sp. samples differed significantly from controls ($F_{3,66} = 168.8$, $P < 0.0001$), with the exception of samples frozen for 60 days ($F_{1,65} = 0.87$, $P = 0.35$, Fig 1b; S1 Table). Mean $\delta^{13}\text{C}$ enrichment of up to 1.5‰ occurred in ethanol-preserved samples, while frozen samples showed depletion of up to 0.6‰ compared to controls (Fig. 1b; Table 1).

For *M. doucasae*, $\delta^{13}\text{C}$ samples preserved in commercial and fuel ethanol solutions for 15 days did not differ from controls ($F_{1,65} = 0.71$, $P = 0.40$), but did differ from all other preservation methods ($F_{2,67} = 18.06$, $P < 0.0001$, Fig 2b; S2 Table). Samples preserved in ethanol for 60 days had mean $\delta^{13}\text{C}$ enrichment of up to 0.6‰ compared to controls; for frozen samples, there was a mean $\delta^{13}\text{C}$ depletion of up to 0.7‰ (Fig 2b; Table 1).

Table 1. Carbon and nitrogen stable isotope values, N(%), C(%) and C/N atomic values. Mean $\pm$ SD for $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ isotopic values, nitrogen and carbon total content (%), and C/N atomic values of cricket samples subjected to different preservation methods.

Species	Methods	Mean $\pm$ SD ($n = 10$)				
		$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	N (%)	C (%)	C/N
<i>Phoremia</i> sp.	Control – Freshly processed	4.4 $\pm$ 0.3	-27.0 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.2	44.4 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.1
	Freezer – 15 days	4.6 $\pm$ 0.5	-27.6 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 0.4	45.1 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 0.1
	Freezer – 60 days	4.7 $\pm$ 0.3	-27.2 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.2	46.3 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.1
	Ethanol fuel – 15 days	5.2 $\pm$ 0.4	-25.8 $\pm$ 0.3	13.8 $\pm$ 0.3	41.8 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.1
	Ethanol fuel – 60 days	4.4 $\pm$ 0.4	-25.5 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.5	43.0 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 0.1
	Ethanol (92,8%) – 15 days	5.3 $\pm$ 0.2	-25.9 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.3	42.1 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 0.0
	Ethanol (92,8%) – 60 days	4.5 $\pm$ 0.6	-25.6 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.3	43.8 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.1
<i>Mellopsis doucasae</i>	Control – Freshly processed	5.4 $\pm$ 0.4	-27.4 $\pm$ 0.3	11.8 $\pm$ 0.3	45.6 $\pm$ 0.9	4.5 $\pm$ 0.2
	Freezer – 15 days	4.0 $\pm$ 0.8	-27.9 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.5	44.2 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.2
	Freezer – 60 days	3.2 $\pm$ 0.6	-28.1 $\pm$ 0.5	11.3 $\pm$ 0.5	46.1 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.2
	Ethanol fuel – 15 days	3.5 $\pm$ 0.9	-27.3 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.5	43.2 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.1
	Ethanol fuel – 60 days	4.4 $\pm$ 0.9	-26.8 $\pm$ 1.1	13.3 $\pm$ 0.5	43.3 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.1
	Ethanol (92,8%) – 15 days	3.5 $\pm$ 0.6	-27.6 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 0.4	42.7 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.1
	Ethanol (92,8%) – 60 days	4.2 $\pm$ 1.0	-26.7 $\pm$ 0.9	13.0 $\pm$ 0.2	43.5 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.1

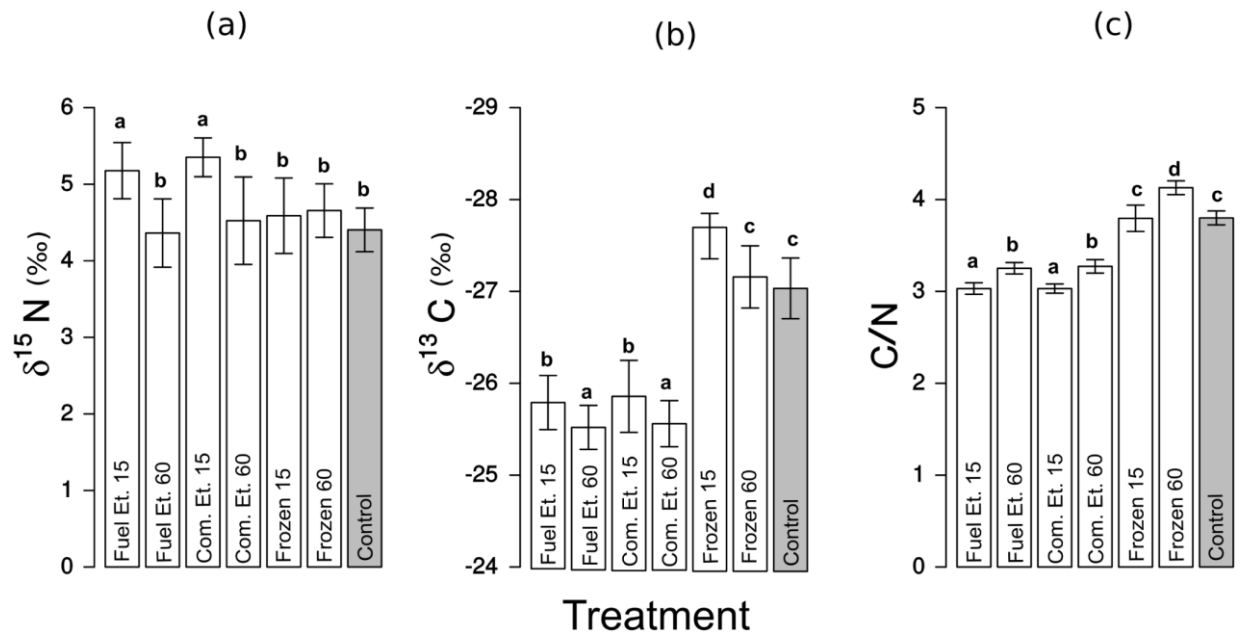


Fig 1. Carbon and nitrogen stable isotope values, and C/N atomic values for *Phoremia* sp. Mean $\pm$ standard deviation of (a) $\delta^{15}\text{N}$, (b) $\delta^{13}\text{C}$, and (c) C/N atomic values from the following treatments: Fuel Et. 15—preserved in fuel ethanol for 15 days; Fuel Et. 60—preserved in fuel ethanol for 60 days; Com. Et. 15—preserved in 92.8% commercial ethanol for 15 days; Com. Et. 60—preserved in 92.8% commercial ethanol for 60 days; Frozen 15—frozen for 15 days; Frozen 60—frozen for 60 days; Control—freshly processed material (highlighted in gray). Different letters indicate significant differences between treatment groups ($P < 0.05$)

C/N ratio

For *Phoremia* sp., C/N atomic values from samples frozen for 15 days did not differ from controls ($F_{1,64} = 0.01$, $P = 0.91$), however all other preservation methods did differ from controls ($F_{3,66} = 572.75$, $P < 0.001$) (Fig 1c; Table 1; S1 Table). All preservation methods for *M. doucasae* resulted in C/N atomic values that significantly differed from controls ($F_{5,64} = 88.2$, $P < 0.001$, Fig 1c; Table 1; S2 Table).

Storage time

Storage time prior to processing had a significant effect on isotope values and C/N atomic values for both cricket species, with a few exceptions (Figs 1a, 1b,

1c, and 2a, 2b, 2c; Table 1). For all but one preservation method, *Phoremia* sp. showed no significant differences in C or N isotope values between different chemical solutions (fuel or commercial ethanol) when storage time was equal ($\delta^{15}\text{N}$: Com.Et.15 = Fuel Et.15, $F_{1,66} = 0.95$, $P = 0.33$; $\delta^{13}\text{C}$: Com.Et.15 = Fuel Et.15, $F_{1,64} = 0.25$, $P = 0.61$; $\delta^{13}\text{C}$: Com.Et.60 = Fuel Et.60, $F_{1,63} = 0.09$, $P = 0.77$; S1 Table). The exception was $\delta^{15}\text{N}$ in samples stored for 60 days, in which fuel-ethanol preserved sampled yielded different values than did commercial ethanol-stored samples. Fuel ethanol stored samples (60 days) did not differ from frozen or control samples ($P > 0.82$; S1 Table). There was 0.8‰ depletion of $\delta^{15}\text{N}$ in samples preserved in ethanol for 60 days compared to 15 days. $\delta^{13}\text{C}$ values were increased by 0.3‰ in samples stored in commercial and fuel ethanol for 60 days, compared to those stored for 15 days (Fig 1a and 1b; Table 1).

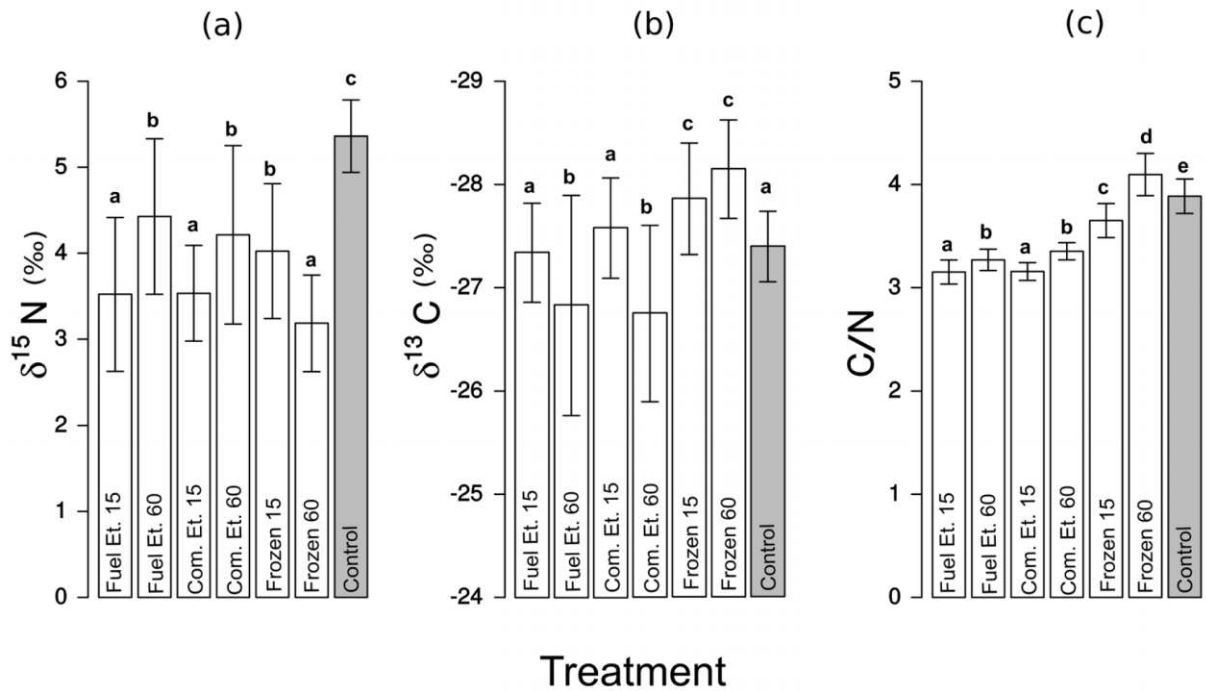


Fig 2. Carbon and nitrogen stable isotope values, and C/N atomic values for *Mellopsis doucasae*. Mean $\pm$ standard deviation of (a) $\delta^{15}\text{N}$, (b) $\delta^{13}\text{C}$, and (c) C/N atomic values from the following treatments: Fuel Et. 15—preserved in fuel ethanol for 15 days; Fuel Et. 60—preserved in fuel ethanol for 60 days; Com.Et. 15—preserved in 92.8% commercial ethanol for 15 days; Com.Et. 60—preserved in 92.8% commercial ethanol for 60 days; Frozen 15—frozen for 15 days; Frozen 60—frozen for 60 days; Control—freshly processed material (highlighted in gray). Different letters indicate significant differences between treatment groups ($P < 0.05$). All preservation methods resulted in significant ^{15}N depletion compared to controls.

For *M. doucasae*, there were no differences in $\delta^{15}\text{N}$ values between preservation solutions (fuel or commercial ethanol) when storage time was equal ($\delta^{15}\text{N}$: Com.Et.15 = Fuel Et.15, $F_{1,64} = 0.01$, $P = 0.97$; Com.Et.60 = Fuel Et.60, $F_{1,63} = 0.39$, $P = 0.54$). There were no differences in $\delta^{13}\text{C}$ values between chemical solutions (fuel vs. commercial ethanol) and controls when storage time was equal ($\delta^{13}\text{C}$: Com.Et.15 = Fuel Et.15 = Control, $F_{1,65} = 0.71$, $P = 0.40$; Com.Et.60 = Fuel Et.60, $F_{1,64} = 0.07$, $P = 0.79$; S2 Table). Longer storage time in ethanol led to enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ (0.9‰ and 0.7‰, respectively for commercial and fuel ethanol) and $\delta^{13}\text{C}$ (0.5‰ and 0.9‰, respectively for commercial and fuel ethanol) (Fig 2a and 2b; Table 1).

There were no differences in C/N atomic values between ethanol preservation solutions in either cricket species when storage time was equal (*Phoremia* sp.—C/N: Com.Et.15 = Fuel Et.15, $F_{1,63} = 0.0$, $P = 1$; Com.Et.60 = Fuel Et.60, $F_{1,65} = 0.33$, $P = 0.56$, Fig 1c; S1 Table; *M. doucasae*—C/N: Com.Et.15 = Fuel Et.15, $F_{1,63} = 0.09$, $P = 0.93$; Com.Et.60 = Fuel Et.60, $F_{1,65} = 1.69$, $P = 0.2$, Fig 2c; S2 Table).

Discussion

This study presented the first evidence of preservation method-dependent shifts in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in cricket specimens, and contributed with novel and useful information on the use of preserved samples in SIA studies. Of particular relevance was the notion that even methods sometimes used for control groups, i.e. freezing [20, 24, 55, 56], may alter SIA results.

Our results reinforced previous studies showing that storage method can have very different impacts on stable isotope values depending on preservative type and sample taxon [20, 49, 57]. For example, though some studies have proposed efficient preservation methods for SIA (e.g., for Isoptera: EtOH 80% and NaCl [58]; for Diptera and Hymenoptera: EtOH $\geq 70\%$ for $\delta^{15}\text{N}$ values [2, 24]; for aquatic insects: EtOH 80% [42] and EtOH 75% [19]), our results agreed with a large proportion of alternative studies demonstrating that such preservatives may alter either $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$ values, or both [19–21, 45, 47–49, 59–61].

The two preservation methods tested in this study similarly affected $\delta^{13}\text{C}$ values and C/N atomic values, with chemical preservatives generally producing depletion and freezing producing enrichment (after 60 days) in both cricket species. $\delta^{13}\text{C}$ was enriched over time in both cricket species, with *M. doucasae* (1.5‰) becoming more enriched than *Phoremia* sp. (0.6‰). The range of enrichment values (0.6-1.5‰), irrespective of preservation time, was similar to the ranges found for ants [2], fish, octopus and kelp [21], fish muscle and liver [47], zooplankton [45], and bird tissues and blood (0.7-1.5‰) [61]. $\delta^{15}\text{N}$ values also varied between species, with depletion of up to 2.2‰ in *M. doucasae* and enrichment of 0.9‰ in *Phoremia* sp. preserved in ethanol for 15 days. Different mechanisms are proposed to explain how preservation techniques may affect $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios in samples. One hypothesis attributes enrichment in both to assimilation of heavier isotopes present in the preserving agents [19, 25]. Both preservatives (fuel ethanol and commercial ethanol) are carbon-based chemicals with characteristic $\delta^{13}\text{C}$ signatures, and once preserved samples are immersed, their signature may shift toward that of the preservative. Another hypothesis suggests the loss of molecules carrying the “lighter” isotope (e.g., lipid molecules or nitrogenous excreta) [5, 25]. By removing lipids, which are naturally highly depleted of ^{13}C (and rich in ^{12}C) [43], ethanol may increase the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in sample, thus amplifying its ^{13}C signal. According to Post et al. [62], the C/N ratio is a strong predictor of lipid content in animals. Thus, if the lipid content or C/N ratio is high (C/N > 4 for terrestrial animals [62]), then lipid concentrations are also sufficiently high to assume that extraction will affect $\delta^{13}\text{C}$ values [63–65]. The C/N atomic values in this study were greater than four in all treatments that were not preserved in ethanol, indicating high lipid content in the crickets, and reinforcing the hypothesis of lipid leaching in ethanol-preserved samples.

We noted a striking increase in $\delta^{13}\text{C}$ in all ethanol samples, which were greater in *Phoremia* sp. (Fig 1(b)—up to 1.5‰) than in *M. doucasae* (Fig 2(b)—up to 0.7‰). We attribute the changes in these values to the leaching of lipid in the smaller body-sized *Phoremia* sp. preserved in ethanol solution. Smaller bodies result in larger surface area to volume ratios, leading to stronger solvent action [66–68].

Freezing, a common preservation method, altered isotopic values in both cricket species. Freezing caused an increase in C/N atomic values (Figs.1c and 2c), and a decrease in both $\delta^{13}\text{C}$ (Figs. 1b and 2b) and $\delta^{15}\text{N}$ (Fig 2a). Although some previous studies found no effects of freezing on SIA results^[20, 21, 43, 47], others detected shifts in the $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$ values, or both^[3, 45, 46, 48, 57]. Feuchtmayr and Grey^[45] and Dannheim et al.^[46] suggested that SIA shifts in frozen samples may result from the breakdown of cells and subsequent loss of cytosol, as well as metabolic degradation by free enzymes and microorganisms. This process results in carbon and nitrogen leaching when thawed, but there is no direct evidence of mechanical cell destruction and cytosol loss in normally frozen samples (-20°C) is causing the observed decrease in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ ^[45, 46]. That cytosol components are indeed isotopically lighter is only speculation. Our results show that storage time prior to processing may enhance the effects of chemical preservatives on C and N isotopes. Longer storage time in ethanol (both commercial and fuel) produced slight enrichment of $\delta^{13}\text{C}$ in both cricket species, with species-dependent effects on $\delta^{15}\text{N}$.

Lecea et al.^[59] also observed that long-term effects of the preservative solutions were species-dependent. They compared $\delta^{13}\text{C}$ values between two zooplanktonic species stored in EtOH for 1, 3 or 9 months and found an enrichment peak at 3 months, with subsequent depletion occurring after 9 months. Our storage periods were shorter, yet still sufficient to provoke similar shifts in SIA profile. For *M. doucasae*, a storage period of 15 days caused a decrease of up to 1.8‰ in $\delta^{15}\text{N}$ values compared to controls. However, when the storage time was 60 days $\delta^{15}\text{N}$ values increased, and the difference compared to controls fell to 1.1‰.

The similarities in total C and N content and C/N atomic values indicates similar chemical composition between species. All preservation methods for *Phoremia* sp. changed the C/N atomic values compared to controls, with the exception of freezing for 15 days (Figs.1c and 2c). Contrasts revealed a subtle difference among treatment levels in C/N atomic values, but mean value profiles were similar among cricket species. Furthermore, the SIA shifts caused by the different preservation methods were similar between species. We interpret these similarities as evidence for consistent SIA shift patterns due to preservation methods, indicating that the differences in effects of preservation methods between

species were not experimental artifacts. They instead result from effectively different chemical processes, brought about by the interaction between preservation method and intrinsic characteristics of each species.

Some authors suggest the use of a correction factor for preserved samples to account for eventual SIA shifts, especially when differences in isotopic values between preserved and unpreserved samples are minor compared to the assumed enrichment between trophic levels^[16, 26, 56]. However, we agree with other authors^[20, 40, 47, 64, 69] that advise against correction factor extrapolation beyond the studied species SIA shifts caused by cricket preservation would confound critical ecological information, which suggests avoidance of sample preservation altogether.

Conclusions

This study showed that preservation methods such as freezing and ethanol storage significantly affect stable isotope values in cricket samples. Our results also revealed SIA value shifts along storage time, and suggest interspecific differences in the effects of storage time on SIA results. Further, we detected an idiosyncratic interaction of species identity with storage method on SIA results. We therefore recommend that storage of cricket samples for SIA should be avoided, and that samples stored for different lengths of time may not be directly comparable. Only freshly dried samples should be used for production of reliable SIA results.

Acknowledgments

We thank Karla N. Oliveira, Gabriel Lobregat, Ênio H. V. Araújo, Geanne C. R. Rodrigues and Rafael A. Narciso for assistance in the field and for help in cricket screening. This article is a part of the PhD thesis of the first author under the supervision of Carlos F. Sperber at the Ecology graduate program at Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil.

Funding Statement

FMJ, MRP, CSR, and CFS (309787/2012-2) were supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br/>), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, <http://www.capes.gov.br/>) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, <http://www.fapemig.br/>), and benefitted from financial support provided by CNPq and FAPEMIG, Process N. 563360/2010-0, Edital N. 47/2010 of the Ministério de Ciência e Tecnologia/CNPq/Ministério de Meio Ambiente/Ministério da Educação/CAPES/Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ação Transversal/Fundações de Apoio à Pesquisa, Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade, SISBIOTA Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Data Availability

All data have been made available as Supporting Information files.

References

1. Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S, Phillips DL. A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ*. 2006; 5(8): 429–436. Doi: 10.1890/060150.1
2. Tillberg CV, McCarthy DP, Dolezal AG, Suarez AV. Measuring the trophic ecology of ants using stable isotopes. *Insect Soc*. 2006; 53: 65–69. Doi: 10.1007/s00040-005-0836-7
3. Wolf N, Carleton SA, del Rio CM. Ten years of experimental animal isotopic ecology. *Funct Ecol*. 2009; 23(1): 17–26. Doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01529.x
4. Perkins MJ, McDonald RA, van Veen FJF, Kelly SD, Rees G, Bearhop S. Application of Nitrogen and Carbon Stable Isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to Quantify Food Chain Length and Trophic Structure. *PLoS ONE*. 2014. March; 9(3):

e93281–. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0093281> Doi: 10.1371/journal.pone.0093281 [PMC free article] [PubMed]

5. DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*. 1978; 42 (5): 495–506. Doi: 10.1016/0016-7037(78)90199-0

6. DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*. 1981; 45 (3): 341–351. Doi: 10.1016/0016-7037(81)90244-1

7. Fry B, Smith TJ. Stable isotope studies of red mangroves and filter feeders from the shark river estuary, Florida. *Bull Mar Sci*. 2002; 70 (3): 871–890.

8. Pearson SF, Levey DJ, Greenberg CH, Martinez del Rio C. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous song bird. *Oecologia*. 2003; 135(4): 516–523. Doi: 10.1007/s00442-003-1221-8 [PubMed]

9. Chikaraishi Y, Ogawa NO, Doi H, Ohkouchi N. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). *Ecol Res*. 2011; 26 (4): 835–844. Doi: 10.1007/s11284-011-0844-1

10. Cummings DO, Buhl J, Lee RW, Simpson SJ, Holmes SP. Estimating Niche Width Using Stable Isotopes in the Face of Habitat Variability: A Modelling Case Study in the Marine Environment. *PLoS ONE*. 2012. August; 7 (8): e40539 Available from: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0040539> Doi: 10.1371/journal.pone.0040539 [PMC free article] [PubMed]

11. Florêncio DF, Marins A, Rosa CS, Cristaldo PF, Araújo APA, Silva IR, et al. Diet segregation between cohabiting builder and inquiline termite species. *PLoS ONE*. 2013. June; 8(6): e66535 Available from:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066535>

Doi:

10.1371/journal.pone.0066535 [PMC free article] [PubMed]

12. Tayasu I, Abe T, Eggleton P, Bignell DE, Division B, History TN, et al. Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. *Ecol Entomol.* 1997; 22: 343–351. Doi: 10.1046/j.1365-2311.1997.00070.x

13. Gannes LZ, Brien DMO, Martínez C, Jun N. Stable Isotopes in Animal Ecology: Assumptions, Caveats, and a Call for More Laboratory Experiments. *Ecology.* 1997; 78 (4): 1271–1276. Doi: 10.1890/0012-9658(1997)078%5B1271:SIIAEA%5D2.0.CO;2

14. Wolf N, Martínez del Rio C. Use of saguaro fruit by white-winged doves: isotopic evidence of a tight ecological association. *Oecologia.* 2000; 124 (4): 536–543. Doi: 10.1007/s004420000406

15. Spain AV, Reddell P. $\delta^{13}\text{C}$ values of selected termites (Isoptera) and termite-modified materials. *Soil Biol Biochem.* 1996; 28 (12): 1585–1593. Doi: 10.1016/S0038-0717(96)00260-X

16. Post DM. Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position: Models, Methods, and Assumptions. *Ecology.* 2002; 83 (3): 703–718. Doi: 10.1890/0012-9658(2002)083%5B0703:USITET%5D2.0.CO;2

17. Ji R, Brune A. Digestion of peptidic residues in humic substances by an alkali-stable and humic-acid-tolerant proteolytic activity in the gut of soil-feeding termites. *Soil Biol Biochem.* 2005; 37: 1648–1655. Doi: 10.1016/j.soilbio.2005.01.026

18. Ji R, Brune A. Nitrogen Mineralization, Ammonia Accumulation, and Emission of Gaseous NH_3 by Soil-feeding Termites. *Biogeochemistry.* 2006. May; 78(3): 267–283. Doi: 10.1007/s10533-005-4279-z

19. Fanelli E, Cartes JE, Papiol V, Rumolo P, Sprovieri M. Effects of preservation on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of deep sea macrofauna. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2010; 395(1-2): 93–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2010.08.020> Doi: 10.1016/j.jembe.2010.08.020
20. Carabel S, Verísimo P, Freire J. Effects of preservatives on stable isotope analyses of four marine species. *Estuar Coast Shelf S.* 2009; 82(2): 348–350. Doi: 10.1016/j.ecss.2009.01.011
21. Kaehler S, Pakhomoy EA. Effects of storage and preservation on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of selected marine organisms. *Mar Ecol Prog Ser.* 2001; 219: 299–304. Doi: 10.3354/meps219299
22. Cloern JE, Canuel EA, Harris D. Stable carbon and nitrogen isotope composition of aquatic and terrestrial plants of the San Francisco Bay estuarine system. *Limnol Oceanogr.* 2002. May; 47(3): 713–729. Doi: 10.4319/lo.2002.47.3.0713
23. Collier KJ, Bury S, Gibbs M. A stable isotope study of linkages between stream and terrestrial food webs through spider predation. *Freshwater Biol.* 2002. September; 47(9): 1651–1659. Doi: 10.1046/j.1365-2427.2002.00903.x
24. Ponsard S, Amlou M. Effects of several preservation methods on the isotopic content of *Drosophila* samples. *C R Acad Sci III.* 1999; 322(1): 35–41. Doi: 10.1016/S0764-4469(99)80015-8 [PubMed]
25. Hobson KA, Gloutney ML, Gibbs HL. Preservation of blood and tissue samples for stable-carbon and stable-nitrogen isotope analysis. *Can J Zool.* 1997; 75(10): 1720–1723. Doi: 10.1139/z97-799

26. Barrow LM, Bjorndal KA, Reich KJ. Effects of Preservation Method on Stable Carbon and Nitrogen Isotope Values. *Physiol Biochem Zool.* 2008; 81(5): 688–693. Doi: 10.1086/588172 [PubMed]
27. Desutter-Grandcolas L. Toward the Knowledge of the Evolutionary Biology of Phalangopsid Crickets (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae): Data, Questions and Evolutionary Scenarios. *J Orth Res.* 1995; 4:163–175. Doi: 10.2307/3503472
28. Hattenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S. Biodiversity and litter decomposition interrestrial ecosystems. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2005; 36:191–218. Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932
29. Szinwelski N, Rosa CS, Schoereder JH, Mews CM, Sperber CF. Effects of Forest Regeneration on Crickets: Evaluating Environmental Drivers in a 300-Year Chronosequence. *International Journal of Zoology.* 2012; 2012: Article ID 7934, 13 pp. Doi: 10.1155/2012/793419
30. Ribas CR, Sobrinho TG, Schoereder JH, Sperber CF, Lopes-Andrade C, Soares SM. How large is large enough for insects? Forest fragmentation effects at three spatial scales. *Acta Oecol.* 2005; 27(1): 31–41. Doi: 10.1016/j.actao.2004.08.008
31. Huber F, Moore TE, Lower W. Cricket behavior and neurobiology. Ithaca and London: Cornell University Press; 1989.
32. Sperber CF, Soares LGS, Pereira MR. Litter disturbance and trap spatial positioning affects the number of captured individuals and genera of crickets (Orthoptera: Grylloidea). *J Orthopt Res.* 2007; 16(1): 77–83. Doi: 10.1665/1082-6467(2007)16%5B77:LDATSP%5D2.0.CO;2
33. Sperber CF, Vieira GH, Mendes MH. Aprimoramento da amostragem de grilos de serapilheira (Orthoptera: Gryllidae) por armadilha. *Neotrop Entomol.* 2003; 32(5): 733–735. Doi: 10.1590/S1519-566X2003000400030

34. Schmidt MH, Clough Y, Schulz W, Westphalen A, Tschardt T. Capture efficiency and preservation attributes of different fluids in pitfall traps. *J Arachnol.* 2006; 34(1): 159–162. Doi: 10.1636/T04-95.1
35. Sasakawa K. Effects of pitfall trap preservatives on specimen condition in carabid beetles. *Entomol Exp Appl.* 2007. December; 125(3): 321–324. Doi: 10.1111/j.1570-7458.2007.00620.x
36. Gurdebeke S, Maelfait JP. Pitfall trapping in population genetics studies: Finding the right “solution”. *J Arachn.* 2002; 30(2): Biosyst Div.
37. Szinwelski N, Yotoko KSC, Solar R, Seleme LR, Sperber CF. Ethanol Fuel Improves Pitfall Traps Through Rapid Sinking and Death of Captured Orthopterans. *Environ Entomol.* 2013. August; 42(4): 758–762. Doi: 10.1603/EN13030 [PubMed]
38. Nagy ZT. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Org Divers Evol.* 2010. March; 10(1): 91–105. Doi: 10.1007/s13127-010-0012-4
39. Szinwelski N, Fialho VS, Yotoko KSC, Seleme LR, Sperber CF. Ethanol fuel improves arthropod capture in pitfall traps and preserves DNA. *Zookeys.* 2012; (196): 11–22. Doi: 10.3897/zookeys.196.3130 [PMC free article] [PubMed]
40. Syväranta J, Vesala S, Rask M, Ruuhijärvi J, Jones RI. Evaluating the utility of stable isotope analyses of archived freshwater sample materials. *Hydrobiologia.* 2008; 600(1): 121–130. Doi: 10.1007/s10750-007-9181-3
41. Ventura M, Jeppesen E. Effects of fixation on freshwater invertebrate carbon and nitrogen isotope composition and its arithmetic correction. *Hydrobiologia.* 2009; 632(1): 297–308. Doi: 10.1007/s10750-009-9852-3

42. Sarakinos HC, Johnson ML, Zanden MJV. A synthesis of tissue-preservation effects on carbon and nitrogen stable isotope signatures. *Can J Zool.* 2002; 80(2): 381–387. Doi: 10.1139/z02-007
43. Wessels FJ, Hahn Da. Carbon 13 discrimination during lipid biosynthesis varies with dietary concentration of stable isotopes: Implications for stable isotope analyses. *Funct Ecol.* 2010; 24(5): 1017–1022. Doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01716.x
44. Côcco LC, Yamamoto CI, Von Meien OF. Study of correlations for physicochemical properties of Brazilian gasoline. *Chemometri Intell Lab.* 2005; 76(1): 55–63. Doi: 10.1016/j.chemolab.2004.09.004
45. Feuchtmayr H, Grey J. Effect of preparation and preservation procedures on carbon and nitrogen stable isotope determinations from zooplankton. *Rapid Commun Mass Sp.* 2003; 17(23): 2605–2610. Doi: 10.1002/rcm.1227 [PubMed]
46. Dannheim J, Struck U, Brey T. Does sample bulk freezing affect stable isotope ratios of infaunal macrozoobenthos? *J Exp Mar Biol Ecol.* 2007; 351(1-2): 37–41. Doi: 10.1016/j.jembe.2007.06.001
47. Sweeting CJ, Polunin NVC, Jennings S. Tissue and fixative dependent shifts of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in preserved ecological material. *Rapid Commun Mass Sp.* 2004; 18(21): 2587–2592. Doi: 10.1002/rcm.1661 [PubMed]
48. Syväranta J, Martino a, Kopp D, Céréghino R, Santoul F, Kopp D, et al. Freezing and chemical preservatives alter the stable isotope values of carbon and nitrogen of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Hydrobiologia.* 2011; 658(1): 383–388. Doi: 10.1007/s10750-010-0512-4
49. Krab EJ, Van Logtestijn RSP, Cornelissen JHC, Berg MP. Reservations about preservations: Storage methods affect $\delta^{13}\text{C}$ signatures differently even in closely related soil fauna. *Methods Ecol Evol.* 2012; 3(1): 138–144. Doi: 10.1111/j.2041-

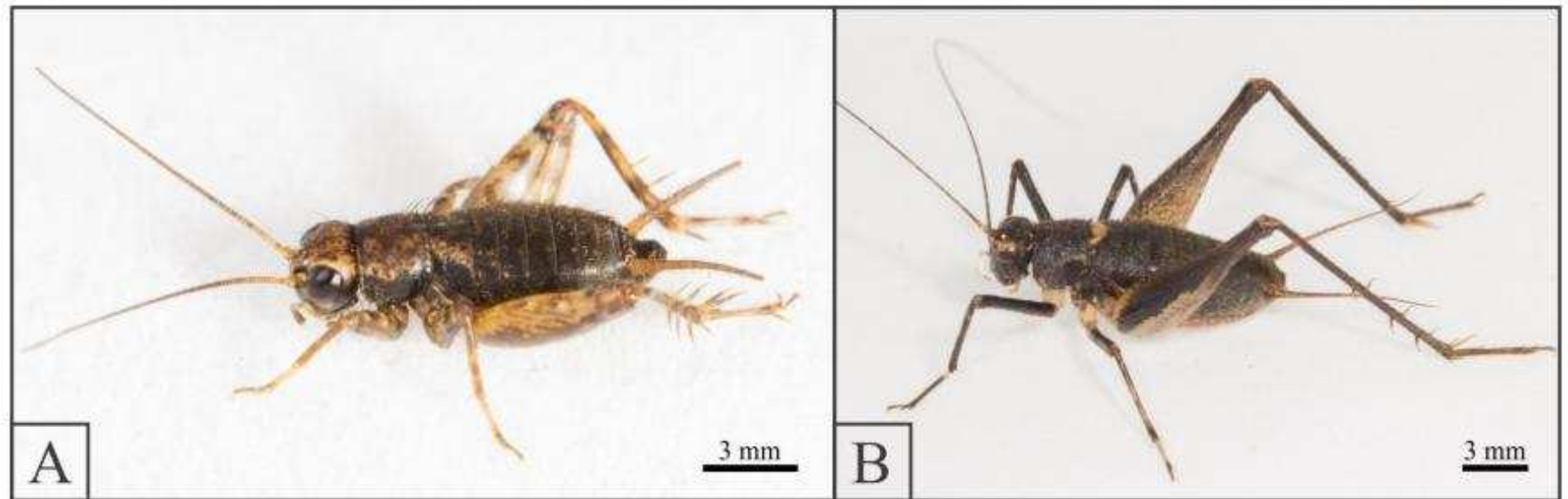
50. Veloso HP, Filho ALRR, Lima JCA. Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); 1991.
51. Desutter L. Structure et évolution du complexe phalique des Gryllidae (Orthoptères) et classification des genres néotropicaux de Grylloidea: Première partie. Ann Soc Entomol FR. 1987; 23:213–239.
52. Gorochov AV. System and morphological evolution of crickets from the family Gryllidae (Orthoptera) with description of new taxa. Communication 1. Zoologicheskij Zhurnal. 1986; 65: 516–527.
53. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2014.
54. Crawley MJ. The R book. 2nd ed Chichester: Wiley; 2013.
55. Arrington DA, Winemiller KO. Preservation Effects on Stable Isotope Analysis of Fish Muscle. T Am Fish Soc. 2002; 131: 337–342. Doi: 10.1577/1548-8659(2002)131%3C0337:PEOSIA%3E2.0.CO;2
56. Edwards MS, Turner TF, Sharp ZD. Short- and Long-Term Effects of Fixation and Preservation on Stable Isotope Values ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$) of Fluid-Preserved Museum Specimens. Copeia. 2002; 4(4): 1106–1112. Doi: 10.1643/0045-8511(2002)002%5B1106:SALTEO%5D2.0.CO;2
57. Fleming NEC, Houghton JDR, Magill CL, Harrod C. Preservation methods alter stable isotope values in gelatinous zooplankton: Implications for interpreting trophic ecology. Mar Biol. 2011; 158(9): 2141–2146. Doi: 10.1007/s00227-011-1714-7

58. Florêncio DF, Rosa CS, Marins A, Cristaldo PF, Araújo APa, Silva IR, et al. How to preserve termite samples in the field for carbon and nitrogen stable isotope studies? *Rapid Commun Mass Sp.* 2011. January; 25(1): 243–246. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157868> Doi: 10.1002/rcm.4820 [PubMed]
59. De Lecea AM, Smit AJ, Fennessy ST. The effects of freeze/thaw periods and drying methods on isotopic and elemental carbon and nitrogen in marine organisms, raising questions on sample preparation. *Rapid Commun Mass Sp.* 2011; 25(23): 3640–3649. Doi: 10.1002/rcm.5265 [PubMed]
60. Ruiz-Cooley RI, Garcia KY, Hetherington ED. Effects of lipid removal and preservatives on carbon and nitrogen stable isotope ratios of squid tissues: Implications for ecological studies. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2011; 407(1): 101–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.002> Doi: 10.1016/j.jembe.2011.07.002
61. Bugoni L, McGill RAR, Furness RW. Effects of preservation methods on stable isotope signatures in bird tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008; 22: 2457–2462. Doi: 10.1002/rcm.3633 [PubMed]
62. Post DM, Layman Ca, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J, Montaña CG. Getting to the fat of the matter: Models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia.* 2007; 152 (1): 179–189. Doi: 10.1007/s00442-006-0630-x [PubMed]
63. Medeiros L, Monteiro DdS, Petit R, Bugoni L. Effects of lipid extraction on the isotopic values of sea turtle bone collagen. *Aquatic Biol.* 2015; 23(3): 191–199. Doi: 10.3354/ab00628
64. Stallings CD, Nelson JA, Rozar KL, Adams CS, Wall KR, Switzer TS, et al. Effects of preservation methods of muscle tissue from upper- trophic level reef fishes on stable isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{13}\text{N}$). *PeerJ.* 2015. March; 3:e874 Doi: 10.7717/peerj.874 [PMC free article] [PubMed]

65. DeNiro MJ M J, Epstein S. Mechanism of Carbon Isotope Fractionation Associated With Lipid-synthesis. *Science*. 1977; 197(4300): 261–263. Doi: 10.1126/science.327543 [PubMed]
66. Bell WJ, Cardé RT. *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall; 1984.
67. Price PW. *Insect Ecology*. 3rd ed Wiley; 1997.
68. Nelson P. *Biological Physics: with New Art by David Goodsell*. W. H. Freeman; 2013.
69. Kelly B, Dempson JB, Power M. The effects of preservation on fish tissue stable isotope signatures. *J Fish Biol*. 2006; 69(6): 1595–1611. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01226.x

Supporting Information

S1 Fig. Picture of the studied cricket species. A: Male *Phoremia* sp. (Orthoptera: Trigonidiidae: Nemobiinae); B: male *Mellopsis doucasae* (Orthoptera: Phalangopsidae: Luzarinae).



S1 Table. Models and contrasts used to inspect the effects of preservation method on the $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ isotopic values, C(%) and N(%) total content and C/N ratio of *Phoremia* sp. samples. Treatment levels were: Fuel Et.15 – preserved in fuel ethanol for 15 days; Fuel Et.60 – preserved in fuel ethanol for 60 days; Com. Et.15 – preserved in 92.8% commercial ethanol for 15 days; Com. Et.60 – preserved in 92.8% commercial ethanol for 60 days; Frozen 15 – frozen for 15 days; Frozen 60 – frozen for 60 days; Control – freshly processed material. Model simplification was performed by backward term extraction, removing one term at a time, performing consecutive one degree of freedom contrast analyses. Terms returned to the model if their removal provoked a change of deviance with $p < 0.05$. Factor level contrasts were performed testing the amalgamation of treatment levels with the most similar mean values (=a posteriori amalgamation). When contrast was not significant, we repeated the procedure of term deletion of factor level amalgamation, up to achieving the Minimum Adequate Model (MAM), where any further amalgamation would lead to significant change in deviance. MAM's significance was evaluated contrasting it with the null model (nm). Amalgamation is indicated by the symbol +. All models with normal (Gaussian) error distribution. NS= $p > 0.05$; *= $p < 0.01$; **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$.

$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{15}\text{N}$			
Models		Contrasts	df	F	p
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)		m2 x m1	1	0.06	0.81 NS
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60+Control, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60)		m3 x m2	1	0.13	0.72 NS
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60+Control, Com. Et.15, Com. Et.60+Frozen 15, Frozen 60)		m4 x m3	1	0.42	0.52 NS
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60+Control, Com. Et.15, Com. Et.60+Frozen15+Frozen60)		m5 x m4	1	0.97	0.33 NS
m5: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Control, Com. Et.60+Frozen15+Frozen60)		m6 x m5	1	3.21	0.08 NS
m6: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Control+Com. Et.60+Frozen15+Frozen60)		nm x m6 (MAM)	1	27.08	< 0.0001 ***
nm: y ~ 1		Error	68		

Continues

Table S1. (Cont.)

$\delta^{13}\text{C}$
Models
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Com. Et.15, Frozen15, Frozen60, Control)
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen15, Frozen60+Control)
nm: y ~ 1

N(%)
Models
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen60, Frozen15+Control)
nm: y ~ 1

$\delta^{13}\text{C}$				
Contrasts	df	F	<i>p</i>	
m2 x m1	1	0.09	0.77	NS
m3 x m2	1	0.26	0.61	NS
m4 x m3	1	0.86	0.36	NS
nm x m4 (MAM)	3	168.67	<0.0001	*
Error	66			

N(%)				
Contrasts	df	F	<i>p</i>	
m2 x m1	1	0.45	0.5	NS
m3 x m2	1	0.93	0.33	NS
m4 x m3	1	1.83	0.18	NS
nm x m4 (MAM)	3	224.77	<0.0001	*
Error	66			

Continues

Table S1. (Cont.)

C(%)		C(%)				
Models		Contrasts	df	F	p	
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)		m2 x m1	1	1.01	0.32	NS
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)		m3 x m2	1	3.83	0.05	NS
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60+Control, Frozen15, Frozen60)		nm x m3 (MAM)	3	77.1	<0.0001	*
nm: y ~ 1		Error				

C/N		C/N				
Models		Contrasts	df	F	p	
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)		m2 x m1	1	0	0.99	NS
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen15, Frozen60, Control)		m3 x m2	1	0.01	0.96	NS
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen15+Control, Frozen60)		m4 x m3	1	0.32	0.57	NS
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen60, Frozen15+Control)		nm x m4 (MAM)	3	577.03	<0.0001	*
nm: y ~ 1		Error	66			

S2 Table. Models and contrasts used to inspect the effects of preservation methods on the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ isotopic values, %N, %C total content and C/N atomic values of *Mellopsis doucasae* sp. samples. Treatment levels were: Fuel Et.15 – preserved in fuel ethanol for 15 days; Fuel Et.60 – preserved in fuel ethanol for 60 days; Com. Et.15 – preserved in 92.8% commercial ethanol for 15 days; Com. Et.60 – preserved in 92.8% commercial ethanol for 60 days; Frozen 15 – frozen for 15 days; Frozen 60 – frozen for 60 days; Control – freshly processed material. Model simplification was performed by backward term extraction, removing one term at a time, performing consecutive one degree of freedom contrast analyses. Terms returned to the model if their removal provoked a change of deviance with $p < 0.05$. Factor level contrasts were performed testing the amalgamation of treatment levels with the most similar mean values (=a posteriori amalgamation). When contrast was not significant, we repeated the procedure of term deletion of factor level amalgamation, up to achieving the Minimum Adequate Model (MAM), where any further amalgamation would lead to significant change in deviance. MAM's significance was evaluated contrasting it with the null model (nm). Amalgamation is indicated by the symbol +. All models with normal (Gaussian) error distribution. NS= $p > 0.05$; *= $p < 0.01$; **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$.

$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{15}\text{N}$			
Models		Contrasts	df	F	p
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)		m2 x m1	1	0.001	0.97
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)		m3 x m2	1	0.39	0.53
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)		m4 x m3	1	1.03	0.31
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60+Frozen 15, Frozen 60, Control)		m5 x m4	1	1.38	0.24
m5: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15+Frozen 60, Fuel Et.60+Com. Et.60+Frozen 15, Control)		nm x m5 (MAM)	2	26.24	<0.0001
nm: y ~ 1		Error	67		*

Continues

Table S2 (Cont.)

$\delta^{13}\text{C}$
Models
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Control, Fuel Et.60, Com. Et.60, Com. Et.15, Frozen 15, Frozen 60)
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Control, Fuel Et.60+Com. Et.60, Com. Et.15, Frozen 15, Frozen 60)
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Control+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60)
m5: y ~ treatments (Fuel Et.15+Control+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 15+Frozen 60)
nm: y ~ 1

N(%)
Models
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 60, Frozen 15+Control)
nm: y ~ 1

$\delta^{13}\text{C}$				
Contrasts	df	F	<i>p</i>	
m2 x m1	1	0.04	0.84	NS
m3 x m2	1	0.07	0.79	NS
m4 x m3	1	0.7	0.41	NS
m5 x m4	1	1	0.32	NS
nm x m5 (MAM)	2	18.06	< 0.0001	***
Error	67			

N(%)				
Contrasts	df	F	<i>p</i>	
m2 x m1	1	1.16	0.29	NS
m3 x m2	1	2.04	0.16	NS
m4 x m3	1	3.34	0.07	NS
nm x m4 (MAM)	3	86.04	< 0.0001	***
Error	66			

Continues

Table S2. (Cont.)

	C(%)
Models	
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Fuel Et.60+Com. Et.60, Com. Et.15, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
m4: y ~ treatments (Fuel Et.15+Fuel Et.60+Com. Et.60, Com. Et.15, Frozen 15, Frozen 60+Control)	
nm: y ~ 1	

	C/N
Models	
m1: y ~ treatments (Fuel Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.15, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
m2: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60, Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
m3: y ~ treatments (Fuel Et.15+Com. Et.15, Fuel Et.60+Com. Et.60, Frozen 15, Frozen 60, Control)	
nm: y ~ 1	

	C(%)			
Contrasts	df	F	p	
m2 x m1	1	0.16	0.69	NS
m3 x m2	1	0.67	0.42	NS
m4 x m3	1	2.68	0.11	NS
nm x m4 (MAM)	3	72.7	< 0.0001	***
Error	66			

	C/N			
Contrasts	df	F	p	
m2 x m1	1	0.09	0.93	NS
m3 x m2	1	1.69	0.2	NS
nm x m3 (MAM)	4	108.81	< 0.0001	***
Error	65			

ARTIGO 2: Efeito da dieta na composição isotópica de grilos (Orthoptera: Grylloidea). *Artigo a ser submetido na revista Rapid Communications in Mass Spectrometry em formato de Carta ao Editor.*

Carta ao editor, a ser submetida na revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry*

Caro editor,

Efeito da dieta na composição isotópica de grilos (Orthoptera, Grylloidea)

Ao longo dos últimos 40 anos, isótopos estáveis de carbono e nitrogênio têm sido cada vez mais utilizados pelos ecologistas para elucidar padrões em cadeias alimentares de animais.^[1-8] A sua utilidade reside no fato de que as taxas de isótopos estáveis das proteínas dos consumidores refletem aquelas das proteínas da sua dieta de uma forma previsível.^[9,3] Convencionalmente expressa como $\delta^{15}\text{N}$ (‰), a razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, exibe um enriquecimento gradual (aumento do valor de ^{15}N) em cada nível trófico e, conseqüentemente, os valores ^{15}N nos tecidos dos consumidores tendem a situar-se entre 2 e 5‰ acima dos valores isotópicos de suas dietas.^[10-12] A razão de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$ ‰) também aumenta com o nível trófico na ordem de 1‰.^[1]

Estudos que utilizam análises de isótopos estáveis (AIE) para estimar nicho trófico de animais exigem um conhecimento de como a razão de isótopos estáveis em tecidos de consumidores estão relacionadas aos valores da sua dieta.^[3,7] Acredita-se que o fracionamento (discriminação isotópica) de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ em animais ocorre durante a síntese de aminoácidos,^[13] o que resulta na retenção de ^{15}N isotopicamente pesado e a excreção do ^{14}N isotopicamente leve,^[10,14] resultando no aumento de ^{15}N nos tecidos. A variação no fracionamento trófico depende do fracionamento da dieta nos tecidos animais, do *turnover* (taxa de renovação celular) de cada tecido, do tipo de recurso alimentar consumido,^[15-19] entre outros.

Embora a compreensão dos efeitos fisiológicos dos tecidos nos valores de isótopos estáveis tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos devido a um aumento no número de estudos de dieta controlada,^[9,11,19,20-23] o número destes

trabalhos com invertebrados de pequeno porte ainda é pequeno, principalmente com insetos. Para insetos com pequeno tamanho corporal, as AIE necessitam ser feitas com todo o corpo do organismo, às vezes sendo necessário reunir vários indivíduos para compor uma única amostra,^[24] devido à quantidade mínima de material necessário para as análises. Apesar de análises isotópicas de corpos inteiros serem recomendadas para organismos pequenos,^[1] não sabemos até que ponto a composição isotópica do corpo inteiro de animais pequenos reflete sua dieta. Embora se saiba que os valores isotópicos de consumidores sofrem um fracionamento em comparação com os valores isotópicos de sua dieta,^[16,19] uma quantificação desse fracionamento espécie-específico é essencial para se ter maior precisão na estimativa de níveis tróficos. Particularmente para grilos de serrapilheira, cujo estudo da dieta em campo é geralmente dificultado pelo seu tamanho pequeno e características peculiares (hábito noturno, ágeis, respondem fortemente às vibrações da serrapilheira e se camuflam com facilidade),^[25,26] análises de isótopos estáveis (AIE) podem ser reveladoras. Como grilos são considerados onívoros,^[27] há uma grande variedade de potenciais recursos alimentares, que abrange desde material de origem vegetal ou animal, até material vivo ou morto. Os valores de isótopos de carbono fornecem informações sobre o material vegetal ingerido pelo organismo ou por seu recurso (no caso de consumidores secundários), quanto ao ciclo fotossintético vegetal (C₃, C₄ ou CAM).^[6] Por outro lado, os isótopos de nitrogênio, com mudanças isotópicas maiores e previsíveis, indicam o grau de decomposição dos recursos alimentares ingeridos,^[24] e interações tróficas em comunidades naturais.

O objetivo desse trabalho foi avaliar se os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de grilos são alterados pela sua dieta, e como se dá o fracionamento isotópico de ^{13}C e ^{15}N nesses organismos. Com os resultados desse trabalho, esperamos fornecer informações de base para interpretar resultados de nicho trófico baseados na AIE de grilos em comunidades naturais. Estimamos os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e a razão C/N de três espécies de grilos alimentados com dieta artificial, e comparamos com os valores isotópicos de grilos das mesmas espécies com dieta de campo (dieta natural). Estimamos também os valores isotópicos da dieta artificial, oferecida no laboratório. Se a dieta predominar na determinação dos valores isotópicos dos grilos, esperamos que indivíduos mantidos com dieta

artificial apresentem valores isotópicos semelhantes, diferentes da composição isotópica de grilos com dieta natural. Além disso, esperamos que os indivíduos alimentados com dieta artificial apresentem um enriquecimento entre 2,4 e 3‰ para $\delta^{15}\text{N}$, e 0,8 a 1‰ para $\delta^{13}\text{C}$, comparada à composição isotópica da dieta artificial, conforme encontrado para ampla gama de consumidores.^[15] Caso as diferenças específicas (variação fisiológica, idade, fracionamento do alimento nos tecidos dos organismos) prevalecerem na determinação dos valores isotópicos, a composição isotópica de grilos com dieta artificial não será diferente daquela de grilos da mesma espécie, com dieta natural, e poderão ocorrer diferenças isotópicas entre espécies que sejam maiores do que entre dietas, na mesma espécie.

Utilizamos três espécies de grilos (Orthoptera: Grylloidea) neotropicais de serrapilheira florestal (*Mellopsis doucasae*, *Phoremia rolfsi* e *Phoremia* sp1) que ocorrem em remanescentes florestais do bioma Mata Atlântica, na zona da Mata Mineira, MG, Brasil. Pouco se sabe sobre a dieta de grilos de serrapilheira, além da generalização de onívoros. Em laboratório foi observada ingestão de folhas frescas e secas, canibalismo e diferentes rações artificiais pelas espécies aqui estudadas (FM Jesus, obs. pessoal), e análises de conteúdo estomacal de uma outra espécie de grilo de serrapilheira encontraram fragmentos vegetais e animais.^[28]

Para dieta artificial, coletamos cerca de 50 indivíduos de cada espécie no 1º estágio ninfal, em serrapilheira florestal, entre agosto e novembro de 2013. Os grilos foram mantidos em laboratório por 120 a 168 dias, com dieta artificial, até se tornarem adultos (com exceção de *Mellopsis doucasae*, que não alcançou o estágio adulto nesse período), sob condições de luz (fotoperíodo de 12 horas), umidade (60%) e temperatura (25°C) controladas. A manutenção até atingir o estágio adulto foi necessária para a identificação das espécies. A alimentação das ninfas foi ração de peixe (Alcon Basic ® - MEP 200 Complex) e água, fornecida em um pedaço de algodão umedecido. A mortalidade nos primeiros instares em todas as espécies foi alta, por isso as amostras para a análise isotópica variaram entre 5 e 20 indivíduos (ver detalhes na Tabela 1).

Para a dieta natural, coletamos um mínimo de 10 indivíduos adultos de cada espécie, com exceção de *M. doucasae*, em fase de ninfa, no campo, entre novembro e dezembro de 2013, de forma a processá-los para AIE simultaneamente aos grilos mantidos em laboratório. Dois a três espécimes de cada

espécie foram fixados em etanol 80%, como amostra de referência e depositadas na coleção de Orthoptera da Universidade Federal de Viçosa, afiliada ao Museu Regional de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa – UFVB, Brasil.

Para análise de isótopos estáveis, todas as amostras foram secas em estufa à 60°C por 72 horas, moídas e peneiradas (mesh=100) até a granulometria de pó. A razão isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e a razão C/N foram determinadas a partir de 1,5 µg de amostra no laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura– CENA, universidade de São Paulo (USP), através da combustão das amostras sob fluxo contínuo de hélio, em um analisador elementar (Carlo Erba, CHN- 1110) acoplado ao espectrômetro de massa *Thermo Finnigan Delta Plus*. Os gases CO_2 e N_2 , resultantes da combustão das amostras, foram analisados em duplicata. As relações isotópicas foram expressas em notação "delta" ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) em partes por mil (‰) contra os padrões internacionais de Viena Pee Dee Belemnite para o carbono e nitrogênio atmosférico para o nitrogênio. Normas internas (NBS-19 e NBS-22, e AIEA-N1 e N2 como IAEA-e) foram usadas para determinar a precisão de 0.1‰ para o carbono e 0.2‰ para nitrogênio. E finalmente a razão isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) de cada amostra foi calculada pela equação:

$$\delta X(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} - 1 \right) * 1000$$

onde, $X = {}^{13}\text{C}$ ou ${}^{15}\text{N}$, $R =$ a relação ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ ou ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$, fornecendo portanto, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, da amostra em relação ao padrão. Os valores de δX denotam enriquecimento isotópico ou depleção em relação ao padrão; um valor de "δ" mais positivo é enriquecimento isotópico, o que significa que a amostra contém proporcionalmente mais do isótopo "pesado".

Os limites dos nichos isotópicos (subconjuntos do espaço delta $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$) de cada espécie foram estatisticamente definidos como elipses Bayesianas padrão, plotados a partir dos pontos definidos pelos valores das coordenadas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Estas elipses são calculadas com base em um desvio padrão centrado na média, contendo cerca de 40% dos dados, ^[8,29] definindo os limites estatísticos para as dimensões de cada nicho isotópico. Assim, elipses sobrepostas indicam

espaços de nicho indistinguíveis estatisticamente. Elipses e métricas associadas foram calculadas utilizando o SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipse Package in R^[8] do pacote SIAR - Stable Isotope Analysis Package in R,^[30] sob o ambiente R 3.1.1 de computação estatística.^[31] O SIAR utiliza um processo Bayesiano para calcular todas as possíveis soluções para o modelo e fornece o intervalo mais provável de solução (95% intervalo de credibilidade) entre potenciais proporções de dieta.^[29] As elipses geradas pelo SIBER são imparciais em relação ao tamanho da amostra.^[8]

Os grilos de diferentes espécies, quando alimentados com a mesma dieta, tiveram valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) mais semelhantes entre si do que grilos da mesma espécie alimentados com dietas diferentes (Fig. 2). Enquanto os valores isotópicos de grilos com dieta artificial variaram de 4.9 a 8.4‰ para $\delta^{15}\text{N}$ e de -24.5 a -22.5 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$, os valores isotópicos de grilos com dieta desconhecida variaram de 2 a 6.1‰ para $\delta^{15}\text{N}$ e de -28.7 a -25.5 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ (Tabela 1, Fig. 1).

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ da dieta artificial foram, em média, de 4.3 ‰ (± 0.04) para $\delta^{15}\text{N}$ (média $\pm$ desvio padrão) e -23.4‰ (± 0.08) para $\delta^{13}\text{C}$ (Tabela 1, assinalados na Fig. 1 pelas linhas vermelhas pontilhadas). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da dieta artificial correspondem a valores de carnívoros 1,^[32] o que reflete a sua composição, que inclui peixe, camarão e lula.

O fracionamento isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, estimado pelas diferenças entre os valores isotópicos da dieta artificial e os valores isotópicos dos grilos que se alimentaram dessa dieta, causou um enriquecimento entre 1.3 e 4‰, com média de 2.7 ± 0.4 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$, e uma depleção entre 0.04 a 0.7‰, com média de 0.5‰, para $\delta^{13}\text{C}$, com exceção de *M. doucasae*, em que ocorreu enriquecimento de 0.04‰, para $\delta^{13}\text{C}$ (Tabela 1; Fig. 1).

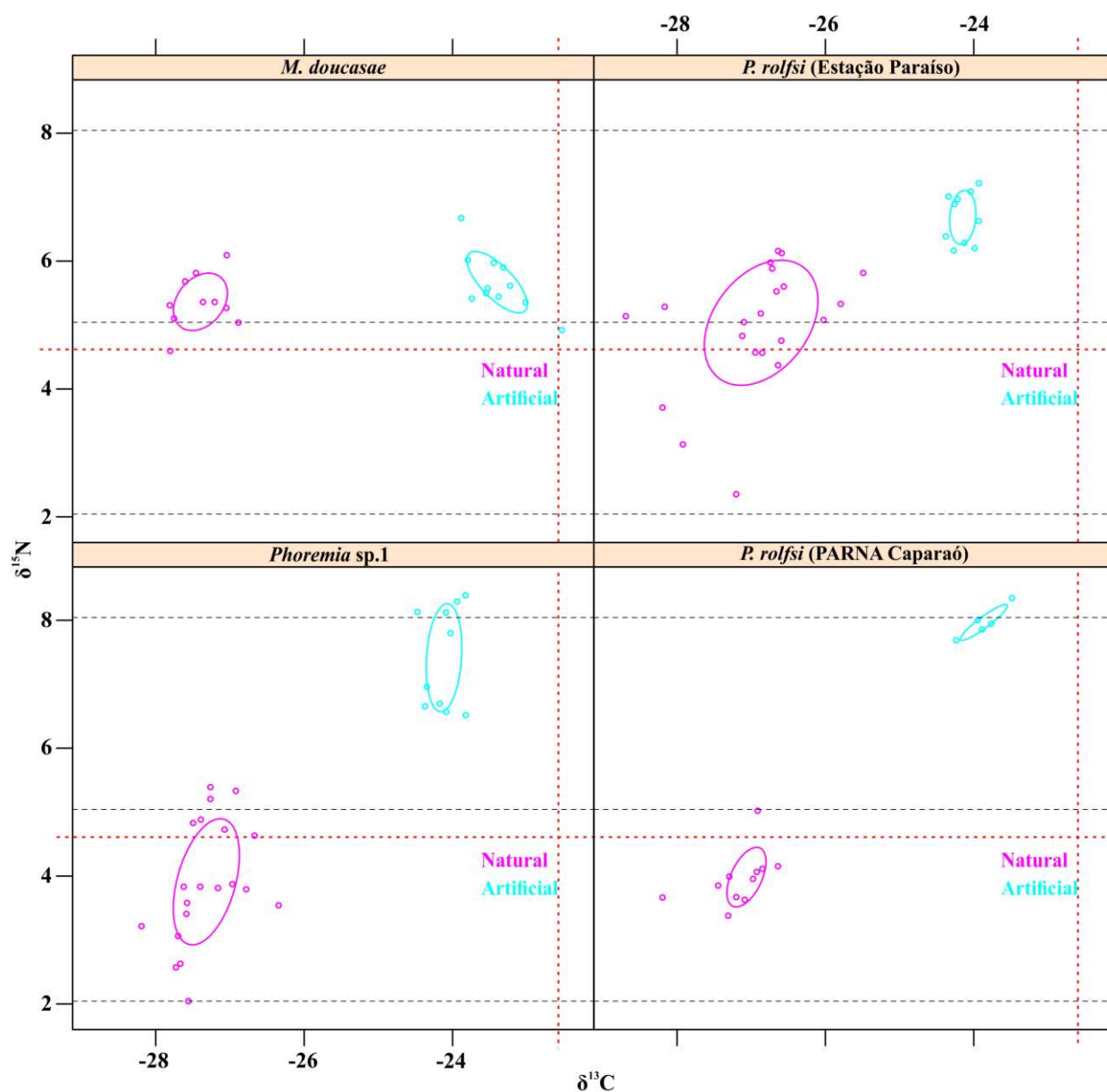


Figura 1. Valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em três espécies de grilos alimentadas com dieta artificial, em laboratório, e dieta desconhecida (natural), em campo. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse representa o intervalo de credibilidade de 95% para cada dieta (artificial ou natural); cada painel representa uma espécie de grilo, com exceção da espécie *P. rolfsi* que está sendo representada em dois painéis, pois foi coletada em dois locais. As linhas pretas pontilhadas paralelas ao eixo-x ($\delta^{13}\text{C}$) definem intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas, conforme a literatura.^[8] As linhas vermelhas pontilhadas representam os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (paralelas ao eixo-x) e de $\delta^{13}\text{C}$ (paralelas ao eixo-y) da dieta artificial, oferecida aos grilos em laboratório.

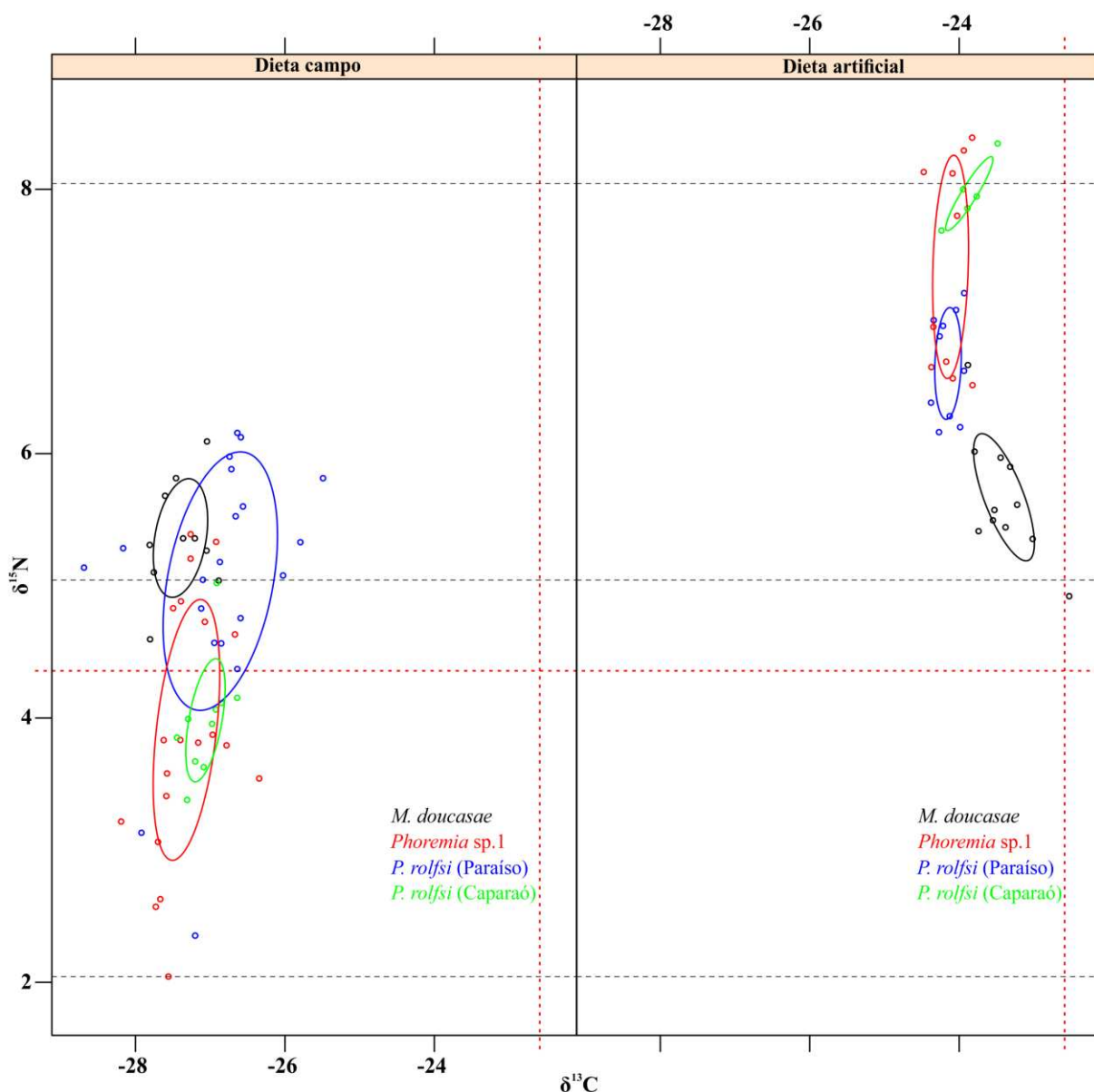


Figura 2. Valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em três espécies de grilos alimentadas com dieta artificial, em laboratório, e dieta natural, em campo. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse representa o intervalo de credibilidade de 95% de uma espécie, com exceção da espécie *P. rolfsi* que está sendo representada em duas elipses, de acordo com o local de coleta dos indivíduos; cada painel representa uma dieta (artificial ou natural). As linhas pretas pontilhadas paralelas ao eixo-x ($\delta^{13}\text{C}$) definem intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas, conforme a literatura.^[8] As linhas vermelhas pontilhadas representam os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (paralelas ao eixo-x) e de $\delta^{13}\text{C}$ (paralelas ao eixo-y) da dieta artificial, oferecida aos grilos em laboratório.

Tabela1. Média $\pm$ SD dos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ (‰), $\delta^{15}\text{N}$ (‰), conteúdo elementar de carbono e nitrogênio (%) e razão C/N para amostras de: grilos coletados diretamente no campo (dieta natural); grilos coletados no campo ainda ninfas e alimentados com dieta artificial em laboratório; valores isotópicos da dieta artificial (ração de peixe - Alcon Basic® - MEP 200 Complex) e números de amostras para cada espécie (n total = 99). Cada amostra é composta por um indivíduo.

Espécie	Área	Dieta	Média $\pm$ SD					n
			$\delta^{15}\text{N}$ ‰	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	N (%)	C (%)	C/N	
<i>Mellopsis doucasae</i>	Mata Biologia	Artificial	5.67 ± 0.46	-23.40 ± 0.39	10.99 ± 0.82	46.10 ± 1.72	4.22 ± 0.42	11
		Campo	5.36 ± 0.42	-27.40 ± 0.34	11.76 ± 0.35	45.64 ± 0.90	3.88 ± 0.17	10
<i>Phoremia rolfsi</i>	Parna Caparaó	Artificial	7.41 ± 0.80	-24.11 ± 0.23	9.62 ± 0.73	46.57 ± 1.99	4.85 ± 0.31	10
		Campo	3.91 ± 0.96	-27.31 ± 0.43	12.24 ± 0.41	46.50 ± 0.96	3.80 ± 0.18	20
<i>Phoremia rolfsi</i>	Estação Paraíso	Artificial	6.68 ± 0.40	-24.15 ± 0.17	9.71 ± 0.24	49.41 ± 0.95	5.09 ± 0.15	10
		Campo	5.04 ± 0.95	-26.87 ± 0.74	12.27 ± 0.73	45.96 ± 1.20	3.76 ± 0.24	20
<i>Phoremia</i> sp1	Parna Caparaó	Artificial	7.97 ± 0.24	-23.86 ± 0.27	11.22 ± 1.57	46.77 ± 1.61	4.23 ± 0.54	5
		Campo	3.98 ± 0.44	-27.06 ± 0.25	13.22 ± 0.48	47.07 ± 1.14	3.57 ± 0.21	10
—	—	Ração de Peixe	4.35 ± 0.04	-23.44 ± 0.08	6.57 ± 0.17	42.90 ± 1.13	6.53 ± 0.01	3

Nossos resultados são promissores para estudos que buscam avaliar o nicho trófico em grilos de serrapilheira florestal, pois obtivemos os valores de fracionamento isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nos corpos de grilos quando alimentados com dieta artificial conhecida. Esse fracionamento foi evidenciado na diferença entre os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de grilos alimentados com dieta artificial e da ração de peixe, oferecida como dieta artificial. A razão de isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) dos animais reflete um equilíbrio entre a ingestão desses isótopos através da alimentação e perda através da respiração e excreção. Os tecidos dos consumidores terão sempre mais do isótopo raro do que a sua dieta, por que a respiração é preferencial ao ^{12}C e a excreção ao ^{14}N .^[7] Segundo McCutchan e colaboradores,^[16] é esperado que um animal terrestre que excrete ácido úrico e coma plantas vasculares, tenha um enriquecimento trófico entre 0.4‰ e 0.5‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 2.3‰ e 2.4‰ para $\delta^{15}\text{N}$, maior do que a sua dieta.

O fracionamento isotópico de N nos grilos causou um enriquecimento entre 1.3‰ e 4‰ nos valores de $\delta^{15}\text{N}$. Este resultado está dentro da média encontrada na literatura.^[10,14,2,7,22] Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos grilos com dieta natural, desconhecida, foi próximo aos valores da dieta artificial. Tendo em vista que encontramos um fracionamento de 2.7 ± 0.4 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$, deduzimos que os recursos alimentares dos grilos no campo são mais pobres em ^{15}N que a dieta artificial oferecida nesse estudo. Interpretamos tais resultados como evidências para uma dieta de campo que inclui grande proporção de plantas.

Os valores do fracionamento isotópico de ^{13}C nos grilos foram menores se comparado com aos valores de ^{15}N , variando entre 0.04‰ e 0.7‰. Esse valor de fracionamento é semelhante aos valores encontrados em outros estudos,^[11,12,15,16,21] porém, com uma diferença. Essa discriminação nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ resultou em uma depleção nos valores de ^{13}C , ao invés de enriquecimento. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos grilos com dieta natural foi menor (3.4‰ a 4‰) que os valores da dieta artificial. Portanto, os recursos alimentares dos grilos no campo têm valores de $\delta^{13}\text{C}$ pelo menos 3.4‰ menores que os valores da dieta artificial aqui oferecida. Interpretamos isso como evidência de que os recursos alimentares dos grilos no campo são predominantemente originários de plantas C_3 .^[1,15]

Nossos resultados mostraram que a AIE é uma ferramenta promissora para investigar nicho trófico em grilos de serrapilheira, uma vez que os valores de $\delta^{15}\text{N}$

e $\delta^{13}\text{C}$ do seu corpo refletiram os valores isotópicos de sua dieta, com um fracionamento isotópico de ^{15}N semelhante aos encontrados na literatura. Este estudo nos permite inferir com maior precisão sobre sua posição trófica dos grilos dentro de comunidades naturais. E finalmente encontramos que grilos de espécies diferentes quando alimentados com a mesma dieta possuem valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ mais semelhantes entre si do que indivíduos da mesma espécie.

Agradecimentos

Agradecemos Ênio H.V. Araújo, Geanne C.R. Rodrigues, Gabriel Lobregat, Thiago G. Kloss, Natallia M. Vicente, Cristielle Costa e Rafael A. Narciso pela assistência no campo e ajuda na triagem e processamento das amostras. Agradecemos Karla N. Oliveira e José A. Roxinol pela revisão do manuscrito. Este artigo é parte da tese de doutorado do primeiro autor, sob a supervisão de Carlos F. Sperber no programa de pós-graduação Ecologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Este trabalho foi financiado pela CAPES, CNPq, FAPEMIG e SISBIOTA: Processo N. 563360/2010-0.

Fabiane M. Jesus^{1}, Marcelo R. Pereira², Cassiano S. Rosa³, Marcelo Z. Moreira⁴
e Carlos F. Sperber⁵*

¹Programa de Pós-graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, Alegre, ES, Brasil.

³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus Iturama, Curso de Ciências Biológicas, Iturama, MG, Brasil.

⁴Laboratório de Ecologia Isotópica, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

⁵Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

**Correspondência para: F.M. Jesus, Laboratório de Orthoptera, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.*

E-mail: fabienneuab@gmail.com

Referências bibliográficas

- [1] M. J. DeNiro, S. Epstein. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1978**, 42, 495.
- [2] B. Peterson, B. Fry. *Annu. rev. ecol. evolut. syst.* **1987**, 18, 293.
- [3] T. S. Adams, R. W. Sterner. *Limnol. Oceanogr.* **2000**, 45, 601.
- [4] S. Bearhop, C. E. Adams, S. Waldron, R. A. Fuller, H. Macleod. *J. Anim. Ecol.* **2004**, 73, 1007.
- [5] J. Wang, G. Lin, J. Huang, X. Han. *Chin. Sci. Bull.* **2004**, 49, 2239.
- [6] B. Fry. *Stable isotope ecology*. Springer, New York, NY, **2006**.
- [7] P. M. Wehi, B. J. Hicks. *J. Insect Behav.* **2010**, 56, 1877.
- [8] A. L. Jackson, A. C. Parnell, R. Inger, S. Bearhop. *J. Anim. Ecol.* **2011**, 80, 595.
- [9] K. A. Hobson, R. G. Clark. *Condor*, **1992a**, 94, 181.
- [10] M. J. DeNiro, S. Epstein. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1981**, 45, 341.
- [11] K. A. Hobson, R. G. Clark. *Condor* **1992b**, 94, 189.
- [12] S. Bearhop, S. Waldron, S. C. Votier, R. W. Furness. *Physiol. Biochem. Zool.* **2002**, 75, 451.
- [13] O. H. Gaebler, T. G. Vitti, R. Vukmirovich. *Can. J. Biochem.* **1966**, 44, 1249.
- [14] M. Minagawa, E. Wada. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1984**, 48, 1135.
- [15] D. M. Post. *Ecology* **2002**, 83, 703.
- [16] J.H. McCutchan, W.M. Lewis, C. Kendall, C.C. McGrath. *Oikos* **2003**, 102, 378.
- [17] M.A. Vanderklift, S. Ponsard. *Oecologia* **2003**, 136, 169.
- [18] K.O. Spence, J. A. Rosenheim. *Oecologia* **2005**, 146, 89.
- [19] S. Caut, E. Angulo, F. Courchamp. *J. Appl. Ecol.* **2009**, 46, 443.
- [20] G.V. Hilderbrand, S.D. Farley, C.T. Robbins, T.A. Hanley, K. Titus, C. Servheen. *Can J Zool.* 1996, 74, 2080–2088.
- [21] G. M. Haramis, D. G. Jorde, S. A. Macko, J. L. Walker. *Auk* **2001**, 118, 1008.
- [22] S. F. Pearson, D.J. Levey, C.H. Greenberg, C. Martinez del Rio. *Oecologia* **2003**, 135, 516.
- [23] C. Gratton, A.E. Forbes. *Oecologia* **2006**, 147, 615.
- [24] D. F. Florêncio, A. Marins, C. S. Rosa, P. F. Cristaldo, A. P. A. Araújo, I. R. Silva, O. F. DeSouza. *PLoS ONE*. **2013**, DOI: [//dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066535](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066535).
- [25] L. Desutter-Grandcolas. *J. Zool. Lond.* **1995**, 236, 243.
- [26] C. F. Sperber, L. G. S. Soares, M. R. Pereira. *J. orthoptera res.* **2007**, 16, 1.
- [27] F. Huber, T. E. Moore, W. Loher. *Cricket behavior and neurobiology*. Cornell University Press, New York, **1989**.
- [28] M. C. Gonçalves. *Dieta do grilo Eidmanacris bidentata Sperber, 1998 (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, **2004**.
- [29] F. Ercoli, T. J. Ruokonen, H. Hämäläinen, R. Jones. *Biol. Invasions* **2014**, 16, 2025.
- [30] A. C. Parnell, R. Inger, S. Bearhop, A. L. Jackson. *PLoS ONE* **2010**, DOI:10.1371/journal.pone.0009672. PMID: 20300637.
- [31] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2014**. ISBN 3-900051-07-0.
- [32] A. Kupfer, R. Langel, S. Scheu, W. Himstedt, M. Maraun, M. *J.Trop. Ecol.* **2006**, 22, 469.

[33] J. M. Patt, S. C. Wainright, G. C. Hamilton, D. Whittinghill, K. Bosley, J. Dietrick, J. H. Lashomb. *Ecol. Entomol.* **2003**, 28, 717.

ARTIGO 3: Partição de nicho trófico entre grilos (Orthoptera: Grylloidea) de serrapilheira florestal. *Artigo científico a ser submetido na revista Functional Ecology.*

Partição de nicho trófico entre grilos (Orthoptera: Grylloidea) de serrapilheira florestal

Fabiene M. Jesus^{1*}, Marcelo R. Pereira², Cassiano S. Rosa³, Marcelo Z. Moreira⁴ & Carlos F. Sperber³

¹Programa de Pós-graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, Alegre, ES, Brasil.

³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus Iturama, Curso de Ciências Biológicas, Iturama, MG, Brasil.

⁴Laboratório de Ecologia Isotópica, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

⁵Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

*Correspondência para: F.M. Jesus, Laboratório de Orthoptera, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

E-mail: fabienneuab@gmail.com

Resumo

A partição de recursos alimentares tem sido descrita como um dos processos que facilitam a coexistência de espécies potencialmente competidoras, quando o recurso é limitante. Padrões de partição de recursos, com diferenciação de nicho realizado, eram interpretados como evidências de exclusão competitiva no tempo evolutivo. No entanto, dados sobre utilização de recursos não são suficientes para avaliar processos competitivos: eles se restringem a informações básicas sobre as quais se podem construir hipóteses de processos ecológicos e evolutivos. Aqui nós avaliamos se existe partição de nicho trófico entre espécies de grilos que coocorrem em serrapilheira de florestas tropicais e quais fatores influenciam essa partição. Encontramos evidências de que a coexistência de espécies de grilos em comunidades naturais envolve partição de recursos alimentares. O local de forrageamento influenciou diretamente no uso da dieta e conseqüentemente na posição trófica dos grilos, os quais apresentaram até três níveis tróficos quando avaliados em um contexto global da dieta. Além disso, os indivíduos do mesmo gênero apresentaram maior sobreposição no uso de recursos alimentares. Como previsto na literatura, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ determinaram a posição trófica dos grilos dentro de uma comunidade biológica e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ indicaram que todos os grilos utilizam recursos alimentares com origem em plantas C_3 . Finalmente, encontramos evidências de estreitamento do nicho trófico à medida que aumenta o número de espécies coocorrentes.

Palavras-Chave: partição de nicho, coexistência, nicho isotópico, Mata Atlântica, dieta

Introdução

A partilha de recursos alimentares entre espécies coexistentes, e potencialmente concorrentes, tem sido descrita como um dos processos responsáveis pela estruturação de populações e comunidades naturais (Tilman 1988; Tilman & Pacala 1993; Chase & Leibold 2003; Svanback & Schluter, 2012; Correa & Winemiller, 2014). Na maioria das vezes essa partilha evoca processos competitivos associados à teoria de nicho (Chase & Leibold 2003). Um dos principais propósitos dos estudos de partilha de recursos é analisar os limites que a competição interespecífica impõe ao número de espécies que podem coexistir de maneira estável em ambientes com restrição de recursos (Schoener 1974a). Neste contexto, a amplitude e sobreposição de nicho trófico são importantes para quantificar como duas ou mais espécies se relacionam e partilham recursos alimentares (Hurlbert 1978), ou até mesmo para descrever os tipos de organização de uma comunidade (Abrams 1980).

Dentre as várias definições de nicho ecológico, Hutchinson (1957) chama atenção para uma definição baseada na quantificação de suas dimensões. Ele descreve o nicho fundamental ou potencial como um espaço com um hipervolume n -dimensional, que consiste de uma série de variáveis climáticas e bióticas, em que, na ausência de competição, a espécie é capaz de persistir indefinidamente (McGill et al. 2006). No entanto, as interações bióticas, incluindo competição, relações simbióticas e predação, desempenham importante papel no delineamento das porções de nichos fundamentais, alimentares e geográficos, que são os chamados "nichos realizados", ou ocupados, dada a influência de outras espécies, e não sendo possível uma sobreposição total destas porções (Soberon 2007).

Alguns autores (Bearhop et al. 2004; Newsome et al. 2007; Layman et al. 2007a; Jackson et al. 2011) têm proposto uma tecnologia relativamente nova baseada em análise de isótopos estáveis (AIE), que pode ser utilizada para medir algumas das muitas dimensões dos nichos ecológicos. O uso de isótopos estáveis para explorar nichos tróficos é facilitado pela existência de uma variedade de assinaturas isotópicas que distinguem os elementos dentro e entre teias alimentares (Newsome et al. 2007). Dentre esses isótopos, o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ são os isótopos estáveis mais frequentemente utilizados em estudos de ecologia trófica (Post 2002).

Assume-se que o fator de discriminação para o carbono varia com um aumento de 0‰ a 1‰, ao longo da cadeia alimentar (Peterson & Fry 1987), servindo para determinar as fontes de carbono usadas por consumidores (Vander Zanden & Rasmussen 2001; Post 2002) e o nitrogênio possui um fator de discriminação que aumenta entre 2‰ e 5‰, a cada nível trófico (Peterson & Fry 1987; De Niro & Epstein 1981; Hobson & Clark 1992b; Bearhop et al. 2002), empregado por ecologistas para estimar posição trófica dos animais em teias alimentares.

Em organismos onívoros, como é o caso de grilos de serrapilheira, a utilização de AIE para estudo da dieta e do nicho trófico, têm sido a metodologia mais adequada, uma vez que reflete a história alimentar dos organismos, não se restringindo apenas aos itens recém ingeridos (Fry 2006). Ou seja, as técnicas tradicionais (observações diretas e análise de conteúdo estomacal ou fecal) utilizadas para avaliar a amplitude de dieta de grilos não refletem a quantidade e qualidade de nutrientes assimilados nos tecidos em escala temporal (Bolnick et al. 2003).

O delineamento dos espaços de nichos isotópicos (eixos $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) e as medidas de sobreposição interespecífica desses nichos podem fornecer um meio para quantificar nichos tróficos em comunidades naturais e inferir sobre o quão semelhante são as dietas entre espécies coocorrentes (Wang et al. 2004; Ercoli et al. 2014). Alguns autores acreditam que esta ferramenta pode ser utilizada para prever o potencial para a coexistência ou exclusão competitiva das espécies que se alimentam dos mesmos recursos alimentares (Araújo & Guisan 2006). Isso porque a variação isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nos indivíduos de cada espécie pode ser utilizada como uma medida de amplitude de forrageamento, além de definir os limites do nicho isotópico ocupado (Layman et al. 2007a; Jackson et al. 2011, Ercoli et al. 2014; Syvaranta et al. 2013).

Neste estudo descrevemos os nichos tróficos de grilos em escala local e avaliamos se há partição de nicho trófico entre as espécies coocorrentes em serrapilheira de floresta tropical. Avaliamos também os efeitos de local de forrageamento, identidade específica, proximidade filogenética e número de espécies coocorrentes, sobre os nichos tróficos, testando as seguintes hipóteses: (i) a dieta dos grilos é determinada pelo local de forrageamento; (ii) as espécies coocorrentes particionam nichos tróficos; (iii) a partição de nicho trófico diminui

com a proximidade filogenética entre os indivíduos; (iv) a amplitude do nicho trófico das espécies diminui com o aumento no número de espécies coocorrentes.

Material e métodos

Declaração de ética

Todas as licenças necessárias para este estudo estão de acordo com as normas pertinentes do Brasil. Isto inclui a concessão de licenças do ICMBio/SISBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), a permissão dos proprietários de reservas particulares e a permissão da UFV (Universidade Federal de Viçosa) para realizar o estudo em suas áreas de preservação ambiental

Definição de termos

Utilizamos os termos “nicho trófico” e “nicho isotópico” como sinônimos, que se referem ao sub-conjunto do espaço delta (δ) e refletem os valores isotópicos estimados para cada indivíduo de grilo analisado (unidade amostral). Os valores isotópicos representam proporções dos isótopos estáveis ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) incorporados em tecidos do animal.

Os termos “coocorrentes” e “co-habitantes” foram utilizados como sinônimos, referindo-se à ocorrência simultânea de indivíduos de diferentes espécies de grilos no mesmo local de forrageamento (áreas de 500m²), sem implicação de influências positivas ou negativas recíprocas, nos quais coletamos os grilos.

Consideramos como “local de forrageamento” o estrato da serapilheira florestal de cada uma de seis áreas de cerca de 500m², inseridas em remanescentes florestais isolados entre si por pelo menos 1,2km de distância.

Área de estudo

O estudo foi realizado em seis remanescentes de Mata Atlântica inseridos numa matriz predominantemente de pastagens, na mesorregião da Zona da Mata, Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. As distâncias entre os remanescentes florestais são de no mínimo 1,2km e no máximo 39,7 km (Fig. S1). A vegetação nativa da região é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual (Veloso et al. 1991), com clima do tipo Cwa e Cwb (mesotérmico) segundo a classificação de Köppen, com verões brandos a quentes e úmidos (Peel et al. 2007). Temperatura média de 19°C com precipitação entre 1248 mm a 1500 mm de outubro a abril (Peel et al. 2007).

Três remanescentes são Unidades de Conservação: Parque Nacional do Caparaó – Parna Caparaó (20° 25' 19.3" S – 41° 51' 10.3" O), município de Alto Caparaó; Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – Parque Brigadeiro (20°43'23.8" S – 42°28'57.0" O), que abrange cinco municípios; e Estação de Pesquisas, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso – Estação Paraíso (20°48'1.0" S – 42°51'52.2" O), município de Viçosa. Os outros três remanescentes se localizam no município de Viçosa, denominados: "Mata da Biologia" – Mata Biologia (20°45'33.6" S – 42°51'53.5" O), "Mata do Seu Nico" – Mata Nico (20°47'45.6" S – 42°50'46.5" O) e "Mata do Prof. Chaves" – Mata Chaves (20°43'19.49" S – 42°51'42.25" O) (Fig. S1).

Coleta e identificação dos espécimes

Coletamos os grilos manualmente, ao longo de cerca de 10 horas acumuladas, por três a quatro noites em cada remanescente florestal. A intensidade da coleta em cada local foi dependente da dificuldade de captura dos indivíduos. Coletamos de novembro de 2013 a Janeiro de 2014, entre 18h e 22h, um mínimo de 22 indivíduos para cada espécie de grilo encontrada coexistindo na serrapilheira de cada remanescente. Este número de grilos foi escolhido para compor 20 repetições para cada espécie e 2 indivíduos como amostras de referência. *Zucchiella matiottiae* foi a única exceção, pois coletamos apenas oito indivíduos (Tabela S1).

No laboratório, todos os grilos foram morfoespeciados e separados em grupos por espécie e local para posterior análise isotópica. Um mínimo de dois indivíduos de cada grupo foi mantido em álcool 80% como material de referência e

posteriormente identificado em nível de espécie (ou morfoespécie). Estas amostras foram depositadas na coleção de Orthoptera da Universidade Federal de Viçosa, afiliada ao Museu Regional de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa – UFVB, Brasil.

Análise isotópica

Após a morfoespeciação, todos os grilos foram mantidos em inanição alimentar durante dois dias a fim de evitar que a composição isotópica do alimento ingerido imediatamente antes da coleta interferisse nos resultados. Apenas água foi fornecida em um chumaço de algodão umedecido. Depois de sacrificados, os grilos foram lavados cuidadosamente com água destilada para extrair qualquer resíduo de solo ou materiais vegetais aderidos à superfície do corpo. Imediatamente foram levados à estufa na temperatura de 60°C por aproximadamente 72 horas. Após a secagem, cada amostra, representada por um indivíduo de cada espécie, foi macerada em almofariz de ágata e peneirada (mesh=100) até a granulometria de pó. Este procedimento foi repetido para cada indivíduo, separadamente, compondo 20 amostras para cada espécie encontrada em cada local, com exceção da espécie *Zucchiella matiottiae*.

Aproximadamente 1,5 µg de amostra (corpo do grilo homogeneizado) foram pesados dentro de cápsulas de estanho, em combustão, e analisadas para $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em um sistema de espectrometria de massa de fluxo contínuo no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, da Universidade de São Paulo, Brasil.

As relações isotópicas foram expressas com notação "delta" ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) em partes por mil (‰) de acordo com os padrões internacionais de Viena Pee Dee Belemnite para o carbono e nitrogênio atmosférico para o nitrogênio. Normas internas (NBS-19 e NBS-22, e AIEA-N1 e N2 como IAEA-e) foram utilizadas para determinar a precisão de 0.1‰ para o carbono e 0.2‰ para nitrogênio. Finalmente, a razão isotópica ($\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$) de cada amostra foi calculada pela equação:

$$\delta X(\text{‰}) \left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1 \right) * 1000$$

onde, X= ^{13}C ou ^{15}N , R= a relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, fornecendo portanto, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, da amostra em relação ao padrão. Os valores de δX denotam enriquecimento isotópico ou depleção em relação ao padrão. Desta forma, um valor de " δ " positivo significa um enriquecimento isotópico, ou seja, a amostra contém proporcionalmente mais do isótopo "pesado" e estará portanto em um nível trófico superior.

Análise de dados

Os limites do nicho isotópico (subconjuntos do espaço delta $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$) de cada espécie foram estatisticamente definidos como elipses Bayesianas padrão, plotados a partir dos pontos definidos pelos valores das coordenadas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Tais elipses são usadas como representação de dados bivariados, assim como o desvio padrão é utilizado para dados univariados. Uma vez que estas elipses definem os limites estatísticos para as dimensões de cada nicho isotópico, elipses sobrepostas indicam espaços de nicho indistinguíveis estatisticamente. Elipses e métricas associadas foram calculadas utilizando o SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipse Package in R (Jackson et al. 2011) do pacote SIAR - Stable Isotope Analysis Package in R (Parnell et al. 2010), sob o ambiente R 3.1.1 de computação estatística (R Core Team 2014). O SIAR utiliza um processo Bayesiano para calcular todas as possíveis soluções para o modelo e fornece o intervalo mais provável (95% intervalo de credibilidade) entre potenciais proporções da dieta (Parnell et al. 2010).

As elipses geradas pelo SIBER são imparciais em relação ao tamanho da amostra, permitindo comparações mais robustas entre diferentes comunidades (Jackson et al. 2011). Estas elipses são calculadas com base em um desvio padrão centrado na média, contendo cerca de 40% dos dados (Jackson et al. 2011). Essas elipses foram estimadas de acordo com três pontos de vista distintos, mas complementares ao conjunto de dados. Inicialmente, um único espaço isotópico foi

estimado para toda a comunidade de co-habitantes de grilos, sem considerar a identidade das espécies, permitindo comparações dos nichos isotópicos entre os locais de forrageamento. Elipses sobrepostas indicariam similaridade entre as dietas dos grilos em escala global de dieta. Em seguida, elipses individuais foram plotadas para cada espécie dentro das comunidades de grilos co-habitantes, permitindo comparações dos nichos isotópicos em cada local. Finalmente, foram plotadas elipses para cada espécie mostrando a amplitude total do seu nicho trófico.

Para inferir sobre processos interativos que regulam a sobreposição da dieta, fizemos uma ANOVA a fim de verificar o efeito do número de espécies coocorrentes sobre as dimensões do nicho isotópico das espécies dentro de cada local. Se uma espécie diminui seu nicho isotópico em resposta à coocorrência com outras espécies, a dimensão do seu respectivo nicho trófico deve diminuir com o número de espécies coocorrentes. As análises foram realizadas com Modelos Lineares Generalizados (GLM) sob erros normais, seguidos por análises de resíduos para confirmar a adequação do modelo e a distribuição de erro.

Os níveis relativos de onivoria, bem como a posição trófica dos grilos, foram inferidos a partir da amplitude do nicho trófico, estimada pelos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e de $\delta^{13}\text{C}$ medidos nos indivíduos de cada espécie. O eixo isotópico $\delta^{13}\text{C}$ foi utilizado para diferenciar dietas baseadas em plantas com diferentes vias fotossintéticas (C_3 , C_4 e CAM) (Peterson & Fry 1987) enquanto o eixo $\delta^{15}\text{N}$ foi utilizado para inferir a posição trófica das espécies (Post 2002; Anderson & Cabana 2007). A posição trófica dos grilos foi inferida, nesse estudo, a partir de valores de fracionamento isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ estimado em corpos de grilos submetidos à dieta artificial (Jesus *et al.* em preparação).

Resultados

Coletamos 557 indivíduos de grilos, pertencentes a nove espécies e duas famílias dentro da superfamília Grylloidea. Em cada local encontramos de três a quatro espécies de grilo coocorrendo. Dentre as nove espécies coletadas, cinco ocorreram em apenas um remanescente florestal: *Eidmanacris* sp. e *Phoremia* sp1 (Parna Caparaó), Luzarinae gen. nov. e *Phoremia* sp2 (Parque Brigadeiro), *Izecksohniella* sp. (Mata Chaves).

As figuras de 1 a 6 apresentam os nichos tróficos das comunidades de grilos (Grylloidea) e das espécies em cada local de ocorrência. Mais detalhadamente, nestas figuras testamos:

- (i) o efeito do local de forrageamento na segregação de nicho trófico em comunidades de grilos (Grylloidea) como um todo, no espaço global de dieta (Fig. 1) e em cada espécie (Fig. 2);
- (ii) se existe partição de nicho trófico entre indivíduos de espécies coocorrentes, em cada local (Fig. 3);
- (iii) o efeito de proximidade filogenética na segregação de nicho trófico dos grilos, em nível de gênero (Fig. 4) e em nível de família (Fig. 5).

A figura 6 apresenta a amplitude média dos nichos tróficos das espécies, comparando locais de forrageamento com três e quatro espécies coocorrentes. Nessa figura testamos:

- (iv) o efeito do número de espécies coocorrentes na amplitude do nicho trófico das espécies.

(i) Efeito do local de forrageamento

De forma geral, houve partição dos nichos tróficos dos grilos entre os locais de forrageamento (Fig. 1 e 2), separando-os em até três níveis tróficos. Em nível específico também houve partição de nicho trófico entre os locais de forrageamento quando analisamos o nicho trófico das espécies que ocorreram em mais de um local (Fig. 2). A partição de nicho trófico pelos grilos entre os locais de forrageamento ocorreu devido a menor variação isotópica dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em cada local quando comparada ao espaço global como um todo (Figs. 1 e 2).

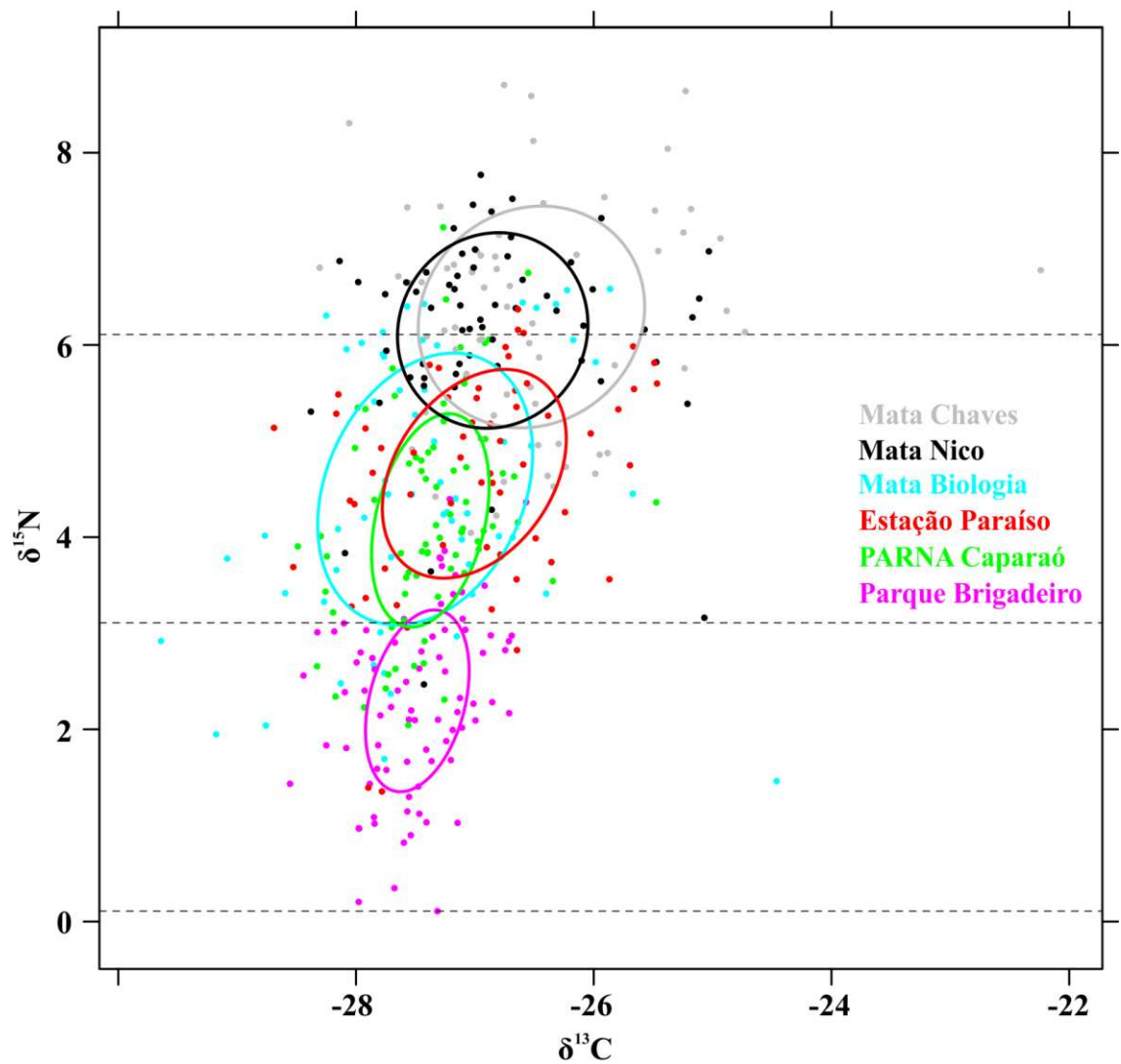


Figura 1. Resumo dos nichos isotópicos (subconjuntos do espaço delta) das comunidades de grilos em diferentes locais de forrageamento, como inferido a partir de suas assinaturas isotópicas. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse Bayesiana padrão representa um local amostrado. As linhas pontilhadas paralelas ao eixo-x define intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas. Ver Tabela S1 para a identidade das espécies que compõem cada local.

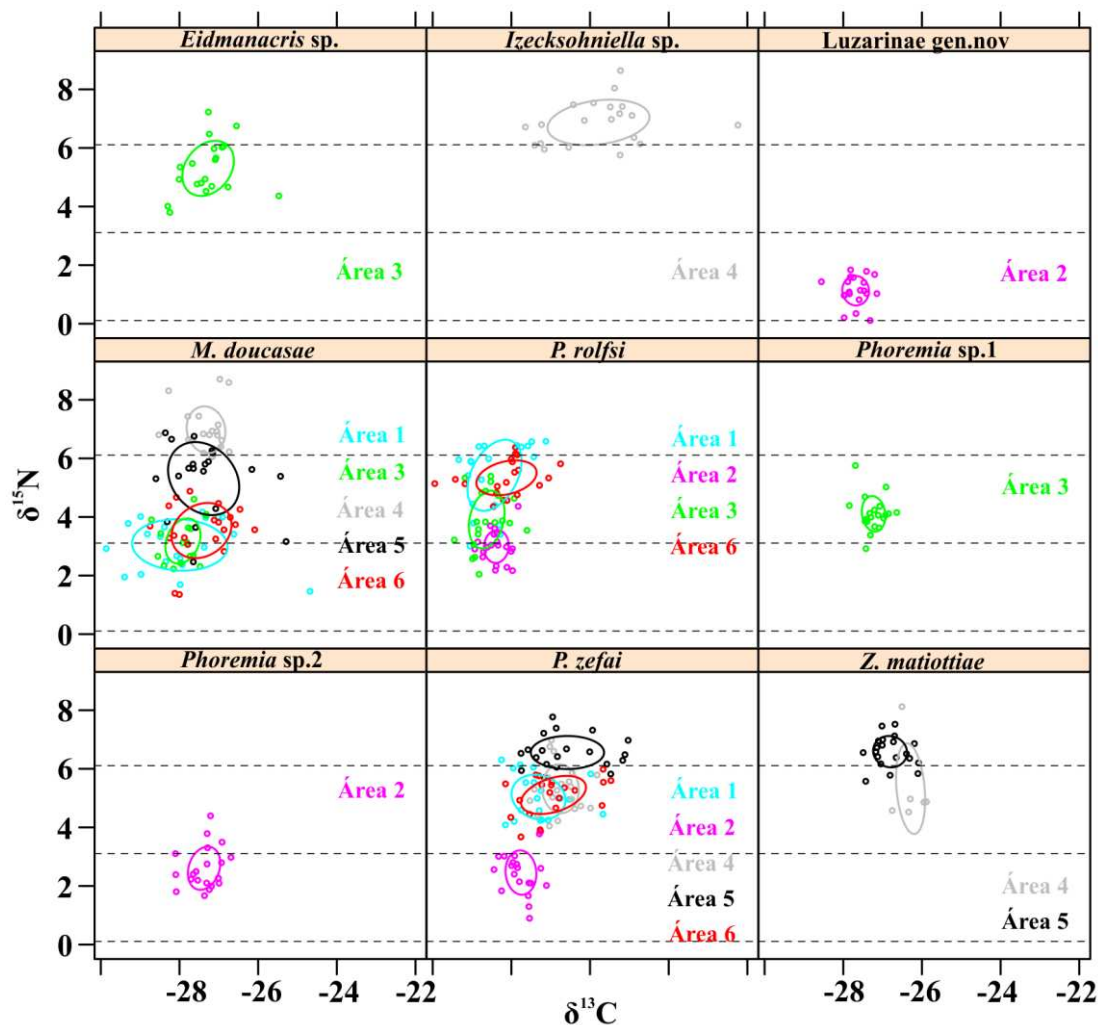


Figura 2. Resumo dos nichos isotópicos dos indivíduos de cada espécie em todos os locais de sua ocorrência, como inferido a partir de suas assinaturas isotópicas. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse Bayesiana padrão representa um local amostrado. Cada painel representa uma espécie em seu respectivo local de forrageamento dentro do remanescente florestal amostrado. As linhas pontilhadas paralelas ao eixo-x define intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas. Sendo área 1= Mata Biologia; área 2= Parque Brigadeiro; área 3= Parna Caparaó; área 4= Mata Chaves; área 5= Mata Nico e área 6 = Estação Paraíso.

(ii) *Efeito de identidade específica*

Encontramos partição de nicho trófico entre a maioria das espécies coocorrentes de grilos (Fig. 3). Apenas em um dos fragmentos de Mata Atlântica amostrados não observamos partição de nicho trófico entre as espécies coocorrentes (*Mellopsis doucasae* x *Phoremia zefai* + *Z. mattiotiae*: Mata do seu Nico) (Fig. 3).

(iii) *Efeito da proximidade filogenética*

Encontramos evidências de que a distância filogenética promoveu partição de nicho trófico entre as espécies coocorrentes (Fig. 4 e 5). Os casos mais evidentes de partição de nicho trófico ocorreram entre indivíduos de gêneros diferentes (Fig. 4), coincidentes com a segregação entre indivíduos de famílias diferentes (Fig. 5).

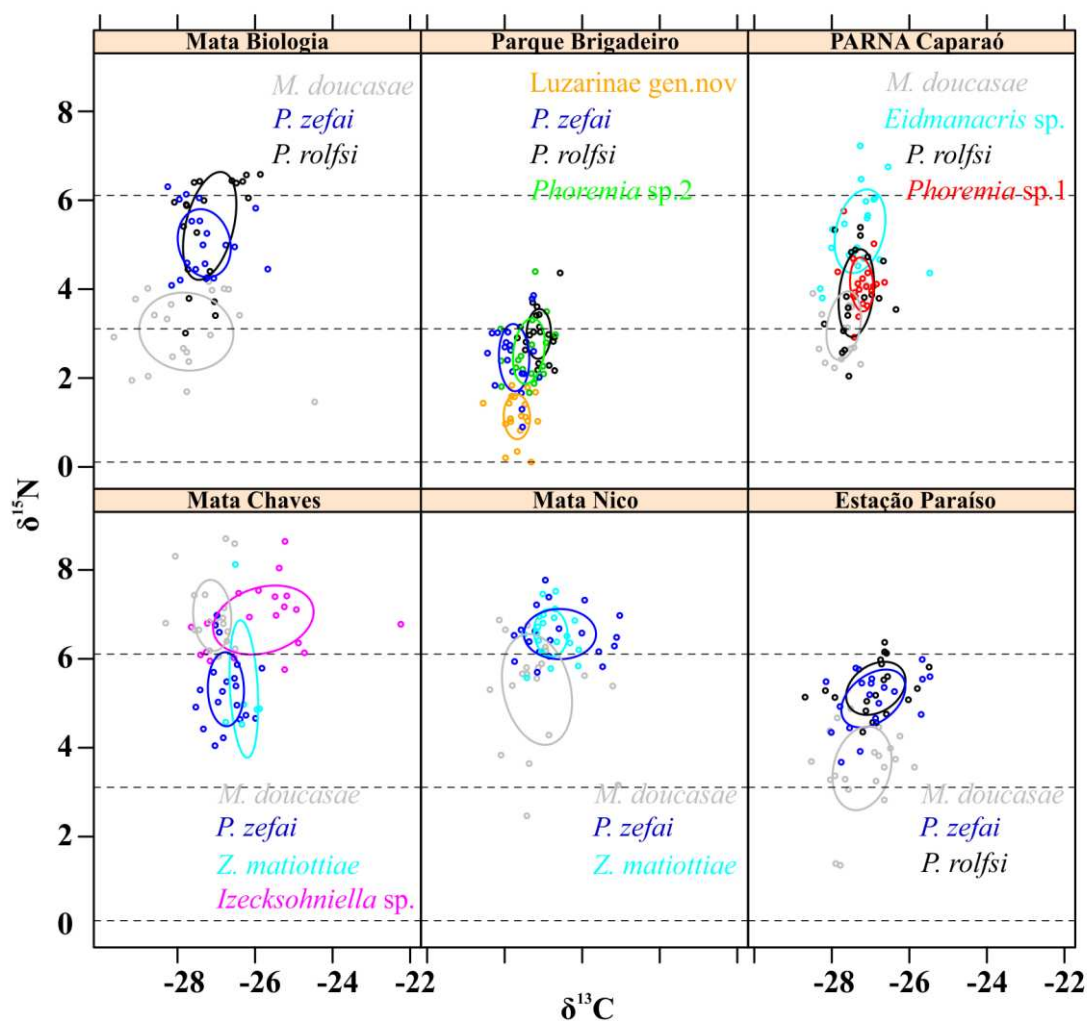


Figura 3. Resumo dos nichos isotópicos dos indivíduos de cada espécie em escala local, como inferido a partir de suas assinaturas isotópicas. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse Bayesiana padrão representa uma espécie. Cada painel representa o local de forrageamento das espécies coocorrentes dentro do remanescente florestal amostrado. As linhas pontilhadas paralelas ao eixo-x define intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas.

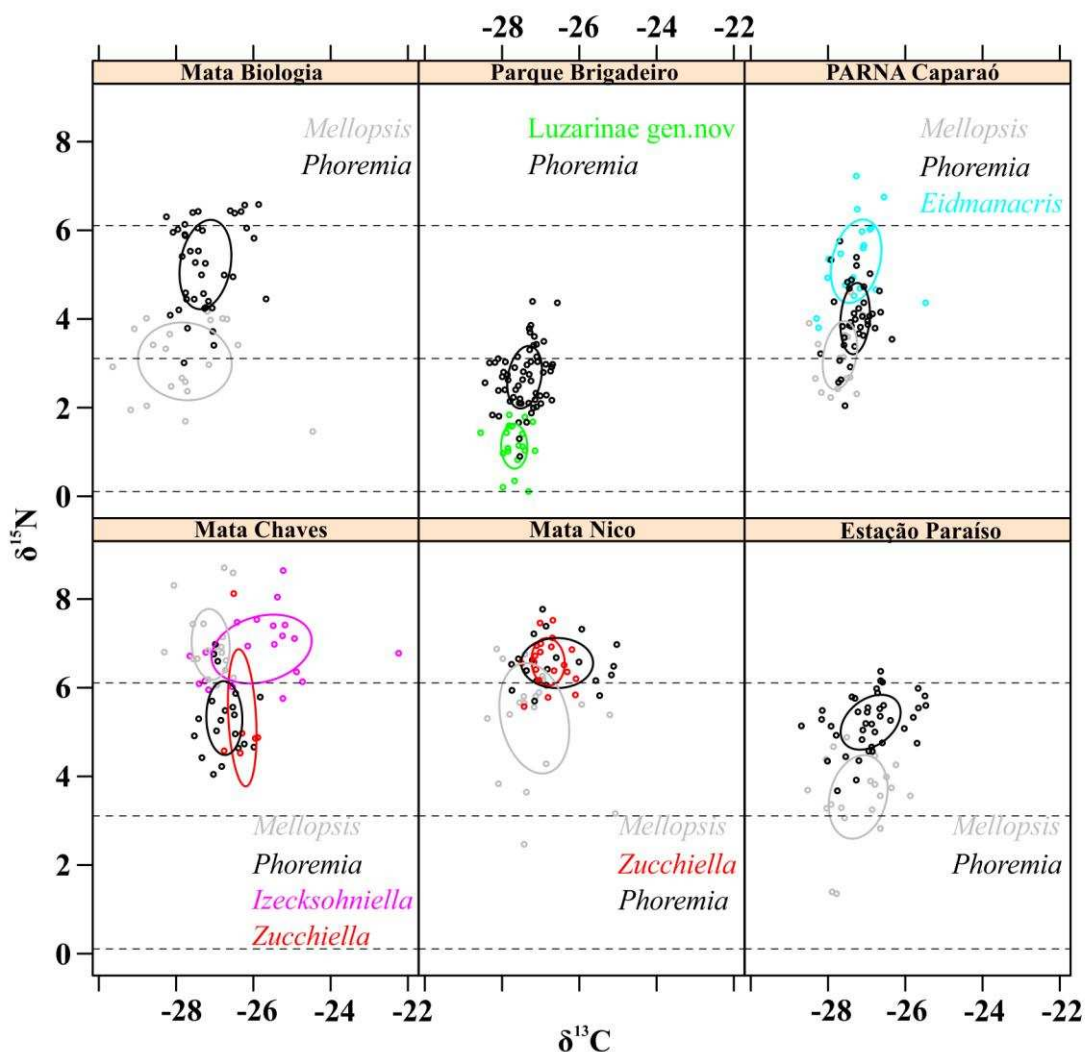


Figura 4. Resumo dos nichos isotópicos dos indivíduos de cada gênero em escala local, como inferido a partir de suas assinaturas isotópicas. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse Bayesiana padrão representa indivíduos de um gênero. Cada painel representa o local de forrageamento dos gêneros coocorrentes dentro do remanescente florestal amostrado. As linhas pontilhadas paralelas ao eixo-x define intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas.

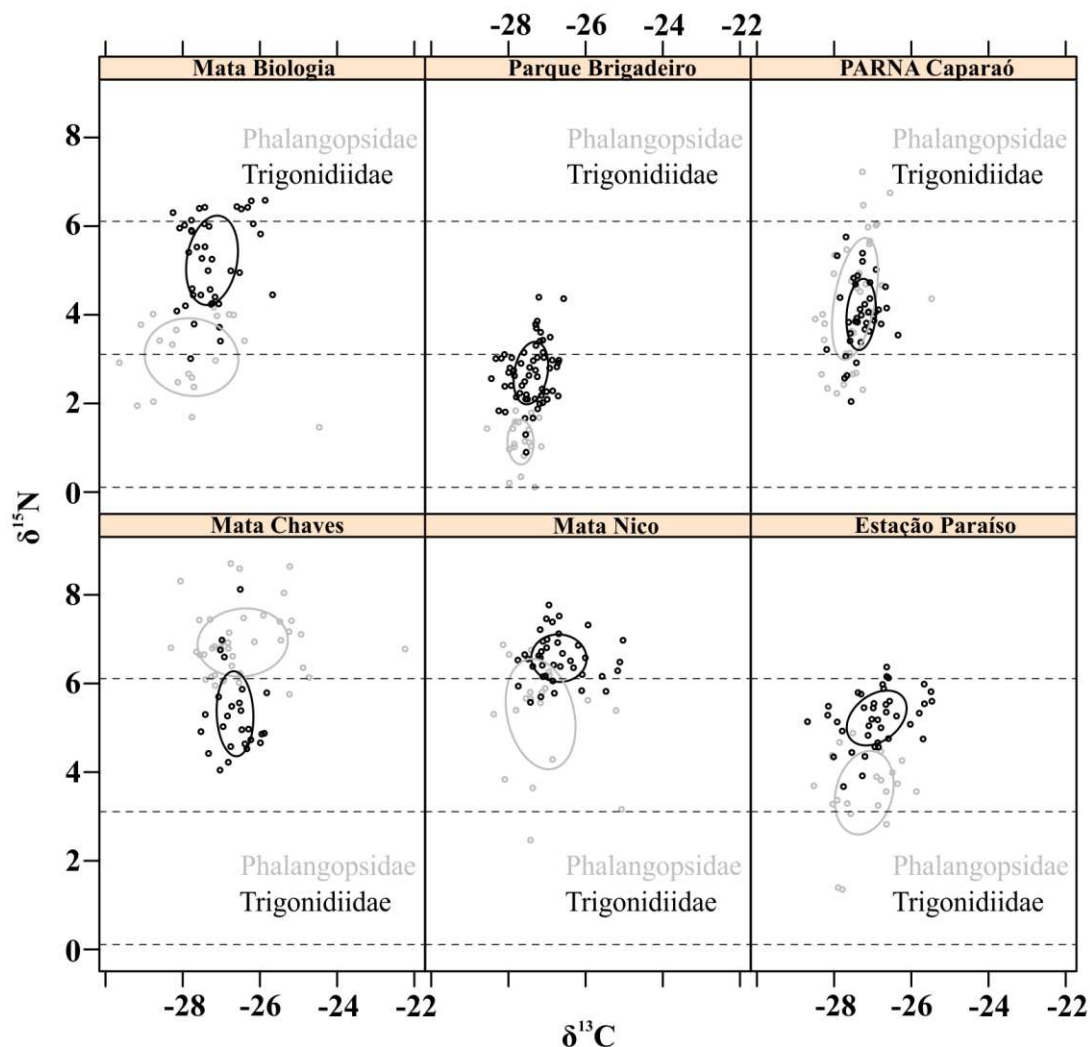


Figura 5. Resumo dos nichos isotópicos dos indivíduos de cada família em escala local, como inferido a partir de suas assinaturas isotópicas. Cada ponto representa os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no corpo de um indivíduo de grilo. Cada elipse Bayesiana padrão representa indivíduos de uma mesma família. Cada painel representa o local de forrageamento das famílias coocorrentes dentro do remanescente florestal amostrado. As linhas pontilhadas paralelas ao eixo-x define intervalos de 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$, que correspondem a posições tróficas distintas.

Efeito do número de espécies coocorrentes na amplitude de nicho trófico

Encontramos evidências de que o número de espécies coocorrentes influenciou na amplitude do nicho trófico das espécies ($F_{(1,19)} = 5.27$, $P = 0.03$) (Fig. 6). As áreas dos nichos isotópicos dos grilos nos locais onde foram encontradas três espécies coocorrendo foram maiores do que as áreas dos nichos onde havia quatro espécies coocorrendo (Fig. 6).

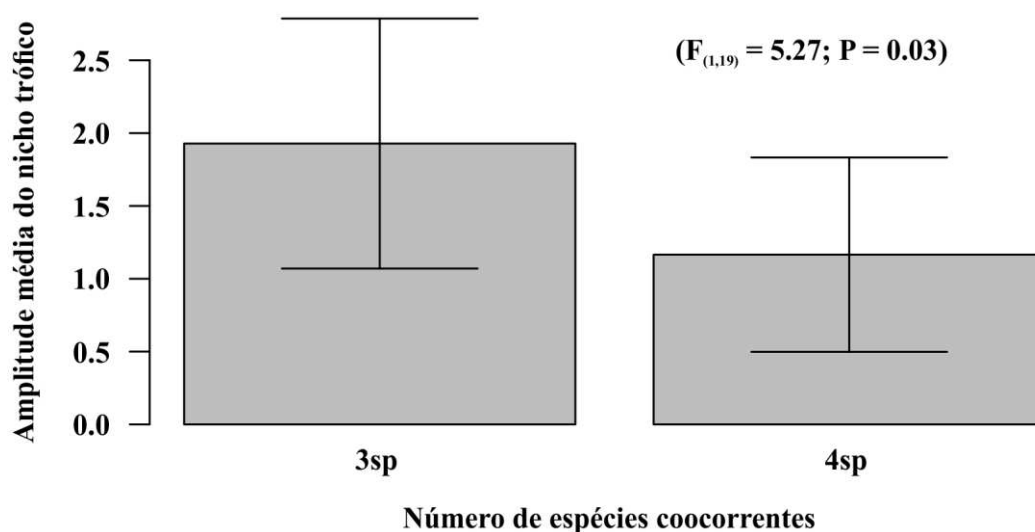


Figura 6. Efeito do número de espécies coocorrentes na amplitude média do nicho trófico das espécies em cada local de forrageamento. A amplitude de cada nicho trófico foi estimada calculando a área total de cada elipse Bayesiana padrão gerada a partir de 40% dos pontos amostrais de cada espécie.

Discussão

Esses dados são os primeiros que avaliam nicho trófico em comunidades biológicas de grilos. A partilha de recursos alimentares tem sido considerada um dos principais mecanismos que facilitam a coexistência das espécies (Chase & Leibold 2003), e isso inclui comunidades de plantas (Silvertown 2004; Fargione & Tilman 2005), peixes (Mason et al. 2008) e insetos (Florêncio et al. 2013, Sarty, Abbott & Lester 2007; Tillberg et al. 2007). Em comunidades de grilos encontramos partição de nicho trófico entre espécies coocorrentes na maior parte dos locais amostrados.

Isso não significa que a coexistência de grilos nesses micro-habitas estaria sendo facilitada unicamente porque os grilos estariam partilhando recursos alimentares. Para que isso fosse verdade, os locais amostrados deveriam ser, comprovadamente, restritos em recursos alimentares para os grilos, e até onde se sabe, tudo que compõe a serrapilheira pode ser recurso alimentar para os grilos. Essa variação na composição alimentar foi demonstrada pela grande amplitude trófica inferida pelos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas comunidades de grilos (Fig. 1 e 2).

Essa grande amplitude de dieta coloca os grilos em até três posições tróficas, considerando uma mudança de nível a cada 2.7‰ de $\delta^{15}\text{N}$ (Jesus et al. em preparação/cap.2). Nossos resultados, portanto, sugerem que os recursos para grilos podem não ser limitantes a ponto de explicar a coexistência de espécies através da segregação de nichos alimentares, mas são dados fundamentais para entender a ecologia trófica desses organismos.

O conhecimento do nicho trófico de grilos que vivem em serapilheiras de florestas neotropicais é fundamental para compreender parte do funcionamento desse ecossistema. Os grilos desses ambientes são importantes componentes na base de cadeias alimentares, fornecendo um fluxo significativo de energia através da predação por animais de níveis tróficos superiores como aves (Hau, Wikelski & Wingfield 2000), répteis (Unrine et al. 2007), anfíbios, outros artrópodes etc. (Kupfer et al. 2006).

(i) Efeito do local de forrageamento

A partição de nichos tróficos entre grilos nos diferentes locais de forrageamento (Fig 1) com relação ao espaço global de dieta, evidencia que, na grande maioria, as comunidades de grilos exploram dietas diferentes. Essa partição foi evidenciada pelos valores de $\delta^{15}\text{N}$, que originou grande amplitude de nicho trófico para grilos que forragearam em mais de um local. Esses valores contribuíram para uma amplitude de dieta que variou entre 0.1 a 8.7‰ em 421 indivíduos de grilos avaliados. As diferenças entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ são mais acentuadas se comparados os grilos que forragearam na “Mata Nico” e “Mata Chaves” comparados aos que forragearam no “Parque Brigadeiro” (Fig. 1). Os grilos desse último local de forrageamento parecem consumir recursos mais pobres em nitrogênio, podendo ser considerados como decompositores primários (Kupfer et al. 2006). Enquanto os

grilos que ocuparam os nichos tróficos superiores (Mata Chaves e Mata Nico) estão entre as faixas de $\delta^{15}\text{N}$ que, segundo Kupfer e colaboradores (2006) englobam (i) os carnívoros 1, os quais utilizam várias fontes alimentares, incluindo detritos e presas animais; (ii) e os carnívoros 2, que se alimentam, principalmente de outros animais. Seguindo este raciocínio, podemos inferir que, por serem onívoros e exibirem ampla flexibilidade alimentar, algumas espécies de grilos conseguem se alimentar e dessa forma, continuar se reproduzindo em locais diferentes.

Com relação aos valores de $\delta^{13}\text{C}$, foi observada uma sobreposição dos nichos tróficos. A maioria dos grilos apresentou valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -28 e -26‰ (Fig. 1). Com essa variação podemos inferir que a fonte de recursos utilizados pelos grilos, independente do local de forrageamento, provém de plantas C_3 . Segundo a literatura, essas plantas possuem valores de $\delta^{13}\text{C}$ que variam, em média, entre -32 e -24‰ (Peterson & Fry 1987; Fry 2006). Alguns estudos atribuem a maior ingestão de plantas C_3 à sua maior digestibilidade (Carvalho & Pires 2008). No entanto, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados em organismos onívoros também podem ser atribuídos ao fato de ter havido uma assimilação preferencial do carbono ingerido de plantas C_3 (Gannes et al. 1998). Nossos resultados, no entanto, não permitem maiores discussões sobre os processos fisiológicos, que ocorreram nos corpos dos grilos, e resultaram em valores de $\delta^{13}\text{C}$ dentro do esperado para o consumo de recursos provenientes de plantas C_3 (árvores e arbustos) (Fry 2006). No entanto, parece ser lógico supor que plantas C_3 são os recursos alimentares disponíveis em florestas e por isso há uma maior assimilação de carbono proveniente dessa fonte, pelos grilos.

A evidencia de partição de nicho trófico dos indivíduos das mesmas espécies entre os locais de forrageamento (Fig. 2) tem as mesmas implicações discutidas para as comunidades de grilos no geral. Ou seja, os diferentes locais de forrageamento implicam em mudanças de posições tróficas de indivíduos dentro de uma mesma espécie de grilo, dependendo dos recursos disponíveis em cada local e provavelmente das espécies que coocorrem. A mudança de níveis tróficos (Kupfer et al. 2006) dentro da mesma espécie pode ser visualizada ao seguir as linhas tracejadas horizontais em todas as figuras que evidenciam a mudança de nível trófico dos grilos à cada 3‰ de $\delta^{15}\text{N}$. Esse valor foi determinado a partir de vários estudos com diferentes taxas, em que a cada nível trófico subsequente, os organismos são enriquecidos, em média, entre 2,5 e 3,4‰ de $\delta^{15}\text{N}$ com relação a sua dieta (Post 2002). Estes valores estão entre a média de fracionamento isotópico observada em

grilos ($2.7\text{‰} \pm 0.04$ - média e SD, Jesus *et al.* em preparação/cap2). Assim, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ estimados nos grilos (0.1‰ à 8.7‰) sugere, no mínimo, duas posições tróficas completas para estes organismos. Isso significa que os grilos consomem uma grande variedade de itens alimentares e por isso apresentam grande amplitudes de nicho trófico (Layman *et al.* 2007b, Syvaranta & Jones 2008, Ercoli *et al.* 2014).

(ii) *Efeito de identidade específica*

Os casos de partição de nicho trófico entre espécies coocorrentes de grilos em cada local (Fig. 3) podem ser uma evidencia de que os grilos estão utilizando itens alimentares diferentes, gerando um discreto padrão de segregação alimentar entre algumas espécies (Putnam & Putnam 1996; Philippsen, Hauser & Benedito 2015; Ercoli *et al.* 2014). Os grilos sempre foram considerados, na grande maioria, como onívoros, com base em sua aceitação de grande variedade de materiais orgânicos em laboratório (Walker & Masaki 1989; FMJ observação pessoal), análise de conteúdo do tudo digestivo (Castner & Fowler 1984) e observações em campo (Desutter-Grandcolas 1995). Neste estudo, confirmamos a onivoria em comunidade de grilos no geral, baseado, principalmente, nos valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ que conferiu a ocupação de até três níveis tróficos quando observamos o espaço global de dieta. Mas também pudemos observar que há certa diferenciação no uso de recursos alimentares pelas espécies que coocorrem, mesmo quando se encontram no mesmo nível trófico.

Quando comparamos os nichos tróficos entre espécies em cada local (Fig. 3) com o nicho trófico de uma única espécie em todos os locais de sua ocorrência (Fig. 2) podemos observar o efeito do local de forrageamento e da espécie específica. As diferentes proporções de sobreposição de nicho podem estar condicionadas a uma menor sobreposição de nicho entre potenciais competidores em escala local, uma vez que os espaços dos nichos tróficos potenciais se sobrepõem consideravelmente em escalas geográficas maiores (Fig. 1) (Ryan 1986; Araújo & Guisan 2006). Por exemplo, quando avaliamos o nicho trófico das espécies *M. doucasae* e *P. zefai* em um espaço global de dieta (Fig. 2), temos um espaço delta que poderia ser comparado ao que seria o nicho fundamental, ou potencial, dessas espécies. Seguindo esse raciocínio podemos perceber que, apesar de possuírem um amplo espectro alimentar (escala global), os indivíduos dessas espécies ocupam apenas

parte do potencial nicho trófico quando em coocorrência com outras espécies (Fig. 3), sobrepondo, na maioria das vezes, o nicho das espécies coocorrentes. O nicho trófico local seria então análogo ao nicho realizado, ou ocupado, de uma espécie, uma vez que o nicho realizado, além das variáveis ambientais, considera as interações biológicas.

Essa partição de nicho trófico entre espécies coocorrentes não representa uma forte evidência, no tempo atual, de que há processos competitivos por recursos alimentares atuando nas comunidades de grilo. Contudo, não podemos confirmar a inexistência de competição por recursos não alimentares, como território (Jain & Balakrishnan 2011; Alexander 1961), fêmeas para acasalamentos (Alexander 1961; Rantala & Kortet 2004), sítios de oviposição, dentre outros, atuando na estruturação das comunidades de grilos.

(iii) Efeito da proximidade filogenética

A partição de nicho trófico parece em algumas comunidade de grilos parece estar relacionados à distância filogenética entre os grilos co-habitantes. As espécies coocorrentes que pertencem a gêneros diferentes segregaram em três dos seis locais de forrageamento (Fig. 4). Esse mesmo resultado foi encontrado quando analisamos as espécies entre diferentes famílias (Fig. 5). Por outro lado, não encontramos casos de segregação de nicho entre espécies do mesmo gênero ou da mesma família, ou seja, as espécies congênicas apresentaram sobreposição dos nichos tróficos em todos os locais de forrageamento. Pode ser que alguma divergência morfológica existente entre os indivíduos de gêneros e famílias diferentes tenha causado uma variação nos recursos consumidos, podendo explicar parcialmente a coexistência de algumas espécies coocorrentes (MacArthur & Levins 1967).

(iv) Efeito do número de espécies coocorrentes na amplitude de nicho trófico

Encontramos uma evidência de estreitamento de nichos tróficos correlacionada com número de espécies coocorrentes. A coocorrência de mais espécies cada local pode ter provocado um empacotamento no nicho trófico efetivo das espécies, que pode ter contribuído para evitar um aumento na sobreposição dos nichos (Pianka 1967). Assim, acreditamos que os mecanismos responsáveis pelo

estreitamento do nicho trófico dos grilos em cada local podem incluir (i) diferenças locais na disponibilidade de recursos, como por exemplo, a presença temporária de frutos, flores e fungos na estação chuvosa, pode favorecer a abundância dos grilos (Neves et al. 2010), levando-os a um estreitamento do uso de recursos alimentares o ao longo de um *continuum* trófico no mesmo local; (ii) diferenças locais nas condições ambientais, com maior agrupamento de indivíduos em locais onde as condições abióticas (temperatura, luminosidade e umidade) sejam mais adequadas, visto que os grilos florestais são muito sensíveis a baixas umidades (Szinwelski 2009) e ao ressecamento, como a grande maioria dos insetos (Dow 2013).

Considerações finais

Neste estudo encontramos evidências de que a coexistência de espécies de grilos em comunidades naturais envolve partição de recursos alimentares. O local de forrageamento influenciou diretamente no uso da dieta e conseqüentemente na posição trófica dos grilos, os quais apresentaram até três níveis tróficos quando avaliados em um contexto global da dieta. Como previsto na literatura, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ determinaram a posição trófica dos grilos dentro de uma comunidade biológica e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ indicaram que todos os grilos utilizam recursos alimentares com origem em plantas C_3 . Além disso, encontramos evidência de que a distância filogenética também parece influenciar na partição trófica em comunidades de grilos. Os indivíduos do mesmo gênero apresentaram maior sobreposição no uso de recursos alimentares. Finalmente, encontramos evidências de estreitamento do nicho trófico à medida que aumenta o número de espécies coocorrentes.

Agradecimentos

Agradecemos Ênio H.V. Araújo, Geanne C.R. Rodrigues, Gabriel Lobregat, Thiago G. Kloss, Natallia M. Vicente, Cristielle Costa, Maria Luiza Bicalho e Rafael A. Narciso pela assistência no campo. Agradecemos Ênio H.V. Araújo pela ajuda na triagem e processamento das amostras. Agradecemos Karla N. Oliveira e Vivian L. Aguiar pela revisão do manuscrito. Este artigo é parte da tese de doutorado do primeiro autor, sob a supervisão de Carlos F. Sperber no programa de pós-graduação Ecologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Este trabalho foi

financiado pela CAPES, CNPq, FAPEMIG e SISBIOTA: Processo N. 563360/2010-0.

Referências bibliográficas

- Abrams, PA (1980) Some comments on measuring niche overlap, *Ecology*, **61**, 44-49.
- Alexander, RD (1961) Aggressiveness, territoriality, and sexual behavior in field crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Behaviour*, 130-223.
- Anderson, C & Cabana, G (2007). Estimating the trophic position of aquatic consumers in river food webs using stable nitrogen isotopes. *Journal of the North American Benthological Society*, **26**, 273-285.
- Bearhop, S, Adams, CE, Waldron, S, Fuller, RA & MacLeod, H (2004) Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, **73**, 1007-1012.
- Bearhop, S, Waldron, S, Votier, SC & Furness, RW (2002) Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiological and biochemical zoology*, **75**, 451-458.
- Bolnick, DI, Svanbäck, R, Fordyce, JA, Yang, LH, Davis, JM, Hulsey, CD & Forister, ML (2003) The ecology of individuals: incidence and implications of individual specialization. *The American Naturalist*, **161**, 1-28.
- Carvalho, GGP & Pires, AJV (2008) Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. *Archivos de Zootecnia*, **57**, 13-28.
- Castner, JL & Fowler, HG (1984) Gut content analyses of Puerto Rican mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: Scapteriscus). *Florida Entomologist*, 479-481.
- Chase, J. & Leibold, M. (2003) *Ecological Niches: linking classical and contemporary approaches*. The University of Chicago Press.
- Correa, SB & Winemiller, KO (2014) Niche partitioning among frugivorous fishes in response to fluctuating resources in the Amazonian floodplain forest. *Ecology*, **95**, 210-224.
- Desutter-Grandcolas, L (1995) Toward the knowledge of the evolutionary biology of phalangopsid crickets (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae): data, questions and evolutionary scenarios. *Journal of Orthoptera Research*, 163-175.
- Dow, J.A.T. (2013) *Excretion and salt and water regulation*. In: *The insects: structure and function* / R. F. Chapman. – 5th edition / edited by Simpson, S. J & Douglas, A. E, Cambridge University Press, New York 959pp.

- Ercoli, F, Ruokonen, TJ, Hämäläinen, H and Jones, R (2014) Does the introduced signal crayfish occupy an equivalent trophic niche to the lost native noble crayfish in boreal lakes? *Biological Invasions*, **16**, 2025-2036.
- Fargione J, Tilman D (2005) Niche differences in phenology and rooting depth promote coexistence with a dominant C₄ bunchgrass. *Oecologia*, **143**, 598–606.
- Florêncio DF, Marins A, Rosa CS, Cristaldo PF, Araújo APA, Silva IR, et al. Diet segregation between cohabiting builder and inquiline termite species. PLoS ONE. 2013. June; 8(6): e66535 Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066535> Doi: 10.1371/journal.pone.0066535 [PMC free article] [PubMed]
- Fry, B (2006) *Stable isotope ecology*. Springer, New York, NY.
- Gannes, LZ, DelRio, CM & Koch, P (1998) Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative biochemistry and physiology Part A: Molecular & integrative physiology*, **119A**, 725-737.
- Hau, M, Wikelski, M & Wingfield, JC (2000). Visual and nutritional food cues fine-tune timing of reproduction in a neotropical rainforest bird. *Journal of Experimental Zoology*, **286**, 494-504.
- Hobson, KA, & Clark, RG (1992) Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. *Condor*, 189-197.
- Hurlbert, S.H.(1978) The measurement of niche overlap and some relatives, *Ecology*, **59**, 67-77.
- Jackson, AL, Parnell, AC, Inger, R & Bearhop, S (2011) Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER-Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, **80**, 595-602.
- Jain, M & Balakrishnan, R (2011) Microhabitat selection in an assemblage of crickets (Orthoptera: Ensifera) of a tropical evergreen forest in Southern India. *Insect Conservation and Diversity*, **4**, 152-158.
- Kupfer, A, Langel, R, Scheu, S, Himstedt, W & Maraun, M (2006) Trophic ecology of a tropical aquatic and terrestrial food web: insights from stable isotopes (¹⁵N). *Journal of Tropical Ecology*, **22**, 469-476.
- Layman, CA, Arrington, DA, Montana, CG & Post, DM (2007a) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*, **88**, 42-48.
- Layman, CA, Quattrochi, JP, Peyer, CM & Allgeier, JE (2007b) Niche width collapse in a resilient top predator following ecosystem fragmentation. *Ecology Letters* **10**, 937-944.
- MacArthur, RH & Levins, R (1967) The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *American Naturalist*, **101**, 377–385.

- Mason, NW, Irz, P, Lanoiselée, C, Mouillot, D & Argillier, C (2008) Evidence that niche specialization explains species–energy relationships in lake fish communities. *Journal of Animal Ecology*, **77**, 285-296.
- McGill, BJ, Enquist, BJ, Weiher, E, & Westoby, M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in ecology & evolution*, **21**, 178-185.
- Neves, FS, LS Araújo, MM Espírito-Santo, M Fagundes & GW Fernandes, (2010) Efeito da estratificação florestal e da sucessão secundária sobre a fauna de insetos herbívoros associada ao dossel de uma floresta estacional decidual. *Biota*, **3**, 33-44.
- Newsome, SD, Martinez del Rio, C, Bearhop, S & Phillips, DL (2007) A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **5**, 429-436.
- Parnell, AC, Inger, R, Bearhop, S & Jackson, AL (2010) Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLoS one*, **5**, 1-5.
- Peel, MC, Finlayson, BL & McMahon, TA (2007) Updated world map of the Kooppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, **11**, 1633-1644.
- Peterson, B & Fry, B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematic*, **18**, 293-320.
- Philippsen, JS, Hauser, M & Benedito, E (2015) Isotopic niches of sympatric native and exotic fish species in a Neotropical floodplain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, (AHEAD), 00-00.
- Pianka, ER (1967) On lizard species diversity: North American flatland deserts. *Ecology*, 334-351.
- Post, DM (2002) Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position: Models, Methods, and Assumptions. *Ecology*, **83**, 703-718.
- Rantala, MJ & Kortet, R (2004) Male dominance and immunocompetence in a field cricket. *Behavioral Ecology*, **15**, 187-191.
- R Development Core Team (2014) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Ryan, JM (1986) Dietary overlap in sympatric populations of pygmy shrews, *Sorex hoyi*, and masked shrews, *Sorex cinereus*, in Michigan. *Canadian field-naturalist*. Ottawa, **100**, 225-228.
- Sarty M, Abbott KL & Lester PJ (2007) Community level impacts of an ant invader and food mediated coexistence. *Insectes Sociaux*, **54**, 166–173.
- Schoener, T.W. (1974a) Resource partitioning in ecological communities. *Science*, **185**, 27-39.

- Silvertown J (2004) Plant coexistence and the niche. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 605– 611.
- Soberon, J (2007) Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters*, **10**, 1115-1123.
- Svanbäck, R & Schluter, D (2012) Niche specialization influences adaptive phenotypic plasticity in the threespine stickleback. *The American Naturalist*, **180**, 50-59.
- Syvaranta, J & Jones, RI (2008) Changes in feeding niche widths of perch and roach following biomanipulation, revealed by stable isotope analysis. *Freshwater Biology*, **53**, 425-434.
- Syväranta, J, Lensu, A, Marjomäki, TJ, Oksanen, S, & Jones, RI (2013) An empirical evaluation of the utility of convex hull and standard ellipse areas for assessing population niche widths from stable isotope data. *PloS one*, **8**, e56094.
- Szinwelski, N. (2009) *Riquezas de Espécies de Grilos (Orthoptera: Grylloidea) em fragmentos de Mata Atlântica em regeneração*. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Viçosa. 37p.
- Tillberg CV, Holway DA, LeBrun EG & Suarez AV (2007) Trophic ecology of invasive Argentine ants in their native and introduced ranges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 20856–20861.
- Tilman, D. & Pacala, S. (1993) Species diversity in ecological communities, The University of Chicago Press, chap. *The maintenance of species richness in plant communities*. pp. 13–25.
- Tilman, D (1982) *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Tilman, D (1988) *Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities*. Princeton University Press.
- Unrine, J M, Jackson, BP, Hopkins, WA (2007) Selenomethionine biotransformation and incorporation into proteins along a simulated Terrestrial Food Chain. *Environmental science & technology*, **41**, 3601–3606.
- Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R. & Lima, J.C.A. (1991) *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. 1 edição. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro.
- Walker, T J & Masaki, S. (1989) Natural history. In: Huber, F; Moore, T E and Loher, W (eds.). *Cricket behavior and neurobiology*. Cornell University Press, pp. 1-42.
- Wang, J, Lin, G, Huang, J & Han, X (2004) Applications of stable isotopes to study plant-animal relationships in terrestrial ecosystems. *Chinese Science Bulletin*, **49**, 2239-2347.

Wilson, JB (1990) Mechanism of species coexistence: twelve explanations for Hutchinson's paradox of the plankton: evidence from New Zealand plant communities. *New Zealand Journal of Ecology*, **13**, 17–42.

Vander Zanden, M & Rasmussen, JB (2001) Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology and oceanography*, **46**, 2061-2066.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apontados nos três artigos desta tese permitem concluir que:

- (i) Os métodos de preservação físico (congelamento) e químicos (etanol comercial e combustível) por 15 e 60 dias, alteram pelo menos um dos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de amostras de grilos de serrapilheira florestal. Recomendamos o uso de material recém-processado para AIE de grilos.
- (ii) O fracionamento isotópico de Carbono e Nitrogênio avaliado em corpos de grilos com relação a dieta causa um enriquecimento entre 1.3‰ e 4‰ nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e uma depleção entre 0.04‰ e 0.7‰ nos valores de ^{13}C . Com isso, concluímos que a AIE constitui uma ferramenta promissora para investigar o nicho trófico e conseqüentemente a posição trófica da comunidade de grilos de serrapilheira, uma vez que sabemos como se dá o fracionamento isotópico nos grilos com relação à dieta.
- (iii) A coexistência de espécies de grilos em comunidades naturais envolve partição de recursos alimentares. Sendo que o local de forrageamento influencia diretamente no uso da dieta e conseqüentemente na posição trófica dos grilos, os quais podem apresentar até três níveis tróficos quando avaliados em um contexto global da dieta. Há evidências também de que a distância filogenética parece influenciar na partição trófica em comunidades de grilos. Os indivíduos de grilos do mesmo gênero apresentam maior sobreposição no uso de recursos alimentares.
- (iv) Como previsto na literatura, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ determinam a posição trófica dos grilos dentro de uma comunidade biológica e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ indicam a origem da matéria orgânica, que no caso de grilos de serrapilheira é basicamente plantas C_3 .
- (v) Finalmente, encontramos evidências de estreitamento do nicho trófico à medida que aumenta o número de espécies coocorrentes. Vale ressaltar que esses dados sobre utilização de recursos não devem ser utilizados como evidências sobre processos competitivos, porém são informações básicas

sobre as quais se podem construir hipóteses de processos ecológicos e evolutivos em comunidades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams, P (1983) The theory of limiting similarity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **14**, 359–376.
- Allesina, S & Levine, JM (2011) A competitive network theory of species diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 5638-5642.
- Bearhop, S, Adams, CE, Waldron, S, Fuller, RA & MacLeod, H (2004) Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, **73**, 1007-1012.
- Bearhop, S, Waldron, S, Votier, SC & Furness, RW (2002) Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiological and biochemical zoology*, **75**, 451-458.
- Bolnick, DI, Svanbäck, R, Fordyce, JA, Yang, LH, Davis, JM, Hulsey, CD & Forister, ML (2003) The ecology of individuals: incidence and implications of individual specialization. *The American Naturalist*, **161**, 1-28.
- Carabel S, Verísimo P, Freire J (2009) Effects of preservatives on stable isotope analyses of four marine species. *Estuar Coast Shelf S.*, **82**(2): 348–350. doi: 10.1016/j.ecss.2009.01.011.
- Castner, JL & Fowler, HG (1984) Gut content analyses of Puerto Rican mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: Scapteriscus). *Florida Entomologist*, 479-481.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination factors ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J. Appl. Ecol.*, **46**, 443-453.
- Chase, J. & Leibold, M (2003) *Ecological Niches: linking classical and contemporary approaches*. The University of Chicago Press.
- Chesson, P (2000) Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 343–366.
- Correa, SB & Winemiller, KO (2014) Niche partitioning among frugivorous fishes in response to fluctuating resources in the Amazonian floodplain forest. *Ecology*, **95**, 210-224.
- Desutter-Grandcolas L (1995) Functional forewing morphology and stridulation in crickets (Orthoptera, Grylloidea). *J. Zool. Lond.*, **236**, 243 – 252.
- Elton, CS (1927) The nature and origin of soil-polygons in Spitsbergen. *Quarterly Journal of the Geological Society*, 83(1-5), 163-NP.

- Ercoli, F, Ruokonen, TJ, Hämäläinen, H and Jones, R (2014) Does the introduced signal crayfish occupy an equivalent trophic niche to the lost native noble crayfish in boreal lakes? *Biological Invasions*, **16**, 2025-2036.
- Fry, B (2006) *Stable isotope ecology*. Springer, New York, NY.
- Gangwere, SK (1961). A monograph on food selection in Orthoptera. *Transactions of the American Entomological Society*, **24**, 67-230.
- Giacomini, HC (2007) Os mecanismos de coexistência de espécies como vistos pela teoria ecológica. *Oecologia Brasiliensis*, **11**, 521–543.
- Gonçalves, MC (2004) *Dieta do grilo Eidmanacris bidentata Sperber, 1998 (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Orientador: Carlos F. Sperber.
- Gratton C, Forbes AE (2006) Changes in $\delta^{13}\text{C}$ stable isotopes in multiple tissues of insect predators fed isotopically distinct prey. *Oecologia*, **147** (4), 615-624. [//dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066535](https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066535).
- Grinnell, J (1917) The niche-relationships of the California Thrasher. *The Auk*, 427-433.
- Haramis GM, Jorde DG, Macko SA, Walker JL (2001) Stable-isotope analysis of canvasback winter diet in upper Chesapeake Bay: *Auk*, **118**, 1008-1017.
- Hilderbrand GV, Farley SD, Robbins CT, Hanley TA, Titus K, Servheen C (1996) Use of stable isotopes to predict diets of living and extinct bears. *Can J Zool.*, **74**, 2080–2088. doi:10.1139/z96-236.
- Hobson KA, Clark RG (1992a) Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *Condor*, **94**, 181-188.
- Hobson KA, Clark RG (1992b) Assessing avian diets using stable isotopes. II. Factors influencing diet-tissue fractionation. *Condor*, **94**, 189–197.
- Hobson KA, Gloutney ML, Gibbs HL (1997) Preservation of blood and tissue samples for stable-carbon and stable-nitrogen isotope analysis. *Can J Zool.*, **75**, 1720–1723. doi: 10.1139/z97-799.
- Hutchinson, GE (1957) Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology. *Concluding remarks*, **22**, 415-427.
- Jackson, AL, Parnell, AC, Inger, R & Bearhop, S (2011) Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER-Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, **80**, 595-602.
- Kaehler S, Pakhomoy EA (2001) Effects of storage and preservation on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of selected marine organisms. *Mar Ecol Prog Ser.*, **219**-299–304. doi: 10.3354/meps219299.

- Kupfer, A, Langel, R, Scheu, S, Himstedt, W & Maraun, M (2006) Trophic ecology of a tropical aquatic and terrestrial food web: insights from stable isotopes (^{15}N). *Journal of Tropical Ecology*, **22**, 469-476.
- Layman, CA, Arrington, DA, Montana, CG & Post, DM (2007a) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*, **88**, 42-48.
- MacArthur, RH & Levins, R (1967) The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *American Naturalist*, **101**, 377-385.
- McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, **102**, 378-390.
- McGill, BJ, Enquist, BJ, Weiher, E, & Westoby, M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in ecology & evolution*, **21**, 178-185.
- Newsome, SD, Martinez del Rio, C, Bearhop, S & Phillips, DL (2007) A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **5**, 429-436.
- Pearson SF, Levey DJ, Greenberg CH, Martinez del Rio C (2003) Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia*, **135**, 516-523.
- Peterson, B & Fry, B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematic*, **18**, 293-320.
- Ponsard S, Amlou M (1999) Effects of several preservation methods on the isotopic content of *Drosophila* samples. *C R Acad Sci III.*, **322**, 35-41. doi: 10.1016/S0764-4469(99)80015-8. pmid:10047952.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, **83**, 703-718.
- Soberon, J (2007) Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters*, **10**, 1115-1123.
- Spence KO, Rosenheim JA (2005) Isotopic enrichment in herbivorous insects: a comparative field-based study of variation. *Oecologia*, **146**, 89-97. doi: 10.1007/s00442-005-0170-9.
- Sperber, CF, Soares LGS, Pereira MR (2007) Litter disturbance and trap spatial positioning affects the number of captured individuals and genera of crickets (Orthoptera: Grylloidea). *J. orthoptera res.*, **16**, 77-83.
- Syväranta, J, Lensu, A, Marjomäki, TJ, Oksanen, S, & Jones, RI (2013) An empirical evaluation of the utility of convex hull and standard ellipse areas for assessing population niche widths from stable isotope data. *PloS one*, **8**, e56094.
- Tilman, D (1982) *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

- Tilman, D (1988) *Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities*. Princeton University Press.
- Tilman, D. & Pacala, S. (1993) Species diversity in ecological communities, The University of Chicago Press, chap. *The maintenance of species richness in plant communities*. pp. 13–25.
- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia*, **136**, 169-182.
- Walker, T J & Masaki, S. (1989) Natural history. In: Huber, F; Moore, T E and Loher, W (eds.). *Cricket behavior and neurobiology*. Cornell University Press, pp. 1-42.
- Wehi PM, Hicks BJ (2010) Isotopic fractionation in a large herbivorous insect, the Auckland tree weta. *J. Insect Behav.*, **56**, 1877–1882. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.005.

Material Suplementar - Artigo 3.

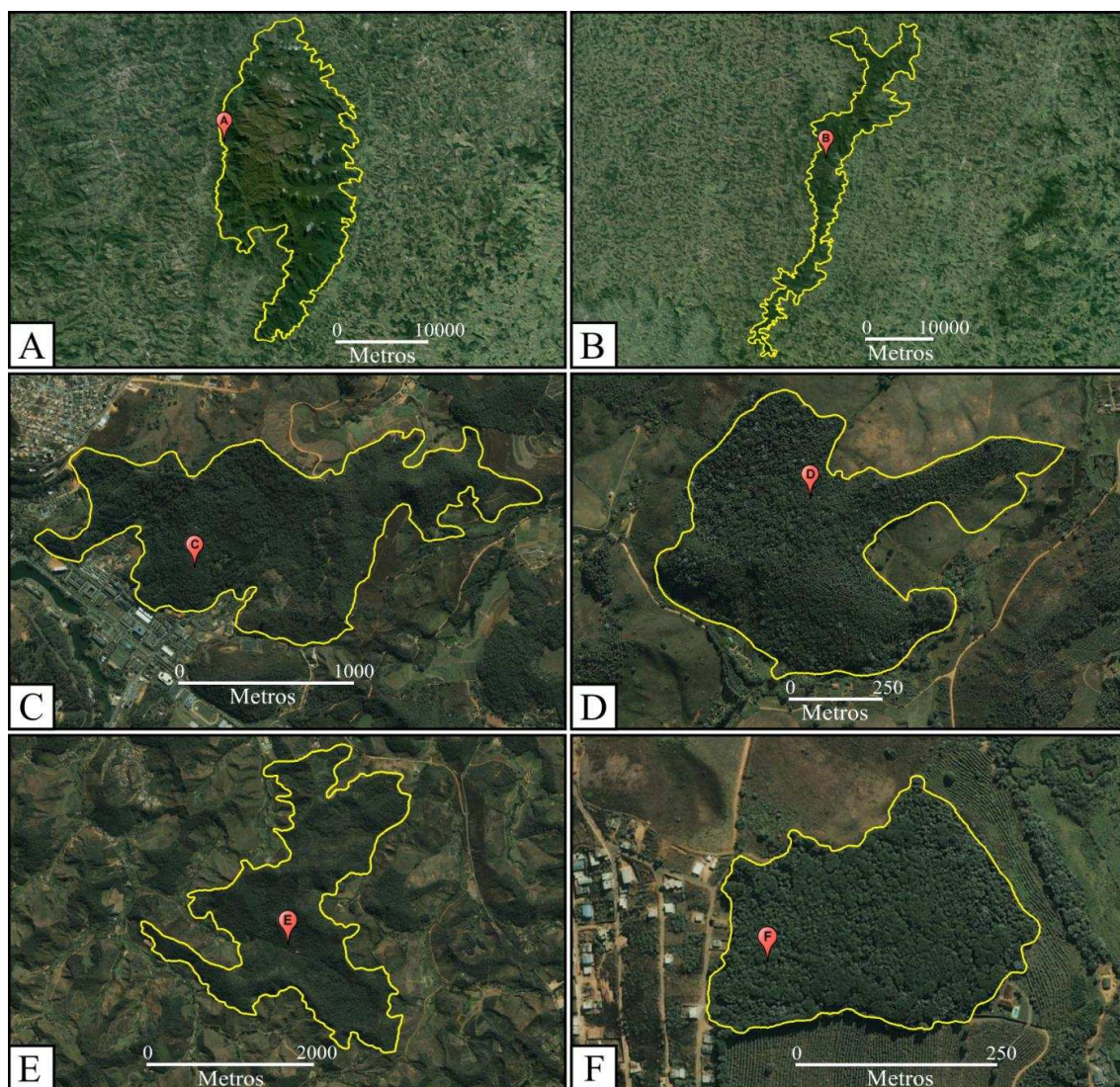


Figura S1. Ilustração dos locais de forrageamento das espécies estudadas. Cada local de forrageamento está inserido em um remanescenteflorestal inserido no Bioma Mata Atlântica, localizados na Zona da Mata Mineira, MG, Brasil. Sendo A = Parque Nacional do Caparaó, B = Parque Estadual Serra do Brigadeiro, C = Mata da Biologia, D = Mata do Seu Nico, E = Estação de Pesquisa Paraíso e F = Mata do professor Chaves. O ponto marcado em cada remanescente corresponde ao local de coleta (área de aproximadamente 500m²).

Tabela S1. Descrição do número de indivíduos coletados (*n.* amostras para análises isotópicas) por espécie em cada remanescente florestal amostrado, totalizando 557 indivíduos pertencentes a nove espécies e duas famílias. Cada amostra foi equivalente a um indivíduo, totalizando 401 amostras para análise isotópica.

Táxon		Mata Biologia	Mata Nico	Mata Chaves	Estação Paraíso	Parna Caparaó	P. E. Serra Brigadeiro
Trigonidiidae	<i>Phoremia zefai</i>	34 (20)	27 (20)	26 (20)	32 (20)	28 (20)	32 (20)
	<i>Phoremia</i> sp1					29 (20)	
	<i>Phoremia</i> sp2						34 (20)
	<i>Zucchiella matiottiae</i>		22 (20)	8 (6)			
Phalangopsidae	<i>Eidmanacris</i> sp.					22 (20)	
	<i>Izecksohniella</i> sp.			22 (20)			
	<i>Mellopsis Doucasae</i>	31 (20)	28 (20)	23 (20)	29 (20)	22 (20)	
	Luzarinae Gen.Nov.						22 (20)