

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
RECONHECEDORES DE PADRÕES MOLECULARES E β -1,3 ENDOGLUCANASES
(FAMÍLIA GH16) EM *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE) DURANTE INFECÇÃO
POR ENTOMOPATÓGENOS

por

FELIPE MARINHO COUTINHO DE SOUZA

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino - UFRPE)

RESUMO

O sistema de defesa dos insetos é constituído de barreiras estruturais passivas, como a cutícula, e respostas ativas, como a resposta celular e humoral. Estas respostas são controladas por vias de sinalização que são ativadas para induzirem a expressão de genes responsáveis por controlar vários mecanismos de defesa, dos quais um dos principais é a via Toll, que é evolutivamente conservada. Em larvas e adultos, esta via é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que no caso de fungos são as β -1,3 glicanas, e de bactérias são os peptidoglicanos, reconhecidas a partir das GNBPs ou β GRPs. Estas proteínas são caracterizadas por possuírem um domínio N-terminal de ligação a carboidrato denominado CBM e um domínio GH16 de β -1,3 glucanase não funcional, que irão sinalizar a presença do patógeno e tentar combatê-lo. Além disso, muitos insetos possuem β -1,3 glucanases funcionais onde a proteína possui apenas o domínio GH16. Ao contrário de *Drosophila*, onde GGBP1 reconhece peptidoglicanos (PGs) de bactérias Gram-positivas e GGBP3 reconhece β -1,3 glicanas de fungos, em Lepidoptera todos os

ortólogos de GNBPs (as β GRPs) podem reconhecer bactérias Gram-positivas e negativas e fungos. No entanto, a maioria dos estudos realizados nesta área utilizou microrganismos não patogênicos a insetos ou oportunistas. Portanto, existe a necessidade de estudos sobre como essas vias do sistema imunológico se comportam durante a infecção por entomopatógenos, particularmente nos estágios iniciais da infecção. Neste estudo, analisamos os genes que possuem o domínio GH16 (β GRPs e β -1,3 glucanases) utilizando a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* como modelo de estudo. Assim, a expressão dos genes identificados foi avaliada em lagartas de 3º instar desafiadas com doses subletais dos patógenos *Metarhizium anisopliae* e *Bacillus thuringiensis*. Adicionalmente, a expressão de um gene de β -1,3 glucanase foi avaliada em lagartas que se alimentaram de diferentes dietas. Por fim, discutimos como estes genes que estão envolvidos na resposta imune e seus genes relacionados, respondem a patógenos naturais, que possuem mecanismos para superar as defesas dos insetos.

PALAVRAS-CHAVE:

Sistema imune, domínio GH16, expressão gênica, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MOLECULAR PATTERN
RECOGNITION AND β -1,3 ENDOGLUCANASE GENES (GH16 FAMILY) EXPRESSION IN
Diatraea saccharalis (LEP.: CRAMBIDAE) DURING ENTOMOPATHOGENS INFECTION

por

FELIPE MARINHO COUTINHO DE SOUZA

(Sob Orientação do Professor Jose Dijair Antonino - UFRPE)

ABSTRACT

The cuticle is a passive structural barrier in the insect defense system, and cellular and humoral responses are active defense mechanisms. These responses are regulated by signaling pathways that are activated to cause the expression of genes in charge of managing different defense mechanisms, one of which is the Toll pathway, which has been conserved throughout evolution. The recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are β -1,3 glucans in fungi and peptidoglycans in bacteria and are recognized by GNBPs or β GRPs, activates this pathway in larvae and adults. These proteins are distinguished by having a non-functional β -1,3 glucanase GH16 domain and an N-terminal carbohydrate-binding domain known as CBM that will signal the presence of the pathogen, triggering the response to combat it. Furthermore, many insects have functional β -1,3 glucanases with only the GH16 domain. In Lepidoptera, all orthologs of GNBPs (the β GRPs) are able to recognize both gram-positive and negative bacteria as well as fungi, in contrast to *Drosophila*, where GGBP1 recognizes peptidoglycans (PGs) from gram-positive bacteria and GGBP3 recognizes β -1,3 glucans from fungi. However, non-pathogenic or

opportunistic microorganisms were used in the majority of studies in this field. Therefore, research is required to determine how these immune system pathways respond to entomopathogen infection, especially in the early stages of infection. We used the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, as a study model and looked at genes with the GH16 domain (β GRPs and β -1,3 glucanases). Thus, in third instar caterpillars exposed to sublethal doses of the pathogens *Metarhizium anisopliae* and *Bacillus thuringiensis*, the expression of the identified genes was assessed. Additionally, in caterpillars fed various diets, the expression of a gene encoding a β -1,3 glucanase was assessed. Finally, we discuss how these immune response-related genes, and their associated genes react to naturally occurring pathogens, which have mechanisms to circumvent insect defenses.

KEY WORDS:

Immune system, GH16 domain, gene expression, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
RECONHECEDORES DE PADRÕES MOLECULARES E β -1,3 ENDOGLUCANASES
(FAMÍLIA GH16) EM *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE) DURANTE INFECÇÃO
POR ENTOMOPATÓGENOS

por

FELIPE MARINHO COUTINHO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2023

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
RECONHECEDORES DE PADRÕES MOLECULARES E β -1,3 ENDOGLUCANASES
(FAMÍLIA GH16) EM *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE) DURANTE INFECÇÃO
POR ENTOMOPATÓGENOS

por

FELIPE MARINHO COUTINHO DE SOUZA

Comitê de Orientação:

José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
RECONHECEDORES DE PADRÕES MOLECULARES E β -1,3 ENDOGLUCANASES
(FAMÍLIA GH16) EM *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE) DURANTE INFECÇÃO
POR ENTOMOPATÓGENOS

por

FELIPE MARINHO COUTINHO DE SOUZA

Banca Examinadora:

José Dijair Antonino de Souza Júnior – UFRPE (Presidente)

Fernando Campos de Assis Fonseca – IFG-GO

Guilherme Duarte Rossi – FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP

Felipe Marinho Coutinho de Souza
Mestre em Entomologia

Prof. José Dijair Antonino de Souza
Júnior – UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal Rural de
Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S729i

Souza, Felipe, Felipe Marinho Coutinho de
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RECONHECEDORES DE
PADRÕES MOLECULARES E ?-1,3 ENDOGLUCANASES (FAMÍLIA GH16) EM *Diatraea saccharalis* (LEP.:
CRAMBIDAE)
DURANTE INFECÇÃO POR ENTOMOPATÓGENOS / Felipe, Felipe Marinho Coutinho de Souza. - 2023.
70 f. : il.

Orientador: Jose Dijair Antonino de Souza
Junior. Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Entomologia Agrícola, Recife, 2024.

1. Sistema imune. 2. domínio GH16. 3. expressão gênica. 4. *Metarhizium anisopliae*. 5. *Bacillus thuringiensis*. I. Junior, Jose Dijair Antonino de Souza, orient. II. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João de Assis de Souza e Edilma Marinho Coutinho, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Dedico.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	11
2 OS GENES QUE POSSUEM DOMÍNIO GH16 SÃO INIBIDOS EM <i>Diatraea saccharalis</i> (LEP.: CRAMBIDAE) DURANTE ESTÁGIOS INICIAIS DA INFECÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
RESUMO	19
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	38
AGRADECIMENTOS	43
LITERATURA CITADA.....	43
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos estão expostos a uma variedade de microrganismos, e para sua manutenção no ambiente, desenvolveram um eficiente mecanismo de defesa contra essas infecções através de respostas imunológicas (Lu & Leger 2016). O sistema de defesa dos insetos é constituído de barreiras estruturais “passivas” e respostas ativas (Ratcliffe *et al.* 1985, Lavine & Strand 2002, Negreiro *et al.* 2004). As respostas ativas são formadas por respostas celulares e humorais que compõem um dos principais mecanismos de defesa, denominado de sistema imunológico inato (Lavine & Strand 2002). A resposta humoral é dada pela presença de proteínas solúveis na hemolinfa que desencadeiam uma série de ações imunológicas como: a fagocitose, a melanização e a síntese de peptídeos antimicrobianos (Vilmos & Kurucz 1998). Para que ocorra a resposta do sistema imune dos insetos frente a alguma infecção é necessário que as vias de sinalização sejam ativadas para induzirem a expressão de genes responsáveis por controlar vários mecanismos de defesa, permitindo assim, controlar e/ou eliminar grande parte das infecções (Wu *et al.* 2022).

Sistema Imune dos Insetos

Os primeiros estudos conduzidos a respeito da imunidade nos insetos são datados ainda do século XIX, onde a partir da observação de células responsáveis por fagocitar corpos estranhos levantou-se hipóteses a respeito do que hoje conhecemos como sistema imune inato (Park & Lee 2012). Esse sistema é formado por defesas complexas, que o patógeno precisa superar para que consiga colonizar todo o corpo do inseto e consequentemente se estabelecer no ambiente. Até que

o patógeno consiga realizar todos os processos de colonização ele precisará ultrapassar, primeiro pelas barreiras físicas e químicas presentes no tegumento do inseto e chegando na hemocele irá então precisar superar barreiras ainda mais complexas, que são as do sistema imune inato (Park & Lee 2012). Adentrando no corpo do inseto, assim que o patógeno tem acesso à hemocele, ele precisa enfrentar a defesa humoral que produzem moléculas tóxicas, concomitantemente com os hemócitos (granulócitos, plasmatócitos, oenocitoides, etc), que fazem parte da defesa celular, e estes são capazes de fagocitar, encapsular o patógeno alvo, ou realizar a melanização, processo que acontece tanto na defesa celular quanto humoral (Royet 2004). As defesas celulares são de grande importância no processo de proteção do inseto porque são as grandes responsáveis por produzir respostas letais aos patógenos. Um outro ponto importante é que os patógenos intracelulares, como os vírus, precisam enfrentar tanto a xenofagia celular quanto as defesas de RNA interferente (Merkling & van Rij 2013).

Imunidade Celular

A partir de glândulas linfáticas presentes nos órgãos hematopoiéticos, presentes durante duas das fases de desenvolvimento dos insetos, a embriogênese e o estado larval, originam-se os pró-hemócitos, células primárias que se diferenciam podendo dar origem a outros tipos de células hemolíticas como os hemócitos (Cerenius *et al.* 2008).

Os hemócitos são responsáveis por fazerem uma das primeiras “linhas de frente” na identificação e controle de infecção microbiana nos insetos. Os hemócitos são responsáveis por envolver, degradar e eliminar substâncias ou corpos estranhos que estejam invadindo o organismo do inseto (Kim-Jo *et al.* 2019). Os principais tipos de hemócitos nos insetos são os granulócitos, plasmatócitos, oenocitoides e os esferulócitos, sendo os granulócitos os mais abundantes nos lepidópteros (Merkling & van Rij 2013).

A partir do processo de fagocitose os granulócitos se aderem à molécula desconhecida e a degradação se dá a partir da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), que são substâncias tóxicas para os patógenos, que adiante ativam a produção de oxidases do NADPH, que podem ativar as vias de defesa humoral nos insetos. (Lundgren & Jurat-Fuentes 2012).

Imunidade Humoral

A imunidade humoral é caracterizada, principalmente pela produção de peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides* ou simplesmente, AMPs). Estes peptídeos são produzidos no corpo gorduroso, e em menor proporção em outras células somáticas e por granulócitos e plasmócitos circulantes na hemolinfa (Hoffmann, 1995, Lavine & Strand 2002, Govind 2008, Strand 2008, Meng *et al.* 2021). A produção de AMPs é o estágio final da resposta humoral, podendo ser iniciada pela ativação de três principais vias ou rotas de sinalização extra e intracelular. Estas vias são denominadas Toll, IMD e Jak-STAT.

Os principais estudos de identificação da função destas vias foram realizados na espécie modelo *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), geralmente utilizando microrganismos não-patogênicos de insetos ou oportunistas, que podem ativar as vias de defesa, mas não apresentam virulência capaz de levar o inseto a morte (Williams 2007). Neste inseto, a via Toll é mobilizada em resposta a infecção causada por bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto a via IMD é mobilizada por bactérias Gram-negativas e infecções causadas por múltiplas classes de patógenos associados com as barreiras da membrana (Lemaitre & Hoffmann 2007).

Já a via Jak-STAT é ativada em resposta a vírus, junto com a via do RNAi, e, também, envolvida na resposta celular a insetos parasitoides (Dostert *et al.* 2005, Myllymäk & Rämet 2014, Tafesh-Edwards & Eleftherianos 2020). Uma das características em comum destas vias de

sinalização é a especificidade frente a divergência genética observada em grupos de patógenos que desencadeiam a mesma via de resposta (Hoffmann 2003).

O motivo disto foi posteriormente elucidado com a caracterização das principais proteínas reconhecedoras de padrões molecular (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*, ou PRRs), sendo os principais, as proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (do inglês, *Peptidoglycan Recognition Proteins*, ou PGRPs), as proteínas de ligação a bactérias Gram-negativas (do inglês *Gram-Negative Binding Proteins* ou GNBPs) e também Gram-positivas, e as proteínas de reconhecimento de β -glicanas (do inglês, *β -Glucan Recognition Proteins* ou β -GRPs) (Lemaitre & Hoffmann, 2007). As duas últimas são alvos deste trabalho e serão discutidas posteriormente.

A via Toll

A Via Toll é uma via evolutivamente conservada inicialmente caracterizada como fundamental no desenvolvimento embrionário de *Drosophila* (Belvin & Anderson 1996). Alguns componentes essenciais desta via são a citocina extracelular Spätzle, o receptor transmembrânico Toll (que dá nome a via), os adaptadores intracelulares MyD88 e Tube, a quinase Pelle, a proteína Cactus (o homólogo de *Drosophila* para I κ B) e os fatores de transcrição Dorsal e Dif (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Interessante notar que a maioria destes genes, em *Drosophila*, são regulados positivamente durante uma infecção por fungos ou bactérias Gram-positivas (naturalmente não patogênicos ou oportunistas) (Lemaitre *et al.* 1996, 1997), e a deleção de qualquer um desses genes com exceção de Cactus e Dorsal é caracterizada pela ausência de resposta imune, marcada pela expressão de AMPs, e um aumento de susceptibilidade a estes mesmos microrganismos (Lemaitre *et al.* 1996, Rutschmann *et al.* 2002). De fato, Cactus regula negativamente a via Toll, inibindo a ação de Dorsal e Dif (Nicolas *et al.* 1998), que por sua vez possuem funções redundantes, pelo menos em larvas de *Drosophila* (Manfrulli *et al.* 1999).

De forma breve, a via Toll é inicialmente ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que no caso de fungos pode ser a β -1,3 glicana, e no caso de bactérias Gram-positivas podem ser peptidoglicanos. Essas moléculas são reconhecidas por receptores de padrões moleculares ou PRRs (GNBPs ou β -GRPs, discutidas posteriormente) que estão presentes na hemolinfa ou no intestino de forma extracelular (Rosales & Vonnice 2017). Após o reconhecimento, o receptor Toll não é ativado por interações diretas com microrganismos propriamente ditos ou os seus receptores, mas pela interação com intermediada por uma citocina Spätzle, que é ativada a partir da clivagem feita por uma serino protease (Hoffmann 2003, Govind 2008). Durante a infecção por fungo, o gene *persephone* está envolvido na produção dessas serino proteases (Brennan & Anderson 2004). A cascata proteolítica é composta por pelo menos três proteases, que culmina na ativação de Spätzle. Desta forma Spätzle se liga a porção extracelular do receptor Toll ativando-o. Em seguida, a porção intracelular de Toll associa-se a MyD88, que por sua vez, associa-se a Tube, em seguida a Pelle através dos domínios DD (Dead box). Após este processo, Pelle fosforila a proteína Cactus (Daigneault *et al.* 2013), que é dissociada de Dorsal/DIF que, por sua vez, formam homodímeros translocando-se para o núcleo, onde ativam a expressão de AMPs (Lemaitre & Hoffmann 2007, Valanne *et al.* 2022).

De fato, é importante salientar que não necessariamente este mecanismo da via Toll de *Drosophila*, se repete em outras ordens de insetos, inclusive Lepidoptera. Na realidade, precisa-se de cautela na hora de inferir função por homologia pois alguns genes do sistema imune podem exercer funções diferentes em espécies diferentes (Lima *et al.* 2021). Entretanto, a função das proteínas Toll e Spätzle já foram confirmadas em *Manduca sexta* (Zhong *et al.* 2012), e provavelmente a sinalização da via Toll deva funcionar de maneira similar em *Diatraea saccharalis*.

Finalmente, mais recentemente, a via Toll também foi implicada na resposta induzidas por padrões moleculares associados a danos ou perigo de danos (DAMPs), respostas a infecções virais em determinadas condições, e resposta celular a ação de parasitoides que depositam ovos na hemolinfa de *Drosophila* (Vallane *et al.* 2022).

As PRRs reconhecedoras de bactérias e fungos, β GRPs e GNBPs

Na imunidade inata, a primeira linha de defesa dos insetos, depende inicialmente de proteínas que reconhecem padrões os padrões moleculares dos microrganismos. Estas proteínas que reconhecem estes padrões são chamadas de receptoras de reconhecimento de padrões moleculares ou PRRs (Lemaitre & Hoffmann 2007). Os principais padrões são os lipopolissacrídeos (LPS) e peptidoglicanos (PGs) em bactérias, e β -1,3 glicana em fungos (Park & Lee 2012). As PRRs se ligam a célula invasora e iniciam, de forma rápida, tanto a resposta humoral (produção de AMPs), como a resposta celular, por exemplo, melanização através da ativação da via da profenoloxidase (Lemaitre & Hoffmann 2007, Eleftherianos *et al.* 2021). Em relação as PRRs que reconhecem bactérias Gram-positivas e fungos, podemos destacar, inicialmente, as GNBPs. Este nome foi dado originalmente devido a propriedade da proteína se ligar a bactérias Gram-negativas no lepidóptero *Bombyx mori* (Lee *et al.* 1996). Entretanto, esta nomenclatura se consolidou em *Drosophila*, apesar de que a GGBP1 ativar via toll em resposta a bactérias Gram-positivas (Gobert *et al.* 2003) e a GGBP3 ativar a mesma via em resposta a fungos (Gottar *et al.* 2006). Já a denominação β GRP (proteína de reconhecimento de β -glicana) foi dada a partir do trabalho de Ma & Kanost (2000) onde estes identificaram uma proteína no lepidóptero *Manduca sexta* que era capaz de se ligar a bactérias (G+ e G-) e a fungos, especialmente, a β -1, 3 glicana. Outras β GRPs foram identificadas em *M. sexta* também com a capacidade de se ligar a bactérias e fungos em maior ou menor grau, o

que difere das GNBPs de *Drosophila*, que são específicas para cada microrganismo (Jiang *et al.* 2004, Wang *et al.* 2011).

As GNBPs e β GRPs são caracterizadas por possuírem um domínio N-terminal de ligação a carboidrato denominado CBM (do inglês Carbohydrate Binding Module) e um domínio GH16 de β -1,3 glucanase, porém sem atividade de catálise (Lemaitre & Hoffman 2007). Até agora, o modelo que melhor explica o modo de ação de das PRRs é o descrito para β GRP2 de *M.sexta* para reconhecimento de fungos. Inicialmente, as infecções na hemolinfa são detectadas pela ligação das β GRP2 às β -1,3 glucanas da parede celular do fungo, o que induz a associação proteína-proteína de β GRP2 através do domínio CBM (N-terminal) (Dai *et al.* 2013, Takahashi *et al.* 2014). Esta interação entre β GRPs e β -1,3 glucanas fornece uma plataforma para o recrutamento e ativação localizada de proHP14, uma protease serínica que dá início a ativação da cascata proteolítica que culmina na ativação da via de PPO (Takahashi *et al.* 2014). MSP e ModSP, ortólogos de proHP14, também funcionam em uma cascata proteolítica para ativar a via Toll em *Tenebrio molitor* (Park *et al.* 2007) e *Drosophila melanogaster* (Buchon *et al.* 2009).

Finalmente, apesar de todas as β GRPs/ GNBPs identificadas até momento não possuírem atividade enzimática no domínio GH16, elas estão relacionadas evolutivamente com as β -1,3 glucanases encontradas em diversos insetos, também conhecidas como laminarinases (Hughes, 2012). De fato, as β GRPs/ GNBPs não são consideradas propriamente pertencentes a família GH16 por não possuírem atividade enzimática, e estão classificadas como proteínas que possuem módulo de associação a carboidratos (Viborg *et al.* 2019).

β -1,3 Glucanases pertencentes a família GH16

As β -1,3-Glucanases são um grupo de enzimas hidrolíticas, intrinsecamente associadas a plantas, fungos, vírus, e invertebrados, podendo estar presentes como endo ou exo- β -1,3-Glucanase,

e exercem funções fisiológicas essenciais na regulação de reações importantes, desde a germinação ou dormência de sementes até a quebra da parede celular de um hospedeiro atacado por um vírus (Fibriansah *et al.* 2007). Estas enzimas pertencem a uma das mais amplas famílias de enzimas, as Glicosil Hidrolases (GH), que são consideradas a chave do metabolismo de carboidratos, e é um grupo de enzimas presente em vários organismos desde arqueobactérias a eucariontes, contemplando praticamente todos os reinos. As β -1,3-Glucanases atuam quebrando ligações do tipo β -1,3 em β -glicanas.

Grupo de glicoproteínas importante, as β -1,3-Glicanas, por sua vez, são polissacarídeos de cadeia simples e não ramificada presentes em vários organismos, tanto eucariotos, como plantas inferiores e superiores, mais especificamente nas *Poaceae*, em fungos, protozoários, cromistas, algas e alguns líquens, e em procariotos, como por exemplo, algumas bactérias Gram-negativas. Desempenham um importante papel estrutural em micro e macrorganismos, geralmente estão associadas a outros carboidratos ou proteínas na formação da matriz não-celulósica, constituindo a parede celular de plantas e microrganismos eucariontes, mas podendo também estar associada à membrana plasmática ou a proteínas presentes na parede celular de alguns procariontes (Chen *et al.* 1993, Fibriansah *et al.* 2007, Burton & Fincher, 2009).

As β -1,3-Glucanases pertencem a família GH16 e possuem como característica uma estrutura do tipo β , o que faz com que tenha afinidade de reação com moléculas que possuam mesmo tipo de conformação, e essas estruturas estão presentes em polissacarídeos de origem marinha ou terrestre, estão compreendidas taxonomicamente em uma família grande e diversa de glicosidases e transglicosidases. Agindo diretamente na degradação e remodelagem dos polissacarídeos da parede celular de organismos marinhos e terrestres, as GH16 possuem uma grande diversidade e

ampla distribuição em vários domínios como bactéria, oomicetos, fungos, plantas e animais, sejam eles terrestres, como os insetos, e/ou invertebrados marinhos (Viborg *et al.* 2019).

Muitas β -1,3-Glucanases já foram validadas em insetos, especialmente, no coleóptero *T. molitor* (Genta *et al.* 2009), nos lepidópteros *Helicoverpa armigera* (Pauchet *et al.* 2009) e *Spodoptera frugiperda* (Bragatto *et al.* 2010) além de dípteros como *Aedes aegypti* (Souza *et al.* 2019). Em todos os casos, as enzimas foram mais expressas no intestino, indicando uma provável função na digestão. Porém, alguns indícios apontam para uma possível função na imunidade, uma vez que esta enzima respondeu a ingestão de bactérias (Pauchet *et al.* 2009). A função exata destas enzimas em insetos ainda permanece a ser elucidada.

Relevância do Estudo

A cana de açúcar *Saccharum officinarum* Linneu (1753) é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, que é o maior produtor da indústria sucroalcooleira mundial, com uma estimativa de produção da safra 2022/2023 de aproximadamente 600 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 8 milhões ha (Conab 2022).

Frente a esse cenário, torna-se necessário buscar tecnologias e técnicas de manejo que contribuam para a diminuição das perdas nos campos, causadas principalmente por doenças, que geralmente surgem após o ataque de pragas como a broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Crambidae) (Wenzel *et al.* 2022), a qual, é praga-chave da cultura no Brasil (Pereira *et al.* 2020). A broca-da-cana-de-açúcar é responsável por causar perdas drásticas tanto na produção de etanol quanto de açúcar, como em outros cultivos (Daquila *et al.* 2019, Francischini *et al.* 2019). O principal problema na presença dessa praga no campo se dá justamente pelas perdas ocasionadas, tanto pela raspagem das folhas da planta nos primeiros instares da broca, como pela

abertura de galerias no colmo que causam o "coração-morto" (Valencia Arbelaéz *et al.* 2021). Além disso, interrompem o fluxo de água e sais minerais das raízes para as folhas, que concomitantemente interrompe o fluxo inverso no redirecionamento da seiva elaborada para o colmo e raízes, propiciando a entrada de fitopatógenos como o *Fusarium moniliforme* e o *Colletotrichum falcatum*, responsáveis por doenças como a podridão vermelha do colmo. A podridão acaba diminuindo a qualidade do caldo, uma vez que a inversão da sacarose ocasiona uma perda na pureza da calda e contaminação no processo de fermentação alcoólica resultando em prejuízos (Tomaz *et al.* 2018, Oliveira Barbosa *et al.* 2020).

No Brasil, o controle desta praga pode ser realizado via aplicação de inseticidas químicos, porém não é o tipo de controle mais eficiente devido ao adensamento das plantas e o hábito endofítico da praga. Além disso, os inseticidas químicos podem provocar danos ao meio ambiente, diminuindo populações de insetos não-alvo e/ou benéficos, tendo em vista que grande parte dos inseticidas não é seletivo, fazendo com que seja crucial a busca por alternativas que possam ser tanto eficazes no controle como menos danosas ao meio ambiente (Daquila *et al.* 2019). Outra estratégia de controle é utilização do controle biológico, que na maioria dos casos é feito utilizando o parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), que é um inimigo natural desta broca (Parra 2014, Sanches *et al.* 2017). Uma outra alternativa importante é a utilização de fungos entomopatogênicos, onde destaca-se a espécie *Beauveria bassiana* (Legaspi *et al.* 2000, Wenzel *et al.* 2022), e a *Metarhizium anisopliae* (Zappelini *et al.* 2010), ou a utilização de bactérias entomopatogênicas como o *Bacillus thuringiensis* Bt (Silva *et al.* 2018), além de combinações entre diferentes agentes de controle biológico (Mahmoud *et al.* 2011)

O *Metarhizium anisopliae* é uma das espécies do gênero *Metarhizium* que se destaca por ser um agente de controle populacional de várias espécies de insetos, sendo assim classificado como

uma espécie generalista, utilizada principalmente no controle de pragas agrícolas e que tem sido foco de estudos diante de sua eficiência (Wang *et al.* 2012, Moon *et al.* 2017). Esta espécie se caracteriza por produzir uma série de enzimas como as quitinases que auxiliam na penetração da cutícula e os metabólitos secundários como as destruxinas (DTX) que são depsipeptídeos cíclicos que auxiliam na inibição das defesas do inseto facilitando a infecção do fungo (Pal *et al.* 2007, Schrank & Vainstein, 2010).

Um outro importante agente microbiano usado amplamente no controle de pragas é o *Bacillus thuringiensis*, que como é uma alternativa viável ao controle químico e já há a utilização dos genes responsáveis pela expressão de toxinas Cry em plantas transgênicas (Tabashnik *et al.* 2023), empregadas no controle de *D. saccharalis*. O Bt caracteriza-se por agir no intestino de insetos principalmente de larvas de lepidópteros, e sua toxicidade é resultado da ação sinérgica de cristais e esporos, porém os cristais são suficientes para provocar mortalidade (Pardo-Lopez *et al.* 2013, Daquila *et al.* 2019).

Todos estes patógenos precisam lidar com as defesas imunológicas dos insetos e de alguma forma superá-las para poder se desenvolver e multiplicar dentro do hospedeiro. Neste processo proteínas relacionadas a família GH16 estão diretamente envolvidas pois são peças fundamentais no reconhecimento de bactérias Gram-positivas e fungos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo identificar os integrantes da família GH16, ou seja que possuam o domínio GH16, de *D. saccharalis* e caracterizá-los *in silico*, e em resposta a agentes microbianos de controle. Ainda, é importante salientar que o trabalho focará no processo inicial de infecção dos agentes (até 48 horas), principalmente, na forma natural de infecção.

Literatura Citada

- Belvin, M. P., & Anderson, K. V. 1996.** A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12(1): 393-416.
- Bragatto, I., Genta, F. A., Ribeiro, A. F., Terra, W. R., & Ferreira, C. 2010.** Characterization of a β -1, 3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to β -glucan-binding proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40(12): 861-872.
- Brennan, C. A., & Anderson, K. V. 2004.** *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 457-483.
- Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H. M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B. L., & Lemaitre, B. 2009.** A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *PNAS.* 106(30): 12442-12447.
- Burton, R. A., & Fincher, G. B. 2009.** (1, 3, 1, 4)- β -d-Glucans in cell walls of the Poaceae, lower plants, and fungi: a tale of two linkages. *Mol Plant.*, 2(5): 873-882.
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. 2008.** The proPOsystem: Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29: 263–271
- Chen, S. S., Lee, C. N., Lee, W. R., McIntosh, K., & Lee, T. H. 1993.** Mutational analysis of the leucine zipper-like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 67(6): 3615-3619.
- Conab- Companhia Nacional de Abastecimento. 2022.** Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso: 28 dezembro 2022
- Dai, H., Hiromasa, Y., Takahashi, D., VanderVelde, D., Fabrick, J. A., Kanost, M. R., & Krishnamoorthi, R. (2013).** An initial event in the insect innate immune response: Structural and biological studies of interactions between β -1, 3-glucan and the N-terminal domain of β -1, 3-glucan recognition protein. *Biochemistry.* 52(1); 161-170.
- Daigneault, J., Klemetsaune, L., & Wasserman, S. A. 2013.** The IRAK homolog Pelle is the functional counterpart of I κ B kinase in the *Drosophila* Toll pathway. *PLoS One.* 8(9): e75150.
- Daquila, B. V., Scudeler, E. L., Dossi, F. C. A., Moreira, D. R., Pamphile, J. A., & Conte, H. 2019.** Action of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in the midgut of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)(Lepidoptera: Crambidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184: 109642.
- de Oliveira Barbosa, V., de Brito, C. H., de Oliveira, R., de Lima, R. M., da Silva, J. F., Alves, J. C. G., ... & de Luna Batista, J. 2020.** Biological aspects and populational preference of *Cotesia flavipes* between *Diatraea saccharalis* and *Diatraea flavipennella*. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.*, 1-8p.

- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., ... & Imler, J. L. 2005.** The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* 6(9): 946-953.
- Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. 2021.** Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *J. Immunol.* 164(3): 401-432. <https://doi.org/10.1111/imm.13390>.
- Fibriansah, G., Masuda, S., Koizumi, N., Nakamura, S., & Kumasaka, T. (2007).** The 1.3 Å crystal structure of a novel endo- β -1, 3-glucanase of glycoside hydrolase family 16 from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Protein J.* 69(3). 683.
- Francischini, F. J., Cordeiro, E. M., de Campos, J. B., Alves-Pereira, A., Viana, J. P. G., Wu, X., ... & Zucchi, M. I. 2019.** *Diatraea saccharalis* history of colonization in the Americas. The case for human-mediated dispersal. *PloS one*. p. e0220031.
- Genta, F. A., Bragatto, I., Terra, W. R., & Ferreira, C. 2009.** Purification, characterization and sequencing of the major β -1, 3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39(12): 861-874.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., ... & Ferrandon, D. 2003.** Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*. 302(5653): 2126-2130.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A. A., Reichhart, J. M., Wang, C., Butt, T. M., ... & Ferrandon, D. 2006.** Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. 127(7): 1425-1437.
- Govind, S. 2008.** Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Ins. Sci* 15: 29-43. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x>.
- Hoffmann, J. A. 1995.** Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.*, 7(1): 4-10.
- Hoffmann, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38.
- Hughes, Austin L. 2012.** Evolution of the β GRP/GNBP/ β -1, 3-glucanase family of insects. *Immunogenetics*. 64: 549-558.
- Jiang, T., Li, T., Li, J., Fu, H. Z., Pei, Y. H., & Lin, W. H. 2004.** Cerebroside analogues from marine-derived fungus *Aspergillus flavipes*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 6(4): 249-257.
- Kim-Jo, C., Gatti, J. L., & Poirié, M. 2019.** *Drosophila* cellular immunity against parasitoid wasps: A complex and time-dependent process. *Front. Physiol.* 10: 603. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00603>.

- Lavine, M.O & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Elsevier sci. 32: 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9).
- Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., & Brey, P. T. 1996.** Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. PNAS. 93(15): 7888-7893.
- Legaspi, J. C., Poprawski, T. J., & Legaspi Jr, B. C. 2000.** Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. J. Econ. Entomol., 93(1): 54-59.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. J. Microbiol. 25:697-743. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. 1996.** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell J. 86(6): 973-983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. 1997.** *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. PNAS. 94(26): 14614-14619.
- Lima, L. F., Torres, A. Q., Jardim, R., Mesquita, R. D., & Schama, R. 2021.** Evolution of Toll, Spätzle and MyD88 in insects: the problem of the Diptera bias. BMC Genom. 22: 1-21.
- Lu, H. L., & Leger, R. S. 2016.** Insect immunity to entomopathogenic fungi. Adv. Genet. 94: 251-285.
- Lundgren, J. G., & Jurat-Fuentes, J. L. 2012.** The physiology and ecology of host defense against microbial invaders. J. insect pathol. 460-80.
- Ma, C., & Kanost, M. R. 2000.** A β 1, 3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. J. Biol. Chem. 275(11): 7505-7514.
- Mahmoud, A. M. A., De Luna-Santillana, E. J., & Rodriguez-Perez, M. A. (2011).** Parasitism by the endoparasitoid, *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances susceptibility of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. J. Insect Sci. 11(1): 119.
- Manfrulli, P., Reichhart, J. M., Steward, R., Hoffmann, J. A., & Lemaitre, B. 1999.** A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. EMBO J., 18(12): 3380-3391.
- Meng, Q., Wu, P. P., Li, M. M., Shu, R. H., Zhou, G. L., Zhang, J. H., ... & Zou, Z. 2021.** Distinct responses of *Thitarodes xiaojinensis* β -1, 3-glucan recognition protein-1 and

- immulectin-8 to *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* infection. *J. Immunol.*, 207(1): 200-209.
- Merkling, S.K. & van Rij, R.P. 2013.** Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J. Insect Physiol.* 59: 159–170.
- Moon K, Aw S, Hue S.M. 2017.** Mode of Infection of *Metarhizium* spp . Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämet, M. 2014.** The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J. Immunol.* 192(8): 3455-3462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>.
- Negreiro, M. D.; Andrade, F. D.; Falleiros, A. M. F. 2004** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Cie. Agra.* 25:293-308.
- Nicola, S. M., & Malenka, R. C. 1998.** Modulation of synaptic transmission by dopamine and norepinephrine in ventral but not dorsal striatum. *J. Neurophysiol.* 79(4): 1768-1776.
- Pal, S., Leger, R. J. S., & Wu, L. P. 2007.** Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 282(12): 8969-8977.
- Pardo-López, L., A, Bravo & M, Soberón. 2013.** *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 3–22.
- Park, J.W., Lee, B.L. 2012.** 14 - Insect Immunology, Editor(s): Lawrence I. Gilbert, *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Academic Press, 2012, Pages 480-512, ISBN 9780123847478.
- Parra, J.R.P. 2014.** Biological control in Brazil: an overview. *Sci. Agric*, 420–429p.
- Pauchet, Y., Freitak, D., Heidel-Fischer, H. M., Heckel, D. G., & Vogel, H. 2009.** Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. *J. Biol. Chem.* 284(4): 2214-2224.
- Pereira, Igor Alves Ferreira, M., Oliveira, B. K. S., de Menezes, F. G., Peixoto, J. V. M., Mageste, J. G., ... & de Moraes, E. R. 2020.** *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar de segundo corte fertilizada com organomineral de lodo de esgoto e bioestimulante. *Braz. J. Dev.* 6(1): 2265-2271p.
- Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F.; Fitzgerald, S. W.; Rhodes, C. P. 1985** Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* Academic Press.
- Rosales, C., & Vonnice, S. 2017.** Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Adv In Insect Phys.*, 179-212. <http://dx.doi.org/10.5772/6107>.

- Royet, J., Gupta, D., & Dziarski, R. 2011.** Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(12): 837-851.
- Rutschmann, O. T., McCrory, D. C., Matchar, D. B., & Immunization Panel of the Multiple Sclerosis Council for Clinical Practice Guidelines. (2002).** Immunization and MS: a summary of published evidence and recommendations. *J. Neurol.* 59(12), 1837-1843.
- Sanches, P. A. Santos, F., Peñafior, M. F. G. V., & Bento, J. M. S. 2017.** Direct and indirect resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* induced by jasmonic acid. *Bull. Entomol. Res.* 107(6):828p.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. 2010.** *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon.* 56(7): 1267-1274.
- Silva, L. M., Silva, M. C., Silva, S. M. F. A., Alves, R. C., Siqueira, H. A. A., & Marques, E. J. 2018.** Toxin Gene Contents and Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Against Two Sugarcane Borer Species, *Diatraea saccharalis* (F.) and *D. flavipennella* (Box). *Neotrop. Entomol.*, 47: 292-301.
- Souza, R. S., Gama, M. D. V. F., Schama, R., Lima, J. B. P., Diaz-Albiter, H. M., & Genta, F. A. 2019.** Biochemical and functional characterization of glycoside hydrolase family 16 genes in *Aedes aegypti* larvae: Identification of the major digestive β -1, 3-glucanase. *Front. Physiol.* 10: 122.
- Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Ins. Sci.* 15(1): 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>.
- Tabashnik, B. E., Fabrick, J. A., & Carrière, Y. 2022.** Global patterns of insect resistance to transgenic Bt crops: the first 25 years. *J. Econ. Entomol.*
- Tafesh-Edwards, G., & Eleftherianos, I. 2020.** *Drosophila* immunity against natural and nonnatural viral pathogens. *Virol.* 540: 165-171.
- Takahashi, D., Dai, H., Hiromasa, Y., Krishnamoorthi, R., & Kanost, M. R. 2014.** Self-association of an insect β -1, 3-glucan recognition protein upon binding laminarin stimulates prophenoloxidase activation as an innate immune response. *J. Biol. Chem.* 289(41): 28399-28410.
- Tomaz, A. C., Coutinho, A. E., Soares, B. O., Peternelli, L. A., Pereira, E. J. G., & Barbosa, M. H. P. 2018.** Assessing resistance of sugarcane varieties to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fab.(Lepidoptera: Crambidae). *Bull. Entomol. Res.* 108(4): 547-555.
- Valanne, S., Vesala, L., Maasdorp, M. K., Salminen, T. S., & Rämetsä, M. 2022.** The *Drosophila* Toll Pathway in Innate Immunity: from the Core Pathway toward Effector Functions. *J. Immunol. Res.* 209(10): 1817-1825. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200476>.

- Valencia Arbeláez, J. A., Soto Giraldo, A., Villa, G. J. C., Espinosa, L. F. V., Salazar Gutierrez, M. R., & Vargas, G. 2021.** Population dynamics of sugarcane borers, *Diatraea* spp., under different climatic scenarios in Colombia. PloS one, p. e0244694.
- Viborg, A. H., Terrapon, N., Lombard, V., Michel, G., Czjzek, M., Henrissat, B., & Brumer, H. (2019).** A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). J. Biol. Chem. 294(44): 15973-15986.
- Vilmos, P., & Kurucz, E. 1998.** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunol. Lett. 62(2): 59-66.
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., & Wang, C. 2012.** Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. PNAS, 109(4), 1287-1292.
- Wang, Y., Sumathipala, N., Rayaprolu, S., & Jiang, H. 2011.** Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1, 3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. Insect Biochem. Mol. Biol. 41(5): 322-331.
- Wenzel, I. M., Giometti, F. H. C., & Almeida, J. E. M. 2022.** Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. Arq. Ins. Bio. 73: 259-261.
- Williams, M. J. 2007.** Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. J. Immunol. Res. 178(8): 4711-4716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711>.
- Wu, P. P., Shu, R. H., Gao, X. X., Li, M. M., Zhang, J. H., Zhang, H., ... & Meng, Q. 2022.** Immulectin-2 from the ghost moth, *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae), modulates cellular and humoral responses against fungal infection. Dev. Comp. Immunol. 133: 104429.
- Zappelini, L. O., Almeida, J. E. M., Batista F., A., & Giometti, F. H. C. 2010** Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (fabr., 1794). Arq. Ins. Bio..77: 75-82.
- Zhong, X., Xu, X. X., Yi, H. Y., Lin, C., & Yu, X. Q. 2012.** A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol, 42(7), 514-524.