

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE,
MODIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO INTESTINO MÉDIO DAS
TRÊS PRINCIPAIS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

por

GLENDIA CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino - UFRPE)

RESUMO

A membrana peritrófica (MP) é uma estrutura presente no intestino da maioria dos insetos, e tem a função de proteção do epitélio intestinal e compartimentalização da digestão. A MP é composta principalmente de quitina e proteínas associadas. Isto faz com que as enzimas envolvidas no metabolismo de quitina no intestino seja, fundamentais para a fisiologia e proteção dos insetos. Neste estudo fez-se a identificação e caracterização das principais enzimas envolvidas no metabolismo de quitina, como quitina sintase (CHS), quitina desacetilases (CDA) e quitinases (CHT), com foco naquelas que atuam no intestino. Os alvos do estudo foram as espécies-praga da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus*. Após a identificação averiguou-se em *D. saccharalis* a resposta de expressão destes genes sob o tratamento com concentrações subletais dos inseticidas lufenuron, um inibidor da síntese de quitina, e *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria que produz toxinas que vão atuar sob o epitélio intestinal do inseto. Os genes foram identificados a partir de transcritomas intestinais das três espécies estudadas. Após dedução das proteínas, confirmou-se os domínios funcionais que caracterizam as enzimas estudadas. Estes domínios foram identificados utilizando o algoritmo “CDD” do NCBI. Os peptídeos sinal e os domínios transmembrana foram identificados utilizando o Phobius. Foram identificadas em média um gene de CHS2, 7 de CDAs e 8 de CHTs nas três espécies estudadas, mantendo-se conservados os genes identificados. Para análise da expressão gênica por RT-qPCR utilizou-se como espécie modelo *D. saccharalis* para tratamentos com os inseticidas. No tratamento com Bt verificou-se um aumento da expressão de um gene de CDA e diminuição da expressão de

dois genes de quitinase. Já o tratamento com lufenuron, verificou-se o aumento relativo da expressão de uma CDA e uma quitinase, e diminuição da expressão de duas quitinases. A questão que fica é se esses genes têm sua expressão relativa aumentada ou diminuída pela ação direta dos inseticidas, ou se essa variação é uma resposta fisiológica secundária do inseto para remodelagem de reparo da MP. A melhor compreensão das respostas moleculares do metabolismo de quitina da membrana peritrófica podem auxiliar no aperfeiçoamento de táticas de manejo de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: Membrana peritrófica, quitina sintase, quitina desacetilase, quitinase, expressão gênica, efeitos subletais.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN SYNTHESIS,
MODIFICATION AND DEGRADATION OF CHITIN IN THE MIDGUT OF THE THREE
SUGARCANE BORERS

by

GLEND CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO

Under the Direction of Prof. José Dijair Antonino - UFRPE

ABSTRACT

The peritrophic membrane (PM) is a chitin structure present in the midgut of most insects. The PM has the function of protecting the intestinal epithelium and digestion compartmentalization. MP is mainly composed of chitin and associated proteins, and this makes the enzymes involved in the metabolism of chitin in the midgut pivotal for the physiology and protection of insects. In this study, we identified and characterized the main enzymes involved in chitin metabolism, such as chitin synthase (CHS), chitin deacetylases (CDA) and chitinases (CHT), focusing on those that act in the midgut. The study targets were the sugarcane pest species, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* and *Telchin licus*. After genes identification, the expression response of these genes was investigated in *D. saccharalis* under treatment with sublethal concentrations of the insecticides lufenuron, an inhibitor of chitin synthesis, and *Bacillus thuringiensis* (Bt), a bacterium that produces toxins that will act in the insect's midgut epithelium. The genes were identified from midgut transcriptomes of the three species studied. After protein sequences prediction, the functional domains that characterize the studied enzymes were confirmed. The domains were identified using the NCBI's "CDD" algorithm. Signal peptides and transmembrane domains were identified using Phobius. On average, one CHS gene, 7 CDAs and 8 CHTs were identified in the three species studied. The identified genes were conserved across species. For the analysis of gene expression by RT-qPCR, *D. saccharalis* was used as a model species for treatments with insecticides. In the treatment with Bt, there was an increase in the expression of a CDA gene and a decrease in the expression of two chitinase genes. On the other hand, treatment with lufenuron showed a relative increase in the expression of a CDA and a chitinase, and a decrease in the expression of two other chitinases. Whether these genes have their relative expression increased or decreased by the direct

action of insecticides, or whether this variation is a secondary physiological response of the insect to remodeling during PM repair is still elusive. A better understanding of the molecular responses of genes involved in peritrophic membrane metabolism could help improve pest management tactics.

KEY WORDS: Peritrophic membrane, chitin synthase, chitin deacetylase, chitinase, gene expression, sublethal effects

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE,
MODIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO INTESTINO MÉDIO DAS
TRÊS PRINCIPAIS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

por

GLEND CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO

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

RECIFE - PE

Agosto – 2022

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE,
MODIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO INTESTINO MÉDIO DAS
TRÊS PRINCIPAIS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

por

GLEND CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO

Comitê de Orientação:

José Dijair Antonino– UFRPE

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE,
MODIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO INTESTINO MÉDIO DAS
TRÊS PRINCIPAIS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

por

GLEND CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO

Banca Examinadora:

Marcelo Henrique Santos Paiva - UFPE

Leonardo Lima Pepino de Macedo – Embrapa

Glenda Caroline Conceição Damasceno
Mestre em Entomologia

Prof. José Dijair Antonino – UFRPE

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)

- D155i Damasceno, Glenda Caroline Conceição
 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE, MODIFICAÇÃO E
 DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO INTESTINO MÉDIO DAS TRÊS PRINCIPAIS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR /
 Glenda Caroline Conceição Damasceno. - 2022.
 68 f.
- Orientador: Jose Dijair Antonino.
 Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
 Agrícola, Recife, 2022.
1. Membrana peritrófica. 2. Quitina sintase. 3. Quitina desacetilase. 4. Quitinase. 5. Expressão gênica. I. Antonino,
 Jose Dijair, orient. II. Título

CDD 632.7

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, ao Programa de Pós-graduação em Entomologia – PPGE e a fundação de amparo a ciência e tecnologia do estado de Pernambuco- FACEPE, pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador pelos ensinamentos, incentivos, orientações, paciência e disponibilidade. Agradeço por todo acolhimento quando muito precisei.

Agradeço aos Professores Herbert Siqueira e Marcelo Paiva pela disponibilidade de uso dos laboratórios.

Aos membros do laboratório de toxicologia e controle biológico.

A banca examinadora que disponibilizou seu tempo para avaliar o meu trabalho.

A Manoely, Felipe e Daniel, por todo companheirismo no desenvolvimento desse trabalho.

A Gessica Santos e Leticia Brilhante por todo apoio e atenção.

Agradeço a família DePaula, Matias e Nunes por todo carinho, cuidado e amor.

Ao meu noivo Andson Nunes, por todo companheirismo, amor e paciência.

Ao médico Leandro Valetta e Marina Souza.

Agradeço aos meus pais, irmãos e família pelo amor dedicado a mim.

Ao bom Deus, pela fé, força e coragem durante a minha jornada.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	8
LISTA DE TABELAS	47
LISTA DAS FIGURAS	52
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	10
RELEVANCIA DO ESTUDO	14
LITERATURA CITADA.....	16
2 CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE LUFENURON E <i>Bacillus thuringiensis</i> AFETAM A EXPRESSÃO DE QUITINA DESACETILASES E QUITINASES INTESTINAIS DE <i>Diatraea saccharalis</i>].....	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
AGRADECIMENTOS.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A quitina é considerada como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, e é encontrada em fungos, nematoides e artrópodes (Wagner, 1994). A quitina é um homopolímero linear de N-acetilglicosamina (GlcNAc) cujos monossacarídeos são unidos através de ligações glicosídicas do tipo β , 1-4 (Merzendorfer & Zimoch. 2003). Em insetos, a quitina é um componente essencial da cutícula e de estruturas internas, como traqueia e membrana peritrófica (Snelling *et al.* 2011, Zhong *et al.* 2013). Logo, o metabolismo da quitina na cutícula e na membrana peritrófica é regulado para lidar com processos fisiológicos e crescimento dos insetos, sendo classificados em processos de síntese, modificação e degradação, e que são realizados por enzimas específicas (Tetreau *et al.* 2015). Das principais enzimas envolvidas no metabolismo de quitina nos insetos, a quitina sintase é a enzima responsável pela síntese de quitina (CHS – do inglês *chitin synthase*), as quitinas desacetilases (CDA - do inglês *Chitin deacetylase*) alteram a quitina por desacetilação e as quitinases degradam a quitina por processo hidrolítico (Liu *et al.* 2019).

A membrana ou matriz peritrófica consiste principalmente de fibrilas de quitina associadas a glicoproteínas e proteoglicanos, e equivalem a cerca de 20-60% da massa total da membrana peritrófica (De Mets & Jeuniaux, 1962). A membrana peritrófica está localizada no intestino médio dos insetos, funcionando como uma barreira de proteção do epitélio intestinal contra danos mecânicos causados por alimentos abrasivos, e auxilia na eficácia da digestão (Hegedus *et al.* 2009, Liu *et al.* 2019). Isto é possível em razão da sua composição, pois as proteínas presentes na membrana peritrófica auxiliam na imobilização de enzimas digestivas, permitindo a digestão e

aquisição de nutrientes de forma eficiente (Terra. 2001). Outra função fisiológica atribuída a membrana peritrófica é a neutralização de toxinas e outros compostos tóxicos como inseticidas (Abedi & Brown 1991), metais pesados (Devenport *et al.* 2006), aleloquímicos vegetais (Barbehenn 2001), além da proteção física contra bactérias (Kuraishi *et al.* 2011) e vírus (Derksen & Granados 1988).

A formação da quitina por monômeros de UDP-N-Acetilglicosamina é sintetizada por CHS, enzimas da família das glicosiltransferases. Nas etapas do mecanismo da síntese da quitina a CHS é responsável por transferir o açúcar ativado UDP-GlcNAc para a extremidade não redutora da cadeia crescente de quitina (Merzendorfer, 2011). Em insetos existem dois genes de CHS (*CHS1* e *CHS2* ou *CHSA* e *CHSB*), sendo *CHS1* expresso no tegumento e traqueia, enquanto o gene *CHS2* é restrito ao epitélio intestinal, responsável pela síntese da quitina na formação da membrana peritrófica (Merzendorfer & Zimoch. 2003, Merzendorfer. 2006). Embora apenas dois genes de CHS sejam descritos para insetos, estudos mostram que diferentes isoformas resultam da *CHS1*, esse processo de *splicing* alternativo acontece durante o desenvolvimento do inseto (Arakane, *et al.* 2004). Segundo observações de Zimoch *et al* (2005), em insetos lepidópteros a quitina sintase do intestino médio é expressa no ápice microvilar, isso pode implicar diretamente na síntese da MP. Estudos com *Bombyx mori* (Lineu), *Leptotarsa decemlineata* (Say) e *Rhodnius prolixus* (Stal) comprovaram a importância da quitina nas funções da membrana peritrófica, isso foi confirmado após silenciar a expressão de *CHS2* utilizando a técnica de RNA interferente (Zhuo *et al.* 2014, Shi *et al.* 2016, Alvarenga *et al.* 2016).

A degradação da quitina é catalisada pelas enzimas quitinases que fazem parte da família glicosídeo ou glicosil hidrolases (GH). As quitinases estão classificadas em duas famílias, GH 18 e 19, sendo a família 18 representada em todos os reinos, como bactérias, plantas e animais, e GH 19 exclusivamente encontradas em plantas (Arakane & Mutukrishnan, 2010). As quitinases

desempenham sua função na eliminação da cutícula velha e na rotatividade da membrana peritrófica, dessa forma, as GH18 de insetos, que são endoquitinases, são responsáveis por hidrolisar ligações β -1,4 de N-acetilglucosamina (Arakane & Mutukrishnan, 2010, Zhu *et al* 2008). O silenciamento de quitinases pode afetar o crescimento e o peso de larvas de insetos, e, provavelmente, estes efeitos são devido ao enfraquecimento da membrana peritrófica (Liu *et al.* 2019, Khajuria *et al.* 2010).

As quitina desacetilases (CDA) são enzimas que modificam a quitina, convertendo N-acetilglucosamina em glucosamina, ou seja, removendo o grupo acetil, essa desacetilação torna a matriz de quitina mais resistente a hidrólise por endoquitinases. (Liu *et al.* 2019). As CDAs são classificadas em dois tipos: CDAs específicas do intestino médio e CDAs não intestinais, baseando-se na localização de enzimas em vários insetos (Campbell *et al.* 2008, Toprak *et al.* 2008, Zhong *et al.* 2014). As sequências de CDAs são divididas em vários grupos, sendo eles: I, II, III, IV e V (Yu *et al.* 2018, Han *et al* 2015, Xi *et al* 2014). O silenciamento de CDAs em alguns insetos resultou em fenótipos anormais e altas taxas de mortalidade. (Yu *et al.* 2016, Quan *et al.* 2013)

Dessa forma, devido a quitina ser essencial para o desenvolvimento, crescimento e aspectos fisiológicos dos insetos, a sua interferência ou inibição representa um alvo potencial para o controle de insetos. Moléculas que interferem no metabolismo da quitina, como as benzoil-fenil-ureias (BPU) foram desenvolvidas em 1970, como o diflubenzuron (Graf, 1993). Os inseticidas BPU inibem a síntese de quitina, ocasionando interferência na formação da cutícula quando o inseto faz a muda (Post *et al* 1974, Mian *et al* 1982, Schneider *et al.* 2008). De acordo com o IRAC (2022), estão registradas no Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os seguintes princípios ativos de BPU: bistrifluron, chlorfluazuron, diflubenzuron, flucycloxuron, flufenoxuron, hexaflumuron, lufenuron, novaluron, noviflumuron, teflubenzuron e triflumuron. Em relação a resistência a inseticidas inibidores de síntese de quitina, já foram relatados casos para diflubenzuron,

teflubenzuron, flufenoxuron, lufenuron, chlorfluazuron e entre outras BPU (Voudouris *et al.* 2011, Rodrigues *et al.* 2011, Anwar *et al.* 2005). As BPUs atuam como inibidores da síntese de quitina ao interferir na síntese ou deposição de quitina no exoesqueleto e em estruturas quitinosas dos insetos (Merzendorfer & Zimoch, 2003). O modo de ação exato dessas BPUs tem sido debatido, em afetar indiretamente a biossíntese da quitina, resultando em alterações no tráfego vesicular e na alteração do receptor transportador ABC na síntese de quitina (Meyer *et al.* 2013). Insetos e ácaros resistentes a BPUs foram identificados com mutações no gene de CHS, isso confirmou-se quando a deleção por CRISPR-Cas9 das regiões de mutação em insetos suscetíveis aumentou a razão de resistência de 100 a 15000 vezes dependendo do inseticida utilizado (Douris *et al.* 2016). Um estudo com *Tetranychus urticae* caracterizou uma população resistente a BPU como monogênica e recessiva, identificando também como mecanismo de resistência uma mutação no gene CHS 1 (Van Leeuwen *et al.* 2012). Outros insetos como populações de *S. frugiperda* apresenta resistência poligênica, incompletamente recessiva com herança autossômica (Nascimento, *et al.* 2020).

Outra forma de controle de insetos que também podem interferir na membrana peritrófica é a utilização de inseticidas à base da bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Lacey *et al.* 2015). As primeiras tentativas de usar Bt para o controle de insetos ocorreram em 1920 nos Estados Unidos e na Hungria, contra as pragas *Lymantria dispar* e *Ostrinia nubilalis*, respectivamente (Metalnikov & Chorine. 1929; Husz. 1930). O crescimento do uso de formulados de Bt foi devido a sua ação específica, o que resultou na redução do uso de inseticidas químicos, e, principalmente, por se mostrar eficaz contra insetos mastigadores especialmente aqueles que se alimentam no interior de plantas (Pardo-Lopez *et al.* 2013). As toxinas de Bt causam mortalidade devido a formação de poros na membrana das células epiteliais do intestino de insetos. As δ -endotoxinas também chamadas de proteínas Cry e proteínas Cyt são as principais responsáveis pela ação inseticida da bactéria (Bravo *et al.* 2005). As toxinas agem quando os cristais proteicos são ingeridos

pelo inseto, e são dissolvidos no intestino médio, assim as protoxinas liberadas são ativadas por proteases intestinais que se ligam a receptores do intestino médio permitindo a oligomerização da toxina e inserção nas células. Este processo desencadeia uma série de alterações celulares que culmina na morte celular, resultando na degradação do intestino médio, e consequente morte do inseto (Zavala *et al.* 2020, Pacheco *et al.* 2009). Os motivos que acarretam a resistência de insetos ao Bt estão associados a diversos mecanismos como a ativação alterada de toxinas Cry por proteases do intestino médio, sequestro da toxina por reações glicolípídicas, indução de uma resposta elevada do sistema imune e ligações reduzidas as membranas intestinais incluindo mutações nos receptores das toxinas (Li *et al.* 2004, Ma *et al.* 2011, Hernan *et al.* 2010, Gahah *et al.* 2010, Baxter *et al.* 2011). Plantas transgênicas expressando toxinas Cry de Bt são liberadas comercialmente no Brasil, e tem-se disponível cultivares de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar (CNTBio, 2022).

Relevância do estudo

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) apresentando uma produção em torno de 654,72 milhões de toneladas na safra 2020/2021 (Conab 2022). Desse total, 92% são produzidos na região Centro-Sul e 8% nas regiões Norte e Nordeste, sendo Pernambuco o segundo maior produtor do Nordeste (Conab 2022). Um dos principais problemas que tem reduzido a produtividade da cultura é a ocorrência de insetos-praga. Dentre estes, os principais que afetam os canaviais são: a broca comum da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.), a broca-amarela da cana, *Diatraea impersonatella* (Box), anteriormente conhecida como *D. flavipennella*, e a broca gigante, *Telchin licus licus* (Drury) (Mendonça 1996, Pinto *et al.* 2009). As lagartas destas espécies, se alimentam do colmo da cana, abrindo galerias, e muitas vezes se alimentando dos meristemas provocando o sintoma de coração morto (Pinto *et al.* 2009, Negrisoli

et al. 2015). Os orifícios feitos pelas lagartas também servem de porta de entrada para diversos microrganismos, especialmente os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, agentes da doença da podridão vermelha do colmo (Valente *et al.* 2014, Villas Boas & Alves. 1988). Estas infecções resultam na redução da sacarose, quantidade e pureza do caldo afetando o rendimento de produção e açúcar ou etanol (Villas Boas 1986, Negrisoni *et al.* 2015).

Vários métodos de controle são utilizados para minimizar as perdas ocasionadas pela ação dessas pragas como o controle químico, o controle biológico com o uso do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameronn), o controle por catação manual e variedades resistentes que previne a ação de um inseto-praga (Barbosa. 2012, Botelho & Macedo 2002, Negrisoni *et al.* 2015, Zúniga-oviedo *et al.* 2016). Uma classe de inseticidas potente amplamente utilizados para o controle de pragas são as benzoilureias, como o lufenuron que é liberado no Brasil para o controle da espécie da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* (Cohen, 1993; MAPA, 2022). Pouco se sabe a respeito dos efeitos das BPU's na expressão dos genes relacionados ao metabolismo de quitina. Porém, o tratamento de larvas de *T. castaneum* com diflubenzuron não afetou a regulação destes genes, no entanto levou a uma redução de 40% no conteúdo de quitina da membrana peritrófica do inseto (Merzendorfer *et al.* 2012). Em um outro estudo em *Drosophila melanogaster*, os autores concluíram que a ação do diflubenzuron e do lufenuron bloqueiam a síntese da quitina na traqueia desses insetos (Gangishetti, *et al.* 2009) porém sem evidências de alteração de expressão gênica.

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são uma alternativa aos inseticidas químicos para controlar importantes pragas agrícolas. Plantas transgênicas expressando toxinas Cry podem ser utilizadas no controle de diversos insetos, incluindo a broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*. Estas plantas podem ser altamente eficazes contra insetos endofíticos, e que são mais difíceis de controlar com os pesticidas químicos (Pardo-Lopez *et al.* 2012, Daquila *et al.* 2019). Além disso, cepas de Bt que produzem quitinases, aumentam a atividade inseticida das toxinas cry (Regev *et al.*

1996; Guttman e Ellar, 2000). Esse resultado é devido à degradação da membrana peritrófica, o que permite um maior acesso das toxinas aos receptores nas células do intestino médio (Regev *et al.*, 1996). Todavia, pouco se sabe sobre o efeito de *B. thuringiensis* e suas toxinas sobre o metabolismo de quitina nos insetos. Em *Helicoverpa armigera* a alimentação de lagartas com a cepa de Bt HW33-1 que expressa a toxina Cry1Ac, afetou os níveis de expressão de genes de CDAs. Os genes *HaCDA5a*, *HaCDA1* e *HaCDA2* foram significativamente menos expressos em larvas alimentadas com a cepa de Bt. (Han *et al.* 2015).

Diante do exposto, no próximo capítulo, objetivou-se catalogar os principais genes que participam do metabolismo de quitina dos três lepidópteros-praga da cana-de-açúcar, identificar quais são os genes expressos no intestino, e qual é o efeito de concentrações subletais de lufenuron e *B. thuringiensis* na expressão destes genes.

Literatura Citada

- Arakane, Y., R. Dixit., B. Khurshida & P. Yoonseong. 2009.** Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. Insect Biochem Mol Biol. 39: 355-365.
- Arakane, Y., D.G. Hogenkamp., Y.C. Zhu. K.J. Kramer & C.A. Specht. 2004.** Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development". Insect Biochem Mol Biol. 34: 291–304.
- Alvarenga, E.S., J.F. Mansur., S.A. Justi., J. Figueira-Mansur., V.M. Dos Santos & S.G. Lopez. 2016.** Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. Insect Biochem Mol Biol. 69: 61-70.
- Anwar, E.M & A. E.M, Abd El-Mageed. 2005.** Toxicity impacts of certain insect growth regulators on some biochemical activities of the cotton leafworm. Egypt. J. Agric. Res. 83: 915–935.
- Abedi, Z. H & A.W.A. Brown. 1961.** Peritrophic membrane as vehicle for DDT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. Ann. Entomol. 54:539–42
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Sobero. 2004.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49: 423–435.

- Baxter, S.W., F.R. Badenes-Perez., A. Morrison., H. Vogel., N. Crickmore., W. Kain., P. Wang., D.G. Heckel & C.D. Jiggins. 2011.** Parallel evolution of Bt toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics* 189: 675–679.
- Barbosa, M. H. P., M.D.V. Resende., L.A.S. Dias., G.V.S. Barbosa., R.A. Oliveira., L.A. Peternelli & E. Daros. 2012.** Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: the Brazilian experience in network research with. *Crop Breeding and Applied Biotech.* 12: 87-98.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. *Control. Biol. no Bras. Parasitoides e Predadores.* 409–426.
- Campbell, P.M., A.T. Cao., E.R. Hines., P.D. East, P.D & K.H. Gordon, K.H. 2008.** Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 950– 958.
- Cohen, E. 1993.** Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochem and Physiol.* 22:245-261.
- Conab- Companhia Nacional de Abastecimento. 2022.** Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso: 08 abril 2022.
- CTNBio- Comissão técnica nacional de biossegurança. 2022.** Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br>. Acesso: 29 julho de 2022.
- Daquila, B.V., E.L, Scudeler., F.C.A, Dossi., D.R, Moreira., J.A, Pamphile & H, Conte. 2019.** Action of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in the midgut of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). *Ecotoxicol. Environ.* 184: 109-642.
- Derksen, A.C & R.R. Granados. 1988.** Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology.* 167:242–50.
- De Mets, R & C. Jeuniaux. 1962.** On the organic substances constituting the peritrophic membrane of insects. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 70: 93–96.
- Douris, V. D., R. Steinbach, R. Panteleri, I. Livadaras, J. A. Pickett, T. Van Leeuwen, R. Nauen & J. Vontas. 2016.** Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *PNAS* 113: 14692-14697.
- Gahan, L. J., Y, Pauchet., H, Vogel & D.G, Heckel DG. 2010.** An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.* 6: 1001248.

- Gangishetti, U., S. Breitenbach., M. Zander., S.K. Saheb., U. Muller., H. Schwarz & B. Moussian. 2009.** Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *Eur. J. Cell Biol.* 88: 167- 180.
- Graf, J.F. 1993.** The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasit. Today.* 12: 471-474.
- Guttmann, D.M & J.D, Ellar. 2000.** Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *Microbiol. Letters.* 188: 7–13.
- Han, G., L. Xiumin., T. Zhang., X. Zhu & J. Li. 2015.** Cloning and Tissue-Specific Expression of a Chitin Deacetylase Gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Response to *Bacillus thuringiensis*, *J. of Insect Sci.* 15:95-102.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott & U. Toprak. 2009.** New Insights Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annu Rev entomol.* .54: 285-302.
- Hernan, P., G. Navarro-Cerrillo., S. Caccia., R.A, Maagd., W.J, Moar., J. Ferre., B, Escrache B & S, Herrero. 2010.** Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE* 17:12795.
- Husz, B. 1930.** Field experiments on the application of *Bacillus thuringiensis* against the corn borer, *Int. Corn Borer Invest. Sci. Repts.* 3: 91–98.
- Kuraishi, T., O. Binggeli, O. Opota, N. Buchon & B. Lemaitre. 2011.** Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PNAS USA.* 108: 15966-15971.
- Khajuria C., L.L. Buschman, M.S. Chen., S. Muthukrishnan & K.Y. Zhu. 2010.** A gutspecific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 621–629.
- Lacey, L. A., R. Frutos., H.K, Kaya & P, Vail .2015.** Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol* 132:1–41.
- Liu, X., A.M.W. Cooper., J. Zhang & K.Y. Zhu. 2019.** Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *J. Insect Physiol.* 114: 110-115.
- Li, H., B. Oppert., R.A, Higgins., F. Huang., K.Y, Zhu & L. L, Bushman LL. 2004.** Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol Biol.* 34: 753–762.

- Merzendorfer, H & I. Zimoch. 2003.** Chitin metabolism in insects structure, function and regulation of chitin synthases and chitinares. *J. Exp biol.* 206: 4393-4412.
- Merzendorfer, H. 2006.** Insect chitin synthases: a review. *J. Comp Physiol.* 176: 1-15.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Meyer, F., M. Flötenmeyer., B. Moussian. 2013.** The sulfonyleurea receptor Sur is dispensable for the synthesis of chitin in embryos of *Drosophila melanogaster*. *Pest Manag Sci.* 69: 1136–1140.
- Miller, G.W & M.B, Isgar. 2010.** Effects on the development. *Bulletin of Entomol. Reseach*, 75: 21-328.
- Mian, L & M, Mulla. 1982.** Biological and environmental dynamics of insect growth regulator (IGR) as used against Diptera of public health importance. *Residue.* 84: 27–112.
- Ma, G., M.M, Rahman., W, Grant., O, Schmidt & S, Asgari. 2012.** Insect tolerance to the crystal toxins Cry1ac and Cry2Ab is mediated by binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. *Dev Comp Immunol.* 37: 184–192.
- Negrisoli, J., J.I. Baldani, M.F. Grossi-de-Sá, M.C.M Silva, L.L.P. Macedo, F.C.A. Fonseca, C.R.C.B. Negrisoli & E.C. Guzzo. 2015.** Manejo da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus*) (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) no nordeste do Brasil. Aracaju, Embrapa Tabuleiros, 52p. (Documentos 198).
- 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.* 37: 3–22.
- Post, L.C & W.R, Vincent. 1974.** A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften* 60: 431–432.
- Pinto, A.S., P.S.M. Botelho & H.N. oliveira. 2009.** Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de açúcar. Piracicaba, p.160.
- Quan, G., L, Tim., J, Duan., F, Wen., D, Doucet & J. K, Peter. 2013.** Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 683- 691.
- Rodriguez, L.M., J.A, Ottea & T.E, Reagan. 2001.** Selection, egg viability, and fecundity of the sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) with tebufenozide. *J. Econ. Entomol.* 94, 1553–1557.

- Schneider, M., G. Smagghe., S. Pineda & E. Vin. 2008.** Studies on ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae). Pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology*. 17: 181–188.
- Snelling, E. P., R.S. Seymour & S. Runciman. 2011.** Moulting of insect tracheae captured by light and electron-microscopy in the metathoracic femur of a third instar locust *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol*. 57:1312–1316.
- Shi, J.F., L.L. Mu, X. Chen, W.C. Guo & G.Q. Li. 2016.** RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Biol Sci*. 12: 1319-1331.
- Tetreau, G., C. Xiao., Y. R. Chen & P. Wang. 2015.** Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 62: 114-126.
- Terra, W.R. 2001.** The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 47:47–61.
- Toprak, U., D. Baldwin, M. Erlandson, C. Gillott, X. Hou, C. Coutu & D.D. Hegedus. 2008.** A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Mol Biol*. 17: 573-585.
- Valente, E. C. N., E.J. Marques, J.V. Oliveira, E.M. Passos, C.C.M. Silva & J. Guimarães 2014.** Efeito de fungos entomopatogênicos sobre formas imaturas de *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae). *Rev. Bras. Agroec*. 9: 248-258.
- Van Leeuwen, T., P. Demaeght., E.J. Osborne., W. Dermauw., S. Gohlke & R. Nauen, 2012.** Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 4407– 4412.
- Voudouris, C.Ch., B. Sauphano., P. Franck., M. Reyes., Z. Mamuris., J.A. Tsitsipis., J. Vontas & J.T. Margaritopoulos. 2011.** Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pestic. Biochem. Physiol*. 100, 229–238.
- Villas, B & A.M. Alves. 1988.** Patogenicidade de *Beauveria* spp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae). *An. Soc entomol Bras*. 17: 17305-332.
- Wagner, G.P. 1994.** Evolution and multi-functionality of the chitin system. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P., DeSalle, R. (eds) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Experientia Supplementum, vol 69. Birkhäuser, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7527-1_33
- Xi, Y., P.L. Pan, Y.X. Ye, B. Yu & C.X. Zhang. 2014.** Chitin deacetylase family genes in the

brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Mol Biol.* 23:695–705.

Yu, R., X.P. Xu., Y.K. Liang., H.G. Tian., Z.Q. Pan., S.H. Jin., N. Wang & W. Q. Zhang. 2016. The Insect Ecdysone Receptor is a Good Potential Target for RNAi-based Pest Control. *International J of Biol Sci.* 10: 1171-1180.

Zhu, K.Y., H. Merzendorfer., W. Zhang & J.S. Muthukrishnan. 2008. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 61:177–196.

Zhuo, W., F. Chu, L. Kong, H. Tao, Y. Sima & S. Xu. 2014. Chitin synthase B: a midgut specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *bombyx mori* larvae. *Arch. Insect Physiol.* 85: 36-47.

Zhong, X.W., X.H. Wang, X. Tan, Q.Y. Z.H. Xiang & P. Zhao. 2013. Identification and molecular characterization of a chitin deacetylase from *Bombyx mori* peritrophic membrane. *J. Mol Sci.* 15:1946–1961.

Zimoch, L., D.G. Hogenkamp, S. Muthukrishnan & H. Merzendorfer. 2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:515–27.

CAPÍTULO 2

CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE LUFENURON E *Bacillus thuringiensis* AFETAM A EXPRESSÃO DE QUITINA DESACETILASES E QUITINASES INTESTINAIS DE *Diatraea saccharalis*¹

GLEND CAROLINE CONCEIÇÃO DAMASCENO²

2 Departamento de Agronomia - Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Damasceno, G. Concentrações subletais de Lufenuron e *Bacillus thuringiensis* afetam a expressão de quitina desacetilases e quitinases intestinais de *Diatraea saccharalis*. A ser submetido.

RESUMO - A membrana peritrófica (MP) de insetos é formada principalmente por fibras de quitina e proteínas associadas. A MP serve como primeira defesa contra microrganismos, além de proteger as células epiteliais de danos mecânicos. Pouco se sabe a respeito dos efeitos de doses subletais de inseticidas e repostas moleculares dos genes de metabolismo de quitina. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar os principais genes que participam do metabolismo da MP das três brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus* a partir de transcritomas intestinais. Além disso, verificou-se o efeito de concentrações subletais de lufenuron e *Bacillus thuringiensis* sob a expressão dos genes de metabolismo de quitina no intestino de *D. saccharalis*. A partir dos resultados da análise *in silico* identificou-se em média em 7 genes de CDAs, 8 genes de CHTs e um gene de CHS2. Todos os genes e proteínas preditas apresentaram domínios funcionais e demais características preditas equivalentes àquelas já relatadas para outras espécies. Além disso, foram confirmados como mais expressos no intestino em comparação com a carcaça de lagartas de 4º instar de *D. saccharalis*, o gene *DsacCHS2*, três genes de CDAs e 7 genes de CHTs. Por fim, um mesmo gene de CDA foi ativado em insetos tratados com concentrações subletais de lufenuron e Bt. Entretanto, estes mesmos inseticidas alteraram a expressão de genes de quitinases diferentes. Este estudo mostra que os efeitos subletais de lufenuron e Bt podem estar associados de forma direta ou indireta a alterações da expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo de quitina no intestino, e, conseqüentemente, no metabolismo da MP. Estudos futuros devem tentar responder se os efeitos na expressão dos genes são causa ou consequência dos efeitos subletais destes inseticidas. Um melhor entendimento da resposta fisiológica e molecular dos insetos a inseticidas pode fornecer bases para o aperfeiçoamento das estratégias de controle de pragas. Foram determinados nesse estudo um gene de CHS2, 7 genes de CDA e 10 genes de quitinases no transcritomas intestinais das três brocas da cana de açúcar incluindo estruturas de domínios, padrão de expressões e relações filogenéticas. Também verificamos que ação de

inseticidas inibidores da síntese de quitina e biológicos ativam o mesmo gene de CDA e altera a expressão de CHT.

PALAVRAS-CHAVE: Brocas da cana-de-açúcar, membrana peritrófica, inibidores da síntese de quitina, *Bacillus thuringiensis*

SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF LUFENURON AND *Bacillus thuringiensis* AFFECT
THE EXPRESSION OF MIDGUT CHITIN DEACETYLASE AND CHITINASE IN *Diatraea*
saccharalis

ABSTRACT – The peritrophic membrane (PM) of insects is mainly formed by chitin fibers and associated proteins. PM serves as a first defense against microorganisms, and protects epithelial cells from mechanical damage. Little is known about the effects of sublethal doses of insecticides and molecular responses of chitin metabolism genes. Thus, this work aimed to identify the main genes that participate in the PM metabolism of the three sugarcane borers, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* and *Telchin licus*, using intestinal transcriptomes. Furthermore, the effect of sublethal concentrations of lufenuron and *Bacillus thuringiensis* on the expression of chitin metabolism genes in the intestine of *D. saccharalis* was verified. Based on the results of the *in silico* analysis, an average of 7 CDA genes, 8 CHT genes and one CHS2 gene were identified in the three studied species. All genes and predicted proteins presented functional domains and other predicted characteristics corresponding to those already reported for other species. In addition, the *DsacCHS2* gene, three CDA genes and 7 CHT genes were confirmed to be more expressed in the intestine compared to the carcass of *D. saccharalis* 4th instar caterpillars. Finally, the same CDA gene was activated in insects treated with sublethal concentrations of lufenuron and Bt. However, these same

insecticides altered the expression of different chitinases. This study shows that the sublethal effects of lufenuron and Bt may be directly or indirectly associated with alterations in the expression of genes that are involved in the metabolism of chitin in the intestine, and, consequently, in the metabolism of PM. Future studies should try to answer whether the effects on gene expression are the cause or consequence of the sublethal effects of these insecticides. A better understanding of the physiological and molecular response of insects to insecticides can provide a basis for improving pest control strategies.

KEY WORDS: Sugarcane borers, peritrophic membrane, chitin synthesis inhibitors, *Bacillus thuringiensis*

Introdução

O epitélio do intestino médio de insetos é comumente revestido por uma estrutura denominada de membrana peritrófica. A membrana peritrófica consiste principalmente de fibrilas de quitina e proteínas associadas, e seu principal papel é auxiliar na digestão de alimentos, proteção contra patógenos, e na proteção do epitélio intestinal contra danos mecânicos (Liu *et al.* 2019). A Quitina sintase 2 (CHS2) é uma enzima de ação restrita ao epitélio intestinal e é uma das principais responsáveis pela síntese de quitina para a formação da membrana peritrófica (Merzendorfer & Zimoch. 2003, Merzendorfer. 2006). A membrana peritrófica é dinâmica, e está em constante síntese, modificação e degradação durante o desenvolvimento do inseto e no processo de muda (Liu *et al.*, 2019). A degradação da quitina é feita principalmente pela ação das quitinases (CHTs), que possuem pelo menos 11 grupos em insetos (Arakane *et al.* 2009, Tetreau *et al.* 2015). No intestino médio, as quitinases do grupo IV são as mais expressas em relação ao resto do corpo dos insetos (Arakane *et al.* 2009). A membrana peritrófica também é parcialmente modificada pela ação das

quitina desacetilases (CDAs), que removem o grupo acetil da N-acetil-glucosamina, gerando glucosamina, que em conjunto formam a quitosana (Hegedus *et al.* 2019). As CDAs são divididas em cinco grupos baseados em domínios proteicos e relações filogenéticas, das quais as que são mais expressas no intestino pertencem ao grupo V (Toprak *et al.*, 2008; Arakane *et al.*, 2009). Apesar de ainda necessitar de maior esclarecimento, é razoável afirmar que a desacetilação parcial da quitina ajuda a manter a membrana peritrófica mais protegida contra a ação de endoquitinases, fornece grupos amino disponíveis para ligação com proteínas, e gera sítios de ligação seletivos para outras proteínas (Toprak *et al.*, 2008; Liu *et al.* 2019)

Como a quitina é um componente estrutural e fisiológico essencial para a sobrevivência dos insetos, alguns inseticidas atuam comprometendo a síntese de quitina (Doucet & Retnakaran, 2012). Além de provocar má-formação da nova cutícula durante a muda, por exemplo, as benzoilureias, quando ingeridas, também possuem a capacidade de bloquear parcialmente a síntese de quitina no intestino médio, induzindo a má-formação da membrana peritrófica (Cruz *et al.*, 2021), e a redução da quitina na cutícula e ovos de insetos (Merzendorfer *et al.* 2012, Soltani 1984, Clarke *et al.* 1977).

Além disso, muitos isolados de *Bacillus thuringiensis* naturalmente expressam quitinases que auxiliam no processo de patogênese, provavelmente degradando a quitina da membrana peritrófica, tornando-a mais permeável (Martinez-Zavala *et al.*, 2020).

O inibidor de síntese de quitina lufenuron e vários produtos formulados a partir de *B. thuringiensis* são comercializados no Brasil e utilizados no controle da broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis* (MAPA 2022). Um estudo recente (Xin *et al.*, 2021) mostrou que o inibidor de síntese de quitina diflubenzuron, molécula semelhante ao lufenuron, afeta a expressão do gene de quitina sintase 1 (CHS1) no ácaro *Tetranychus cinnabarinus*, sendo dose-dependente. No entanto, ainda existem poucos estudos que identifiquem os possíveis efeitos dos inibidores da síntese de quitina e

de Bt sobre outras enzimas que participem do metabolismo de quitina, principalmente da membrana peritrófica.

Logo, buscou-se entender melhor os efeitos de doses subletais de um inibidor da síntese de quitina, lufenuron, e de um produto formulado a base de Bt sobre a expressão dos genes de CHS2, quitina desacetilases e quitinases. Desta forma, este trabalho relata: (1) a identificação dos genes, domínios funcionais e relações filogenéticas de quitina sintases, quitina desacetilases e quitinases de *D. saccharalis*, *Diatraea flavipenella* e *Telchin licus*, insetos-praga que reduzem a produtividade da cana-de-açúcar, a partir de transcritomas intestinais das espécies estudadas; (2) a localização tecidual da expressão dos genes encontrados em lagartas de *D. saccharalis* por RT-qPCR; e, por fim, (3) os efeitos de doses subletais de lufenuron e *B. thuringiensis* sobre os genes que são mais expressos no intestino dos insetos, e, que provavelmente, estão envolvidos na síntese de quitina da membrana peritrófica. Pesquisas como esta possibilitam entender como agem molecularmente os genes envolvidos no metabolismo da quitina, principalmente nas três brocas da cana-de-açúcar que são economicamente importantes.

Material e Métodos

Criação de *Diatraea saccharalis*. Os insetos de *D. saccharalis* foram mantidos em condições de laboratório de acordo com Hensley & Hammond (1968), modificado por Araújo et al (1985). Lagartas a partir do terceiro instar, pupas e adultos foram mantidos em condições específicas para cada estágio de desenvolvimento. Os ovos, coletados diariamente, foram esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), e posteriormente armazenados em placas de Petri na presença de umidade. Após a eclosão, as lagartas neonatas foram distribuídas em tubos de fundo chato contendo

20 mL de dieta artificial. Os adultos foram mantidos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR, lagartas, pupas e ovos a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h.

Transcritomas. Os transcritomas do intestino de *D. saccharalis* e *T. licus* utilizados no estudo foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina (Noriega et al. 2020a, Noriega et al. 2020b). Além disso, o transcritoma de intestino de *D. impersonatella* também foi obtido por sequenciamento Illumina (Herbert A. A. Siqueira, comunicação pessoal; Dados ainda não publicados).

Identificação e caracterização *in silico* dos genes do metabolismo da quitina. Inicialmente, os principais genes que auxiliam na síntese, modificação e degradação da quitina foram identificadas na espécie modelo *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), buscando nominalmente no campo “protein” pelos nomes dos genes do metabolismo da quitina (CHS-B, CDA’s e CHTs). A partir destas sequências encontramos os genes homólogos na espécie modelo de Lepidoptera *Bombyx mori* através do silkbase (<http://silkbase.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Logo em seguida identificou-se, utilizando o BlastP sequências de *B. mori* como iscas, as sequências de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus* a partir de transcritomas de intestino de lagartas de 4º instar (Noriega et al. 2020a e 2020b, H. Siqueira – comunicação pessoal). Os *contigs* encontrados nos transcritomas das três espécies foram analisados para saber se possuíam as sequências completas, através da predição das janelas de leitura aberta (ORFs – do inglês Open Reading Frames) (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). Os domínios proteicos de cada proteína predita a partir dos *contigs* foram identificados utilizando o algoritmo HMMER v3.1 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) e CDD

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). Os peptídeos sinal foram identificados utilizando o SignalP v. 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) e confirmados utilizando o Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) que também identifica domínios transmembrana. As imagens dos domínios foram feitas com auxílio da ferramenta “PROSITE My Domains” (<https://prosite.expasy.org/mydomains/>) e depois melhoradas utilizando o programa PowerPoint (Microsoft, EUA).

Análises Filogenéticas. Para a construção das árvores filogenéticas, inicialmente, foram selecionadas sequências ortólogas no NCBI através de BlastP, utilizando as sequências das espécies estudadas encontradas nos transcritomas. Para quitina sintase 2 foram selecionadas aproximadamente vinte sequências de espécies diferentes para Lepidoptera e Coleoptera (grupo externo. Já para quitina desacetilases e quitinases, foram escolhidas pelo menos dez sequências para cada gene dentro da ordem Lepidoptera. Sequência de *T. castaneum* (Coleoptera) foram escolhidas como grupo externo. O alinhamento das sequências de aminoácidos foi conduzido no MEGA 7 usando o algoritmo MUSCLE. As análises filogenéticas, foram realizadas usando o PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) utilizando o método de máxima verossimilhança (ML) e bootstrap (Guidon *et al.* 2010), e o Smart Model Selection (SMS) foi utilizado para a escolha do modelo de substituição (Lefort *et al.* 2017). As construções das árvores foram representadas graficamente a partir do programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR. As extrações de RNA total foram realizadas usando TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Quantidades iguais (1,5 µg) de RNA total tratadas com DNaseI foram usadas para a síntese de cDNA (Noriega *et al.* 2020). Utilizou-se o kit de síntese de cDNA iScript gDNA clear (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) de acordo com o

protocolo recomendado pelo fabricante. Para RT-qPCR, foram utilizados os primers descritos na Tabela 1. O volume de reação foi de 10 µL, com 5 µL de 2X SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 2 µL de cDNA diluído 1:10, 0,2 µM (0,2 µL) de cada primer (direto e reverso) e 2,6 µL de água ultrapura. Todos os experimentos de qPCR foram conduzidos em um sistema de PCR em tempo real QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As reações foram conduzidas utilizando o seguinte programa: (i) etapa inicial de 95 °C por 15 min; (ii) 40 ciclos de 95°C por 15 se 60°C por 1 min. iii) Etapa final com análise da curva de “melting” do primer de 60 a 94 °C, aumentando em 0,5 °C por segundo. As análises de expressão foram realizadas usando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001) através do software SATqPCR (Rancurel et al., 2019). Os dois genes mais estáveis dentre GAPDH, β -tubulina, β -actina e RPS10 foram utilizados como genes de referência (Noriega *et al.*, 2020b). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas biológicas e técnicas.

Análise da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de quitina em dois tecidos do inseto (intestino e carcaça). Para avaliar os padrões de expressão nos tecidos, três lagartas de 4º ínstar por amostra foram anestesiadas em gelo por 10 min. Em seguida, os indivíduos foram dissecados para separar e coletar o intestino e a carcaça (tecidos não digestivos). Três repetições biológicas foram separadas para cada tecido. Em seguida, foram realizadas a extração de RNA total, síntese de cDNA e avaliação da expressão por qPCR, conforme descritos anteriormente.

Determinação da CL₃₀ para os inseticidas Lufenuron e *Bacillus thuringiensis*. A concentração letal para 30 % dos indivíduos (CL₃₀) foi escolhida como a dose subletal dos inseticidas a ser utilizada nos experimentos. Para determinar a CL₃₀. Utilizamos os seguintes produtos com suas respectivas concentrações: Lufenuron (Match 50g de ingrediente ativo, i.a. /L-Syngenta) (0,91,

1,82, 3,64, 7,27, 14,55, 29,09, 58,18 e 116, 36 µg de i.a./mL) e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* cepa GC-91 (Agree®, 500g/kg – Biocontrole, SP, Brasil) (24,27, 48,64, 97,27, 194,09, 389,09, 778,18 e 1549,09 µg/mL). Lagartas de 2º instar foram tratadas via alimentação com um volume 4,5 mL de dieta contendo as respectivas doses dos inseticidas. Após 24h horas a mortalidade de lagartas foi contabilizada. A CL₃₀ foi calculada por análise de Probits, no software Polo Plus 1.0 conforme descrito na seção de “Análises estatísticas”.

Bioensaios com dose subletal (CL₃₀) de Lufenuron e *Bacillus thuringiensis* via ingestão. Para o bioensaio foram utilizadas lagartas de 4º instar de *D. saccharallis*. A dieta foi colocada em placas de Petri com um volume de dieta de 4,5 g/ml contendo lufenuron (Match®) na concentração de 3,04 µg/mL (CL₃₀) ou *B. thuringiensis* (Agree®) na concentração final de 114,8 µg/mL. Logo, foram liberadas 10 lagartas de 4º instar de *D. saccharallis* por placa, sendo o experimento repetido em triplicata. Os tubos foram mantidos em BOD a 28°C ± 1°C e 70 ± 10% de UR e fotoperíodo de 12h. Os insetos foram coletados em conjunto de três por repetição e o RNA total foi extraído 24 e 48 horas após a disponibilização da dieta tratada com o inseticida. A extração do RNA total, a síntese do cDNA e a avaliação da expressão gênica por qPCR foi realizada conforme descrito anteriormente.

Análise estatística. A análise da expressão gênica foi feita utilizando o software online de análise de expressão gênica SATqPCR (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/tool.cgi>), que utiliza o teste t de Student para amostras dois a dois. Os dados de mortalidade tanto para Match® ou Agree® foram submetidos à análise de Probit (Finney 1971) após correção da mortalidade (Abbott 1925), utilizando o programa POLO – Plus (Software 2005)

Resultados e Discussão

Identificação, caracterização *in silico* e análise filogenética dos genes de quitina sintase em *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*.

Nos transcritomas intestinais de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus* foram encontrados *contigs* contendo um gene de quitina sintase com a ORF completa. Esses genes possuem características semelhantes (Tabela 2), com as ORFs de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* sendo exatamente iguais, e a ORF de *Telchin licus* possuindo 66 nucleotídeos ou 22 aminoácidos a mais. Além disso, as três proteínas preditas possuem 17 domínios transmembrana e um domínio de quitina sintase C (Figura 1). Adicionalmente, as três sequências apresentaram ponto isoelétrico teórico entre 6,06 e 6,34 e massa teórica entre 173 e 176 (Tabela 2). Dados semelhantes foram relatados por Merzendorfer e Zimoch, (2003), onde estes afirmaram que as CHS de insetos são proteínas grandes transmembrânicas com massa molecular teórica que vai de 160 a 180 kDa e apresentam ponto isoelétrico (pI) entre 6,1 e 6,7. Também foram encontrados *contigs* contendo ORFs parciais de quitina sintase 1 (CHS1) nos transcritomas das três espécies (Dados não mostrados), provavelmente presentes por contaminação do intestino com tecido cuticular ou traqueal. Esse resultado corrobora a observação de que não mais de dois genes de CHS foram identificados em qualquer espécie de inseto investigados até agora (Merzendorfer, 2011). Características semelhantes de CHS2 também foram identificadas em várias espécies, como *Manduca sexta* (Tetreau *et al.* 2015), *Spodoptera exigua* (Lee *et al.* 2017), *Spodoptera frugiperda* (Wan *et al.* 2021), *Ostrinia furnacalis* (Yang *et al.* 2011), *Bombyx mori* (Zhuo *et al.* 2011).

A análise filogenética mostrou que as sequências de CHS2 das três espécies estudadas agrupam-se com outras sequências de Lepidoptera (Figura 2). *DsacCHS2* e *DimpCHS2* agrupam-se em um clado com outras espécies da família Crambidae como *Chilo suppressalis*, *Heortia vitessoides*, *Glyphodes pyloalis* e *Ostrinia furnacalis* (Figura 2). Enquanto isso *TlicCHS2* (Família

Castniidae) agrupa-se com CHS2 de *Grapholitha molesta* (Família Tortricidae), que são mais próximos entre si do que com Crambidae (Mitter *et al.*, 2017). Todas as sequências de Coleoptera formaram um clado separado de Lepidoptera (Figura 2) como esperado. Estas análises confirmam que as sequências identificadas realmente pertencem aos insetos estudados.

Identificação e caracterização *in silico* dos domínios funcionais de desacetilases identificadas em *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*.

As quitina desacetilases (CDA) são enzimas que modificam a quitina, convertendo N-acetilglucosamina em glucosamina, removendo o grupo acetil (Liu *et al.* 2019). As desacetilases foram identificadas no transcrito de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus* por meio de buscas utilizando como “isca” sequências do inseto modelo para Lepidoptera, *Bombyx mori*. Oito sequências (7 completas) de desacetilases foram identificadas em *D. saccharalis*, seis (5 completas) em *D. impersonatella*, e sete (6 completas) em *T. licus*. As sequências apresentam pI em torno de 5, com exceção de *DsacCDA_c5038*, *DsacCDA_c32385*, *DsacCDA_c37171* e *DimpCDA_c12507* que tiveram pI próximo a 4 e a sequência *TlicCDA_c7241* apresentou pI próximo de 6 (Tabela 3).

Com base em estudos sobre arquitetura de domínios, as CDAs de insetos, como do bicho-da-seda, *Bombyx mori* e *T. castaneum*, são divididas em cinco grupos I–V (Dixit *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2019). Os grupos I e II, têm um domínio catalítico CDA, um domínio de ligação à quitina CBM-14 (também chamado peritrofina-A) e um domínio de baixa densidade domínio de ligação ao receptor de lipoproteína (LDLa). As CDAs do grupo III e IV, respectivamente, contém domínios CDA e CBM-14, mas não contém a ligação de LDLa. As CDAs do grupo V, contém apenas o domínio de CDA (Dixit *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2019). *Diatraea saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus* apresentaram sequências com estrutura de domínios que se enquadram nos grupos I, III e

V (Figura 3). Todas as sequências de desacetilase apresentaram peptídeo sinal indicando que estas sequências podem ser secretadas no meio extracelular.

Identificação, caracterização in silico e análise filogenética dos genes de quitinases de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*.

Utilizando como “isca” sequências do inseto modelo para Lepidoptera, *Bombyx mori*, foram identificadas sequências de quitinases e semelhantes a quitinase (quitinase-like) nos transcritomas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*. As quitinases e quitinases-like são divididas, em Lepidoptera, em 11 grupos (I - X e h) (Tetreau *et al.*, 2015). Para *D. saccharalis* e *T. licus* foram identificadas nove sequências de quitinases ou quitinase-like, oito sequências completas, das quais os grupos I, V, VII, VIII e h possuíam uma sequência cada, e o grupo IV com três sequências (Tabela 4). Além disso, duas sequências incompletas foram encontradas pertencendo ao grupo II e III (Tabela 4). Já para *D. impersonatella* foram encontradas 11 sequências, as mesmas 10 já relatadas para *D. saccharalis*, com exceção de uma sequência incompleta pertencente ao grupo I. Adicionalmente, uma outra sequência incompleta foi identificada pertencendo ao grupo VI (Tabela 3). Para as sequências completas foram calculadas as massas moleculares e ponto isoelétricos teóricos. Em todas as espécies os pontos isoelétricos variaram de 4 a 9, sendo as sequências do grupo IV com pI variando entre 4 e 5. Isto surpreende, pois, o pH do intestino médio de insetos lepidópteros variam normalmente entre 9 e 12 (Terra & Ferreira, 2012).

Todas as sequências ortólogas apresentaram domínios similares nas três espécies estudadas, denotando a conservação das sequências de quitinases em Lepidoptera (Figura 5). A organização estrutural de domínios das quitinases inclui de 1-5 domínios catalíticos de GH18, 0-7 domínios de ligação à quitina classificados como peritrofina-A ou CBM-14 e regiões ligantes ricas em serina/treonina (Arakane & Muthukrishnan, 2010). Além disso, as quitinases podem conter

peptídeo sinal ou domínios transmembrânicos (Arakane *et al.* 2003, Royer *et al.* 2002). Todas as sequências completas encontradas apresentaram peptídeo sinal (Figura 5), com exceção das sequências do grupo VIII que apresentam um domínio transmembrânico N-terminal. Com relação as características dos grupos encontrados de forma completa nos transcritomas intestinais, o grupo I é representado por apenas uma sequência em todos os insetos, com exceção de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, e estruturalmente contém um domínio GH18, uma região de ligação rica em serina e um domínio ligação à quitina CBM-14 (Arakane & Muthukrishnan. 2010). Já as CHTs do grupo IV são geralmente abundantes no intestino e representam o maior número de membros. Todas elas têm peptídeos sinal e, presumivelmente, são secretados no lúmen intestinal, possuindo um único domínio catalítico (GH18) e alguns membros deste grupo de quitinases apresentam o domínio CBM-14 (Liu *et al.* 2019). O grupo V é composto por sequências chamadas IDGF (Imaginal Disc Growth Factor) e possuem os aminoácidos do sítio catalítico modificados, não possuindo atividade de quitinase (Arakane & Muthukrishnan, 2010). O grupo VII exibe uma arquitetura que inclui um peptídeo sinal e um único domínio GH18. As quitinases do grupo VIII só têm um domínio catalítico e um domínio transmembrânico (Arakane & Muthukrishnan. 2010). Finalmente, o grupo h possui além do domínio característico de GH18, também possui um domínio de quitinase A N-terminal, sendo este grupo de quitinases exclusivo de Lepidoptera (Treteau *et al.*, 2015). Todas as características aqui descritas foram identificadas nas sequências completas encontradas nos transcritomas intestinais das três espécies de brocas da cana-de-açúcar.

A análise filogenética confirmou os grupos definidos a partir dos domínios em comum, pois as sequências se agruparam em clados que tinham como grupo externo a sequência correspondente de *T. castaneum* (Figura 6). A exceção foi duas sequências de *T. licus* que supostamente eram para se agrupar com o clado do grupo IV, porém formaram um clado separado mais próximo do clado do grupo I (Figura 6). Este agrupamento foi formado com sequências de *Plutella xylostella*

(Plutellidae) e *Leguminivora glycinivorella* (Tortricidae) que assim como *T. licus* (Castniidae) são insetos que pertencem a famílias mais basais na filogenia de Lepidoptera (Mitter et al., 2017).

Avaliação da expressão de transcritos dos genes envolvidos no metabolismo de quitina no intestino e carcaça de *D. saccharalis*.

Para confirmar a localização da expressão dos genes que fazem parte do metabolismo da quitina, foi utilizada como modelo a espécie *Diatraea saccharalis*, por ser uma espécie que possui criação de rotina em laboratório. Foram analisadas as expressões dos genes *DsacCHS2*, *DsacCDAs* e *DsacCHTs* em duas partes do corpo de lagartas de 4º instar, o intestino e carcaça (Figura 7A). A carcaça corresponde ao resto do corpo da lagarta, menos o intestino. A confirmação dos genes de metabolismo de quitina com maior expressão no intestino é um indicativo de que estes podem estar envolvidos na manutenção da membrana peritrófica (Hegedus *et al.*, 2009), por isso os genes confirmados como mais expressos no intestino foram estudados nos experimentos posteriores.

Para o gene *DsacCHS2*, o gene foi mais expresso significativamente, como esperado, no intestino em comparação com a carcaça (Figura 7B). Esse resultado confirma o fato de o gene ter sido identificado de forma completa no transcrito intestinal de *D. saccharalis* e também em outras espécies (Merzendorfer & Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2006; Zhuo *et al* 2014).

Já para as CDAs, apenas o gene *DsacCDAc34976* apresentou uma diferença significativa, com uma expressão 10 vezes maior na carcaça do que no intestino (Figura 7C). *DsacCDAc34976* é classificado no grupo I das CDAs. Em *B. mori* as CDAs do grupo I são expressas principalmente na epiderme e na cabeça, assim sugerindo que têm papel na modificação de quitina no tegumento de insetos (Zhang *et al.* 2019, Liu *et al.* 2019). Posteriormente, os genes *DsacCDAc5038*, *DsacCDAc9780*, *DsacCDAc32385*, que pertencem as CDAs do grupo V, não apresentaram diferença significativa quando comparados o intestino e a carcaça (Figura 7C). Porém, em estudos

anteriores com *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2009) e *B. mori* (Zhang *et al.*, 2019) os genes do grupo V foram mais expressos no intestino médio. Adicionalmente, a expressão em *B. mori* só foi detectada durante o período de alimentação (Zhang *et al.* 2019). Entretanto, apesar de se esperar que as CDAs dos grupos I a IV fossem mais expressas na carcaça do que no intestino, e as do grupo V mais expressas no intestino, os trabalhos em *T. castaneum* e *B. mori* não apresentam análise estatística (Arakane *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2019), o que dificulta a comparação com os resultados obtidos para *D. saccharalis*. O gene *DsacCDAc37171* não foi amplificado em nenhum dos experimentos, mesmo testando um segundo par de primers projetado em região diferente do primeiro par (Figura 7C, Tabela 1).

Finalmente, quando se analisou as expressões das quitinases de *D. saccharalis*, todos os genes foram significativamente mais expressos no intestino do que na carcaça (Figura 7D). Com destaque para os genes dos grupos IV e h, nos quais a expressão variou de 30 a 400 vezes a mais no intestino do que na carcaça (Figura 7D). A expressão dos genes dos grupos I, VII e VIII apesar de significativas, foram em escala menor, variando de 3 a 10 vezes no intestino comparado com a carcaça. A expressão do gene do grupo V (*DsacIDGFc3077*) não foi avaliada porque esta não é uma quitinase funcional (Arakane & Muthukrishnan, 2010). Os dados de expressão do grupo IV são semelhantes aos obtidos em *T. castaneum* (Arakane & Muthukrishnan, 2010), *P. xylostella* (Liao *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018) e *Chilo suppressalis* (Su *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). O mesmo acontece para a quitinase do grupo h que é exclusiva de Lepidoptera (Liao *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), e do grupo VIII (Arakane & Muthukrishnan, 2010). Entretanto, os resultados dos grupos I e VII são divergentes, pois os genes desses grupos em *T. castaneum*, *C. suppressalis* e *P. xylostella* são mais expressos na carcaça ou epiderme (a epiderme está contida na carcaça) do que no intestino, ou não há diferença de expressão entre os tecidos (Arakane & Muthukrishnan, 2010; Liao *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018).

Avaliação da expressão de transcritos dos genes envolvidos no metabolismo da quitina em resposta ao inseticida inibidor de síntese de quitina, lufenuron.

Antes da realização dos experimentos de análise de expressão gênica, foi necessário determinar a concentração subletal de lufenuron por alimentação. O inseticida foi misturado a dieta em diferentes concentrações (0,91 a 116 µg i. a. /mL de dieta), totalizando 8 concentrações. Determinou-se que a concentração letal para 30% dos indivíduos (CL₃₀) seria a concentração subletal a ser utilizada nos experimentos de expressão gênica. A avaliação de mortalidade foi feita 4 dias após a montagem do bioensaios e os dados foram analisados por análise de Probits. A CL₃₀ de lufenuron por alimentação foi de 3,04 µg/mL de dieta (Tabela 5) em lagartas de 3º instar de *D. saccharalis*. A CL₅₀ (9,93 µg/mL, Tabela 5) obtida para *D. saccharalis* foi semelhante a obtida (9.8 µg/mL) por Fonseca *et al.* (2015) para *D. flavipennella*.

Ao avaliar a expressão de *DsacCHS2* sob tratamento do inseticida lufenuron, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em os ambos os tempos analisados (24 e 48h) (Figura 8A). Merzendorfer *et al.* (2012) também não observou diferença significativa na expressão de *TcCHS2* em *T. castaneum* tratado com 100ppm de diflubenzuron, uma molécula de ação semelhante ao lufenuron. Por outro lado, Xin *et al.* (2021) observou um aumento de expressão de *CHS1* do ácaro *Tetranychus cinnabarinus*, quando tratados topicamente com a CL₃₀ de diflubenzuron, o que denota que os genes de CHS podem ter respostas diferentes dependendo do método de aplicação do inseticida. Entretanto, testamos os efeitos de lufenuron por aplicação tópica sob a expressão de *DsacCHS1*, todavia também não houve diferença significativa (Dados não mostrados).

Para avaliação dos genes de quitina desacetilases (CDAs) ficou definido que apesar de nenhum gene ter sido significativamente mais expresso no intestino do que na carcaça, escolheu-se

os três genes que foram quantificados do grupo V. Esta decisão foi baseada em trabalhos anteriores (Arakane *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2019). Dos três genes de CDA avaliados, foi observado que apenas *DsacCDAc32385* apresentou diferença significativa, porém discreta, entre os tratamentos após 48 h, com um aumento de quase duas vezes da expressão quando comparada com o tratamento controle (Figura 8B). De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da ação direta ou indireta de lufenuron sob a expressão de uma CDA intestinal de insetos.

Finalmente, no caso das quitinases foram analisados os sete genes encontrados de forma completa no transcrito de *D. saccharalis*, já que todos foram mais expressos no intestino, do que na carcaça. Desta forma, averiguou-se que dos sete genes testados três tiveram suas expressões alteradas de forma significativa entre os tratamentos controle e CL₃₀, 48 horas após os tratamentos (Figura 8C). Dos três, o gene *DsacCHTc27374* (Grupo I) teve sua expressão aumentada em 8 vezes sob o tratamento de lufenuron, e os genes *DsacCHTc13022* (Grupo IV) e *DsacCHTc33738* (Grupo VII) tiveram suas expressões diminuídas, sob tratamento de lufenuron, em aproximadamente 7 e 4 vezes, respectivamente, quando comparados a expressão do tratamento controle (Figura 8C). Apesar de não relatar nenhuma mudança de expressão em vários genes envolvidos no metabolismo de quitina de *T. castaneum*, Merzendorfer *et al.* (2012) sugere que quando genes envolvidos no metabolismo e modificação de proteínas são regulados positivamente, podem refletir uma condição de resposta e estresse provocado pelo inseticida.

É importante salientar que nem o silenciamento individual ou simultâneo de CDAs (Arakane *et al.*, 2009) ou CHTs (Zhu *et al.*, 2008) resultaram em fenótipos perceptíveis em *T. castaneum* ou em CHTs de *P. xylostella* (Zhu *et al.*, 2018). Estes dados reforçam que nem sempre a função destes genes é óbvia, principalmente dos genes expressos no intestino.

Avaliação da expressão do transcrito dos genes envolvidos no metabolismo da quitina em resposta ao inseticida à base de *Bacillus thuringiensis*.

Os bioensaios com *B. thuringiensis* foram realizados com o produto comercial Agree® que tem como ingrediente ativo esporos e cristais da cepa *B. thuringiensis aizawai* GC-91. Esta cepa é transconjugada e contém o plasmídeo da cepa *B. thuringiensis kurstarki*. As toxinas expressas nesta cepa são Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry2A (EFSA, 2020). Para determinar a CL₃₀ foram utilizadas 7 concentrações, variando entre 24,27 e 1550 µg/mL de dieta, em lagartas de 3º instar de *D. saccharalis*. Após 48 horas a CL₃₀ obtida foi de 114,8 µg/mL de dieta (Tabela 5).

Ao se avaliar a expressão de *DsacCHS2* sob o tratamento com a CL₃₀ de *B. thuringiensis*, não se obteve diferença significativa quando comparada ao tratamento controle nos tempos de 24 e 48h (Figura 9A). Diferentemente, Yao *et al.* (2014) observou um aumento da expressão de *CHS2* em um transcrito de *Ostrinia nubilalis* tratada com a CL₅₀ da toxina Cry1Ab.

Já, ao se avaliar a expressão dos três genes de quitina desacetilases (Grupo V) de *D. saccharalis*, observou-se que, novamente, apenas o gene *DsacCDAc32385* apresentou um aumento 9 e 6 vezes sob tratamento com a CL₃₀ de Bt, nos tempos 24 e 48 h, respectivamente (Figura 9B). Resultado semelhante foi obtido em *H. armigera*, onde a expressão do gene *HaCDA5* (grupo V) foi regulada negativamente em 12 h e regulado positivamente 72 h após o tratamento com a toxina Cry. No mesmo estudo, o nível de expressão de *HaCDA1* e *HaCDA2* (Grupo I), foi suprimido constantemente após a ingestão de dieta contendo *B. thuringiensis* (Han *et al.* 2015). Desta forma, o motivo de *DsacCDAc32385* ter sido regulado positivamente pode ser uma resposta indireta associada com a ação das toxinas no epitélio intestinal do inseto (Han *et al.*, 2015).

Finalmente, ao analisar os resultados de expressão das quitinases, observou-se que apenas os genes do grupo IV, *DsacCHTc8776* e *DsacCHTc29099*, tiveram sua expressão diminuída de forma significativa (Figura 9C) de 15 e 35 vezes, respectivamente. Em *O. nubilalis* um transcrito

de quitinase teve sua expressão diminuída em 2,7 vezes em resposta à ingestão de Cry1Ab por larvas (Yao *et al.*, 2014). Estes autores sugerem que a regulação negativa do gene da quitinase intestinal seria resultado de um mecanismo de defesa para manter a integridade da membrana peritrófica em resposta à ingestão da toxina Cry1Ab.

Efeitos subletais de inseticidas químicos e biológicos

Os efeitos subletais de inseticidas, sejam químicos ou orgânicos são bem conhecidos, e estão entre eles, maior tempo de desenvolvimento, menor peso de pupa, menor longevidade, mudanças de parâmetros de fertilidade, entre outros (Fonseca *et al.*, 2015; Hafeez *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2021). Lufenuron também foi responsável por causar danos na membrana peritrófica de *A. grandis* (Cruz *et al.*, 2021), também causando efeito indireto nos parâmetros reprodutivos. Entretanto, pouco se sabe das respostas moleculares que levam a esses efeitos diretos ou indiretos. Este trabalho tentou associar os efeitos subletais da ação do lufenuron e de *B. thuringiensis*, já relatados na literatura, com respostas moleculares focando principalmente nos genes envolvidos no metabolismo de quitina e, por tabela, da membrana peritrófica, no intestino dos insetos. Apesar de se ter encontrado algumas variações de expressão gênica interessante principalmente dos genes de CDAs e CHTs, esses dados ainda são superficiais. Análises de genômica funcional por RNAi seriam ideais para aprofundar o entendimento da função destes genes durante a ação dos inseticidas lufenuron e Bt. Entretanto, para *D. saccharalis* o RNAi não é eficiente nem por ingestão de dsRNA, nem por injeção na hemolinfa (Reis *et al.*, 2022), tornando a validação por RNAi nesta espécie inviável. Outra solução seria a geração de linhagens nocaute por CRISPR-Cas9 associado com estudos de biologia e análise de transcritômica para se ter uma resposta direta e global da ação dos inseticidas e a função dos genes do inseto estudados. Portanto, futuros trabalhos serão necessários para entendimento completo destes processos.

Conclusões

Em média, foram identificados um gene de CHS2, 7 genes de CDA e 10 genes de quitinases nos transcritomas intestinais de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*. Estes genes foram semelhantes quanto a completude, tamanho e número de domínios, mostrando a conservação destas características entre as espécies estudadas. Isto também ficou demonstrado na análise filogenética. Também se confirmou a expressão de alguns destes genes no intestino, o que possibilitou a análise de expressão sob o tratamento com doses subletais dos inseticidas a base de lufenuron e *B. thuringiensis* via alimentação. Finalmente, ficou caracterizado que os inseticidas ativam a mesma CDA, porém alteram a expressão de quitinases diferentes. Portanto, estes resultados podem servir de base para estudos mais aprofundados a respeito da compreensão da ação de inseticidas inibidores de síntese de quitina e biológicos na fisiologia e manutenção da membrana peritrófica de insetos-praga.

Agradecimentos

Eu agradeço a FACEPE pela concessão da bolsa de estudos, e ao CNPq e a Capes pelo financiamento da pesquisa.

Literatura Citada

- Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Rev. Tecnol. Indust. Açuc. Álcool 36: 45-48.
- Arakane, Y., Q. Zhu., M. Matsumiya., S. Muthukrishnan & K.J. Kramer. 2003.** Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 631–648.
- Arakane, Y., R. Dixit., B. Khurshida, P. Yoonseong, et al. 2009.** Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. Insect Biochem Mol Biol. 39: 355-365.
- Arakane, Y., & S. Muthukrishnan. 2010.** Insect chitinase and chitinase-like proteins. Cell. Mol. Life Sci. 67: 201-216.
- Abbott, W. S. 1925.** A method for computing the effectiveness of insecticides. J of Econ Entomol. 25: 265-267, 1925.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira., J.D. Antonino., G.G.A. Gonçalves., H.N. Costa HN., Ferreira M.C.N., C. L. Neto., L.C. Alves., F.A.B. Santos & A.A.C. Teixeira. 2021.** Lufenuron indirectly downregulates Vitellogenin in the boll weevil females reducing egg viability. Physiol Entomol. 46:24–33.
- Clarke, L., G.H. Temple & J.F. Vincent. 1977.** The effects of a chitin inhibitor-dimilin- on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. J of Insect Physiol 23, 241– 246.
- Dixit, R., Y. Arakane, C. A. Specht, C. Richard, K. J. Kramer, R. W. Beeman & S. Muthukrishnan. 2008.** Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. Insect Bioch. Mol. Biol. 38: 440-451
- Doucet, D & A. Retnakaran. 2012.** Targeting Cuticular Components for Pest Management. 2012. 369-407.
- Fernandes, F. O., T. D. Souza, A. C. Sanches, N. P. Dias, J. A. Desiderio & R. A. Polanczyk. 2021.** Sub-lethal effects of a Bt-based bioinsecticide on the biological conditioning of *Anticarsia gemmatilis*. Ecotoxicol. 30: 2071-2082
- Finney, D. J. 1971.** Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 06- 333.
- Fonseca, A. P. P., E. J. Marques, J. B. Torres, L. M. Silva & H. A. A. Siqueira. 2015.** Lethal and sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. Ecotoxicol. 24: 1869-1879

- Hafeez, M., S. Jan, M. Nawaz, E. Ali, B. Ali, M. Qasim, G. M. Fernandez-Grandon, M. Shahid & M. Wang. 2019.** Sub-lethal effects of lufenuron exposure on spotted bollworm *Earias vittella* (Fab): key biological traits and detoxification enzymes activity. *Env. Sci. Poll. Research.* 26: 14300-14312.
- Han, G., L. Xiumin., T. Zhang., X. Zhu & J. Li. 2015.** Cloning and Tissue-Specific Expression of a Chitin Deacetylase Gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Response to *Bacillus thuringiensis*, *J. of Insect Sci.* 15:95-102.
- Hegedus, D. D., D.B.U, Toprak & C. E, Martin. 2019.** Peritrophic matrix formation. *J of insect physiol.* 117:103- 1112.
- Hegedus, D., M, Erlandson., C, Gillott & U, Toprak. 2009.** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 285–302.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Lee, J.-B., H. S. Kim & Y. Park. 2017.** Down-regulation of a chitin synthase a gene by RNA interference enhances pathogenicity of *Beauveria bassiana* ANU1 against *Spodoptera exigua* (HÜBNER). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 94: e21371.
- Lefort, V., J. E, Longueville., O, Gascuel. 2017.** SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol Biol Evol.* 34: 2422-2424.
- Liu, X., A.M.W. Cooper, J. Zhang & K.Y, Zhu. 2019.** Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *J. Insect Physiol.* 114: 110-115.
- Liao, Z.H., T.C, Kuo., C.H, Kao., T.M, Chou., Y.H, Kao & R.N, Huang. 2016.** Identification of the chitinase genes from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Bull. Entomol. Res.* 2016; 106: 769-780.
- Martínez-Zavala, S.A., U.E., Barboza-Pérez & G. Hernández-Guzmán.** Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. 2020. *Front. Microbiol.* 10- 3024-3032.
- Merzendorfer, H & I. Zimoch. 2003.** Chitin metabolism in insects structure, function and regulation of chitin synthases and chitinares. *J. Exp biol.* 206: 4393-4412.
- Merzendorfer, H. 2006.** Insect chitin synthases: a review. *J. Comp Physiol.* 176: 1-15.
- Merzendorfer, H. 2011.** The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and diferences. *J. Cell Biol.* 90: 759- 769.

- Merzendorfer H., H.S, Kim., S.S, Chaudhari., M, Kumari., C.A, Specht., S, Butcher., S.J, Brown., J, Robert- Manak., R.W, Beeman & K.J, Kramer. 2012.** Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* 42: 264-276.
- Mitter, C., D. R. Davis & M. P. Cummings. 2017.** Phylogeny and Evolution of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 62: 265-283.
- Noriega, D.D., F.B.M. Arraes, J.D. Antonino, L.L.P. Macedo, F.C.A. Fonseca, R.C. Togawa, P. Grynberg, M.C.M. Silva & M.F. Grossi-de-Sá. 2020.** Comparative gut transcriptome analysis of *Diatraea saccharalis* in response to the dietary source. *Plos one.* 15: e0235575.
- Noriega, D.D., F.B.M. Arraes, J.D. Antonino, L.L.P. Macedo, F.C.A. Fonseca, R.C. Togawa, P. Grynberg, M.C.M. Silva & M.F. Grossi-de-Sá. 2020.** Transcriptome analysis and knockdown of the juvenile hormone esterase gene reveal abnormal feeding behavior in the sugarcane giant bore. *Front. Physiol.* 11:1386-1398.
- Royer, V., S, Fraichard & H, Bouhin. 2002.** A novel putative insect chitinase with multiple catalytic domains: hormonal regulation during metamorphosis. *Biochemical Journal* 366: 921–928.
- Soltani, N. 1984.** Effects of ingested diflubenzuron on the longevity and the peritrophic membrane of adult mealworms (*Tenebrio molitor* L.). *Pesticide Science.* 15: 221– 225.
- Su, C. G., S, Tu., Q, Huang., M.F, Yang & F, Shahzad. 2016.** Genome- wide analysis of chitinase genes and their varied functions in larval moult, pupation and eclosion in the rice striped stem borer *Chilo suppressalis*. *Insect Mol Biol.* 25: 401-412.
- Tetreau, G., C, Xiao., Y. R, Chen & P, Wang. 2015.** Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 62: 114-126.
- Terra, W.R. & C, Ferreira. 2012.** Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. *Insect Mol. Biol. and Biochem.* 365–418.
- Xin, T., Z, Li., J, Chen., J, Wang., Z, Zou & B, Xia. 2021.** Molecular characterization of chitin synthase gene in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and its response to sublethal concentrations of an insecticide. 2021. *Insects*, 12:501- 513.
- Zhang, M., Y.N, Ji., X.B, Zhang., P.J, Ma., Y.W, Wang., B, Moussian & J.Z, Zhang. 2019.** The putative chitin deacetylases *Serpentine* and *Vermiform* have non-redundant functions during *Drosophila* wing development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 110: 128–135.
- Zhao, X.X., G.M, Situ., K, He., H.M, XiaO., C.C, Su & L, Li 2018.** Function analysis of eight chitinase genes in rice stem borer and their potential application in pest control. *Pest Manag Sci.* 10- 12525- 12538.

- Zhu, Q., Y. Arakane, R. W. Beeman, K. J. Kramer & S. Muthukrishnam. 2008.** Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *PNAS*. 105: 6650-6655.
- Zhuo W., Y. Fang., L. Kong., X. Li & Y. Sima. 2011.** Chitin synthase A: a novel epidermal development regulation gene in the larvae of *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.* 41:4177–86.
- Zhuo, W., F. Chu, L. Kong, H. Tao, Y. Sima & S. Xu. 2014.** Chitin synthase B: a midgut specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *bombyx mori* larvae. *Arch. Insect Physiol.* 85: 36-47.
- Wan, J., C. Huang., C. Li., H. Zhou, H., Y. Ren., Z. Li., L. Xing., B. Zhang., X. Qiao., B. Liu, & F. Wan. 2021.** Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J of Integ. Agricul.* 20: 646-663.
- Yang, Q & M. Qu. 2011.** A novel alternative splicing site of class A chitin synthase from the insect *Ostrinia furnacalis*—gene organization, expression pattern and physiological significance. *Insect Biochem Mol. Biol.* 41:923–31.
- Yao J., L.L Buschman., N. Lu., C. Khajuria & K.Y., Zhu KY. 2014.** Changes in gene expression in the larval gut of *Ostrinia nubilalis* in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1ab protoxin ingestion. *Toxins*: 6: 1274–1294.

Tabela 1. Primers utilizados nos experimentos de qCPR. Os primers foram projetados para possuírem temperatura de anelamento de 60 °C.

Grupo	Gene	Tipo	Nome do Primer	Sequência (5'-3')
Genes referência	<i>DsacGAPDH</i>	Normalizador	Dsac_GAPDH_Fw	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG
			Dsac_GAPDH_Rv	GTTGTTCATTGAGTGAGATACCG
	<i>DsacRPS10</i>	Normalizador	Dsac_RPS10_Fw	TGATCGCTTCAGTGTTGCTG
			Dsac_RPS10_Rv	TCTCAAATCCAGGGGTTACG
	<i>DsacB-Tubulin</i>	Normalizador	Dsac_B-tub_Fw	CAAGAACTCGTCCTACTTCGTC
			Dsac_B-tub_Rv	CGGTGAACTGTTCCGAGATG
Quitina sintase	<i>DsacCHS2</i>	Gene-alvo	CHSB_qPCR_Fw2	TGGCTACACGTAAGGCAACTT
			CHSB_qPCR_Rv2	CATCGGGTGCGTTATAAAAGA
Quitina desacetilases	<i>DsacCDA_c30476</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c30476_Fw	GAGGACCCCACTAACGATGA
			DsacCDA_c30476_Rv	CAAGCTGCGTGGAAGTACAA
	<i>DsacCDA_c34976</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c34976_Fw	ACGAGTCTCTGCCAGGTTGT
			DsacCDA_c34976_Rv	AGTGGAGACCAAGAGGAGCA
	<i>DsacCDA_c6616</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c6616_Fw	CCTACATTGGGCAGCTGATT
			DsacCDA_c6616_Rv	CGCACTTGTTTGCAAGTTA
	<i>DsacCDA_c5038</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c5038_Fw	TGACTTGCTGTTGATTCCA
			DsacCDA_c5038_Rv	ACGCCGTCATCGAAAGTAAC
	<i>DsacCDA_c32385</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c32385_Fw	TGGGCTTGCTTGCTATTTTC
			DsacCDA_c32385_Rv	GGGAATTGCTGTGGATGAAC
	<i>DsacCDA_c9780</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c9780_Fw	ACGTACACGAATGGCACGTA
			DsacCDA_c9780_Rv	TGGTGACTTCACCCAATCAA
	<i>DsacCDA_c37171</i>	Gene-alvo	DsacCDA_c37171_Fw	CCGAATCTCCAAGACGAAAA
			DsacCDA_c37171_Rv	CTGCAGGGTAAGCAGACACA
		Gene-alvo	DsacCDA_c37171_Fw2	ATGGCCTTCCTTGCACTATG
			DsacCDA_c37171_Rv2	CGTGGATGTAAAAGCCGAAT
Quitinases	<i>DsacCHT_c27374</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c27374_Fw	GAATCAGGGTGGACCAAGAA
			DsacCHT_c27374_Rv	ATCCATGTCGATAGCCCAAG
	<i>DsacCHT_c8776</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c8776_Fw	TACAGTCGATGTTGCTGTGAAGT
			DsacCHT_c8776_Rv	CCGTTCTCATCAACGGAAGT
	<i>DsacCHT_c13022</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c13022_Fw	ACAAATTTCCCAGCAACAGC
			DsacCHT_c13022_Rv	TGACTGCTTTCAATCCACCA
	<i>DsacCHT_c29099</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c29099_Fw	CTGCCGTCGAATATGCTGTA
			DsacCHT_c29099_Rv	TTTCTCTTGGCCTTCCTTCA
	<i>DsacCHT_c33738</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c33738_Fw	CTGCGAGCATGAATTAAACG
			DsacCHT_c33738_Rv	AGTTCAGTTTGCCGTTGGAC
	<i>DsacCHT_c26113</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c26113_Fw	GTGGCAGCACCCAAGACTAT
			DsacCHT_c26113_Rv	AGAGGGGAGTTGAAGCCTGT
	<i>DsacCHT_c33919</i>	Gene-alvo	DsacCHT_c33919_Fw	TGTAGTGGGTGTTGCCATGT
			DsacCHT_c33919_Rv	ATATTTCCCATTTGCCAGCAG

Tabela 2. Características *in silico* dos genes e proteínas preditas das quitina sintases (CHS2) encontradas nos transcritomas intestinais dos três lepidópteros-praga da cana-de-açúcar.

Espécie	Gene	ORF Completa?	ORF (bp)	Proteína predita (aa)	Massa téorica (kDa)	Ponto isolétrico teórico (pI)
<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>DsacCHS2</i>	Sim	4554	1517	173.61	6.08
<i>Diatraea impersonatella</i>	<i>DimpCHS2</i>	Sim	4554	1517	173.55	6.06
<i>Telchin licus</i>	<i>TlicCHS2</i>	Sim	4620	1539	176.60	6.34

Tabela 3. Características *in silico* dos genes e proteínas preditas das quitina desacetilases (CDAs) encontradas nos transcritomas intestinais dos três lepidópteros-praga da cana-de-açúcar.

Espécie	Gene	ORF Completa?	%	Grupo	ORF (bp)	Proteína predita (aa)	Massa téorica (kDa)	Ponto isoelétrico teórico (pI)
<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>DsacCDA_c30476</i>	Sim	100	I	1614	537	61.33	5.11
	<i>DsacCDA_c34976</i>	Sim	100	I	1632	543	61.65	5.21
	<i>DsacCDA_c6616</i>	Sim	100	III	1500	499	56.75	5.53
	<i>DsacCDA_33637</i>	Não	60.3	IV	NA	NA	NA	NA
	<i>DsacCDA_c5038</i>	Sim	100	V	1146	381	43.17	4.82
	<i>DsacCDA_c32385</i>	Sim	100	V	1155	384	43.29	4.92
	<i>DsacCDA_c9780</i>	Sim	100	V	1161	386	44.45	5.38
	<i>DsacCDA_c37171</i>	Sim	100	V	1149	382	43.07	4.97
<i>Diatraea impersonatella</i>	<i>DimpCDA_c16224</i>	Sim	100	I	1614	537	61.33	5.11
	<i>DimpCDA_c3729</i>	Sim	100	I	1632	543	61.70	5.21
	<i>DimpCDA_c11846</i>	Sim	100	III	1500	499	56.23	5.70
	<i>DimpCDA_DN5820</i>	Não	59.5	IV	NA	NA	NA	NA
	<i>DimpCDA_c12507</i>	Sim	100	V	1179	392	44.28	4.92
	<i>DimpCDA_c13401</i>	Sim	100	V	1107	368	41.73	5.48
<i>Telchin licus</i>	<i>TlicCDA_c51763</i>	Sim	100	I	1620	540	61.39	5.02
	<i>TlicCDA_c36840</i>	Sim	100	I	1632	543	61.88	5.22
	<i>TlicCDA_c1928</i>	Sim	100	III	1494	497	56.46	5.74
	<i>TlicCDA_c7241</i>	Sim	100	IV	2622	873	97.96	6.14
	<i>TlicCDA_c48554</i>	Sim	100	V	1149	382	43.32	5.03
	<i>TlicCDA_c26322</i>	Não	99	V	1137*	378	42.78	4.76
	<i>TlicCDA_c13662</i>	Sim	100	V	1161	386	44.06	5.38

*ORF parcial > 90% da média do tamanho do gene em Lepidoptera

Tabela 4. Características *in silico* dos genes e proteínas preditas das quitinases (CHT) encontradas nos transcritomas intestinais dos três lepidópteros-praga da cana-de-açúcar.

Espécie	Gene	ORF Completa?	%	Grupo	ORF (bp)	Proteína predita (aa)	Massa teórica (kDa)	Ponto isolétrico teórico (pI)
<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>DsacCHT_c27374</i>	Sim	100	I	1656	551	61.49	5.53
	<i>DsacCHT_c21631</i>	Não	33.13	II	NA	NA	NA	NA
	<i>DsacCHT_c33849</i>	Não	33.63	III	NA	NA	NA	NA
	<i>DsacCHT_c29099</i>	Sim	100	IV	1191	396	43.98	4.78
	<i>DsacCHT_c8776</i>	Sim	100	IV	1233	410	45.30	5.01
	<i>DsacCHT_c13022</i>	Sim	100	IV	1482	493	54.45	5.48
	<i>DsacIGDF_c3077</i>	Sim	100	V	1305	434	48.31	6.80
	<i>DsacCHT_c33738</i>	Sim	100	VII	1611	536	60.17	6.06
	<i>DsacCHT_c26113</i>	Sim	100	VIII	1434	477	53.54	8.42
	<i>DsacCHT_c33919</i>	Sim	100	h	1665	554	61.34	5.79
<i>Diatraea impersonatella</i>	<i>DimpCHT_DN16717_DN26153_DN1303</i>	Não	76.4	I	NA	NA	NA	NA
	<i>Dimp_DN12398</i>	Não	27.83	II	NA	NA	NA	NA
	<i>Dimp_DN20147_DN25991</i>	Não	61.21	III	NA	NA	NA	NA
	<i>DimpCHT_DN12421</i>	Sim	100	IV	1479	492	54.53	5.58
	<i>DimpCHT_DN13614</i>	Não	96	IV	1146*	381*	42.14	4.93
	<i>DimpCHT_DN13156</i>	Sim	100	IV	1191	396	43.70	4.53
	<i>DimpIGDF_DN11781</i>	Sim	100	V	1305	434	48.35	6.80
	<i>DimpCHT_DN5762</i>	Não	12.83	VI	NA	NA	NA	NA
	<i>DimpCHT_DN9280</i>	Sim	100	VII	1611	536	60.08	6.06
	<i>DimpCHT_DN10459</i>	Sim	100	VIII	1431	476	53.57	8.83
	<i>DimpCHT_DN9259</i>	Sim	100	h	1665	554	61.29	5.86
<i>Telchin licus</i>	<i>TlicCHT_c21325</i>	Sim	100	I	1659	552	61.83	5.12
	<i>TlicCHT_c44999</i>	Não	68.26	II	NA	NA	NA	NA
	<i>TlicCHT_c18375_c22779</i>	Não	69.59	III	NA	NA	NA	NA
	<i>TlicCHT_c48822</i>	Sim	100	IV	1536	511	57.02	4.99
	<i>TlicCHT_c38512</i>	Sim	100	IV?	1194	397	43.64	4.17
	<i>TlicCHT_c10550</i>	Sim	100	IV?	1158	385	41.88	3.99
	<i>TlicIGDF_c45224</i>	Sim	100	V	1305	434	47.89	7.65
	<i>TlicCHT_c2100</i>	Sim	100	VII	1539	512	57.49	6.15
	<i>TlicCHT_c38485</i>	Sim	100	VIII	1515	504	57.61	9.18
	<i>TlicCHT_c10913</i>	Sim	100	h	1671	556	61.31	6.17

*ORF parcial > 90% da média do tamanho do gene em Lepidoptera

Tabela 5. Determinação de concentrações subletais dos inseticidas a base de lufenuron e *Bacillus thuringiensis* para lagartas de 3º instar de *Diatraea saccharalis*.

Produto	Princípio ativo	N	Inclinação ($\pm$ EP)	CL ₃₀ (IC95) µg/mL	CL ₅₀ (IC95) µg/mL
Agree ®	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa GC 91	120	1,905 $\pm$ 0,267	114,80 (41,14- 203,02)	216,39 (110,86 - 414,33)
Match ®	Lufenuron	140	1,019 $\pm$ 0,169	3,04 (1,34- 5,15)	9,93 (5,96 - 16,39)

Telchin licus

TlicCHS2_c33674



Diatraea impersonatella

DsacCHS2_c20893



Diatraea saccharalis

DimpCHS2_DN12423



Legenda



Domínio Transmembrana



Domínio da quitina sintase C (Chitin synth_C)

Figura 1. Análise de domínios conservados das proteínas preditas de quitina sintases de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus* utilizando o banco de domínios conservados CDD (NCBI). Os domínios transmembrana foram identificados através do algoritmo Phobius.

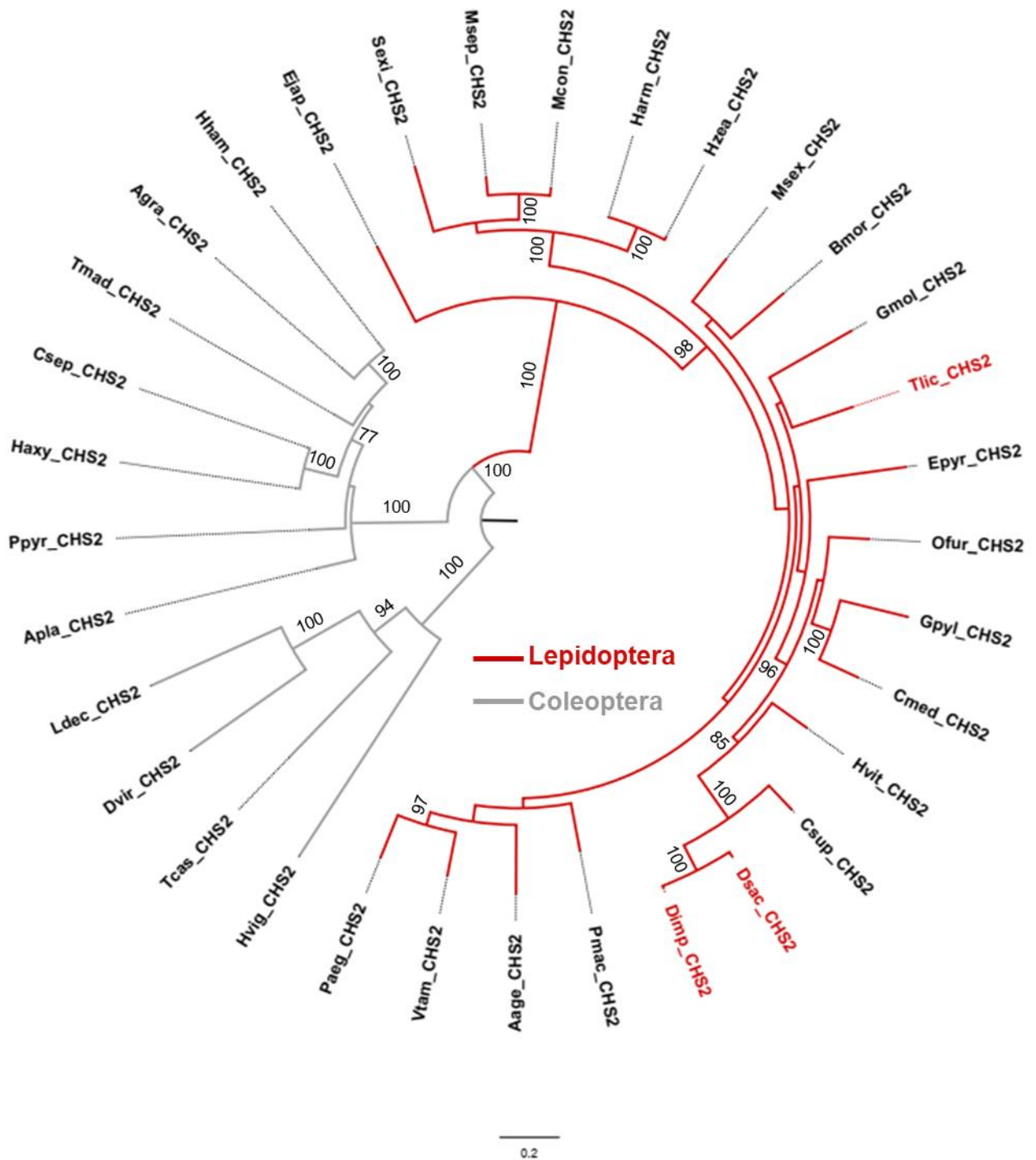


Figura 2. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para quitina sintases de Lepidoptera e Coleoptera. Os ramos de Lepidoptera estão em vermelho e os de Coleoptera em cinza. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em vermelho. O alinhamento

foi realizado no programa MEGA 7.0 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0. Os valores de bootstrap acima de 70 estão mostrados nos respectivos ramos.

Dsac: *Diatraea saccharalis*; Dimp: *Diatraea impersonatella*; Tlic: *Telchin licus*; Ejap: *Eumeta japonica*; Sexi: *Spodoptera exigua*; Msep: *Mythimna separata*; Mcon: *Mamestra configurata*; Harm: *Helicoverpa armigera*; Hzea: *Helicoverpa zea*; Msex: *Manduca sexta*; Bmor: *Bombyx mori*; Gmol: *Grapholitha molesta*; Epyr: *Euzophera pyriella*; Ofur: *Ostrinia furnacalis*; Gpyl: *Glyphodes pyloalis*; Cmed: *Cnaphalocrocis medinalis*; Hvit: *Heortia vitessoides*; Csup: *Chilo suppressalis*; Pmac: *Papilio machaon*; Aage: *Aricia agestis*; Vtam: *Vanessa tameamea*; Paeg: *Pararge aegeria*; Hvig: *Henosepilachna vigintioctopunctata*; Tcas: *Tribolium castaneum*; Dvir: *Diabrotica virgifera*; Ldec: *Leptinotarsa decemlineata*; Apla: *Agrilus planipennis*; Ppyr: *Photinus pyralis*; Haxy: *Harmonia axydiris*; Csep: *Coccinella septempunctata*; Tmad: *Tribolium madens*; Agra: *Anthonomus grandis*; Hham: *Hypothenemus hampei*.

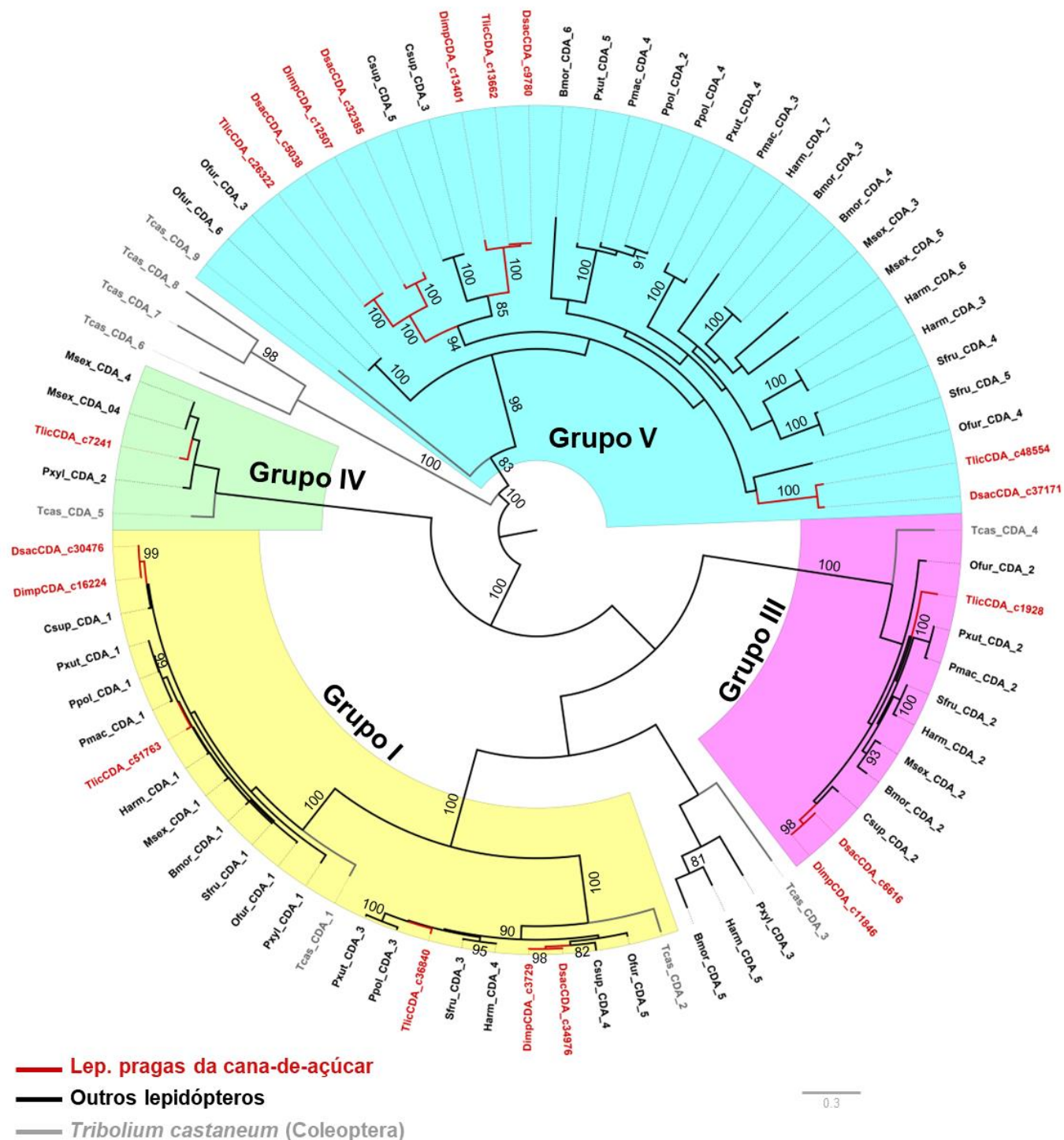


Figura 4. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para quitina desacetilases de Lepidoptera. A espécie *Tribolium castaneum* (Coleoptera) foi utilizada como grupo externo para os diferentes grupos. Os ramos de Lepidoptera estão em preto e os de *T. castaneum*

estão em cinza. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em vermelho. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7.0 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0. Os valores de bootstrap acima de 70 estão mostrados nos respectivos ramos. As quitinas desacetilases são divididas em cinco grupos de acordo com a presença dos domínios funcionais e suas relações filogenéticas, porém nesta análise estão mostrados apenas sequências dos grupos que foram encontrados no transcrito intestinal das três espécies estudadas. Os grupos estão assinalados em cores diferentes. Dsac: *Diatraea saccharalis*; Dimp: *Diatraea impersonatella*; Tlic: *Telchin licus*; Sfru: *Spodoptera frugiperda*; Harm: *Helicoverpa armigera*; Msex: *Manduca sexta*; Bmor: *Bombyx mori*; Ofur: *Ostrinia furnacalis*; Csup: *Chilo suppressalis*; Pmac: *Papilio machaon*; Pxut: *Papilio xuthus*; Ppol: *Papilio polites*; Pxyl: *Plutella xylostella*; Tcas: *Tribolium castaneum*.

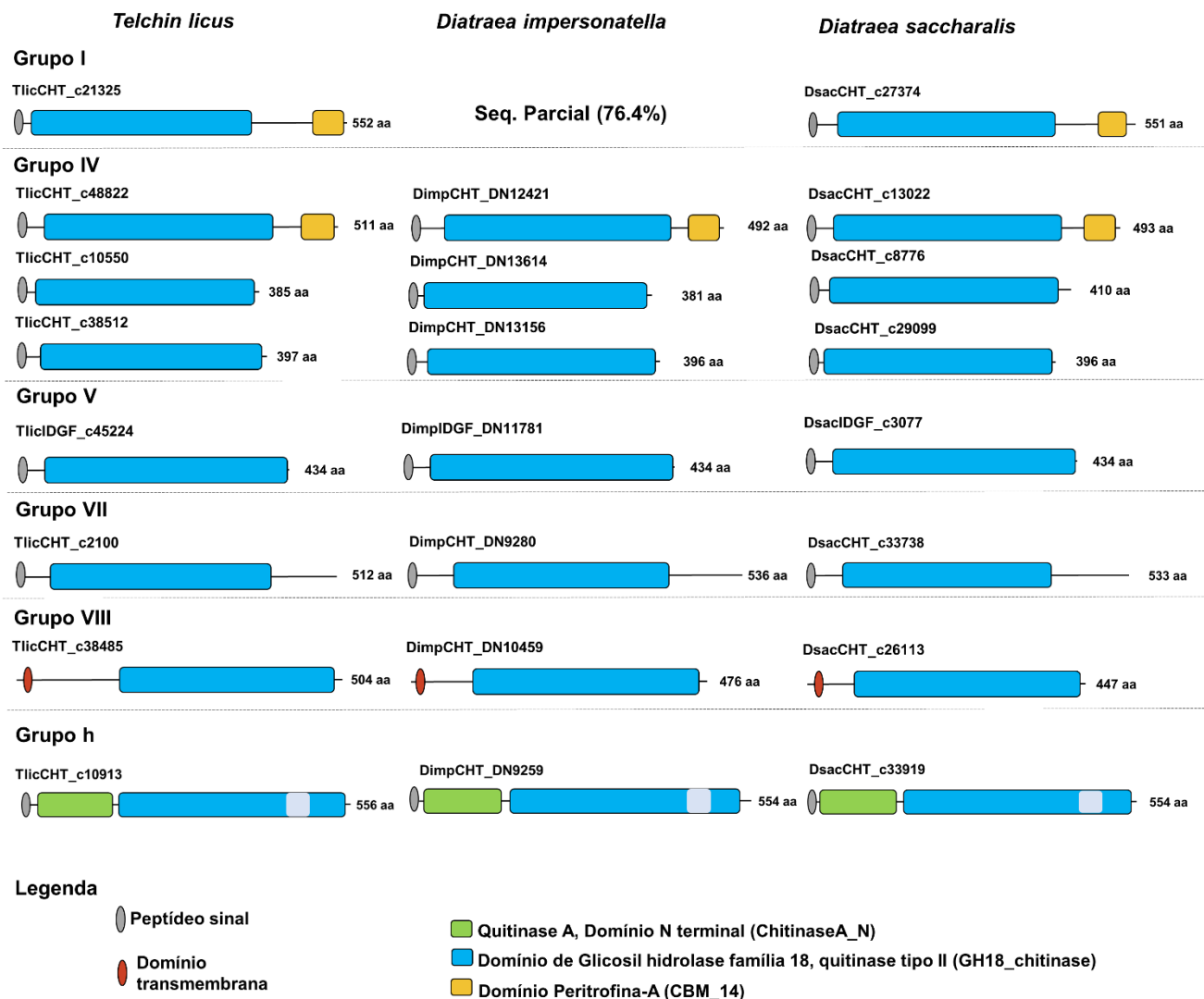


Figura 5. Análise de domínios conservados das proteínas preditas de quitinases e parecidas com quitinases (“chitinase-like”) de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus* utilizando o banco de domínios conservados CDD (NCBI). Os peptídeos sinal e domínios transmembrana foram identificados através do algoritmo Phobius. CHT: quitinase; IDGF: “Imaginal Disc Growth Factor”.

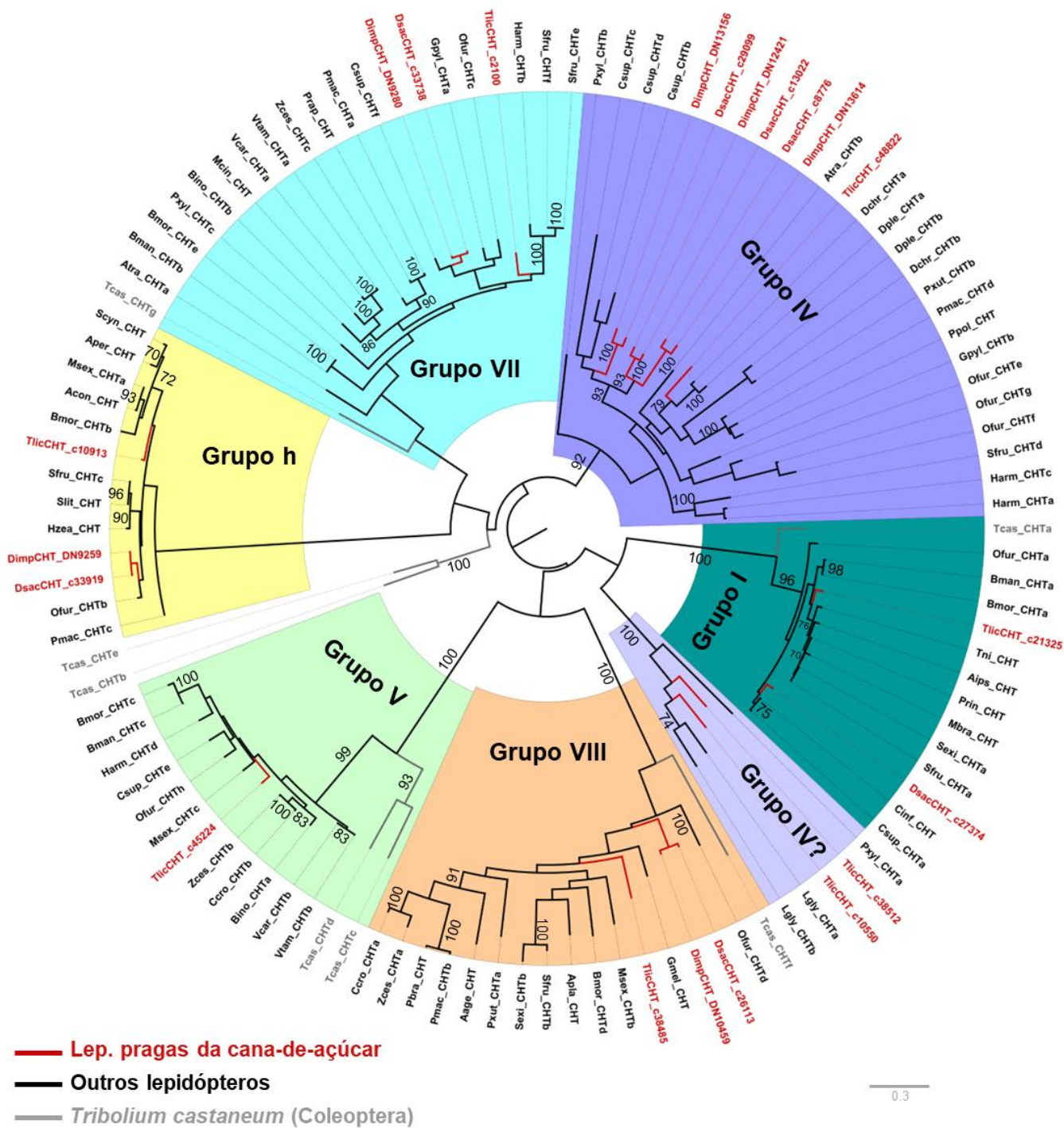


Figura 6. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para sequências de quitinases e parecidas com quitinases (“chitinase-like”) de Lepidoptera. A espécie *Tribolium castaneum* (Coleoptera) foi utilizada como grupo externo para os diferentes grupos. Os ramos de

Lepidoptera estão em preto e os de *T. castaneum* estão em cinza. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em vermelho. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7.0 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0. Os valores de bootstrap acima de 70 estão mostrados nos respectivos ramos. As quitinases são divididas em até 11 grupos de acordo com a presença dos domínios funcionais e suas relações filogenéticas em Lepidoptera. Porém, nesta análise estão mostrados apenas sequências dos grupos que foram encontrados no transcrito intestinal das três espécies estudadas. Os grupos estão assinalados em cores diferentes. Dsac: *Diatraea saccharalis*; Dimp: *Diatraea impersonatella*; Tlic: *Telchin licus*; Atra: *Amyelois transitella*; Sfru: *Spodoptera frugiperda*; Sexi: *Spodoptera exigua*; Slit: *Spodoptera litura*; Harm: *Helicoverpa armigera*; Hzea: *Helicoverpa zea*; Msex: *Manduca sexta*; Bmor: *Bombyx mori*; Bman: *Bombyx mandarina*; Ofur: *Ostrinia furnacalis*; Csup: *Chilo suppressalis*; Pmac: *Papilio machaon*; Pxut: *Papilio xuthus*; Ppol: *Papilio polites*; Pxyl: *Plutella xylostella*; Bino: *Brenthis ino*; Pbra: *Pieris brassicae*; Aper: *Antheraea pernyi*; Mcin: *Melitaea cinxia*; Vcar: *Vanessa cardui*; Vtam: *Vanessa tameamea*; Zces: *Zerene cesonia*; Prap: *Pieris rapae*; Scyn: *Samia cynthia*; Gpyl: *Glyphodes pyloalis*; Ccro: *Colias croceus*; Dchr: *Danaus chrysippus*; Dple: *Danaus plexippus*; Tni: *Trichoplusia ni*; Aips: *Agrotis ipsilon*; Mbra: *Mamestra brassicae*; Cinf: *Chilo infuscatellus*; Lgly: *Leguminivora glycinivorella*; Gmel: *Galleria mellonella*; Apla: *Arctia plantaginis*; Aage: *Aricia agestis*; Acon: *Agrius convolvuli*; Tcas: *Tribolium castaneum*.

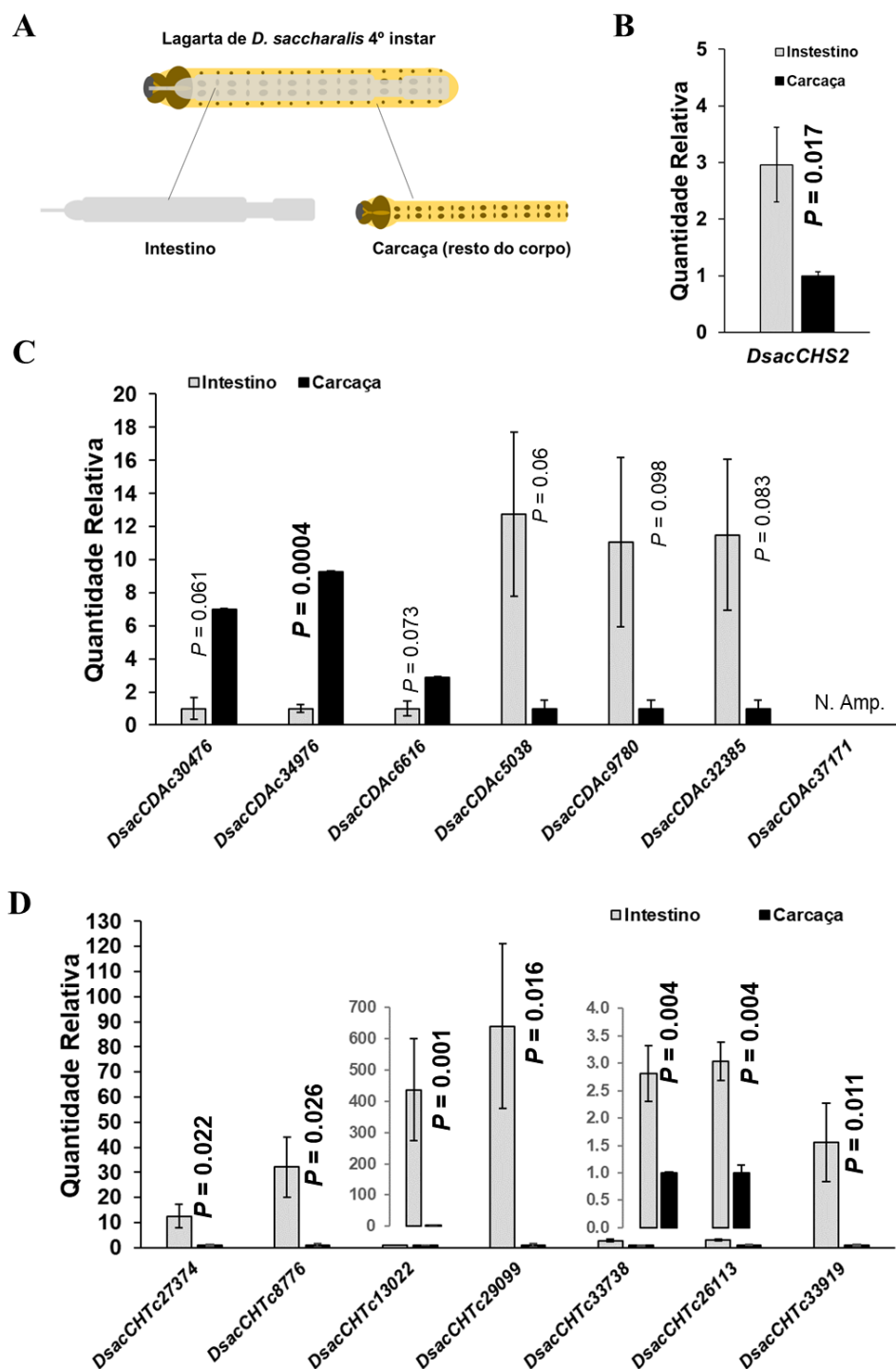


Figura 7. Expressão dos genes envolvidos no metabolismo de quitina no intestino e carcaça de lagartas de 4º instar de *Diatraea saccharalis*. A) Figura esquemática mostrando a carcaça e o intestino de lagartas de *D. saccharalis*. B) Expressão do gene de Quitina Sintase 2 (*DsacCHS2*). C)

Expressão dos genes de quitina desacetilases (*DsacCDAs*). D) Expressão dos genes de quitinases (*DsacCHTs*). A expressão de cada gene foi comparada entre os dois tecidos por teste t utilizando o software SATQPCR. Valores de *P* menores que 0,05 são considerados significativos e estão destacados em negrito.

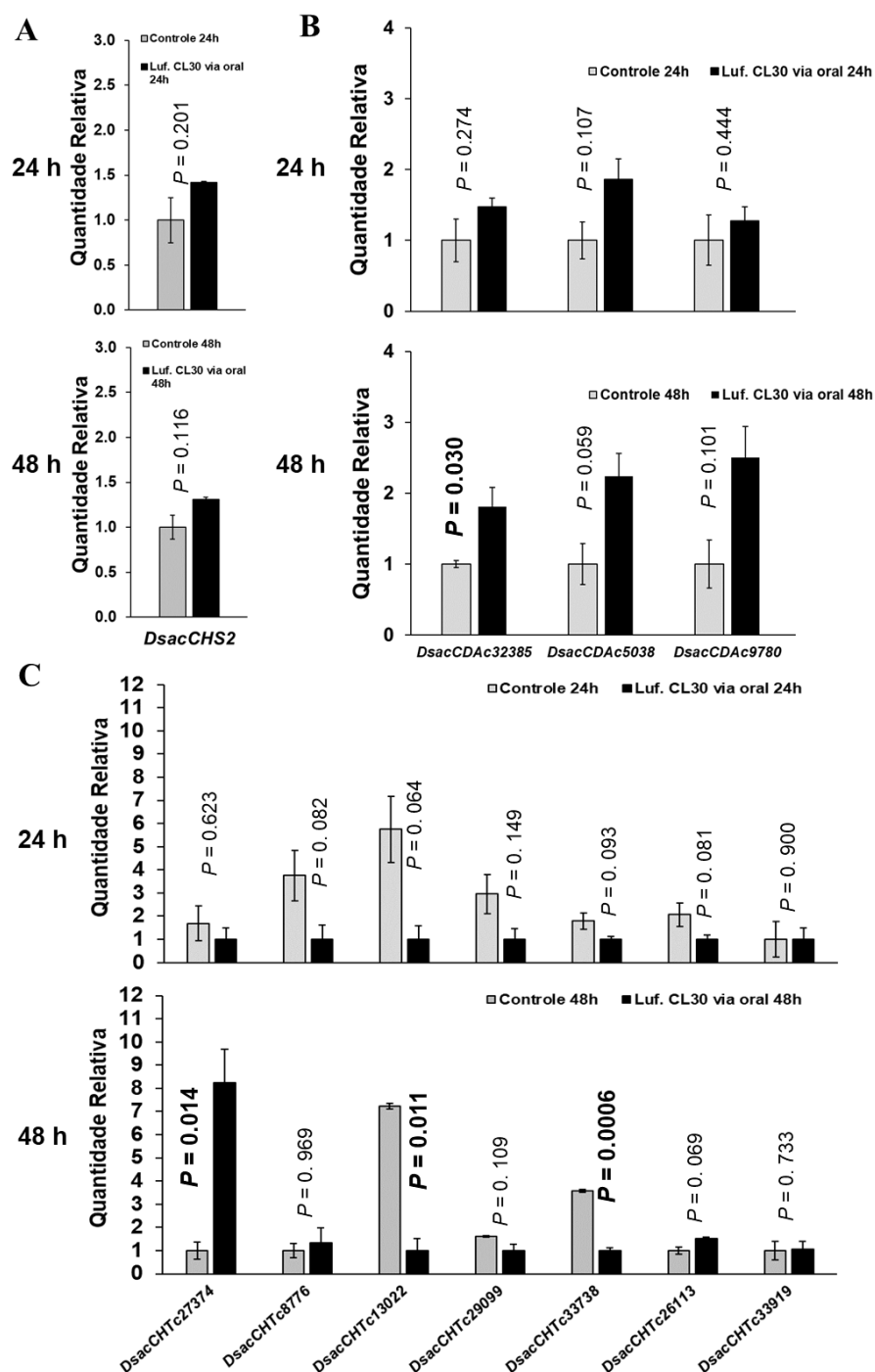


Figura 8. Expressão dos genes envolvidos no metabolismo de quitina em lagartas de 4º instar de *Diatraea saccharalis* 24 e 48 h após serem tratadas com uma concentração subletal de lufenuron via alimentação. A) Expressão do gene de Quitina sintase 2 (*DsacCHS2*). B) Expressão dos genes de quitina desacetilases (*DsacCDAs*). C) Expressão dos genes de quitinases (*DsacCHTs*). A expressão

de cada gene foi comparada entre insetos tratados e não-tratados por teste t utilizando o software SATQPCR. Valores de *P* menores que 0,05 são considerados significativos e estão destacados em **negrito**.

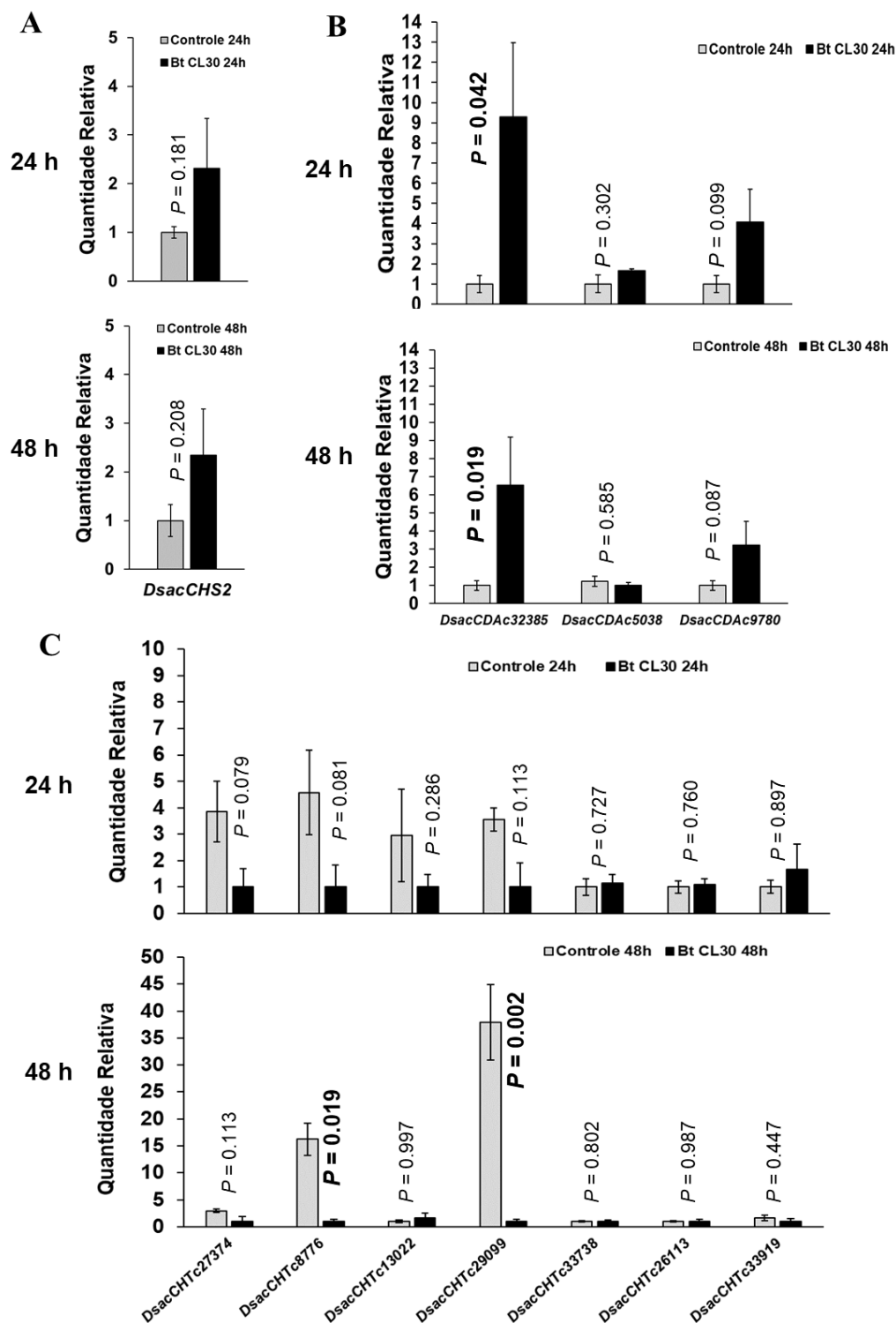


Figura 9. Expressão dos genes envolvidos no metabolismo de quitina em lagartas de 4º instar de *Diatraea saccharalis* 24 e 48 h após serem tratadas com uma concentração subletal de *Bacillus*

thuringiensis aizawai cepa GC-91. A) Expressão do gene de Quitina sintase 2 (*DsacCHS2*). B) Expressão dos genes de quitina desacetilases (*DsacCDAs*). C) Expressão dos genes de quitinases (*DsacCHTs*). A expressão de cada gene foi comparada entre insetos tratados e não-tratados por teste *t* utilizando o software SATQPCR. Valores de *P* menores que 0,05 são considerados significativos e estão destacados em negrito.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho identificou-se em transcritomas intestinais de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*, alguns dos principais genes responsáveis pelo metabolismo de quitina no intestino destas pragas. Constatou-se também que seja em espécies do mesmo gênero ou de famílias diferentes, os genes encontrados parecem ser bem conservados quanto a presença no transcritoma e na arquitetura de domínios. Também foi possível notar que genes que são mais expressos no intestino foram recuperados de forma completa independentemente do tamanho (ex. *CHS2*). Já genes que são expressos em maior quantidade na carcaça são recuperados de forma completa se possuírem até 1600 pb (ex. *CDAs* grupo I e *CHTs* grupo I), porém, genes maiores (ex. *CDA* grupo IV; *CHTs* grupos II, III e VI) são recuperados de forma incompleta ou não são identificados nem parcialmente.

Também se identificou que em *D. saccharalis* o tratamento com concentrações subletais de lufenuron ou *B. thuringiensis* não altera a expressão de *DsacCHS2*. Além disso, a mesma *CDA* (*DsacCDAc32385*) tem sua expressão aumentada sob o tratamento dos dois inseticidas testados. Finalmente, estes mesmos inseticidas alteram a expressão de quitinases diferentes, sem sobreposição. Lufenuron altera a expressão das quitinases *DsacCHTc27374* (I), *DsacCHTc13022* (IV) e *DsacCHTc33738* (VII). Já *B. thuringiensis* altera a expressão de *DsacCHTc8776* e *DsacCHTc29099* (ambas do grupo IV). É importante salientar que ainda não se sabe se estas alterações são de ação direta ou indireta dos inseticidas testados. Porém, sabe-se que de alguma forma esses inseticidas alteram a regulação da manutenção da membrana peritrófica, o que acaba

contribuindo para o desequilíbrio fisiológico do inseto. Por fim estes dados são importantes para compreender melhor a ação de inseticidas sob o metabolismo intestinal de quitina e quem sabe pode ser base para o desenvolvimento ou melhoramento de ferramentas e estratégias de controle destas pragas tão importantes para a cultura da cana-de-açúcar.