

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BETA-GLICOSIDASES
INTESTINAIS DA FAMÍLIA GH1 NOS PRINCIPAIS LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA CANA-
DE-AÇÚCAR

por

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino de Souza Junior)

RESUMO

Beta-glicosidases ou β -glicosidases (BGs) são glicosil-hidrolases que desempenham papel relevante nas interações inseto-planta. Estas enzimas pertencem a família 1 das glicosil-hidrolases (GH1), e são essenciais em insetos, primariamente na digestão de celobiose, dissacarídeo oriundo da digestão de celulose, e na hidrólise de outros compostos ligados a glicose de origem vegetal. Neste trabalho propusemos identificar a partir dos transcritomas intestinais de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* (Lepidoptera: Crambidae) e *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae), genes codificantes para β -glicosidases. Também identificamos os genes presentes no genoma de *D. saccharalis* depositado no GenBank (NCBI). A partir dos loci gênicos identificados no genoma, pudemos analisar relações de microssintenia entre sequências similares de β -glicosidases na família Crambidae para inferir a conservação de função de alguns genes estudados. Além de compreender a relação de distribuição do gene GH1 em Lepidoptera através da construção filogenética. Por fim, com foco em *D. saccharalis*, avaliou-se a expressão de alguns genes de GH1 em resposta a alimentação com cana-de-açúcar e em resposta ao composto cianogênico de origem vegetal, amigdalina. Dessa forma, buscamos identificar genes de enzimas digestivas em Lepidoptera relevantes para a degradação de polissacarídeos e analisar as respostas

moleculares que possam contribuir com aplicações biotecnológicas, como a produção de biocombustíveis, e o desenvolvimento de novas estratégias de controle de *D. saccharalis*, e outros lepidópteros praga da cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVE: *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella*, *Telchin licus*,
Enzimas digestivas, expressão gênica

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BETA-GLICOSIDASES
INTESTINAIS DA FAMÍLIA GH1 NOS PRINCIPAIS LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA CANA-
DE-AÇÚCAR

por

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino de Souza Junior)

ABSTRACT

Beta-glucosidases or β -glucosidases (BGs) are glycosyl hydrolases than important role in insect-plant interactions. These enzymes belong to family 1 of the glycosyl hydrolases (GH1), and are essential in insects, primarily in the digestion of cellobiose, a disaccharide derived from the digestion of cellulose, and in the hydrolysis of other compounds linked to glucose of plant origin. In this work, we set out to identify genes coding for β -glucosidases from the intestinal transcriptomes of *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* (Lepidoptera: Crambidae) and *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae). We also identified the genes present in the *D. saccharalis* genome deposited in GenBank (NCBI). From the gene loci identified in the genome, we were able to analyse microsynteny relationships between similar β -glucosidase sequences in the Crambidae family to infer the conservation of function of some of the genes studied. In addition, to understanding the distribution relationship of the GH1 gene in Lepidoptera through phylogenetic construction. Finally, with a focus on *D. saccharalis*, the expression of some GH1 genes was evaluated in response to feeding on sugar cane and in response to the cyanogenic compound of plant origin, amygdalin. Furthermore, we aim to identify digestive enzyme genes in Lepidoptera that are relevant to the degradation of polysaccharides and analyse the molecular

responses that could contribute to biotechnological applications, such as the production of biofuels and the development of new control strategies for *D. saccharalis* and other lepidopteran pests of sugar cane.

KEY WORDS: *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella*, *Telchin licus*, Digestive enzymes, gene expression

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BETA-GLICOSIDASES
INTESTINAIS DA FAMÍLIA GH1 NOS PRINCIPAIS LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA CANA-
DE-AÇÚCAR

por

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA

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

Julho – 2024

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BETA-GLICOSIDASES
INTESTINAIS DA FAMÍLIA GH1 NOS PRINCIPAIS LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA CANA-
DE-AÇÚCAR

por

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA

Comitê de Orientação:

José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BETA-GLICOSIDASES
INTESTINAIS DA FAMÍLIA GH1 NOS PRINCIPAIS LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA CANA-
DE-AÇÚCAR

por

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA

Banca Examinadora:

José Dijair Antonino de Souza Júnior – UFRPE

Fernando Campos de Assis Fonseca – IFG

Leonardo Lima Pepino de Macedo – Embrapa

Lílian Maria Carvalho Ferreira
Mestre em Entomologia

José Dijair Antonino de Souza Júnior – UFRPE
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade em realizar o curso de Mestrado em Entomologia.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, pelo fornecimento da bolsa, o que possibilitou o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. José Dijair Antonino, pela sua disposição, paciência e incentivo. Suas contribuições foram indispensáveis para a conclusão dessa dissertação.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos – LIMBo, sobretudo aos meus colegas de pesquisa, Caio Remigio, Fátima Dias, Felipe Coutinho, Géssica Alves, Ianne Nobre e Manoely Reis, pela colaboração, discussões e questionamentos que fortaleceram o percurso na pós-graduação.

Agradeço também ao Laboratório de Controle Biológico, em especial ao professor Jorge Braz Torres, pela colaboração e suporte técnico fundamentais para a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Interação Inseto-Tóxico em especial ao professor Herbert Siqueira, pela colaboração e suporte técnico fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos amigos e amigas do Programa de Pós-graduação em Entomologia que de forma direta ou indiretamente compartilharam suas motivações e descontrações ao longo desses anos de mestrado.

Por fim, agradeço aos meus pais, Francisco e Antonia, por toda compreensão, suporte e sabedoria durante essa jornada. E a minha irmã, Maria Clara, pela confiança, que possamos caminhar sempre juntas.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	IX
LISTA DE TABELAS.....	49
LISTA DAS FIGURAS.....	58
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	11
Biomassa vegetal	14
Glicosil Hidrolases	16
β -glicosidasas em Insetos	18
Glicosídeos cianogênicos.....	20
LITERATURA CITADA.....	22
2 A EXPRESSÃO DE GENES DA FAMÍLIA GH1 DE <i>Diatraea saccharalis</i> É INIBIDA PELA ALIMENTAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR.....	26
RESUMO	27
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO.....	45
AGRADECIMENTOS.....	50
LITERATURA CITADA.....	50
4 [CONSIDERAÇÕES FINAIS].....	64

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Lepidoptera, umas das maiores radiações de insetos dos ecossistemas terrestres, destaca-se pela ampla variedade de adaptações ecológicas em uma diversidade de ambientes naturais, construindo sua história natural como herbívoros, polinizadores, detritívoros e presas. O qual compõe um grupo diverso de insetos em torno de 160.000 espécies descritas (Kawahara *et al.* 2019), distribuídas em aproximadamente 43 superfamílias, e 133 famílias (Mitter *et al.* 2017).

Ao longo de 430 milhões de anos de evolução, a interação entre lepidópteros e plantas moldou a diversidade e os mecanismos fisiológicos de ambos os grupos. Essa interação favoreceu uma variedade de hábitos, à exemplo, o reconhecimento de padrões moleculares pelos herbívoros possibilita a ativação de defesas das plantas, enquanto os lepidópteros, por sua vez, sucederam para a superação dessas defesas e obtenção de alimento (Zagrobelny *et al.* 2008; Erb & Reymond, 2019).

Os padrões característicos de herbivoria tornaram-se evidentes com o advento de técnicas e aplicações de biologia molecular, permitindo a investigação dos processos moleculares que conduzem essas interações (Erb & Reymond, 2019). Essa compreensão é particularmente relevante para a agricultura, uma vez que existe uma abundância de espécies de interesse agrícola, muitas das quais consideradas como pragas importantes em diversas culturas vegetais (Regier *et al.* 2013).

Muitas espécies de lepidópteros são relatadas como pragas agrícolas, dentre essas, as três principais brocas da cana-de-açúcar no Brasil, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), *Diatraea impersonatella* (Walker, 1863) e *Telchin licus licus* (Drury, 1770), apresentam distribuições

distintas no território nacional. Sendo, *D. saccharalis* a espécie mais comum em todo o país, amplamente distribuída por todo o Centro-Sul e Nordeste. Já a ocorrência de *D. impersonatella* é mais concentrada no Nordeste, onde predomina sobre *D. saccharalis*, de acordo com estudos de Freitas *et al.*, (2007) e Silva (2013). A broca gigante da cana-de-açúcar, *T. licus*, de origem amazônica, alcançou dispersão por diversos países da América Latina. No Brasil, estando presente principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará e Amapá (Mendonça, 1996; Negrisoli *et al.* 2015).

As brocas de cana-de-açúcar do gênero *Diatraea*, estão agrupadas na superfamília Pyralidae e família Crambidae. Essas espécies causam danos diretos nas culturas de cana, caracterizados pela abertura de galerias no colmo da planta. A postura dos ovos é feita nas folhas, posteriormente as lagartas eclodem e migram para a região do cartucho da planta, permanecendo de uma a duas semanas. Após esse período, a lagarta tende a penetrar no colmo da cana, local onde passa a maior parte do seu período larval. Durante a pupação, é feito um orifício na casca da planta, sendo parcialmente fechado com fios de seda e resto de alimento. Insetos adultos de *D. saccharalis* vivem cerca de 5 dias em campo, as fêmeas põem em média 300 ovos. Tem seu período de ocorrência constante ao longo do ano, apresentando maior prevalência nos períodos quentes e úmidos, com declínio no inverno (Macedo *et al.* 2004).

A espécie *T. licus* (Lepidoptera: Castiniidae) quando adultos, são mariposas de tamanho médio, com cerca de 3,5 cm de comprimento e 9 cm de envergadura, com asas de coloração escura, tendo uma faixa transversal branca nas asas anteriores, e uma fileira de manchas brancas na região apical, e as lagartas podem chegar a medir 8 cm de comprimento e 1,2 cm de largura. Após eclodirem do ovo, as lagartas perfuram a base da cana-de-açúcar através do solo, destruindo os primeiros entrenós da planta. Quando a lagarta finaliza o seu desenvolvimento, é perfurado um orifício na base do colmo, em seguida é iniciada a construção de um casulo com as fibras da cana,

por fim, transforma-se em pupa no interior da planta (Mendonça, 1996; Gallo *et al.* 2002; Negrisoli *et al.* 2015).

Apesar de ter sua ocorrência destacada recentemente, a broca-gigante se tornou uma das pragas mais problemáticas para as plantações de cana-de-açúcar nas regiões Norte e Nordeste, causando perdas de até 60% na produção. Os danos à cultura da cana-de-açúcar decorrentes da espécie *T. licus* afetam a qualidade da matéria prima, tanto na produção de álcool quanto na redução da quantidade de açúcar (Negrisoli *et al.* 2015), incluindo também a presença de microrganismos, os quais podem interferir na pureza do açúcar, resultando em prejuízos econômicos e de produção (Gallo *et al.* 2002; Brisceno, 2008; Negrisoli *et al.* 2015).

Os danos causados pelas brocas do gênero *Diatraea* assemelham-se aos da espécie *T. licus*, podendo ser diferenciado pelo tamanho da galeria formada no caule da planta. Como práticas para mitigar esses danos, ainda são utilizados alguns métodos tradicionais como o controle manual em campo ou mesmo o controle químico, esse, um tanto ineficiente devido ao hábito endofítico dessas brocas (Brisceno, 2008). Outra ferramenta bastante utilizada é o controle biológico, tanto por meio de fungos entomopatogênicos ou pela liberação de parasitoides de lagartas. No entanto, essa técnica demonstra-se limitada e insuficiente, pois está diretamente relacionada à capacidade de adaptação de cada organismo às condições específicas do ambiente e ao microclima da planta (Mendonça, 2005).

O cultivo da cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., se destaca como uma importante cultura no Brasil, alcançando milhões de hectares produzidos ao ano, impulsionando diversos setores econômicos. O bagaço e as fibras da cana são responsáveis por gerar energia renovável, o etanol como biocombustível, o mercado de produção de açúcar e seus derivados, são alguns aspectos fundamentais para a cadeia produtiva do país, fomentando o desenvolvimento social e econômico (Negrisoli *et al.* 2015).

No entanto, em razão do ataque de insetos pragas, todos os anos a produtividade da cana-de-açúcar é drasticamente reduzida, com danos diretos e indiretos que afetam tanto a produtividade quanto a qualidade do produto, e o controle dessas pragas é um desafio frente à crescente incidência desses insetos nas culturas, devido a expansão das áreas de monocultura (Brisceno, 2008; Alves *et al.* 2020).

Alguns danos diretos incluem a redução da produtividade devido à morte de plântulas, encurtamento dos colmos, brotações laterais indesejadas, murchamento e quebra das plantas. A broca-da-cana e outras pragas que atacam o colmo podem enfraquecer a estrutura da planta, tornando-a mais suscetível à quebra pelo vento ou durante a colheita. Quanto aos prejuízos, configura-se o aumento dos custos de produção devido aos investimentos necessários para o controle das pragas, o risco de doenças causadas pela contaminação de fungos e bactérias nas aberturas de galerias, e o impacto ambiental do uso excessivo de inseticidas químicos (Brisceno, 2008; Alves *et al.* 2020).

Biomassa vegetal

A parede celular vegetal primária é composta primariamente por três polissacarídeos quimicamente heterogêneos, a celulose, um homopolímero constituído por uma cadeia linear composta por fragmentos de glicose ligados a β -1,4; A hemicelulose, composta por polímeros ligados a β -1,4 abrangendo xilana, xiloglucano, arabinoxilano, glucoronxilana e glucomanano; e a pectina, que consiste em um agrupamento complexo de polímeros polissacarídicos enriquecidos com ácido galacturônico (Watanabe *et al.* 2009; Gilbert, 2010; Payne, 2015). Esses três componentes distribuídos na parede celular das plantas, representam uma proporção de 20-50%, 15-35% e 10-30%, respectivamente (Payne, 2015).

A diversidade química e estrutural desses carboidratos caracteriza suas variadas funções biológicas, como armazenamento de energia, nas formas de amido e glicogênio, e manutenção da estrutura, através da celulose e quitina (Davies & Sinnott, 2008). A celulose é um biopolímero abundante na natureza, que compõe cerca de 50% da matéria vegetal (Payne, 2015), tornando-se importante em pesquisas de conversão de biomassa celulósica em etanol, e, portanto, na indústria de biocombustíveis. Sendo assim, a digestão da parede celular vegetal, e conseqüentemente da celulose, envolve um processo complexo, que envolve a atividade de inúmeras enzimas em diferentes substratos (Calderon-Cortés *et al.* 2012).

As celulasas são enzimas que quebram a celulose em moléculas menores, como a celobiose e outros oligossacarídeos curtos, os quais são então convertidos em glicose pela ação da β -glicosidase. As enzimas envolvidas nesse processo são agrupadas no que é chamado de sistema celulase, que consiste em três tipos principais de enzimas: endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase (Sighn *et al.* 2016).

A endoglucanase atua hidrolisando, de forma aleatória, as ligações β -1-4 na porção central das moléculas de celulose, enquanto a exoglucanase age nas extremidades redutoras e não redutoras, liberando a celobiose e outros oligossacarídeos. Por fim, esses oligossacarídeos são convertidos em glicose pela ação da β -glicosidase. Esse processo é essencial para a quebra da celulose em unidades de glicose que podem ser utilizadas por organismos para produção de energia ou outros fins metabólicos (Davies & Henrissat, 1995; Sighn *et al.* 2016; Drula *et al.* 2021).

A pesquisa biotecnológica, direcionada à produção de biocombustíveis, tem se concentrado no uso de biomassa celulósica derivada de resíduos agrícolas como matéria-prima renovável. O etanol é amplamente utilizado nas indústrias energética, alcooleira, petroquímica e de transporte. O processo de fabricação de combustíveis e substâncias químicas derivados de

materiais lignocelulósicos inclui a preparação da matéria-prima, pré-tratamento, fracionamento, produção de sistemas enzimáticos altamente eficientes para a conversão da biomassa pré-tratada em açúcares fermentáveis, hidrólise, fermentação, recuperação do produto e tratamento de resíduos, e sendo capazes de converter diversos açúcares em etanol de forma eficaz (Bothast *et al.* 1997; Payne, 2015). A crescente busca por fontes de energias renováveis justifica-se pela recente crise climática global causada, em grande parte, pela demasiada exploração e uso contínuo de combustíveis fósseis. Nesse sentido, é provável que a biomassa seja atualmente o contribuinte primário mais abundante para a produção a médio e longo prazos de energias renováveis, favorecendo o cenário econômico global de energia sustentável, o que coloca o Brasil como promissor para a exportação dessa constituinte (Payne, 2015; CONAB, 2018; Santos *et al.* 2019).

Glicosil Hidrolases

Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) são constituídas por sequências moleculares essenciais para inúmeros processos biológicos, estando envolvidas na composição e fragmentação de carboidratos complexos, sendo pertinentes para adaptações fisiológicas em diferentes organismos. São classificadas em famílias com base na homologia de sequência e na estrutura tridimensional, embasadas na sequência do banco de dados Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy). Essa classificação fornece informações sobre o mecanismo catalítico e a especificidade do substrato da enzima (Gilbert, 2010). Dessa forma, apresentam alta especificidade para diferentes tipos de carboidratos, como celulose, hemicelulose, pectina e amido (Payne, 2015).

As glicosil hidrolases (GHs) representam a maior classe de CAZymes e estão presentes em todas as formas de vida. A variedade de genes que codificam GHs está relacionada à posição taxonômica de cada organismo. A evolução das GHs é caracterizada por eventos frequentes de duplicação, eliminação e transferência horizontal de genes. Esses eventos contribuem para a

diversidade e complexidade do conjunto de GHs em diferentes organismos, permitindo a adaptação a novas fontes de carboidratos e condições ambientais (Naumoff, 2011).

Atualmente estão agrupadas em 173 famílias, as quais são determinadas com base na homologia da sequência de aminoácidos, em que é considerada a similaridade entre proteínas, cujas famílias caracterizam-se pela especificidade enzimática e mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica semelhante (Naumoff, 2011; Drula *et al.* 2021). A nomenclatura, a especificidade do substrato e o mecanismo molecular, não se relacionam às características estruturais (Davies & Henrissat, 1995; Naumoff, 2011).

As glicosil hidrolases compreendem enzimas catalíticas do metabolismo de carboidratos, hidrolisam ligações glicosídicas ligados à O-, N e S entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma fração não carboidrato (Naumoff, 2011). A direção do movimento da enzima ao longo da cadeia pode variar, dependendo do mecanismo específico e da posição exata do ponto de clivagem em relação aos diferentes sítios envolvidos. De acordo com a região de clivagem no substrato são definidas categorias distintas, as enzimas endocelulases, as quais atuam na quebra de ligações glicosídicas aleatoriamente dentro da cadeia polissacarídica liberando oligossacarídeos. E as exocelulases, ativas nas extremidades do polissacarídeo, hidrolisam ligações glicosídicas de forma sequencial a partir das extremidades não redutoras ou redutoras, liberando monossacarídeos (Davies & Henrissat, 1995; Drula *et al.* 2021).

A hidrólise enzimática de uma ligação glicosídica é estereoespecífica (Naumoff, 2011). Isso configura que a enzima catalisa a quebra da ligação em apenas uma das orientações espaciais (α ou β), o que garante a liberação correta de monossacarídeos específicos (Dragan *et al.* 2019). Além disso, esse processo apresenta um mecanismo catalítico bem conservado (Drula *et al.* 2021). No entanto, para que a hidrólise enzimática de uma ligação glicosídica ocorra, é necessário

a presença de dois resíduos de aminoácidos catalíticos no sítio ativo da enzima. Esses resíduos, frequentemente D e/ou E, auxiliam na quebra da ligação glicosídica (Naumoff, 2011).

β -glicosidases em insetos

β -glicosidases (BGs) são enzimas essenciais para o processo de herbivoria em insetos, desempenhando funções importantes para seu metabolismo, como também na digestão da matéria vegetal (Azevedo *et al.* 2003). Dessa forma, decorrem o processo de digestão, auxiliando nas últimas etapas da degradação da celulose e hemicelulose garantindo a conversão da celobiose em glicose (Zhang *et al.* 2012). Para tanto, nos insetos adaptados às funções digestivas das glicosil hidrolases e glicosídeos, é sugerido que divergiram do mesmo ancestral animal o gene GH1, após à mutualidade com plantas para fins de proteção e alimentação (Ketudat-Cairns & Esen, 2010).

A evolução de β -glicosidases em insetos resultou em uma única enzima capaz de hidrolisar β -glicosídeos em um mesmo sítio ativo, a partir de múltiplas enzimas com diferentes substratos específicos. Para as β -glicosidases purificadas do trato intestinal de larvas é reconhecido apenas um sítio ativo, o qual geralmente é composto por duas regiões, uma definida para a ligação da molécula de glicose e a outra caracterizada como reconhecimento para a aglicona (Ferreira *et al.* 2001; Husebye *et al.* 2005). A estrutura clássica das β -glicosidases consiste em triose-fosfato-isomerase barril, conhecido como $(\alpha/\beta)_8$ apresentando oito α -hélices e oito folhas β (Jabbour, 2012).

Sendo classificadas nos insetos, em três classes baseadas na especificidade do substrato, duas das quais apresentam atividade típica de β -glicosidase (Tokuda *et al.* 2002). Na classe 1 são caracterizadas enzimas com capacidade de hidrolisar celobiose e lactose, assim como substratos sintéticos, incluindo β -p-nitrofenilglicosídeo (β -PNPG), β -p-nitrofenilgalactosídeo (β -PNPGal), β -p-nitrofenilfrutosídeo (β -PNPFru) e outros substratos semelhantes, com atividade das enzimas

glicosil β -glicosidase e aril β -glicosidase. A enzima glicosil β -glucosidase, da classe 2, pode hidrolisar substratos como lactose e celobiose. Na classe 3 as enzimas aril ou alquil β -glicosidase desempenham atividade em substrato β -PNPG e outros semelhantes. A abrangência da especificidade de substrato das β -glucosidases de insetos para glicosídeos de plantas com porção aril ou aquila, pode ser resultado da ativação de metabólitos de defesa (Terra & Ferreira, 1994).

Em *Bombyx mori*, o gene da β -glicosidase é expresso exclusivamente no intestino médio, que se trata de uma região específica para a síntese de β -glicosidase (Byeon *et al.* 2005). De fato, a maior expressão de BGs no intestino de insetos herbívoros prenuncia que estas enzimas participam na digestão de vários compostos de plantas (Eyun *et al.* 2014), sendo, portanto, importantes no sucesso da herbivoria de pragas agrícolas. Além disso, as BGs também estão envolvidas na metabolização de compostos anti-nutricionais oriundos de plantas (Pentzold *et al.* 2017; Huber *et al.* 2021), que são ingeridos durante a alimentação, resultando na inativação destes compostos nos insetos. A atividade enzimática das β -glicosidases é mais efetiva no intestino dos insetos (Terra & Ferreira, 1994), por ser um local em que grandes quantidades de β -glicosidases são sintetizadas para a degradação da celulose adquirida da dieta (Byeon *et al.* 2005). No entanto, foram também detectadas nas glândulas hipofaríngeas, ventrículo e intestino posterior de *Apis mellifera* (Pontoh *et al.* 2002), e nas glândulas salivares de cupins *Neotermes koshunensis* (Tokuda *et al.* 2002).

Para tanto, as β -glicosidases da família GH1 atuam nas últimas etapas da destituição da celulose e hemicelulose, convertendo a celulose em glicose, assim como, procedem na fase final da degradação da cana-de-açúcar, na qual é produzida a glicose para posteriormente ser transformada em etanol (Ketudat-Cairns & Esen, 2010). Com isso, salientamos a relevância das β -glicosidases na conversão de biomassa através da digestão pelos insetos, sendo fundamental a identificação e caracterização para o desenvolvimento de pesquisas biotecnológicas.

Glicosídeos cianogênicos

Uma variedade de produtos naturais bioativos produzidos pelas plantas estão amplamente distribuídos em mais de 2500 espécies vegetais, abrangendo samambaias, gimnospermas e angiospermas. Alguns desses compostos pertencem ao grupo dos metabólitos secundários, a saber os glicosídeos cianogênicos (CNglcs), os quais são classificados como fitoanticipinas, caracterizados por liberar substâncias tóxicas durante a herbivoria. Após o rompimento do tecido vegetal, a hidrólise enzimática carregada por uma beta-glicosidase inicia o catabolismo desses CNglcs que se dissociam em substâncias tóxicas, incluindo cianeto de hidrogênio tóxico (HCN), um cetocomposto e glicose (Zagrobelny *et al.* 2008; Pentzold *et al.* 2014; Erb & Reymond, 2019).

As beta-glicosidases envolvidas na clivagem de CNglcs apresentam alta especificidade em relação à porção aglicona de CNglcs de uma mesma espécie vegetal. As plantas ligam moléculas de glicose aos CNglcs para torná-las inativas e protegê-las de danos às suas próprias células. Durante a herbivoria a glicose dos CNglcs é removida, e com isso, ativada a liberação de compostos tóxicos. Glicosídeos cianogênicos são importantes metabólitos secundários com função defensiva nas plantas (Wittstock & Burow, 2007; Zagrobelny *et al.* 2008; Huber *et al.* 2021).

Lepidoptera comumente apresenta classes de componentes químicos sequestrados de metabólitos secundários das plantas, a saber glicosídeos cianogênicos, iridoídes e salicinóides. Glicosídeos de defesa das plantas podem ser ativados tanto pelas glicosidases vegetais quanto de insetos. Todas as enzimas que ativam protoxinas caracterizadas até agora em insetos herbívoros são beta-glicosidases, que clivam beta-D-glicosídeos e liberam glicose livre (Pentzold *et al.* 2014). A ativação defensiva por hidrólise de glicosídeos pode ser uma estratégia de desintoxicação (Huber *et al.* 2021). O glicosídeo é hidrolisado no intestino e a aglicona se difunde

nos tecidos, onde é reconvertida em ciclina, que permanece dissolvida nos fluidos corporais do inseto, característica que pode ser sugerida como resultado de sequestro de compostos de defesa (Zagobelny *et al.* 2008).

Um glicosídeo cianogênico natural é a amigdalina, formado por duas moléculas de glicosídeos, sendo encontrado em várias espécies vegetais de relevância agrícola, como sorgo, milho, maçã e mandioca (Vassão *et al.* 2018). A hidrólise da amigdalina é realizada por β -glicosidases específicas presentes no intestino médio de insetos, resultando na degradação do composto e na liberação do cianeto de hidrogênio tóxico (HCN) (Rasmzi *et al.* 2014; Aydi *et al.* 2020). A presença da amigdalina tem um efeito inibitório sobre a atividade enzimática das beta-glicosidases em lepidópteros (Azevedo *et al.* 2003). Em *Grapholita molesta*, foi observado que a amigdalina influencia no tempo de desenvolvimento e na fecundidade dos insetos, a depender da dosagem do composto (Wang *et al.* 2022). Esses efeitos mostram a complexidade das interações entre plantas e insetos, destacando a importância do estudo dos glicosídeos cianogênicos para entender suas implicações na ecologia e no manejo agrícola.

Portanto, neste trabalho nós identificamos e caracterizamos os genes da família GH1 presentes nas três principais espécies de brocas da cana-de-açúcar, analisados a partir de transcrito intestinal, estabelecendo a filogenia do gene GH1 em Lepidoptera. Além disso, alguns genes diferencialmente expressos foram tiveram sua expressão avaliada, sendo estudados com mais detalhes na espécie *Diatraea saccharalis*. A expressão dos genes foi analisada sob diferentes condições de alimentação, como também, em resposta ao composto cianogênico amigdalina.

Literatura Citada

Alves, R., J. Malaquias, L. Jorge & L. Bortoloto. 2020. Influência do afastamento do palhiço na deposição e na eficiência de inseticidas químicos e biológico no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 21p. ISSN online 2176-509X

Azevedo, T.R., W.R. Terra & C. Ferreira. 2003. Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. Biochem Mol Biol. 33: 81-92. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00179-0)

Briceno, S.H.R. 2008. Lepidópteros da família Castiniidae - Distribuição geográfica das espécies conhecidas na América tropical e subtropical e importância econômica da *Castnia licus* Drury, 1773 no nordeste do Brasil. Cooperativa regional dos produtores de açúcar e álcool de Alagoas. Maceió, AL, 20. ISSN 1678-1953

Byeon, G.M., K.S. Lee, Z.Z. Gui, I. Kim, P.D. Kang, S.M. Lee & B.R. Jin. 2005. A digestive β -glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. Comp. Biochem. Physiol B: Biochem Mol Biol. 141(4), 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.05.001>

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Cana-de-açúcar: Análise Mensal – Outubro 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>.

Davies, G. & B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Struct. v3n (9): 853-859. DOI: [10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)

Dragan, S.V., K.L. Borisova, D.N. Pelageev & V.P. Anufriev. 2019. Concerning the Stereoselectivity of the Oxidative Dimerization of 3-Alkyl-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones in the Synthesis of Hybocarpone. Nat Prod Commun. 14(6). DOI:[10.1177/1934578X19860687](https://doi.org/10.1177/1934578X19860687)

Drula, E., M.L. Garron, S. Dogan, V. Lombard, B. Henrissat & N. Terrapon. 2022. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. Nucleic acids res. 50(D1): D571-D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>

Eyun, S.-I., H. Wang, Y. Pauchet, R.H. French-Constant, A.K. Benson, A. Valencia-Jiménez, E.N. Moriyama & B.D. Siegfried. 2014. Molecular Evolution of Glycoside Hydrolase Genes in the Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). PLoS One. 9: e94052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094052>

Erb, M. & P. Reymond. 2019. Molecular interactions between plants and insect herbivores. An. Rev Plant Biol. 70(1):527-557. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910>

Ferreira, A.H. Marana, S.R. Terra, W.R. & C. Ferreira. 2001. Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. Insect Biochem Mol Biol. 31(11), 1065-1076. DOI: [10.1016/S0965-1748\(01\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00054-6)

Ferreira, C., J.R.P. Parra & W.R. Terra. 1997. The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 27: 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00069-0)

Francischini, F.J.B., E.M.G. Cordeiro, J.B. de Campos, A. Alves-Pereira, J.P.G. Viana, X. Wu, W. Wei, P. Brown, A. Joyce, G. Murua, S. Fogliata, S.J. Clough & M.I. Zucchi. 2019. *Diatraea saccharalis* history of colonization in the Americas. The case for human-mediated dispersal. *PLoS One.* 14(7): e0220031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220031>

Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. da Silva, A.P.P da Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. do Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007. The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. *Fla. Entomol.* 90: 309-313. DOI:[10.1653/0015-4040\(2007\)90\[309:TBODFL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[309:TBODFL]2.0.CO;2)

Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L Carvalho, G.C. de Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. *Entomologia agrícola.* Piracicaba, FEALQ, 920p.

Gilbert, H.J. 2010. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiol.* 153(2): 444–455, <https://doi.org/10.1104/pp.110.156646>

Huber M., T. Order, S. Irmisch, A. Riedel, S. Gablenz, J. Fricke, P. Rahfeld, M. Reichelt, C. Paetz, N. Liechti, L. Hu, Z. Bont, Y. Meng, W. Huang, C.A.M. Robert, J. Gershenzon & M. Erb. 2021. A beta-glucosidase of an insect herbivore determines both toxicity and deterrence of a dandelion defense metabolite. *eLife.* 10: e68642. <https://doi.org/10.7554/eLife.68642>

Husebye, H., S. Arzt, W.P. Burmeister, F.V. Härtel, A. Brandt, J.T. Rossiter & A.M. Bones. 2005. Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. *Insect biochem Mol Biol.* 35(12), 1311-1320. DOI: [10.1016/j.ibmb.2005.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.07.004)

Kawahara, A. Y., D. Plotkin, M. Espeland, K. Meusemann, E.F. Toussaint, A. Donath & J.W. Breinholt. 2019. Phylogenomics reveals the evolutionary timing and pattern of butterflies and moths. *Proc Natl Acad Sci.* 116(45): 22657-22663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907847116>

Ketudat-Cairns, J.R. & A. Esen. 2010. β -Glucosidases. *Cell Mol Life Sci.* 67: 3389-3405. DOI: [10.1007/s00018-010-0399-2](https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2)

Macedo, N. & D. Macedo. 2004. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. *Visão Agrícola* n°1. ISSN 1806-6402

Marana, S. R., M. Jacobs-Lorena, W.R. Terra & C. Ferreira. 2001. Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. *Bioch Biophys Acta.* 1545: 41-52. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00260-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00260-0)

Marana, S.R., W.R. Terra & C. Ferreira. 2000. Purification and properties of a β -glucosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect Biochem Mol Biol.* 30(12), 1139-1146. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00090-4)

Mendonça, A.F. 2005. Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico. *Insecta.*

Mendonça, A.F. 1996. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p. [ISSN 1516-8840](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00090-4)

Mitter, C., D.R. Davis & M.P. Cummings. 2017. Phylogeny and evolution of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol.* (62) 265-283. DOI: [10.1146/annurev-ento-031616-035125](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035125)

Mohsin, I., N. Poudel, D.C. Li & A.C. Papageorgiou. 2019. Crystal structure of a GH3 beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. *Int J Mol Sci.* 20(23) <https://doi.org/10.3390/ijms20235962>. doi: [10.3390/ijms20235962](https://doi.org/10.3390/ijms20235962)

Negrisoli, A.S. Júnior., J.I. Baldani, M.F.G. de Sá, M.C.M da Silva, L.L.P de 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. *Embrapa Tabuleiros Costeiros.* [ISSN 1678-1953](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00147-3)

Payne, C. M., B.C. Knott, H.B. Mayes, H. Hansson, M.E. Himmel, M. Sandgren, J. Ståhlberg & G.T. Beckham. 2015. Fungal Cellulases. *Chem Rev.* 115 (3): 1308-1448. DOI:[10.1021/cr500351c](https://doi.org/10.1021/cr500351c)

Pentzold, S., M.K. Jensen, A. Matthes, C.E. Olsen, B.L. Petersen, H. Clausen, B.L. Moller, S. Bak & M. Zagrobelny. 2017. Spatial separation of the cyanogenic β -glucosidase ZfBGD2 and cyanogenic glucosides in the haemolymph of *Zygaena* larvae facilitates cyanide release. *Royal Soc Open Sci.* 4: 170262. DOI: [10.1098/rsos.170262](https://doi.org/10.1098/rsos.170262)

Pentzold, S., M. Zagrobelny, F. Rook & S. Bak. 2014. How insects overcome two-component plant chemical defence: plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biol Rev.* 89(3), 531-551. DOI: [10.1111/brv.12066](https://doi.org/10.1111/brv.12066)

Pontoh, J., & N.H. Low. 2002. Purification and characterization of β -glucosidase from honeybees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol.* 32(6), 679-690. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00147-3)

Ramzi, S., and A. Zibae. 2014. Digestive proteolytic activity in *Apodiphus amygdali* Germar (Hemiptera: Pentatomidae): effect of endogenous inhibitors. *J Entomol Acarol Res.* 46.2: 35-41.

Regier, J.C., C. Mitter, A. Zwick, A.L. Bazinet, M.P. Cummings, A.Y. Kawahara, J.C. Sohn, D.J. Zwickl, S. Cho, D.R. Davis, J. Baixeras, J. Brown, C. Parr, S. Weller, D.C. Lees & K.T. Mitter. 2013. A Large-Scale, Higher-Level, Molecular Phylogenetic Study of the Insect Order Lepidoptera (Moths and Butterflies) *PLoS One.* 8(3): E58568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058568>

Santos, C.A., M.A.B. Morais, O.M. Terrett, J.J. Lyczakowski, L.M. Zanphorlin, J.A. Ferreira-Filho, C.C.C. Tonoli, M.T. Murakami, P. Dupree & A.P. Souza. 2019. An engineered GH1 β -glucosidase displays enhanced glucose tolerance and increased sugar release from lignocellulosic materials. *Sci Rep.* (9) 4903. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41300-3>

Scharf, M.E., E.S. Kovaleva, S. Jandhao, J.H. Campbell, G.W. Buchman & D.G. Boucias. 2010. Functional and translational analyses of a beta-glucosidase gene (glycosyl hydrolase family 1) isolated from the gut of the lower termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 611-620. DOI: [10.1016/j.ibmb.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.06.002)

Silva, C.C.M. 2013. Associação de *Cotesia flavipes* (Cam.) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 51p.

Singh, G., A.K. Verma & V. Kumar. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech.* 6: 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>

Terra, W.R. & C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization, and function. *Comp Biochem Physiol. B.* 109: 1-62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)

Tokuda, G., H. Saito & H. Watanabe. 2002. A digestive β -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'-and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochem and Mol Biol.* 32(12), 1681-1689. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00108-X)

Vassão, D. G., N. Wielsch, A.M.D.M.M. Gomes, S. Gebauer-Jung, Y. Hupfer, A. Svatoš & J. Gershenson. 2018. Plant defensive β -glucosidases resist digestion and sustain activity in the gut of a lepidopteran herbivore. *Front Plant Sci.* (9):1389.

Wang, Y., J. Li, X. Chai, X. Hu, X. Li, W. Kong & R. Ma. 2022. Development and Fecundity of Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Reared on Various Concentrations of Amygdalin. *Insects.* (13) 974. <https://doi.org/10.3390/insects13110974>

Wittstock, U. & M. Burow. 2007. Tipping the scales-specifier proteins in glucosinolate hydrolysis. *IUBMB life.* 59(12): 744-751. <https://doi.org/10.1080/15216540701736277>

Zagrobelny, M., S. Bak & B.L. Møller. 2008. Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochem.* 69(7):1457-1468. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.019>

CAPÍTULO 2

EFEITO ANTINUTRICIONAL OU AUTOPROTEÇÃO? A ALIMENTAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR DIMINUI A EXPRESSÃO DE GENES DE β -GLICOSIDASE (GH1) EM

*Diatraea saccharalis*¹

LÍLIAN MARIA CARVALHO FERREIRA^{1,2}, MANOELY ABREU REIS^{1,2}, JOSÉ DIJAIR ANTONINO^{1,2}

1. Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, Brasil
2. Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Agronomia Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, Brasil

¹ Ferreira, L.M.C., M.A. Reis, & J. D. Antonino. Efeito antinutricional ou autoproteção? A alimentação com cana-de-açúcar diminui a expressão de genes da Beta-glicosidase (GH1) em *Diatraea saccharalis*. A ser submetido na Insect Molecular Biology.

Este capítulo foi removido devido a embargo temporário.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Agradecemos também à Fátima Dias pela colaboração nesta pesquisa.

CAPÍTULO 3
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo foi removido devido a embargo temporário.