

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Identificação e caracterização de receptores de β - 1, 3 - Glicanas (β GRPs) em
***Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**

LETÍCIA FERNANDA BRILHANTE DA SILVA

RECIFE
Abril de 2023

LETÍCIA FERNANDA BRILHANTE DA SILVA

**Identificação e caracterização de receptores de β - 1, 3 - Glicanas (β GRPs) em
Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae)**

Monografia apresentada ao
Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas/UFRPE como
requisito parcial para obtenção do
grau de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Orientador: José Dijair Antonino de
Souza Junior.

Co-orientador: Felipe Marinho
Coutinho de souza

RECIFE

Abril de 2023

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)

- S586i Silva, Leticia Fernanda Brilhante
Identificação e caracterização de receptores de ?- 1, 3 - Glicanas (?GRPs) em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) / Leticia Fernanda Brilhante Silva. - 2023.
33 f. : il.
- Orientador: Profº Drº Jose Dijair Antonino de Souza Junior.
Coorientador: Felipe Marinho Coutinho de Souza.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2023.
1. Sistema imune. 2. domínio GH16. 3. PRRs. 4. fungos entomopatogênicos. 5. expressão gênica. I. Junior, Profº Drº Jose Dijair Antonino de Souza, orient. II. Souza, Felipe Marinho Coutinho de, coorient. III. TÃ-tulo

LETÍCIA FERNANDA BRILHANTE DA SILVA

**Identificação e caracterização de receptores de β - 1, 3 - Glicanas (β GRPs) em
Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae)**

Comissão Avaliadora:

Profº Drº José Dijair Antonino de Souza Junior.– UFRPE
Orientador

Drª Roberta Ramos Coelho – UFRPE
Titular

Drª Glaucilane dos Santos Cruz– UFRPE
Titular

MSc Manoely Abreu Reis– UFRPE
Suplente

RECIFE
Abril de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me guiado durante toda a trajetória. Ao meu orientador, professor José Dijair Antonino, por toda paciência, humanidade e sabedoria, serei eternamente grata por tudo. Agradeço também a Felipe Coutinho por ter ajudado no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a minha família por todo apoio, em especial a minha mãe (Luisa Brilhante) e a minha tia (Kátia Brilhante). Ao meu noivo Brendon Carlos por sempre me apoiar em todas as áreas da minha vida.

Ao meu “*Quarteto fantástico*”, irmãos que a UFRPE me proporcionou, Maiely Sena, Ewerton Ferreira, Géssica Alves. Sem eles nada teria feito sentido, obrigada por cada ensinamento, risada, companheirismo.

Maiely, obrigada por ser a nossa base e inspiração. Ewerton, agradeço muito pela parceria e irmandade que formamos, meu irmão. Géssica que sempre esteve comigo exatamente em todos os momentos, desde a primeira disciplina até a conclusão desta monografia, bbzão, obrigada de todo coração. Meus amigos, amo vocês!

Por fim, mas não menos importante, a todos que passaram por minha vida e contribuíram de forma direta e indireta para que este momento fosse possível.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus; sem ele eu não teria capacidade para desenvolver este trabalho. Ao meu orientador, José Dijair Antonino, sem o qual não teria conseguido concluir esta difícil tarefa. A quem colaborou diretamente comigo, Géssica Alves e Felipe Coutinho, minha família e a todos que fizeram parte do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
DEDICATÓRIA	5
SUMÁRIO	6
RESUMO GERAL	7
INTRODUÇÃO	8
REFERENCIAL TEÓRICO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

RESUMO GERAL

Em insetos existe um grupo de proteínas reconhecedoras de padrões moleculares (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos-PAMPs. No caso de PRRs que possuem o domínio GH16 temos as GNBPs / β GRPs que podem reconhecer fungos e bactérias em maior ou menor especificidade, dependendo da proteína e da espécie. As GNBPs/ β GRPs possuem o domínio GH16 C-terminal, porém sem os aminoácidos catalíticos, e um domínio de ligação a carboidratos (CBM) na região N-terminal. Além disso, GNBPs/ β GRPs podem iniciar a sinalização da resposta humoral em duas rotas específicas: (i) a via Toll, que pode combater infecções de fungos e bactérias gram-positivas (melhor caracterizada em *Drosophila*), e (ii) a melanização ativada pelo sistema de profenoloxidasas ou PPOs (especialmente em *Lepidoptera*). O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar *in silico*, as proteínas β GRPs, que possuem o domínio GH16 em *Diatraea saccharalis*. A broca da cana-de-açúcar, importante praga desta cultura, e avaliar a expressão destes genes quando lagartas foram infectadas por patógenos naturais como o fungo *Metarhizium anisopliae*. Foram identificados 4 genes com domínio GH16 em um transcrito intestinal de *D. saccharalis*. *DsGH16_c10227*, provável β -1,3 glucanase, e *DsGH16_c12479*, *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367*, prováveis β GRPs, de acordo com a arquitetura de domínios e relações filogenéticas. Confirmando estes dados, *DsGH16_c10227* foi mais expresso no intestino, e *DsGH16_c28729* na carcaça (epiderme, corpos gordurosos e hemolinfa). Então, de forma surpreendente, *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* foram regulados negativamente 24 h após o início da infecção de *M. anisopliae* por via tópica. Existem pelo menos duas hipóteses que podem explicar esses resultados. Uma é que os tempos avaliados foram muito tardios e que a resposta de indução pode ter ocorrido mais cedo, embora ainda não justifique uma regulação negativa dos genes. A segunda hipótese é que o fungo pode produzir algum fator de virulência que reprime a expressão de genes de resposta à infecção. Entretanto, ambas as hipóteses precisam ser testadas em trabalhos posteriores.

PALAVRAS-CHAVE:

Sistema imune, domínio GH16, PRRs, fungos entomopatogênicos, expressão gênica.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, e o segundo em produção de etanol (JACQUES *et al.*, 2019). A cana é constantemente atacada por diversas pragas destacando-se a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como a broca da cana-de-açúcar (RODRIGUES & ROSS, 2020, SANDOVAL & SENÔ, 2010). Esta praga é responsável por diversos danos como: aberturas de galerias, o que facilita a entrada de microrganismos ocasionando a podridão-vermelha do colmo, além de perda de peso e, conseqüentemente o tombamento pelo vento, e morte das gemas, o que causa falhas na germinação da cultura. Alguns métodos são utilizados para o controle desta praga, destacando-se o controle biológico utilizando o parasitóide *Cotesia flavipes*, por exemplo. Outro potencial agente de controle biológico são os fungos entomopatogênicos, pois já são utilizados no controle de outras pragas. Dentre estes fungos, destacam-se as espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* por possuírem ampla distribuição geográfica e variedade de hospedeiros (ZAPPELINI *et al.*, 2020, WENZEL *et al.*, 2022, LIU *et al.*, 2022, DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Entretanto, os insetos possuem um mecanismo de defesa bem definido como resposta às infecções causadas por patógenos (GARCIA *et al.*, 2004). A principal via de defesa dos insetos, o sistema imune inato, é composto basicamente pela defesa celular e humoral. A defesa humoral é composta por vias de sinalização que ativam genes efetores de resposta ao ataque de organismos entomopatogênicos (Hultmark, 2003). Diante disso, é necessário entender melhor essas vias do sistema humoral de *D. saccharalis*, pois são responsáveis por desenvolver parte da resposta do sistema imune inato.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), é uma monocotiledônea de origem asiática, pertencente à família das *Poaceae*. A indústria canavieira é um dos setores mais relevantes do agronegócios brasileiro, com expansão por diversas regiões do país, sendo os principais produtos o açúcar e o etanol, além da cachaça

artesanal, doces e forragens para alimentação de animais. Além disso, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. No cenário interno destaca-se a região centro-sul como maior produtora, sendo responsável por cerca de 93% da produção na escala nacional. (ALVES *et. al.*, 2021, ALMEIDA, 2019, SANTANA *et. al.*, 2019). mesmo com a COVID 19 a cultura auxiliou no aumento do PIB em 23% em 2020 com recordes da safra neste período (DE CARLI *et. al.*, 2022). A cana-de-açúcar representa uma alternativa no setor de biocombustíveis, sendo menos nocivo ao meio ambiente em relação à queima de petróleo.

Contudo, a produção de cana vem sofrendo com ataques de insetos pragas, como a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e a cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*), por exemplo (SANDOVAL & SENÔ, 2010).

2.2 *Diatraea saccharalis* (Broca da cana-de-açúcar)

Entre estas espécies causadoras de danos, destaca-se a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), conhecida popularmente como a broca da cana-de-açúcar, devido ao amplo prejuízo que pode causar (SILVA *et. al.*, 2010, CRUZ, 2010).

De acordo com Botelho (1999), a fêmea de *D. saccharalis*, uma mariposa, realiza a postura nas folhas variando de 5 a 50 ovos colocados em massa. A eclosão se dá de quatro a dez dias dependendo da temperatura, as lagartas neonatas irão se alimentar inicialmente do parênquima foliar, e, posteriormente penetram o colmo da planta. O ciclo de vida do inseto é de aproximadamente 30 dias (VACARI *et. Al.*, 2012). Devido a abertura de galerias dentro do colmo, provocada pela ação da *D. saccharalis* ocorre injúrias diretos, e entre eles estão a interrupção da passagem de seiva, perda de peso, o que provoca o tombamento da planta pela ação do vento, e redução de açúcares. Os danos indiretos é o favorecimento da penetração, pelas aberturas das galerias, de fungos, como *Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme*, resultando na podridão vermelha do colmo (DOS SANTOS *et. al.*, 2015, FIPKE *et. al.*, 2012, DEMETRIO, 2008).

De acordo com DINARDO-MIRANDA *et. al.*, (2012), a conexão da broca com microorganismos presentes no campo resultam em um complexo de broca-podridão,

responsáveis por perdas agroindustriais significativas, diminuindo a qualidade do colmo da planta, perceptível de acordo com a porcentagem de ataque e infestações nos entrenós.

Atualmente, as principais formas de controle são o uso de inseticidas químicos e biológicos. No Brasil, o controle químico ainda é o mais usado, com utilização de inseticidas, contudo resíduos passam progressivamente para o solo e lavouras, trazendo riscos para o homem e os animais diante do consumo direto e indiretos dos produtos contaminados. Devido a este fator, faz-se necessário a busca por alternativas para reduzir os impactos causados a longo prazo pelos inseticidas (SANDOVAL & SENÔ, 2010). Outra alternativa é o controle biológico à base de agentes entomófagos, como *Cotesia flavipes* e *Trichogramma galloi*. O controle usando parasitoides tem se mostrado mais promissor, evitando a resistência dos insetos aos inseticidas, além de não deixar poluentes no ambiente (DA COSTA *et al.*, 2021, DE SOUZA *et al.*, 2022). Ainda destacam-se produtos à base de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* que podem ser utilizados para controle de *D. saccharalis*.

2.3 *Metarhizium anisopliae*

Os fungos entomopatogênicos são agentes causadores de infecção em insetos, atuando de forma efetiva e não prejudicial ao meio ambiente. Dentre as espécies de fungos entomopatogênicos destaca-se a *Metarhizium anisopliae*, que é facilmente encontrado no solo e na natureza (FARIA *et al.*, 2001, CELESTINO *et al.*, 2022, BERNARDI *et al.*, 2022, BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação dos fungos entomopatogênicos é dividido em quatro etapas e dura em média 72 horas, são elas: adesão, germinação, penetração e colonização (GARCIA *et al.*, 2008). O processo de infecção do fungo ocorre por penetração direta na cutícula do inseto. Durante o estágio inicial da infecção, os conídios aderem a cutícula através de moléculas hidrofóbicas presentes no corpo do hospedeiro. A germinação e penetração ocorre em decorrência do desenvolvimento de tubos germinativos, chamada de apressório, sendo capaz de penetrar a cutícula até chegar a hemolinfa (WANG *et al.*, 2008; PEDRINI, 2008). De acordo com Fontes *et al.*,(2020), uma vez dentro do inseto, o fungo passa a se disseminar por toda a

cavidade interna do hospedeiro, absorvendo todo o nutriente e provocando a morte do inseto. Após esta etapa, ocorre o processo de colonização inversa, ou seja, as hifas penetram na cutícula de dentro para fora e emergem na superfície do corpo. Porém, mesmo em casos de interação compatível, os insetos dispõem de mecanismos de defesa que tentam barrar a infecção do fungo.

2.4. As vias do sistema sistema imune e as proteína reconhecedoras de β -glicana (β GRPs)

Os insetos possuem um sistema imune bem estruturado, o que permite que se desenvolvam em ambientes com diversos possíveis patógenos. O sistema imune é composto por barreiras estruturais “passivas” e respostas ativas contra os ataques externos (NEGREIRO *et. al.*, 2004). O sistema imune inato tem um papel importante na defesa contra patógenos após a infecção, fornecendo a uma linha de defesa, podendo ser celular ou humoral. (KINGSOLVER *et. al.*, 2013, PARK & LEE, 2012). Já a resposta humoral está ligada à produção de peptídeos antimicrobianos, ativados através de vias de sinalização como a via Toll, IMD e JAK-STAT. Toxicidade seletiva, ou seja, agindo contra o agente infeccioso sem afetar o hospedeiro, e tempo de ação menor que a duplicação do microorganismo infeccioso, estão entre as características dos peptídeos antimicrobianos (AGAISSE *et. al.*, 2003, HULTMARK, 2003; PARK & LEE, 2012).

Para que ocorra uma resposta imune aos patógenos, vias de sinalização precisam ser ativadas induzindo a expressão de genes responsáveis por controlar a resposta imunológica. As vias de sinalização de resposta humoral dos insetos são: JAK-STAT (Janus Kinase), IMD, TOLL e produção de melanina. Essas vias desencadeiam uma cascata de reações que produzem moléculas que agirão contra ação do patógeno (CIRIMOTICH *et. al.*, 2010, HULTMARK, 2003, GOVIND, 2008). A identificação dessas vias é melhor descrita na espécie modelo *Drosophila melanogaster* (WILLIAMS, 2007). Nesta espécie, A via Toll é ativada em resposta a infecção causada por bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto a via IMD é ativada por bactérias Gram-negativas (LEMAITRE & HOFFMANN 2007). Tais vias possuem proteínas de reconhecimento de padrões de microrganismo ou simplesmente PRRs. Entre as principais PRRs estão as proteínas reconhecedoras de peptidoglicano (PGRPs), proteínas de ligação a bactérias Gram-negativas

(GNBPs), e proteínas de reconhecimento de β -glicanas (β GRPs) (LEMAITRE & HOFFMANN, 2007)

As β GRPs/GNBPs são caracterizadas por possuírem um domínio N-terminal de ligação a carboidrato denominado CBM (do inglês Carbohydrate Binding Module) e um domínio GH16 de β -1,3 glucanase, porém sem atividade de catálise (LEMAITRE & HOFFMAN 2007). Até agora, o modelo que melhor explica o modo de ação de das β GRPs em Lepidoptera é o descrito para β GRP2 de *M.sexta* para reconhecimento de β -1,3 glicana de fungos. Inicialmente, as infecções na hemolinfa são detectadas pela ligação das β GRP2 às β -1,3 glucanas da parede celular do fungo, o que induz a associação proteína-proteína de β GRP2 através do domínio CBM (N-terminal) (Dai *et al.*, 2013, Takahashi *et al.* 2014). Esta interação entre β GRPs e β -1,3 glucanas fornece uma plataforma para o recrutamento e ativação localizada de proHP14, uma protease serínica que dá início a ativação da cascata proteolítica que culmina na ativação da via de profenoloxidase (PPO) (Takahashi *et al.* 2014). MSP e ModSP, ortólogos de proHP14, também funcionam em uma cascata proteolítica para ativar a via Toll em *Tenebrio molitor* (Park *et al.* 2007) e *Drosophila melanogaster* (Buchon *et al.*, 2009), entretanto ainda não há evidências que as β GRPs sejam responsáveis pela ativação da via Toll em Lepidoptera, apesar do sistema SPATZLE-Toll ser ativado em resposta a fungos (ZHONG *et al.*, 2012).

2.5 Objetivos

Desta forma, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar os genes de β GRPs presentes em um transcrito de *D. saccharalis* em resposta ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Os objetivos específicos foram:

- Identificar os genes de reconhecimento de β -glicana (β GRP) a partir do transcrito de *Diatraea saccharalis*;
- Analisar as relações filogenéticas das β GRP preditas identificadas em *D. saccharalis* diferenciando-as da β 1,3, glucanases;
- Determinar o perfil de expressão dos genes de β GRP em diferentes tecidos de *D. saccharalis*;

- Verificar se há a indução dos genes de β GRP durante a infecção do fungo *M. anisopliae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Criação de *Diatraea saccharalis*

Insetos de *D. saccharalis* são mantidos no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos/UFRPE, onde as lagartas são alimentadas em dieta artificial de Hensley e Hammond (1968) modificada por Araújo *et al.*, (1985). Lagartas a partir do terceiro instar, pupas e adultos são mantidos em recipientes específicos para cada estágio. Os ovos, coletados diariamente, são esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), e, posteriormente, armazenados em placas de Petri na presença de umidade. Após eclosão, as lagartas neonatas são distribuídas em tubos de fundo chato contendo 20 mL de dieta artificial. Os adultos são mantidos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de Umidade Relativa (UR), lagartas, pupas e ovos a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E.

3.2. Identificação dos genes que possuem domínio GH16 em *Diatraea saccharalis*

As sequências de genes pertencentes à família GH16 de glicosil hidrolases, incluindo as β GRPs e β -endoglucanases foram inicialmente identificados em *Bombyx mori*, espécie modelo para Lepidoptera, através do silkbase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>).

Em seguida, foram identificados, utilizando as sequências de *B. mori* como “iscas”, as sequências de *D. saccharalis*, a partir de um transcriptoma de intestino de lagartas de 4º instar. Os *contigs* encontrados no transcriptoma de *D. saccharalis* foram verificados para saber se estavam completos, através da predição das janelas de leitura (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/), e os principais domínios proteicos de cada proteína predita foram mapeados no algoritmo CDD – Conserved Domains Databank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). Os peptídeos sinal foram preditos através do Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>). As imagens dos domínios foram feitas com auxílio da ferramenta “PROSITE My Domains” (prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/).

3.3. Análises filogenéticas

Inicialmente, foram selecionadas sequências de pelo menos 10 espécies de Lepidoptera do banco nr do NCBI. As sequências foram recuperadas utilizando as sequências preditas de *D. saccharalis* com a ferramenta BlastP (BLOSUM62). O alinhamento de múltiplas sequências foi conduzido no MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) usando o algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation). As análises filogenéticas, baseadas em sequências de aminoácidos, foram feitas empregando o método de máxima verossimilhança (ML) com a análise de bootstrap com 1000 repetições, e o Smart Model Selection (SMS) para escolha do modelo de substituição, ambos no PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). A representação gráfica da árvore filogenética foi feita no programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Todos os experimentos que envolveram extração de RNA total e síntese de cDNA foram realizados da seguinte forma: os insetos foram imediatamente pulverizados em nitrogênio líquido, a extração do RNA total foi realizada imediatamente utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1,5 µg de RNA total tratadas com DNaseI usando o kit de síntese de cDNA iScript gDNA clear (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.5. Condições experimentais de RT-qPCR.

Para todos os experimentos as condições de qPCR foram as seguintes: Cada uma das reações teve um volume final de 10 µL sendo, 5 µL de 2x SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 2 µL de cDNA diluído numa proporção de 1:10, 0,2 µM (0,2 µL) de primer (direto e reverso, Tabela 1) e 2,6 µL de água ultrapura. Os testes foram conduzidos no equipamento QuantStudio5 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com duas replicata técnicas, três replicatas biológicas e controles negativos para cada par de primers. As reações foram conduzidas utilizando o seguinte programa: (i) desnaturação inicial a 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” de cada par de primer de 60 a 94 °C, aumentando em 0,5 °C por segundo. Como genes normalizadores de expressão foram utilizados os dois genes mais estáveis dentre GAPDH, β -tubulina e RPS10 (Noriega et al. 2020; Tabela 1).

3.6. Avaliação da expressão dos genes com domínio GH16 em intestino e carcaça de *D. saccharalis*.

Inicialmente, lagartas de 5º instar foram dissecadas com auxílio de pinça entomológica e tesoura, e em seguidas separadas em intestino e carcaça, que responde ao resto do corpo. Cada amostra foi feita em triplicata biológica, e cada triplicata correspondeu a um pool de 5 carcaças ou de 5 intestinos. Amostras de cada parte dos insetos foram pulverizadas em nitrogênio líquido e imediatamente o RNA total foi extraído, e a síntese de cDNA realizada. Após a testagem dos cDNAs por PCR convencional, as amostras de cDNAs foram armazenadas a – 20 °C até a realização da qPCR.

3.7. Isolado de *Metarhizium anisopliae*

O isolado de fungo utilizado foi o ESALQ-E9 de *Metarhizium anisopliae* obtido junto a coleção de entomopatógenos mantida no Laboratório de Patologia de Insetos e Controle Microbiano da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP). O fungo foi cultivado em meio de cultura BDA (Batata + Dextrose + Ágar) em placas de Petri por um período de 8-10 dias a uma temperatura de 26±1°C. O preparo da solução de esporos foi feito pela raspagem do micélio com auxílio de uma alça de níquel e então adicionado a uma solução de Tween 80 a 0,05% para posteriores diluições e contagem na câmara de Neubauer, de acordo com Alves (1998).

3.8. Expressão dos genes GH16 em lagartas tratadas com *Metarhizium anisopliae*

Para avaliar a expressão dos genes que possuem o domínio GH16 sob a ação de *M. anisopliae* foi utilizada a concentração de 1x10⁷ conídios/mL que foram aplicadas por pulverização por todo o corpo de lagartas de 3º instar. Insetos do grupo controle foram pulverizados apenas com a solução de Tween utilizada para diluir os conídios. Os insetos de cada grupo (tratado e controle) foram coletados após 24 e 48 horas após a aplicação do fungo. Ambas as coletas foram realizadas em triplicata biológica, onde cada repetição consistiu em um conjunto de três

lagartas. O experimento foi realizado em condições controladas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12h. Após as coletas dos insetos, os mesmos foram pulverizados em nitrogênio líquido e imediatamente o RNA total foi extraído, e a síntese de cDNA realizada. Após a testagem dos cDNAs por PCR convencional, as amostras de cDNAs foram armazenadas a -20°C até a realização da qPCR.

3.9. Análise estatística dos resultados de expressão gênica.

As análises de expressão foram realizadas usando o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) através da ferramenta web SATQPCR (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/home.cgi>; Rancurel et al. 2019). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste t de Student ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4. 1 Identificação dos genes de β GRP

em *D. saccharalis*

Foram identificadas no transcriptoma intestinal de *D. saccharalis* quatro contigs possuindo sequências com identidade para as proteínas com domínio GH16, todas com ORF completa. As sequências dos genes foram nomeadas de acordo com o número do contig encontrado: *DsGH16_c10227*, *DsGH16_c12479*, *1048 DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367*.

A partir da análise *in silico* das proteínas preditas, observou-se que todas apresentam peptídeo sinal (Figura 1A), sugerindo que todas as proteínas são provavelmente secretadas no meio extracelular. Além disso, todas possuem o domínio GH16 como era esperado, uma vez que a sequência isca utilizada na análise possuía este domínio. (Figura 1A). Por fim, *DsGH16_c12479*, *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* possuem o domínio de ligação a carboidrato CBM39, e *DsGH16_c10227* não, mostrando que os três primeiros podem ser β GRPs (Figura 1A). Outro ponto que sustenta essa possibilidade é que *DsGH16_c10227* possui dois ácidos glutamâmicos (E) que correspondem aos aminoácidos catalíticos (Figura 1B), sugerindo que esta proteína pode ser β -1,3 glucanase funcional. Adicionalmente, *DsGH16_c12479*, *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* não possuem estes aminoácidos na mesma posição (Figura 1B), indicando que o

domínio GH16 destas proteínas provavelmente não é funcional, outra característica das β GRPs.

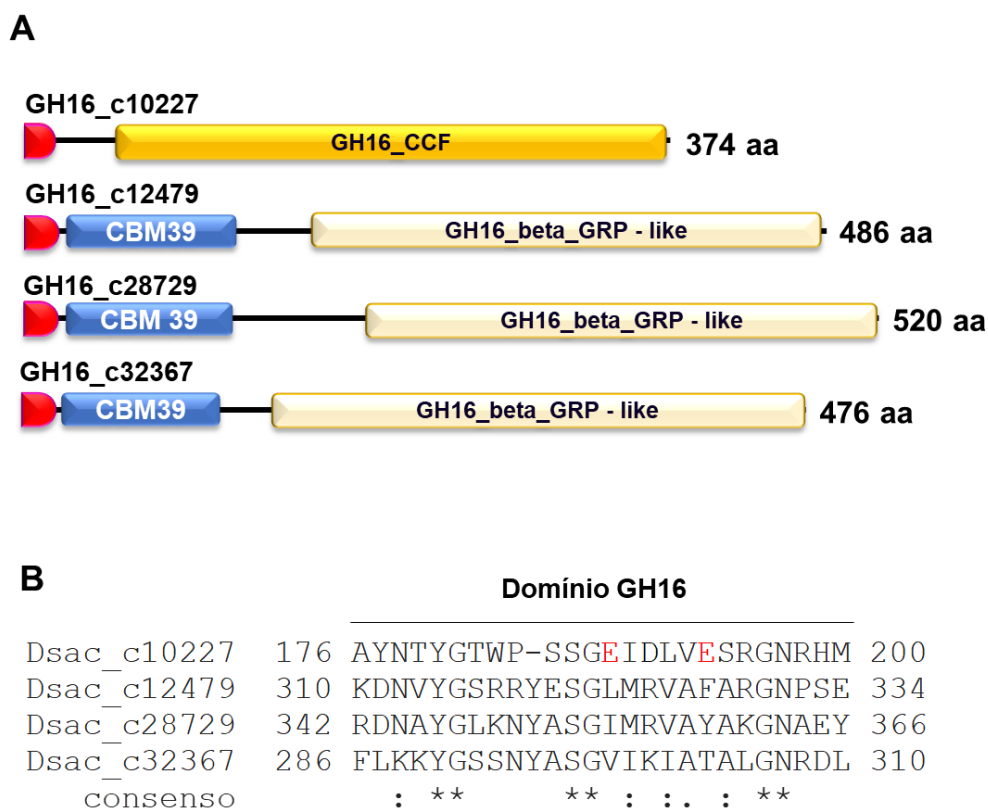


Figura 1. Análise das proteínas preditas que possuem o domínio GH16 em *Diatraea saccharalis*. (A) Caracterização dos domínios funcionais e peptídeos sinal[RRC1] (vermelho) através do CDD. DsGH16_c12479, DsGH16_c28729 e DsGH16_c32367 apresentam domínio de ligação de carboidratos (CBM39) em azul. DsGH16_c10227 não apresenta domínio CBM39. (B) Alinhamento da região correspondente ao domínio GH16 para comparação dos aminoácidos catalíticos (marcados em vermelho). GH16_CCF (cd08024) - Coelomic cytolytic factor, member of glycosyl hydrolase family 16, CBM39 1481 (azul) (pfam15886) - Carbohydrate binding domain (family 32). Gene DsGH16_c10227 possui dois ácidos glutamâmicos (E) em vermelho.

4.2 Análise filogenética das sequências com domínio GH16 de *D. saccharalis*

Para construção da árvores filogenética foi usado o método da verossimilhança (ML). A árvore foi gerada a partir do alinhamento de sequências de proteínas com os domínios GH16 de *D. saccharalis* e outras espécies de Lepidoptera. Sequências de *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* (Diptera) foram utilizados como grupo externo (Figura 2). É notório a formação de três grupos ou clados com valores de bootstrap acima de 70, dos quais as sequências DsGH16_c10227 se agrupa com outras sequências de β -1,3 glucanases de outros

Lepidoptera, inclusive as de *Spodoptera frugiperda* e *Manduca sexta*. As sequências DsGH16_c12479 e DsGH16_28729 agruparam-se em diferentes clados, porém bem mais próximos entre si, do que com as demais. DsGH16_c12479 se agrupa com β GRP2 de *M. Sexta* e DsGH16_28729 se agrupa com β GRP1, sugerindo que estes dois genes se originaram de um ancestral em comum. Além disso, neste grupo, as sequências de *D. melanogaster* e *A. aegypti* formaram grupos externos. Finalmente, DsGH16_c32367 formou um terceiro clado com MBP e β GRP de *M. sexta*. Claramente, alguns lepidópteros possuem mais de um gene neste clado, mas *D. saccharalis* possui apenas um. As sequências de *D. melanogaster* e de *A. aegypti* formam o grupo externo deste clado. É importante destacar que todas as sequências de *D. saccharalis* agruparam-se com as de *Chilo suppressalis* e/ou *Ostrinia furnacalis*, representantes da família Crambidae.

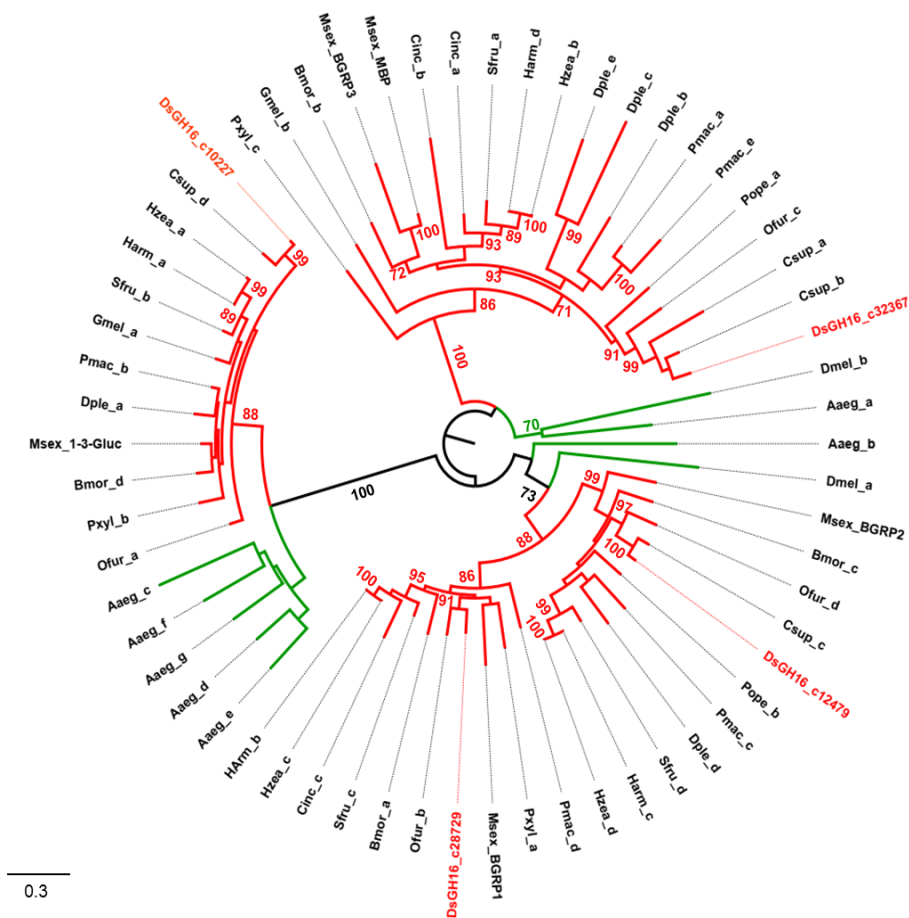


Figura 2. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para proteínas que possuem o domínio GH16 de Lepidoptera e Diptera. Os ramos de Lepidoptera estão em vermelho e os de Diptera em verde. A espécie-alvo deste estudo está destacada em vermelho. O alinhamento foi

realizado no programa MEGA 7 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. Códigos das espécies utilizadas e seus respectivos números de acesso no NCBI estão descritos a seguir. *Aedes aegypti*: Aaeg_a (EAT40654.2), Aaeg_b (EAT48288.2), Aaeg_c (XP_001652521.1), Aaeg_d (XP_001659796.1), Aaeg_e (XP_001659797.2), Aaeg_f (XP_001664288.1), Aaeg_g (XP_001664289.1); *Bombyx mori*: Bmor_a (NP_001036840.1), Bmor_b (NP_001037450.1), Bmor_c (NP_001128672.1), Bmor_d (NP_001159614.1); *Chrysodeixis includens*: Cinc_a (CAH0584499.1), Cinc_b (CAH0584500.1), Cinc_c (CAH0584501.1); *Chilo suppressalis*: Csup_a (CAH0398888.1), Csup_b (CAH0398890.1), Csup_c (CAH0398896.1), Csup_d (CAH2992139.1); *Drosophila melanogaster*: Dmel_a = GNB3 (CAJ18907.1), Dmel_b = GNB1 (CAJ18915.1); *Danaus plexippus plexippus*: Dple_a (XP_032511450.1), Dple_b (XP_032520321.1), Dple_c (XP_032520323.1), Dple_d (XP_032520413.1), Dple_e (XP_032520894.1); *Galleria mellonella*: Gmel_a (XP_026751005.1), Gmel_b (XP_026762479.2); *Helicoverpa armigera*: Harm_a (XP_049702897.1), Harm_b (XP_049706601.1), Harm_c (XP_049707922.1), Harm_d (XP_049707924.1); *Helicoverpa zea*: Hzea_a (XP_047020091.1), Hzea_b (XP_047026604.1), Hzea_c (XP_047026780.1), Hzea_d (XP_047026782.1); *Manduca sexta*: Msex_1-3-Gluc (XP_030023420.1), Msex_BGRP2 (XP_037294818.1), Msex_BGRP1 (XP_037294759.1), Msex_MBP (AYK02796.1), Msex_BGRP3 (ADK39022.1); *Ostrinia furnacalis*: Ofur_a (XP_028179173.1), Ofur_b (XP_028179414.1), Ofur_c (XP_028179416.1), Ofur_d (XP_028179419.1); *Papilio machaon*: Pmac_a (XP_014357992.2), Pmac_b (XP_014363378.2), Pmac_c (XP_045536216.1), Pmac_d (XP_045536217.1), Pmac_e (XP_045536315.1); *Phthorimaea operculella*: Pope_a (KAI5637471.1), Pope_b (KAI5637473.1); *Plutella xylostella*: Pxyl_a (CAG9088905.1), Pxyl_b (XP_037961545.2), Pxyl_c (XP_037976333.2); *Spodoptera frugiperda*: Sfru_a (XP_035445207.2), Sfru_b (XP_035458158.1), Sfru_c (XP_050549491.1), Sfru_d (XP_050549498.1).

4.3. Validação da expressão dos genes que possuem domínio GH16 no intestino e carcaça

Os tecidos de intestino e carcaça foram dissecados de lagartas de 5º instar. O gene *DsGH16_c10227* (provável β -1,3 endoglucanase), foi mais expresso no intestino do que na carcaça, conforme esperado (Figura 3A). Dentre os genes de prováveis β GRPs, o gene *DsGH16_c28729*, foi mais expresso na carcaça do inseto, que compreende principalmente a cutícula, os corpos gordurosos e a hemolinfa (Figura 3B). Os demais genes, *DsGH16_c12479* e *DsGH16_c32367*, não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, são expressos tanto no intestino quanto na carcaça de forma idêntica (Figura 3B).

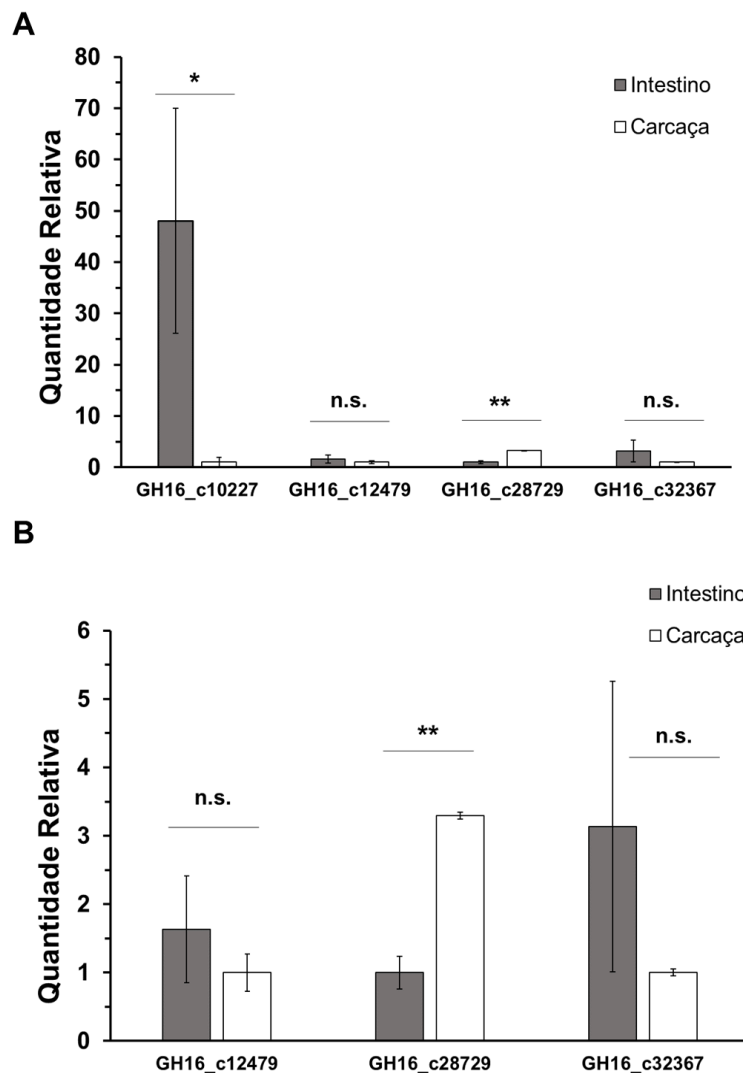


Figura 3. Localização da expressão dos genes que possuem domínio GH16 de *Diatraea saccharalis* no intestino e carcaça de lagartas de 5º instar. Os dados de expressão foram analisados no SATqPCR o utilizando o método de $\Delta\Delta Ct$ e teste t de Student. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n. s. não significativo.

4.4. Expressão dos genes que possuem domínio GH16 após aplicação de conídios de *Metarhizium anisopliae* na cutícula

Após a aplicação tópica de *Metarhizium anisopliae* nas lagartas de 3º instar de *D. saccharalis*, das prováveis β GRPs, os genes *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* tiveram sua expressão diminuída de forma significativa após as primeiras 24h de exposição ao fungo, em comparação ao tratamento controle. Após

48h, apenas o gene *DsGH16_c28729* continuou com sua expressão diminuída no tratamento com *M. anisopliae* em comparação ao tratamento controle. Os demais genes não sofreram alteração de expressão entre os tratamentos.

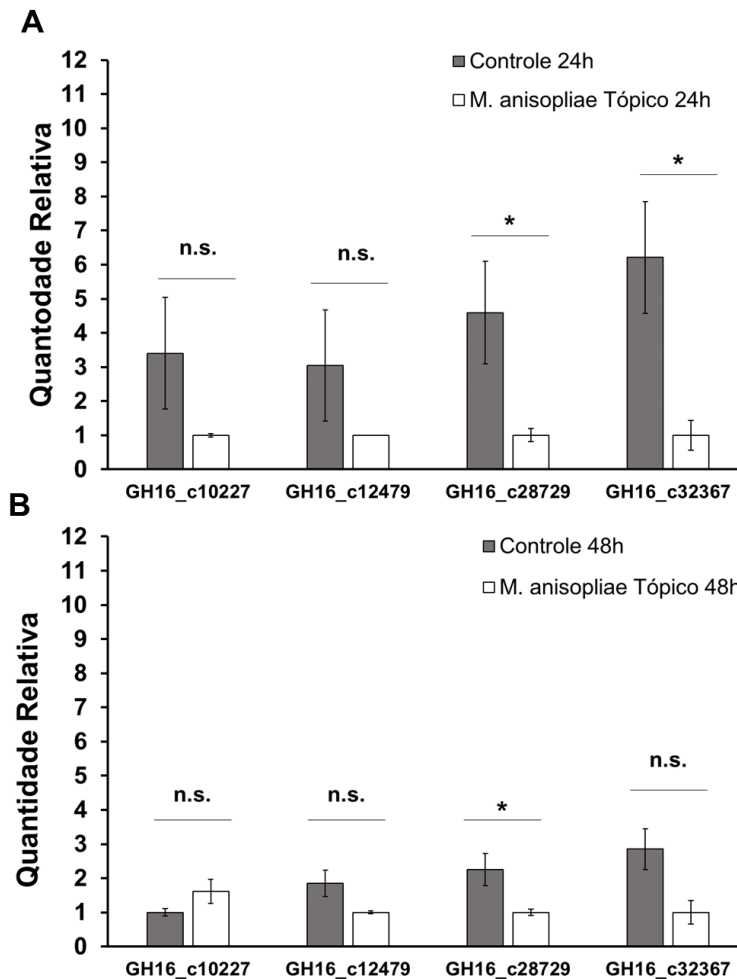


Figura 4. Análise da expressão dos genes que possuem domínio GH16 de *Diatraea saccharalis* em lagartas de 3º instar a 24h (A) e 48h (B) após a aplicação tópica de solução de conídios de *M. anisopliae*. Os dados de expressão foram analisados no SATqPCR o utilizando o método de $\Delta\Delta Ct$ e teste t de Student. * $P < 0,05$; n. s. não significativo.

5. DISCUSSÃO

Os insetos, diferente dos vertebrados, possuem o sistema imune inato (humoral e celular) para combater infecções por microrganismo (LEMAITRE & HOFFMANN, 2007). A resposta humoral dos insetos depende de receptores moleculares (PRRs) para reconhecer o patógeno e iniciar a resposta (GOBERT *et*

al., 2003; GOTTAR *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2014). As β GRPs podem reconhecer, dependendo da espécie, bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (GOBERT *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2004; GOTTAR *et al.*, 2006). Entretanto, em Lepidoptera, parecem reconhecer além de fungos e bactérias gram-positivas, também reconhecem bactérias gram-negativas (JIANG *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2014).

Neste trabalho, foram identificados quatro genes com domínio GH16, tanto β GRPs, como β -1,3 glucanases, a partir do transcriptoma intestinal da *D. saccharalis* (NORIEGA *et al.*, 2020). Dentre os domínios, provavelmente três são β GRPs, que normalmente têm um domínio de ligação a carboidrato (CBM) N-terminal, bem como um domínio GH16 que carece de atividade de hidrolase catalítica, contudo muitos insetos possuem uma enzima hidrolítica com domínio GH16 funcional (HUGHES, 2012). Dentre estas, encontramos um gene em *D. saccharalis* com características de uma β -1,3 glucanase com domínio GH16 provavelmente funcional devido a presença dos aminoácidos catalíticos. De fato, nas espécies de Lepidoptera, o gene β -1,3 glucanase é único em diferentes espécies (PAUCHET *et al.*, 2009; BRAGATTO *et al.*, 2010; HUGHES, 2012), contudo quando se trata de β GRPs os lepidópteros possuem no mínimo três cópias (HUGHES, 2012).

Os genes de β GRPs se agrupam em clados distintos em Lepidoptera, normalmente formando três quando realizado uma análise filogenética, e separados do clados das β -1,3 glucanases (Figura 2; HUGHES, 2012). Durante nossa análise, as proteínas preditas DsGH16_c12479 e DsGH16_c28729 se agrupam com β GRP2 e β GRP1 de *Manduca sexta*, respectivamente, tendo como grupo externo GNB3 de *Drosophila melanogaster*, a mesma que reconhece padrões moleculares fúngicos neste díptero (GOTTAR *et al.* 2006). No terceiro clado se encontra DsGH16_c32367, onde também se agrupam a β GRP3 e MBP de *M. sexta* e β GRP2/GNB3 de *Bombyx mori*, tendo como grupo externo GNB1 de *D. melanogaster* que reconhecem bactérias Gram-positivas. As β GRPs de Lepidoptera, diferentemente das GNBs de *Drosophila*, podem reconhecer fungos, bactérias gram-positivas ou negativas, embora as diferentes β GRPs de Lepidoptera possam ter maior indução frente a um tipo específico de patógeno (LEE *et al.* 1996; WANG *et al.* 2011, RAO *et al.*, 2014).

Quanto à localização da expressão, o gene *DsGH16_c10227* foi mais expresso no intestino, o que já era de se esperar, por provavelmente ser uma enzima digestiva. Outras proteínas homólogas de β -1,3 glucanases em outros insetos também obtiveram expressão majoritária no intestino (GENTA et al, 2009; PAUCHET et al. 2009; BRAGATTO et al. 2010), embora Pauchet et al., (2009) não descarte que esta enzima tenha função no sistema imune do intestino. No grupo das β GRPs, apenas o gene *DsGH16_c28279* foi mais expresso na carcaça, onde a mesma possui corpos gordurosos, hemocele, epiderme e traqueias. A β GRP1 de *Manduca sexta* também é mais expressa nos corpos gordurosos e é secretada na hemolinfa do inseto (MA & KANOST, 2000). Contudo, os genes *DsGH16_c12479* e *DsGH16_c32367* se expressaram de forma idêntica tanto na carcaça quanto no intestino o que pode indicar uma função em ambos os tecidos ou que estes genes são induzíveis. β GRP2 de *M. sexta* é expressa na lagarta diante de alguns fatores, como ausência de alimento, fase de pré-pupa ou quando sofre ação de patógenos (JIANG et al., 2004).

Alguns estudos mostram que os genes envolvidos na resposta humoral dos insetos, são induzidos quando expostos a patógenos (JIANG et al. 2004; BAI et al. 2020; LONG et al. 2022), contudo, de forma surpreendente, os genes, *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* foram inibidos nas primeiras 24h, quando entraram em contato com os conídios de *M. anisopliae* na cutícula, e o gene *DsGH16_c28729* continuou sendo inibido após 48h após o contato. Existem pelo menos duas hipóteses que podem explicar esses resultados. Uma é que os tempos avaliados foram muito tardios e que a resposta de indução pode ter ocorrido mais cedo, embora ainda não justifique uma repressão da expressão dos genes. A segunda hipótese é que o fungo pode produzir algum fator de virulência que reprime a expressão de genes de resposta à infecção. Ambas hipóteses precisam ser testadas para podermos explicar melhor esses dados.

Neste estudo identificamos os genes de β GRPs de *D. saccharalis* e o seu perfil de expressão durante a infecção de *M. anisopliae*. Uma vez que a expressão das β GRPs foi menor no tratamento com fungo do que no controle, fica o questionamento se a expressão dos genes de profenoloxidasas (PPOs) também é diminuída, uma vez que as β GRPs atuam a montante das PPOs na via de produção de melanina em resposta a ataque de patógenos. Entender como os insetos

respondem a ação de patógenos pode ajudar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate de pragas como *D. saccharalis*, uma das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui mostrados mostram que os quatro genes afetados, o gene *DsGH16_c10227* afeta de alguma forma quando as lagartas são infectadas com entomopatógenos. Foi possível observar que houve uma supressão da expressão dos genes *DsGH16_c28729* e *DsGH16_c32367* quando exposto ao *M. anisopliae* após das 24h e 48h, o que pode indicar que haja alguma proteína responsável. Havendo a necessidade de estudos posteriores para confirmação. Tais estudos são importantes para compreensão das vias de sinalização do sistema imune dos insetos porém não consegue a simular o ambiente de campo e o que acontece na natureza, onde os insetos são suscetíveis a patógenos de insetos.

7 . REFERÊNCIAS

AGAISSE, Hervé *et al.* Papel de sinalização dos hemócitos na resposta dependente de JAK/STAT da *Drosophila* à lesão séptica. **Célula de desenvolvimento** , v. 5, n. 3, pág. 441-450, 2003.

ALMEIDA, P.R.F.D. **Determinantes dos custos na produção de cana-de-açúcar no Brasil.** 2019.

ALVES, L. Q. *et al.* Desempenho da produção da cultura de cana-de-açúcar nos principais estados produtores. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 15, n. 2, p. 303-317, 2021.

ARAÚJO, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Rev. **Tecnol. Indust. Açuc. Álcool** 36: 1290 45-48, 1985.

BAI, J., Xu, Z., Li, L., Ma, W., Xu, L., & Ma, L. Temporospacial modulation of *Lymantria dispar* immune system against an entomopathogenic fungal infection. **Pest Management Science**, 76(12), 3982-3989, 2020.

BAUERMEISTER, A. *et al.* Fungal beta-1, 3-Glucanases: production and biotechnological applications. **Semina: Exact and Technological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.

BELVIN, M. P., & Anderson, K. V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. Annual. **Rev. Cell. Develop. Bio.** 12(1): 393-416, 1996.

BERNARDI, E. *et al.* Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 127-129, 2022.

BEYS-DA-SILVA, W. O. *et al.* Atualização da aplicação de *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitologia experimental**, v. 208, p. 107812, 2020.

BOTELHO, P. SM *et al.* Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.)(Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.)(Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 491-496, 1999.

BRAGATTO, I., G., F. A., RIBEIRO, A. F., TERRA, W. R., & Ferreira, C. Characterization of a β -1, 3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to β -glucan-binding proteins. **Insect biochemistry and molecular biology**, 40(12), 861-872, 2010.

CELESTINO, M. F.; DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A. Métodos de encapsulamento de fungos entomopatogênicos para sua aplicação no controle biológico. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e123111638031-e123111638031, 2022.

COSTA, A. e cols. A via Imd está envolvida em respostas imunes antivirais em *Drosophila*. **PloS um**, v. 4, n. 10, pág. e7436, 2009.

CIRIMOTICH CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against Plasmodium infection. **Dev Comp Immunol**. 2010;34(4):387–95.

CRUZ, I. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

DA COSTA, A. S.; FARIAS, PHTS; GUZZO, E. C. Avaliação da resistência de acessos do complexo *Saccharum* spp. à brocada-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. 2021.

DE CARLI, Sara Maria; MARTINS, Vidigal Fernandes. Comparabilidade dos custos de produção da cana de açúcar no Brasil. **RAGC**, v. 10, n. 44, 2022.

DE OLIVEIRA, Marco Aurélio Paes *et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F.(Lepidoptera: Crambidae. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 219-224, 2008.

DE SOUZA, Francis Moretti *et al.* Fungos entomopatogênicos associados ao controle da mosca-branca: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e252111133536-e252111133536, 2022.

DINARDO-MIRANDA, Leila Luci *et al.* Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 71, p. 342-345, 2012.

DOS SANTOS, Isadora Ferreira *et al.* Monitoramento de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)(Lepidoptera: Crambidae) e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes sistemas de cultivo na **Embrapa Milho e Sorgo**. 2015.

DOSTERT, C., J., E., IRVING, P., TROXLER, L., GALIANA-ARNOUX, D., Hetru, C., ... & Imler, 496 J. L. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral 497 response of drosophila. **Nat. immu.** **6**(9): 946-953.

FARIA, MR de; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001.

FIPKE, M. V. *et al.* Infestação da broca da cana (*Diatraea saccharalis*) em grupos de cultivares de cana-de-açúcar implantada em terras baixas no sul do rio grande do sul. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 4.; REUNIÃO TÉCNICA DE AGROENERGIA, 4., 2012, AMRIGS: Porto Alegre. Anais... **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, 2012. Organizado por Sérgio Delmar dos Anjos e Silva Ivan Rodrigues de Almeida., 2012.

FONTES, E. M. G. *et al.* Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF: **Embrapa**, 2020.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1513-1518, 2004.

GARCIA, M. V. *et al.* Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 855-863, 2008.

GENTA, F. A., BRAGATTO, I., TERRA, W. R., & FERREIRA, C. 2009. Purification, characterization and sequencing of the major β -1, 3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Ins. Biochem. Mol. Bio.* 39(12): 861-874, 2009.

GOODRIDGE HS, WOLF AJ, UNDERHILL DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):38-50. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x. PMID: 19594628; PMCID: PMC6618291. 2009.

GOBERT, V., G., M., MATSKEVICH, A. A., RUTSCHMANN, S., ROYET, J., BELVIN, M., FERRANDON, D. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science.* 302(5653): 2126-2130.

GOTTAR, M., G., V., MATSKEVICH, A., A. REICHHART J. M., WANG, C., BUTT T. M. FERRANDON, D. 2006. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell.* 127(7): 1425-1437. 2006.

GOVIND, S. Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect Sci.* v. 15, p. 29–43. 2008.

HENSLEY, S.D. & A.M. HAMMOND. 1968. Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743. 1968.

HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* v. 15, p. 12–19. 2003.

HUGHES, A. L. 2012. Evolution of the β GRP/GNBP/ β -1, 3-glucanase family of insects. *Immunogenetics.* 64: 549-558.

HULTMARK, D. Imunidade à *Drosophila*: caminhos e padrões. **Opinião atual em imunologia** , v. 15, n. 1, pág. 12-19, 2003.

JACQUES, Kelly Aparecida Silva; DE OLIVEIRA NETO, Odilon José; MACHADO, Waltuir Batista. O AGRONEGÓCIO DA CANA-DE-AÇÚCAR E OS PREÇOS DOS COMBUSTÍVEIS NO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Revista INTERFACE-UFRN/CCSA ISSN Eletrônico 2237-7506**, v. 16, n. 1, p. 51-72, 2019.

JIANG, H., MA, C., LU, Z. Q., & KANOST, M. R. 2004. β -1, 3-Glucan recognition protein-2 (β GRP-1331 2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds β -1, 3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. **Insect biochemistry and molecular biology**. 34(1): 89-100. 2004.

KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W. Imunidade inata antiviral de insetos: caminhos, efetores e conexões. **Jornal de biologia molecular** , v. 425, n. 24, pág. 4921-4936, 2013.

LEE, W. J., LEE, J. D., KRAVCHENKO, V. V., ULEVITCH, R. J., & BREY, P. T. 1996. Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. **Pro. Nat. Aca. Sci.** 93(15): 7888-7893. 1996

LEMAITRE, B., & HOFFMANN, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Ann Rev. Imm.** 25:697-743. 2007. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>

LIU, Y.; YANG, Y. WANG, B.. Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* desempenham papel de promotores de crescimento do milho (*Zea mays*). **Relatórios Científicos** , v. 12, n. 1, pág. 1-10, 2022.

LONG, Y., G., T., LIU, S., ZHANG, Y., LI, X., ZHOU, L., ... & YANG, Y. 2022. Analysis of the humoral immune response transcriptome of *Ectropis obliqua* infected by *Beauveria bassiana*. **Insects**. 13(3): 225. 2022.

MA, C., & KANOST, M. R. 2000. A β 1, 3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *Journal Bio. Chem.* 275(11): 7505-7514. 2000

MORRIS, R.; KERSHAW, N. J.; BABON, J. J. Os detalhes moleculares da sinalização de citocinas via via JAK/STAT. **Ciência da Proteína** , v. 27, n. 12, pág. 1984-2009, 2018.

MYLLYMÄKI, H., V., S., & RÄMET, M. 2014. The *Drosophila* Imd signaling pathway. *The Journal of Immunology*. 192(8): 3455-3462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>. 2014.

NEGREIRO, MCC D.; ANDRADE, FG D.; FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* *Hübner* (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina Cienc Agric**, v. 25, p. 293-308, 2004.

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.** 11:1386-1398p. 2020

PAUCHET, Y. e cols. Imunidade ou digestão: atividade da glucanase em uma família de proteínas de ligação a glucanas de Lepidoptera. **Journal of Biological Chemistry** , v. 284, n. 4, pág. 2214-2224, 2009.

PAUCHET, Y., F., D., HEIDEL-FISCHER, H. M., HECKEL, D. G., & VOGEL, H. 2009. Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. **Journal Bio. Chem.** 284(4): 2214-2224. 2009.

PARK, J.W., LEE, B.L. 2012. 14 - Insect Immunology, Editor(s): Lawrence I. Gilbert, Insect Molecular Biology and Biochemistry, **Academic Press**, 2012, Pages 480-512, ISBN 9780123847478. 2012

PEDRINI, N. Interações moleculares entre fungos entomopatogênicos (Hypocreales) e seus hospedeiros insetos: perspectivas de campos de batalha estressantes de cutícula e hemolinfa e o potencial do sequenciamento duplo de RNA para estudos futuros. **Biologia Fúngica** , v. 122, n. 6, pág. 538-545, 2018.

RODRIGUES, G. S. D. S. C.; ROSS, J. L. S. A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental. **Edufu**, 2020.

ROSALES, C., & VONNIE, S. 2017. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect 633 physiology and ecology*, 179-212. 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/6107>

SANDOVAL, S. S.; SENÔ, K. C. A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2010.

SANTANA, R. S. *et al.* Marcha de absorção de macronutrientes e produção de variedades de cana-de-açúcar. 2019.

SILVA, P. RR *et al.* Flutuação populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)(Lepidoptera-Crambidae) em cana-de-açúcar no Município de União-PI. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 303-307, 2010.

TAFESH-EDWARDS, G., & ELEFThERIANOs, I. 2020. Drosophila immunity against natural and nonnatural viral pathogens. **Virology**. 540: 165-171. 2020

TAKAHASHI, D., DAI, H., HIROMASA, Y., KRISHNAMOORTHY, R., & KANOST, M. R. 2014. Self- association of an insect β -1, 3-glucan recognition protein upon binding laminarin stimulates prophenoloxidase activation as an innate immune response. **Journal Bio. Chem.** 289(41): 28399-28410. 2014

VACARI, A. M. *et al.* Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, v. 71, p. 355-361, 2012.

VALANNE, S., V., L., MAASDORP, M. K., SALMINEN, T. S., & RÄMET, M. 2022. The *Drosophila* 678 Toll Pathway in Innate Immunity: from the Core Pathway toward Effector Functions. **Journal 679 Imm.** 209(10): 1817-1825. 2022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200476>.

VIBORG, A. H. *et al.* A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 44, p. 15973-15986, 2019.

WANG, C.; DUAN, Z.; ST. LEGER, R. J. O osmosensor MOS1 de *Metarhizium anisopliae* é necessário para a adaptação à hemolinfa hospedeira do inseto. **Eukaryotic Cell** , v. 7, n. 2, pág. 302-309, 2008.

WANG, Y., SUMATHIPALA, N., RAYAPROLU, S., & JIANG, H. 2011. Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1, 3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. **Insect Biochem. Mol. Bio.** 41(5): 322-331. 2011

WENZEL, I. M.; GIOMETTI, F. H. C.; ALMEIDA, J. E. M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 259-261, 2022.

WILLIAMS, M. J. 2007. *Drosophila hemopoiesis* and cellular immunity. **Journal Imm.** 178(8): 4711-705 4716. 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711>.

ZAPPELINI, L. O. *et al.* Seleção de isolados do fungo Entomopatogênico *Metarhiziu. Anisopliae* (METSCH.) Sorok. Visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea Saccharalis* (FABR., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 75-82, 2020.