

DESVENDANDO A REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *Diatraea saccharalis*
EM RESPOSTA A DIFERENTES AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

por

MANOELY ABREU REIS

(Sob Orientação do Professor Jose Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE)

RESUMO

Os insetos não possuem sistema imunológico adaptativo como os vertebrados, dependendo basicamente do sistema imunológico inato, composto por respostas humorais e celulares, para se defenderem de parasitas e patógenos. A resposta humoral é composta por várias vias de sinalização que resultam na produção de moléculas como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e a melanina, que atuam contra o agente invasor. Apesar de muitos estudos descreverem os tipos de resposta e sinalização das vias do sistema imune de insetos a diferentes patógenos, grande parte deles é realizado com insetos modelos ou com patógenos que não são naturais. Neste trabalho investigou-se diferentes aspectos do sistema imunológico de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), uma praga chave da cana-de-açúcar no Brasil. Inicialmente, foram caracterizados os principais genes componentes das vias de sinalização de resposta humoral: Toll, IMD, Jak-STAT e a via Profenoloxidase (via da melanização). Em seguida, investigou-se a modulação de pelo menos um gene representante de cada via, com os insetos expostos a diferentes agentes de controle biológico, como o fungo *Metarhizium anisopliae*, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) e o parasitoide *Tetrastichus howardi*. Em um segundo momento, foi dado enfoque à caracterização dos AMPs de *D. saccharalis*, com destaque para uma lebecina, um peptídeo rico em prolina, que tem sua

expressão aumentada na cabeça de lagartas alimentadas com cana-de-açúcar em relação a lagartas alimentadas com dieta artificial ou quando ingerem esporos e cristais de Bt. Por fim, no quarto capítulo foi abordado se adultos de *T. howardi* induziriam *priming* imunológico em adultos de *D. saccharalis*, com efeitos positivos na prole da praga. O *priming* imunológico ocorre quando uma experiência de contato ou infecção passada resulta em uma resposta imune mais efetiva em uma exposição secundária. A partir destes resultados, novos aspectos do sistema imune de *D. saccharalis* foram desvendados, o que pode contribuir para o aperfeiçoamento do uso de agentes de controle biológico e para o desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis para o controle de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, regulação gênica, sistema imune, interação inseto-patógeno

UNVEILING THE REGULATION OF THE IMMUNE SYSTEM IN *Diatraea saccharalis* IN
RESPONSE TO DIFFERENT BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

POR

MANOELY ABREU REIS

(Sob Orientação do Professor Jose Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE)

ABSTRACT

Insects do not have an adaptive immune system like vertebrates, relying primarily on the innate immune system, which consists of both humoral and cellular responses, to defend against parasites and pathogens. The humoral response involves several signaling pathways that lead to the production of molecules such as antimicrobial peptides (AMPs) and melanin, which act against the invading agent. Although many studies describe the types of responses and signaling pathways in insect immune systems to various pathogens, much of this research is conducted with model insects or non-natural pathogens. This work investigated different aspects of the immune system in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), a key sugarcane pest in Brazil. Initially, the main genes involved in the humoral response signaling pathways were characterized: Toll, IMD, Jak-STAT, and the Phenoloxidase pathway (melanization pathway). Subsequently, the modulation of at least one gene representative of each pathway was investigated, with insects exposed to different biological control agents, such as the fungus *Metarhizium anisopliae*, the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt), and the parasitoid *Tetrastichus howardi*. Later, the focus shifted to characterizing the AMPs of *D. saccharalis*, particularly a lebocin, a proline-rich peptide whose expression is increased in the heads of caterpillars fed on sugarcane compared to those fed on artificial diet or ingesting Bt spores and crystals. Finally, the fourth chapter addressed whether *T. howardi* adults

would induce immunological priming in *D. saccharalis* adults, with positive effects on the pest's offspring. Immunological priming occurs when a past encounter or infection results in a more effective immune response upon subsequent exposure. These results unveiled new aspects of the immune system in *D. saccharalis*, potentially contributing to the improvement of biological control agents and the development of new sustainable pest control technologies.

PALAVRAS-CHAVE: Sugarcane borer, gene regulation, immune system, insect-pathogen interaction

DESVENDANDO A REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *Diatraea saccharalis*
EM RESPOSTA A DIFERENTES AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

por

MANOELY ABREU REIS

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

RECIFE - PE

Julho – 2024

DESVENDANDO A REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *Diatraea saccharalis*
EM RESPOSTA A DIFERENTES AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

por

MANOELY ABREU REIS

Comitê de Orientação:

José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

DESVENDANDO A REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *Diatraea saccharalis*
EM RESPOSTA A DIFERENTES AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

por

MANOELY ABREU REIS

Banca Examinadora:

José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

Ricardo Antônio Polancyk – UNESP/Jaboticabal

Guilherme Duarte Rossi – UNESP/Jaboticabal

Erich Yukio Tempel Nakasu – Embrapa

Clidia Eduarda Moreira Pinto – Embrapa

Manoely Abreu Reis

Doutora em Entomologia

Prof. José Dijair Antonino – UFRPE

Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo –CRB-4 1781

R375d Reis, Manoely Abreu
Desvendando a regulação do sistema imunológico de
Diatraea saccharalis em resposta a diferentes agentes de
controle biológico / Manoely Abreu Reis. – Recife, 2024.
167 f.; il.

Orientador(a): Jose Dijair Antonino de Souza Junior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
Agrícola, Recife, BR-PE, 2024.
Inclui referências .

1. Regulação de expressão gênica 2. Sistema imunológico 3.
Diatraea saccharalis 4. Controle biológico I. Souza Junior,
Jose Dijair Antonino de, orient. II. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cleonice Mesquita Abreu e Manoel da Silva Reis, pelo amor incondicional, incentivo constante e apoio inabalável que tornaram esta conquista possível. Agradeço por terem me ensinado valores que norteiam os meus passos.

À memória de Raimundo Costa Reis, o avô que me marcou com sua alegria e bondade. Sua falta é sentida profundamente, mas sua memória vive eternamente em meu coração.

Ao meu orientador, Dijair Antonino, pela orientação sábia, paciência e encorajamento. Sua dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por acreditar em meu potencial e por me guiar nesta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao professor Dijair Antonino Júnior, pela orientação, incentivo e paciência.

Aos colaboradores, professores Jorge Braz (Entomologia – UFRPE) e Marcelo Paiva (UFPE/IAM) pela disponibilidade de uso de seus respectivos laboratórios.

À Dr. Roberta Coelho, pela dedicação de seu tempo nas correções e sugestões nos capítulos desta tese.

À família Belmonte, por me acolherem como membro de sua família. Obrigada pelo cuidado, carinho e amor.

À minha família, em especial aos meus pais Cleonice Abreu e Manoel Reis e à minha irmã Lucilene Reis, pelo amor e apoio incondicional.

Ao bom Deus, por ser o meu tudo, e à Santíssima Virgem Maria.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Vias de respostas imunológicas em insetos.....	3
Vias do sistema imune em Lepidoptera	8
Peptídeos antimicrobianos (AMPs) nos insetos	9
<i>Priming</i> imunológico.....	12
Sistema de estudo	15
LITERATURA CITADA.....	16
2 HOW <i>Diatraea saccharalis</i> MODULATES ITS HUMORAL RESPONSE AGAINST BIOLOGICAL CONTROL AGENTS: GENE EXPRESSION ANALYSIS OF KEY HUMORAL PATHWAY GENES.....	28
ABSTRACT	29
RESUMO	30
INTRODUCTION.....	32
MATERIAL AND METHODS	35
RESULTS.....	41
DISCUSSION	44
ACKNOWLEDGMENTS.....	49
REFERENCE LIST.....	49

3	IMUNIDADE PARA DENTRO DA CABEÇA: UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO É INDUZIDO NA CABEÇA DE <i>Diatraea saccharalis</i> QUANDO O INSETO INGERE CANA-DE-AÇÚCAR OU <i>Bacillus thuringiensis</i>	70
	RESUMO	71
	ABSTRACT	73
	INTRODUÇÃO.....	75
	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
	RESULTADOS	83
	DISCUSSÃO.....	89
	AGRADECIMENTOS	92
	LITERATURA CITADA.....	93
4	QUANDO (RE)CONHECER O INIMIGO NÃO É VANTAJOSO: TENTATIVA DE PRIMING IMUNOLÓGICO EM ADULTOS DE <i>Diatraea saccharalis</i> COM PARASITOIDE RESULTA NA REDUÇÃO DA IMUNIDADE DA PROLE ...	122
	RESUMO	123
	ABSTRACT	124
	INTRODUÇÃO.....	126
	MATERIAL E MÉTODOS.....	128
	RESULTADOS	133
	DISCUSSÃO.....	135
	AGRADECIMENTOS	140
	LITERATURA CITADA.....	140
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta amplamente cultivada e comercializada em todo o mundo (de Matos *et al.* 2020). Atualmente, o Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, correspondendo a cerca de 35% da produção global (Conab 2024, FAOSTAT 2024). O Estado de Pernambuco corresponde a 2,4% da área total plantada com cana-de-açúcar no Brasil (Zheng *et al.* 2021). Entretanto, a qualidade e o rendimento da cana-de-açúcar são afetados por várias pragas agrícolas, sendo que 13% das perdas na produção são causadas por insetos (Iqbal *et al.* 2021, Qamar *et al.* 2021). Dentro deste contexto, as brocas, lepidópteros que causam danos significativos ao caule, são fatores limitantes que influenciam a produção de cana-de-açúcar no Brasil, destacando-se as espécies *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Telchin licus* (Drury), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) e *Diatraea impersonatella* (Walker) (Maria do Rosário *et al.* 2006, Rossato *et al.* 2013, EMBRAPA 2022).

A espécie *D. saccharalis*, pertencem à ordem Lepidoptera e à família Crambidae, conhecida como broca da cana-de-açúcar, é uma espécie que representa uma crescente ameaça para diversas culturas, sobretudo à da cana-de-açúcar, sendo a principal praga desta cultura no Brasil (Gallo *et al.* 2002, Macedo & Lavorenti 2004, Bortoli *et al.* 2005, Cruz 2007). Sua infestação ocorre ao longo de todo o ano, resultando em danos significativos diretos e indiretos às plantações (Bortoli *et al.* 2005, Cruz 2007).

O lepidóptero *D. impersonatella*, é semelhante à espécie *D. saccharalis*, inclusive em relação aos danos causados à cultura da cana-de-açúcar (Solis & Metz 2016). No entanto, a espécie *D.*

impersonatella tem uma incidência maior na região Nordeste, especialmente nos estados de Alagoas e Pernambuco (da Silva *et al.* 2021).

A espécie *T. licus*, conhecida como broca-gigante da cana-de-açúcar, apresenta alta prevalência na região Nordeste e assim como *D. saccharalis* e *D. impersonatella*, suas lagartas perfuram o colmo da planta, causando danos consideráveis e perdas econômicas significativas (Cursi *et al.* 2022, Silva-Brandão *et al.* 2013, Li *et al.* 2024).

O controle das brocas da cana tem sido realizado por meio do manejo integrado de pragas, que envolve programas de controle biológico e o cultivo de variedades resistentes (Silva *et al.* 1999, Botelho 1992). O sucesso do controle biológico é atribuído à diversidade de inimigos naturais introduzidos em diferentes estágios da praga (Molter *et al.* 2023). No Brasil, destaca-se o uso do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Botelho & Macedo 2002). Outro candidato promissor para o controle de *D. saccharalis* é o parasitoide *Tetrastichus howardi* (Olliff), capaz de parasitar larvas e pupas (Favero *et al.* 2015, Rodrigues *et al.* 2021).

Da mesma forma, o uso de microrganismos entomopatogênicos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, também tem sido amplamente reconhecido como uma estratégia promissora para o controle de pragas. Isso se deve ao sucesso demonstrado no controle de algumas pragas, como a cigarrinha *Mahanarva posticata* (Stal) na cana-de-açúcar, *Notozulia entreriana* (Berg) em pastagens, e *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) no manejo das lagartas da soja, entre outras (Mascarin *et al.* 2019, Deka *et al.* 2021). Em diversas partes do mundo, biopesticidas à base de fungos têm sido formulados e registrados com *Metarhizium anisopliae* (Smith) e *Beauveria bassiana* (Thunberg) sendo os micoinseticidas usualmente utilizados em programas de controle biológico (Dalzoto & Uhry 2009). Ademais, diversas espécies de bactérias são patogênicas a insetos, sendo *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) o biopesticida mais comumente utilizado no mundo (Liu *et al.* 2021). Assim, é fundamental realizar estudos que avaliem como esses microrganismos regulam

as vias de defesa do sistema imunológico dos insetos, utilizando outros insetos diferente do modelo de *Drosophila melanogaster* (Meigen). Além disso, compreender como essas vias funcionam em resposta a agentes de controle biológico é de extrema relevância, pois grande parte do conhecimento sobre o sistema imunológico é baseado em estudos com microrganismos que não são naturalmente patogênicos para insetos, como *Serratia marcescens* (Bizio), *Escherichia coli* (Nissle), *Staphylococcus aureus* (Koch), entre outros (Charles & Killian 2015, Xu *et al.* 2020). Portanto, conhecer a biologia e fisiologia da praga e sua interação e mecanismos de defesa a patógenos é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e, conseqüentemente, para a proteção das culturas agrícolas.

Vias de respostas imunológicas em insetos

Os animais possuem mecanismos de defesa contra patógenos divididos em imunidade inata e adquirida (Lavine & Strand 2002, Zuk & Stoeckl 2002, Schmid-Hempel 2005). A imunidade inata, presente desde o nascimento, atua de forma geral por meio de barreiras físicas e resposta inflamatória (Lavine & Strand 2002). Por outro lado, a imunidade adquirida, desenvolvida ao longo da vida, é específica para cada tipo de invasor, utilizando linfócitos como receptores para antígenos, além de células T e B, para eliminar patógenos e gerar memória imunológica, proporcionando respostas mais eficazes em reinfecções (Lavine & Strand 2002, Stokes *et al.* 2015, Tsakas & Marmaras 2010, Sheehan *et al.* 2018). A união desses sistemas garante proteção contra uma ampla gama de agentes infecciosos (Sheehan *et al.* 2018). Ao contrário de outros animais, os insetos dependem unicamente do sistema imunológico inato para combater infecções (Lavine & Strand 2002, Strand 2008, Tsakas & Marmaras 2010, Sheehan *et al.* 2018). Apesar disso, essa defesa inata é extremamente complexa, composta por respostas celulares e humorais (Tsakas & Marmaras 2010, Stokes *et al.* 2015, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020).

A imunidade celular refere-se à atividade de células específicas, denominadas hemócitos, que realizam ações como fagocitose, nodulação e encapsulação (Strand 2008, Satyavathi *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2021). A descrição mais detalhada dos hemócitos em insetos vem de estudos realizados em *D. melanogaster*, e sabe-se que as larvas de *Drosophila* contêm três tipos diferenciados de hemócitos em circulação: os plasmatócitos, os lamelócitos e as células cristal (Ribeiro & Brehélin 2006, Strand 2008). Os plasmatócitos são responsáveis pela fagocitose, os lamelócitos têm a função de encapsular corpos estranhos (como os ovos de parasitoides) e as células cristal armazenam a profenoloxidase, que atua na melanização (Mackenzie *et al.* 2011, Krautz *et al.* 2014, Dudzic *et al.* 2015, Melcarne *et al.* 2019).

A imunidade humoral refere-se à produção de moléculas efetoras pelo sistema imunológico dos insetos em resposta a estímulos patogênicos, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e as complexas cascatas enzimáticas que coordenam a ativação de precursores de moléculas relacionadas ao sistema imunológico, tais como a profenoloxidase (PPO), pró-Spaetzle (proSpz), proplasmatócitos e peptídeo de espalhamento de plasmócitos (proPSP) (Lavine & Strand 2002, Strand 2008, Zhang *et al.* 2021). Incluem, ainda, a produção de receptores de reconhecimento de padrões humorais (PRRs) e de enzimas líticas, além de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) (Silverman & Maniatis 2001, Zhang *et al.* 2021, Sato 2023).

É importante notar que a classificação das defesas em celulares e humorais é simplificada para melhor compreensão, pois, na realidade, fatores humorais exercem influência sobre as funções celulares e os hemócitos produzem diversas moléculas humorais (Lavine & Strand 2002, Shia *et al.* 2009, Tsakas & Marmaras 2010, Zhang *et al.* 2021). Segundo Sato (2023), o primeiro estágio na formação de nódulos na hemolinfa dos insetos está estreitamente relacionado com a melanização e a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP).

Além disso, para o desencadeamento das respostas imunológicas, é essencial o reconhecimento inicial de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRR) (Silverman & Maniatis 2001, Satyavathi *et al.* 2014, Stokes *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2021). Esses receptores, que podem estar presentes de forma solúvel na hemolinfa ou nas superfícies dos hemócitos, detectam a presença do organismo invasor, que por sua vez, ativa vias de transdução de sinal evolutivamente conservadas, que atuam como cascatas de sinalização intracelular e culminam na ativação de fatores de transcrição (Silverman & Maniatis 2001, Zhang *et al.* 2021). Estes fatores, ligam-se ao DNA, regulando a expressão de genes que resultam em respostas imunológicas para neutralizar a ameaça existente (Stokes *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2021, Weidemüller *et al.* 2021).

Os insetos possuem três vias imunológicas principais, distintas e independentes entre si, denominadas via Toll (via que envolve o receptor Toll), IMD (do inglês *Immune deficiency*) e JAK-STAT (do inglês *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*), que foram muito bem caracterizadas em *D. melanogaster* (Silverman & Maniatis 2001, Leclerc & Reichhart 2004, Tzou *et al.* 2002, Lemaitre & Hoffmann 2007, Cytryńska *et al.* 2016, Rosales & Vonnice 2017).

-Via Toll

A via Toll em *Drosophila* é ativada em resposta a bactérias Gram-positivas e fungos (Silverman & Maniatis 2001, Tzou *et al.* 2002, Leclerc & Reichhart 2004). Nesta via, o peptidoglicano (PGN) do tipo Lys, que compõe a parede celular de bactérias Gram-positivas e a β -1,3-glucana dos fungos, são reconhecidos pelos PRRs (do inglês Pattern recognition receptors), como PGRP-AS (do inglês peptidoglycan recognition protein-AS), PGRP-SD (do inglês peptidoglycan recognition protein-SD), GNB1 e GNB3 (do inglês Gram-negative bacteria binding protein 1 e 3) (Roh *et al.* 2009, Rosales & Vonnice 2017, Ali Mohammadie Kojour *et al.*

2020, Mahanta *et al.* 2023). Após o reconhecimento inicia-se uma cascata proteolítica que ativa a proteína Spatzle (SPE), que se liga ao receptor Toll, presente na membrana celular, e a partir desse momento inicia-se uma série de fosforilações em cascata de MyD88 (do inglês *myloid differentiation primary-response gene 88*), em seguida, Tube, Pelle, Cactus (Leclerc & Reichhart 2004, Valanne *et al.* 2011, Lima *et al.* 2021). Esta cascata de sinalização leva à ativação de fatores de transcrição do tipo fator nuclear kappa B (NF- κ B), Dorsal/Dif, que regulam a expressão de genes que codificam AMPs (Silverman & Maniatis 2001, Tzou *et al.* 2002, Imler & Hoffmann 2003, Leclerc & Reichhart 2004, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020).

-Via IMD

A via de sinalização imunodeficiência (IMD) é uma via que responde a algum determinante molecular presente especialmente em bactérias Gram-negativas, embora em alguns casos também possa atuar em bactérias Gram-positivas (Leclerc & Reichhart 2004, Myllymaki *et al.* 2014).

A sinalização na via IMD é iniciada quando receptores específicos reconhecem estruturas conservadas de peptidoglicano do tipo ácido diaminopimélico (PGN-DAP) de bactérias (Leclerc & Reichhart 2004, Myllymaki *et al.* 2014). Esses receptores incluem o PGRP-LC, o PGRP-LA (receptor transmembranar) e o PGRP-LE (receptor intracelular) que ao reconhecerem os PAMPs, dão início a uma cascata de sinalização caracterizada pela presença das proteínas IMD (Immune Deficiency), FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) e DREDD (*Death-related Ced-3/Nedd2-like protein*) (Leclerc & Reichhart 2004, Tanji & Ip 2005, Myllymaki *et al.* 2014, Hillyer 2016, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020). Estes conduzem à translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B Relish, resultando na ativação da expressão de diversos peptídeos antimicrobianos, além de outros genes relacionados às respostas imunológicas (Hoffmann 2003, Tanji & Ip 2005, Myllymaki *et al.* 2014).

-Via JAK/STAT

A via Janus quinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK/STAT) é considerada uma das vias mais simples dentre as mencionadas anteriormente, mantendo-se evolutivamente conservada desde invertebrados até humanos (Rawlings *et al.* 2004, Harrison 2012). Esta via desempenha um papel crucial nas defesas celulares em resposta às citocinas, contribuindo para o desenvolvimento das células do sistema imunológico (Imada & Leonard 2000, Rawlings *et al.* 2004).

Esta via é ativada em resposta a infecções virais e parasitoides e também a injúrias mecânicas (Dostert *et al.* 2005, Yang *et al.* 2021a, Zhang *et al.* 2023). A sinalização inicia-se quando citocinas extracelulares se ligam ao receptor transmembranar, desencadeando uma cascata de sinalização caracterizada por três componentes principais: o receptor de citocina Domeless, a proteína quinase Janus (JAK) e o fator de transcrição STAT (Arbouzova & Zeidler 2006, Harrison 2012, O'Shea *et al.* 2015).

-Via da profenoloxidase (PPO)

Esta via é tão significativa quanto as demais, pois representa um mecanismo de defesa universal entre os artrópodes e é uma das primeiras vias a serem ativadas após lesões ou infecções (Dudzic *et al.* 2015, Cooper *et al.* 2019, Jiang 2021). As enzima-chave nesta via são as profenoloxidases (PPO), as quais são produzidas, em sua maioria, por células cristal e desempenham um papel crucial na cicatrização de feridas e na eliminação de microrganismos invasores (Dudzic *et al.* 2015, Jiang 2021).

Nos insetos, a cicatrização de feridas e a eliminação de microrganismos invasores é descrita como uma reação de melanização, resultando na produção de melanina como produto final para a

encapsulação de patógenos e parasitoides (De Gregorio *et al.* 2002, González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2012, Tang 2009). Ao direcionar a atenção para os parasitas, a deposição de melanina ocorre após a formação de barreiras físicas conhecidas como nodulação ou encapsulação (Binggeli *et al.* 2014, Cooper *et al.* 2019, Yang *et al.* 2021a). Esses processos permitem a produção localizada e restrita de compostos tóxicos, asseguram a proteção do hospedeiro, e a imobilização e a morte dos organismos invasores de forma rápida nos locais de infecção (Dudzic *et al.* 2015, Yang *et al.* 2021a).

A via da PPO, assim como a via Toll, é ativada por uma cascata de serina proteases, mas se distinguem pelo domínio de ligação clipe (cSP) (Lu *et al.* 2014, Nakhleh *et al.* 2017). A ativação ocorre quando um organismo invasor é reconhecido pelos receptores de reconhecimento de padrão, como PGRP, β GRP e lectinas do tipo C, desencadeando uma cascata extracelular através do domínio clipe. Esse domínio clipe cliva o zimogênio da profenoloxidase (PPO), resultando na produção da fenoloxidase (PO) (Lu *et al.* 2014). Por sua vez, a fenoloxidase catalisa a oxidação de fenóis em quinonas, que formam a melanina (De Gregorio *et al.* 2002, Tang 2009, Nakhleh *et al.* 2017).

No genoma de *Drosophila*, três genes para PPOs são identificados, todos atuando em respostas imunológicas (Binggeli *et al.* 2014, Dudzic *et al.* 2015). No entanto, a PPO3 é encontrada exclusivamente em *Drosophila*. Ela é produzida nos lamelócitos, sendo atribuída a eles a defesa contra parasitoides invasores (Nam *et al.* 2012, Dudzic *et al.* 2015).

Vias do sistema imune em Lepidoptera

Grande parte do conhecimento sobre as vias de sinalização do sistema imunológico foi adquirida através de pesquisas realizadas em *D. melanogaster* (Lemaitre & Hoffmann 2007). Embora essas vias sejam conservadas na maioria dos animais, componentes específicos podem apresentar divergências entre as ordens de insetos (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013).

Assim, insetos de outras ordens, como o bicho-da-seda *Bomby mori* (Linnaeus) e a lagarta do tabaco *Manduca sexta* (Linnaeus), ambos lepidópteros, têm sido frequentemente utilizados para estudar a imunidade dos insetos (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013, Liu *et al.* 2015, Cao *et al.* 2015).

Estudos em Lepidoptera, utilizando *M. sexta* como inseto modelo, identificaram genes importantes da via Toll, como *Spätzles* e o receptor *Toll* (Cao *et al.* 2015). Em outra espécie, *Spodoptera exigua* (Hübner), foram encontrados PRRs associados a esta via, após a infecção com *Metarhizium rileyi* (Farlow), os quais compartilham semelhanças com os receptores de *M. sexta* (Roy & Kim 2022). Em Cao *et al.* (2015), foram identificados 187 genes no genoma de *M. sexta* relacionados aos componentes das vias de transdução de sinal, como Toll, IMD e JAK/STAT. Esses achados sugerem que as respostas imunes identificadas em *Drosophila* são conservadas na ordem dos lepidópteros (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). No entanto, estudos mais recentes mostram que algumas divergências podem ocorrer (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). Por exemplo, em *Spodoptera frugiperda* (Smith), a via Toll foi regulada positivamente diante da infecção pelo fungo *Beauveria bassiana* (Bals) e a via IMD também foi relativamente expressa, o que difere dos achados em *Drosophila* (Li *et al.* 2023).

A via da PPO, foi identificada e caracterizada em diversos Lepidoptera incluindo *Ostrinia furnacalis* (Guenée), *S. exigua*, *S. frugiperda*, entre outras (Shrestha & Kim 2007, Feng *et al.* 2008, Yang *et al.* 2021b). A maioria das atividades dessas enzimas foi relatada em hemócitos de *S. frugiperda*, com níveis mais elevados principalmente nos estágios de ovo e larva (Shrestha & Kim 2007, Yang *et al.* 2021b).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) nos insetos

Os AMPs desempenham um papel crucial no sistema imunológico dos insetos, destacando-se pela sua ação específica contra os patógenos, sem prejudicar o hospedeiro (Nesa *et al.* 2020,

Manniello *et al.* 2021, Dho *et al.* 2023). Eles atuam na defesa em resposta a invasão de patógenos, como bactérias, fungos e alguns parasitas e vírus (Yi *et al.* 2014, Mylonakis *et al.* 2016, Wu *et al.* 2018). Os AMPs agem por meio da desestabilização e rompimento das membranas, interferência no metabolismo e componentes citoplasmáticos dos microrganismos (Yi *et al.* 2014, Dho *et al.* 2023). O mecanismo de permeabilidade e inserção na membrana microbiana varia entre os AMPs, o que dependerá da sequência peptídica e da composição da membrana do microrganismo (Tassanakajon *et al.* 2015).

Após uma infecção microbiana, esses peptídeos são rapidamente liberados na hemolinfa em altas concentrações, levando à morte dos organismos invasores e garantindo a sobrevivência dos insetos (Bulet & Stocklin 2005, Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013, Yi *et al.* 2014, Wu *et al.* 2018). Assim, os AMPs em insetos caracterizam-se por estarem presentes em altas concentrações na hemolinfa de forma temporária (Mylonakis *et al.* 2016).

Os peptídeos geralmente são pequenas moléculas catiônicas com cerca de 7 a 100 aminoácidos, que adotam uma estrutura anfipática e podem passar por modificações pré e/ou pós-traducionais, ou seja, passam por diversos processos antes de serem liberado como peptídeo ativo (Bulet & Stocklin 2005, Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013, Tassanakajon *et al.* 2015, Yi *et al.* 2014, Mylonakis *et al.* 2016). Eles são principalmente produzidos nos corpos gordurosos, mas também podem ser sintetizados pelos hemócitos (Wu *et al.* 2018, Manniello *et al.* 2021, Dho *et al.* 2023). Os insetos podem gerar uma variedade de AMPs e o número de AMPs produzidos por cada espécie varia consideravelmente (Mylonakis *et al.* 2016, Azmiera *et al.* 2022). A exemplificação disso é o Coleoptera da família Coccinellidae, *Harmonia axyridis* (Hudson), que pode apresentar mais de 50 AMPs (Moretta *et al.* 2020, Dho *et al.* 2023). Por sua vez, a barata americana *Periplaneta americana* (Linnaeus) codifica 86 AMPs (Kim *et al.* 2016). No entanto, no Hemiptera da família

Aphilidae, como o pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum* (Clerck), nenhum AMP foi identificado no seu genoma até o momento (Moretta *et al.* 2020).

Esses peptídeos podem variar entre as ordens de insetos e, mesmo entre espécies diferentes, um mesmo peptídeo pode apresentar atividades distintas (Wu *et al.* 2018, Azmiera *et al.* 2022, Dho *et al.* 2023). Por exemplo, a cecropina A, proveniente da traça da seda *Hyalophora cecropia* (Linnaeus), exibe ação apenas contra bactérias, enquanto o mesmo peptídeo no mosquito *Anopheles gambiae* (Ross) apresenta ação bacteriana e fúngica (Bulet *et al.* 2004, Azmiera *et al.* 2022). Isto é atribuído à diferença de tamanho e estrutura dos peptídeos (Bulet *et al.* 2004, Azmiera *et al.* 2022).

Com os avanços da bioinformática, cada vez mais estudos têm se dedicado à identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs) em uma ampla variedade de insetos (Vilcinskas *et al.* 2013, Shelomi *et al.* 2020, Moretta *et al.* 2020, Dho *et al.* 2023, Guo *et al.* 2023). Essas descobertas fornecem conhecimentos valiosos sobre a diversidade e a potencial funcionalidade dos AMPs na defesa imunológica dos insetos.

Nos Lepidoptera, foram identificadas diversas famílias de AMPs, incluindo moricinas, gloverinas (ambas específicas de Lepidoptera), além de cecropinas, attacinas, lebocinas, defensinas e peptídeos semelhantes às defensinas (como spodopterina, heliomicina, gallerimicina e galiomicina), além de peptídeos aniônicos, lisozimas, cobatoxina e X-tox (Badapanda & Chikara 2015, Nesa *et al.* 2020). No entanto, neste contexto, irei concentrar-me principalmente nas cecropinas, defensinas, attacinas, moricinas, gloverinas e lebocinas.

Os AMPs de insetos são classificados de acordo com sua sequência e estrutura em quatro grupos distintos (Bulet & Stocklin 2005, Yi *et al.* 2014, Tassanakajon *et al.* 2015, Mylonakis *et al.* 2016, Azmiera *et al.* 2022, Zhou *et al.* 2024): 1. Peptídeos α -helicoidais: este grupo inclui cecropina e moricina, caracterizados por sua estrutura helicoidal; 2. Peptídeos globulares de folha β ricos em cisteína: defensina e drosomicina são exemplos desse grupo, que apresentam um alto conteúdo de

cisteína em sua composição; 3. Peptídeos ricos em prolina: apidaecina, drosocina e lebecina são exemplos desse grupo, com alta concentração de prolina em suas estruturas; e 4. Proteínas ricas em glicina: atacina e gloverina pertencem a este grupo, caracterizado por sua alta proporção de glicina. Essa classificação dos AMPs em grupos distintos reflete suas diversas estruturas e propriedades antimicrobianas, fornecendo uma compreensão mais abrangente da diversidade desses peptídeos (Bulet & Stocklin 2005, Yi *et al.* 2014, Tassanakajon *et al.* 2015, Mylonakis *et al.* 2016, Azmiera *et al.* 2022, Zhou *et al.* 2024).

Priming imunológico

Como mencionado anteriormente, os vertebrados contam com uma proteção após a exposição a microrganismos patogênicos, baseada em células específicas (Arala-Chaves & Sequeira 2000, Kurtz 2005, Schmid-Hempel 2005). No entanto, a “memória” imunológica em insetos difere daquela dos mamíferos, e a resposta imunológica a uma segunda exposição a um patógeno ainda é pouco compreendida nestes organismos (Arala-Chaves & Sequeira 2000, Little & Kraaijeveld 2004, Kurtz 2005, Schmid-Hempel 2005, Sadd & Schmid-Hempel 2006, Contreras-Garduño *et al.* 2016).

O *priming* imunológico refere-se ao aumento das chances de sobrevivência do inseto em um segundo momento, após uma exposição prévia e não letal a organismos patogênicos, ou seja, trata-se de uma resposta imunológica reforçada devido a experiências anteriores com um agente patogênico (Kurtz 2005, Cooper & Eleftherianos 2017, Sheehan *et al.* 2018, Sheehan *et al.* 2020). A exemplo, adultos de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) após serem inoculados com componente derivado de parede celular de bactérias (LPS), foram mais tolerantes em uma segunda infecção, desta vez pelo fungo *M. anisopliae* (Schmid-Hempel 2005). O mesmo fenômeno foi observado no Lepidoptera *Galleria mellonella* após a exposição à levedura *Candida albicans* (Langenbeck),

resultando em proteção tanto contra *C. albicans* quanto contra *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen), o que indicou uma resposta antimicrobiana generalizada (Sheehan *et al.* 2020).) Entretanto, essa resposta mostrou-se ser bastante específica e adaptada entre parasita e hospedeiro (Schmid-Hempel 2005, Sadd & Schmid-Hempel 2006). Em *T. molitor*, a exposição a bactérias Gram-positivas resultou em proteção duradoura contra infecções, enquanto a imunidade materna foi benéfica, porém mais custosa em termos de gasto energético para a prole quando a exposição foi a bactérias Gram-negativas (Dhinaut *et al.* 2018).

Segundo Milutinović *et al.* (2016), existem duas hipóteses para justificar o efeito do *priming* em insetos. A primeira baseia-se na ideia de que os antígenos induzem defesas duradouras, deixando moléculas imunes circulando no corpo do hospedeiro. Como resultado, a sobrevivência após a exposição secundária seria decorrente das defesas previamente ativadas (Sulek *et al.* 2021). A segunda hipótese fundamenta-se na existência de uma memória específica de invertebrados, que é armazenada e pode ser rapidamente acessada após estímulos (Milutinović *et al.* 2016).

Segundo Schmid-Hempel (2005), o *priming* imunológico não seria um efeito causado apenas por organismos invasores, mas também poderia ser observado após lesões físicas, o que seria compreensível, uma vez que os danos mecânicos também são capazes de ativar o sistema imunológico. No entanto, o que chama a atenção neste processo em insetos é a sua duração, que pode se estender por toda a vida adulta e até mesmo por diferentes estágios de vida do hospedeiro (Schmid-Hempel 2005, Contreras-Garduño *et al.* 2016, Dhinaut *et al.* 2018). Este efeito pode, inclusive, ser transmitido para os descendentes (Sadd *et al.* 2005, Contreras-Garduño *et al.* 2016, Milutinović *et al.* 2016, Tetreau *et al.* 2019). Isso significa que os descendentes podem se beneficiar ao enfrentarem desafios semelhantes aos de suas mães em termos de exposição a patógenos e parasitas (Contreras-Garduño *et al.* 2016, Cooper & Eleftherianos 2017, Dhinaut *et al.* 2018, Sulek *et al.* 2021). Portanto, uma preparação imunológica transmitida de geração em geração poderia

conceder níveis adequados de imunidade (Sadd *et al.* 2005, Tidbury *et al.* 2010, Dhinaut *et al.* 2018). A exemplo, níveis de atividade de fenoloxidase foram mais altas na prole em que a mãe foi exposta a bactérias antes da formação da colônia (Sadd *et al.* 2005). O *priming* imunológico pode manifestar-se tanto intra quanto transgeracionalmente, como demonstrado no Lepidoptera *Plodia interpunctella* (Linnaeus). Neste inseto, uma pré-exposição a uma baixa dose do vírus da granulose resultou em níveis reduzidos de suscetibilidade tanto dentro da mesma geração quanto em gerações subsequentes (Sadd *et al.* 2005, Tidbury *et al.* 2011, Contreras-Garduño *et al.* 2016, Milutinović *et al.* 2016, Dhinaut *et al.* 2018). Assim, o *priming* imunológico transgeracional (TGIP) pode ser definido como a transferência vertical da experiência imunológica dos pais para a prole (Tetreau *et al.* 2019, Sulek *et al.* 2021).

Outro ponto a ser considerado é o quanto cada progenitor, pode contribuir para a imunidade da prole (Tetreau *et al.* 2019). Isso foi observado em estudos que expuseram ambos a componentes bacterianos, resultando em efeitos de proteção qualitativa e quantitativa diferentes entre os dois sexos em proles do lepidóptero *Trichoplusia ni* (Hübner), do ortóptero *Teleogryllus oceanicus* (Le Guillou); e dos coleópteros *Rhychophorus ferrugineus* (Olivier), *T. molitor* e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Tetreau *et al.* 2019).

O *priming* imunológico tem sido objeto de estudo em diversos invertebrados com diferentes organismos invasores, com intuito de entender e desvendar o efeito da imunológico nesses organismos (Contreras-Garduño *et al.* 2016, Cooper & Eleftherianos 2017, Dhinaut *et al.* 2018, Sulek *et al.* 2021). Embora a resposta imunológica aprimorada apresente vantagens de sobrevivência para os insetos, essa característica não é observada em todas as espécies (Tetreau *et al.* 2019). Por exemplo, em formigas *Formica selysi* (Bondroit) desafiadas com o fungo *B. bassiana*, não houve aprimoramento imunológico em um segundo encontro com o fungo (Sheehan *et al.*

2020). Em lepidópteros, *P. interpunctella* quando infectados por *B. thuringiensis* e *T. ni* por vírus também não apresentaram evidências de *priming* imunológico transgeracional (Tetreau *et al.* 2019).

A relação parasitoide-hospedeiro ainda é pouco estudada quanto ao *priming*. Estudos examinaram o impacto do estado imunológico dos progenitores nas respostas imunes dos ovos de insetos ao parasitismo. Nesses estudos são avaliadas as taxas de eclosão de larvas hospedeiras e emergência de parasitoides desses ovos (Bai *et al.* 1992, Abdel-Latief & Hilker 2008, Potter & Woods 2012). Pupas de *M. sexta* injetadas com peptidoglicano bacteriano (PGN) tiveram seus ovos desafiados pelo parasitoide *Trichogramma evanescens* (Westwood) (Trauer-Kizilelma & Hilker 2015). Observou-se que os ovos de cujos pais foram imunizados apresentaram menor desenvolvimento de parasitoides e menor taxa de emergência em comparação com os ovos cujos pais não foram previamente desafiados (Trauer-Kizilelma & Hilker 2015).

Portanto, novos estudos que explorem o *priming* imunológico em insetos não-modelo de importância econômica são fundamentais para uma compreensão mais profunda do sistema imunológico desses insetos frente a organismos específicos e patogênicos

Sistemas de estudo

- *D. saccharalis*. Este inseto holometabólico, na fase larval, é conhecido por causar danos consideráveis à cana-de-açúcar, incluindo a abertura de orifícios e galerias nos colmos, o que leva ao secamento dos ponteiros (coração morto) e ao tombamento da planta pelo vento (Gallo *et al.* 2002, EMBRAPA 2022). Além disso, a infestação por *D. saccharalis* torna a cana mais suscetível à ação de microrganismos fitopatogênicos (EMBRAPA 2022).

- *M. anisopliae*. É uma espécie fúngica facultativa que causa a doença muscardine verde em insetos (Ghanbary *et al.* 2009). Devido ao seu potencial como inseticida natural, *M. anisopliae* é utilizado

no controle de diversas pragas, principalmente pelas usinas de cana-de-açúcar no combate da cigarrinha-da-cana (*Mahanarva fimbriolata*) (Stål) (Ghanbary *et al.* 2009, Iwanicki *et al.* 2019).

- *B. thuringiensis* (Bt). É uma bactéria patogênica para insetos que produz toxinas como Cry e Cyt (Bravo *et al.* 2011). Essas toxinas causam ruptura no tecido do intestino médio das lagartas, seguida por septicemia. O Bt é eficaz no controle de larvas de diferentes ordens de insetos (Raymond *et al.* 2010, Bravo *et al.* 2011).

- *T. howardi*. É um endoparasitoide gregário com ampla gama de hospedeiros, podendo ser considerado um hiperparasitoide facultativo (Tawar *et al.* 1996, Costa *et al.* 2014). *T. howardi* é registrado como parasitoide de pupa em diversos lepidópteros, incluindo *D. saccharalis*, *P. xylostella* e *H. armigera* (Silva-Torres *et al.* 2010, Vargas *et al.* 2011, de Oliveira *et al.* 2016). Em lagartas, *T. howardi* atua como parasitoide primário e pode parasitar diferentes estágios de vida de *D. saccharalis* (Rodrigues *et al.* 2021).

Assim, esta tese se propôs a estudar vários aspectos da interação de *D. saccharalis* com diferentes agentes de controle biológico: No capítulo 2, avaliou-se a modulação de genes das principais vias de defesa durante a interação de *D. saccharalis* com diferentes agentes de controle biológico; No Capítulo 3, identificou-se a expressão de um peptídeo antimicrobiano específico de Lepidoptera em diferentes tecidos da lagartas de *D. saccharalis* quando alimentada com dieta artificial, cana-de-açúcar e *B. thuringiensis*; No capítulo 4, analisou-se o efeito do *priming* imunológico intra e transgeracional em populações de *D. saccharalis* induzido pelo parasitoide *T. howardi*. Por fim, no capítulo 5, compilamos os resultados obtidos e apresentamos uma breve discussão dos capítulos anteriores.

Literatura citada

- Abdel-Latief, M & Hilker, M. 2008.** Innate immunity: eggs of *Manduca sexta* are able to respond to parasitism by *Trichogramma evanescens*. Insect Biochem. Mol. Biol., 382, 136-145.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.10.001>
- Ali Mohammadie Kojour, M., Han, Y. S & Jo, Y. H. 2020.** An overview of insect innate immunity. Entomol. Res., 506, 282-291.doi. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12437>
- Arala-Chaves, M & Sequeira, T. 2000.** Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates?. Aquac. Res., 1911-3, 247-258.doi. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00430-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00430-0)
- Arbouzova, N. I & Zeidler, M. P. 2006.** JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development, 2605–2616. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.02411>
- Azmiera, N., Krasilnikova, A., Sahudin, S., Al-Talib, H & Heo, C. C. 2022.** Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications. J. Asia. Pac. Entomol., 252, 101892.doi. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101892>
- Badapanda, C & Chikara, S. K. 2015.** Lepidopteran antimicrobial peptides AMPs: overview, regulation, modes of action, and therapeutic potentials of insect-derived AMPs. 141-163p. In Short Views on Insect Genomics and Proteomics: Insect Proteomics. doi. 10.1007/978-3-319-24244-6_6.
- Bai, B., Luck, R. F., Forster, L., Stephens, B & Janssen, J. M. 1992.** The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. Entomol. Exp. Appl., 641, 37-48.doi. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01592.x>
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M., & Lemaitre, B. 2014.** Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. PLoS Pathog., 105, e1004067.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004067>
- Bortoli, S. A. D., Dória, H. O. S., Albergaria, N. M. M. S., & Botti, M. V. 2005.** Aspectos biológicos e dano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob diferentes doses de nitrogênio e potássio. Cienc Agrotec, 29, 267-273.
- Botelho, P. S. M., & Macedo, N. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, 409-425.
- Botelho, P.S.M. 1992.** Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. Pesqui. Agropecu. Bras. 27: 255–262.

- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. 2011.** *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(7), 423-431.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Bulet, P & Stocklin, R. 2005.** Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.*, 121, 3-11.doi. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. 2004.** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 1981, 169-184.doi. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>
- Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y. R., Bryant, B & Jiang, H. 2015.** The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 62, 64-74.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.03.006>
- Casanova-Torres, Á. M & Goodrich-Blair, H. 2013.** Immune signaling and antimicrobial peptide expression in Lepidoptera. *Insects*, 43, 320-338. <https://doi.org/10.3390/insects4030320>
- Charles, H. M & Killian, K. A. 2015.** Response of the insect immune system to three different immune challenges. *J. Insect Physiol.*, 81, 97-108. doi. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.005>
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). 2024.** Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, v12 – Safra 2024/25, n.1 - Primeiro levantamento, p. 1-52, Abril.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-mendoza, H. U. M. B. E. R. T. O., Franco, B., Nava, A., PEDRAZA-REYES, M. A. R. I. O & Canales-Lazcano, J. O. R. G. E. 2016.** Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol. Entomol.*, 414, 351-366.doi. <https://doi.org/10.1111/een.12300>
- Cooper, D & Eleftherianos, I. 2017.** Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges. *Front. Immunol.*, 8, 250483. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539>
- Cooper, D., Wuebbolt, C., Heryanto, C & Eleftherianos, I. 2019.** The prophenoloxidase system in *Drosophila* participates in the anti-nematode immune response. *Mol. Immunol.*, 109, 88-98. doi. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.03.008>
- Costa, D. P., Pereira, F. F., Kassab, S. O., Rossoni, C., Favero, K & Barbosa, R. H. 2014.** Reprodução de *Tetrastichus howardi* em pupas de *Diatraea saccharalis* de diferentes idades. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 571, 67-71.
- Cruz, I. 2007.** A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Sete Lagoas, Embrapa, 12p. (Circular Técnica 90) ISSN 1679-1150
- Cursi, D. E., Hoffmann, H. P., Barbosa, G. V. S., Bressiani, J. A., Gazaffi, R., Chapola, R. G & Carneiro, M. S. 2022.** History and current status of sugarcane breeding, germplasm

- development and molecular genetics in Brazil. *Sugar Tech*, 24(1), 112-133. doi. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00951-1>.
- Cytryńska, M., Wojda, I & Jakubowicz, T. 2016.** How insects combat infections. In *Lessons in immunity* pp. 117-128. Academic Press. doi. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803252-7.00009-6>
- da Silva, L. C. D., Ferreira, F. I. P., Dezoti, L. A., Nascimento, C. T., Orikasa, C., Takita, M. A., & de Medeiros, A. H. 2021.** *Diatraea saccharalis* harbors microorganisms that can affect growth of sugarcane stalk-dwelling fungi. *Braz. J. Microbiol.*, 1-11. doi. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00647-4>
- Dalzoto, P. R., & Uhry, K. F. 2009.** Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Divulgação técnica, Biológico, São Paulo*, 71(1), 37-41.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S. I., ... & Brey, P. T. 2002.** An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 3(4), 581-592. doi. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00267-8)
- de Matos, M., Santos, F., & Eichler, P. 2020.** Sugarcane world scenario. In *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives*. Academic Press. 1-19. doi. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00001-9>
- de Oliveira, H. N., Simonato, J., Glaeser, D. F & Pereira, F. F. 2016.** Parasitism of *Helicoverpa armigera* pupae Lepidoptera: Noctuidae by *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* Hymenoptera: Eulophidae. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 111-115. doi. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p111>
- Deka, B., Baruah, C & Babu, A. 2021.** Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 31, 1-8. doi. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00466-7>
- Dhinaut, J., Chogne, M & Moret, Y. 2018.** Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *J. Anim. Ecol.*, 87(2), 448-463. doi. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661>
- Dho, M., Candian, V & Tedeschi, R. 2023.** Insect antimicrobial peptides: advancements, enhancements and new challenges. *Antibiotics*, 12(6), 952. doi. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060952>
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., & Imler, J. L. 2005.** The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat. Immunol.*, 6(9), 946-953. doi. <https://doi.org/10.1038/ni1237>
- Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M & Lemaitre, B. 2015.** *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. *BMC Biol.*, 13, 1-16. doi. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>.

- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2022.** Pragas no colmo. Disponível em <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/pragas/pragas-no-colmo> acessado em 05 de Julho de 2024.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2024.** Disponível em https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity acessado em 04 de Julho de 2024.
- Favero, K., Pereira, F. F., Torres, J. B., De Oliveira, H. N., Kassab, S. O & Zanuncio, J. C. 2015.** Reproduction of *Tetrastichus howardi* Hymenoptera: Eulophidae in *Diatraea saccharalis* Lepidoptera: Crambidae pupae at different temperatures. Fla Entomol., Vol. 98, No. 1, pp. 377-380.
- **Feng, C., Song, Q., Lü, W & Lu, J. 2008.** Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* Lepidoptera: Pyralidae larvae. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 1512, 139-146.doi. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.012>
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, S. S., Carvalho, R. P. L., de Baptista, G. C., Berti Filho, E., & Vendramim, J. D. 2002.** Entomologia Agrícola Vol. 10. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 920p.
- Ghanbary, M. T., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A. R., & Sharif, M. M. 2009.** A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. Am. J. Agric. Biol. Sci., 2009, Vol. 4, 2, 152-155.
- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar .2012.** Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. Entomol. Exp. Appl., 142(1), 1-16.doi. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Guo, L., Tang, M., Luo, S & Zhou, X. 2023.** Screening and Functional Analyses of Novel Cecropins from Insect Transcriptome. Insects, 1410, 794. doi. <https://doi.org/10.3390/insects14100794>
- Harrison, D. A. 2012.** The jak/stat pathway. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 43, a011205. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011205>
- Hillyer, J. F. 2016.** Insect immunology and hematopoiesis. Dev. Comp. Immunol., 58, 102-118. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Hoffmann, J. A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. Nature, 4266962, 33-38.doi. <https://doi.org/10.1038/nature02021> .
- Imada, K., & Leonard, W. J. 2000.** The jak-STAT pathway. Mol. Immunol., 371-2, 1-11.doi. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(00\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(00)00018-3)

- Imler, J. L & Hoffmann, J. A. 2003.** Toll signaling: the TIREless quest for specificity. *Nat. Immunol.*, 42, 105-106.
- Iqbal, A., Khan, R. S., Khan, M. A., Gul, K., Jalil, F., Shah, D. A & Ahmed, T. 2021.** Genetic engineering approaches for enhanced insect pest resistance in sugarcane. *Mol. Biotechnol.*, 63(7), 557-568.doi. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00328-5>
- Iwanicki, N. S. A., Pereira, A. A., Botelho, A. B. R. Z., Rezende, J. M., Moral, R. D. A., Zucchi, M. I., & Delalibera Júnior, I. 2019.** Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium spp* in insects, soil and sugarcane roots. *Sci. Rep.*, 9(1), 4443. doi. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38594-8>
- Jiang, L. 2021.** Insights into the antiviral pathways of the silkworm *Bombyx mori*. *Front. Immunol.*, 12, 639092. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.639092>
- Kim, I. W., Lee, J. H., Subramaniam, S., Yun, E. Y., Kim, I., Park, J & Hwang, J. S. 2016.** De novo transcriptome analysis and detection of antimicrobial peptides of the American cockroach *Periplaneta americana* Linnaeus. *PLoS One*, 115, e0155304.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155304>
- Krautz, R., Arefin, B & Theopold, U. 2014.** Damage signals in the insect immune response. *Front. Plant Sci.*, 5, 342. doi. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>
- Kurtz, J. 2005.** Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.*, 264, 186-192.doi. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 3210, 1295-1309. doi. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Leclerc, V & Reichhart, J. M. 2004.** The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Rev.*, 1981, 59-71. doi. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x>.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 697-743. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Li, A. M., Chen, Z. L., Liao, F., Zhao, Y., Qin, C. X., Wang, M & Huang, D. L. 2024.** Sugarcane borers: species, distribution, damage and management options. *J. Pest. Sci.*, 1-31. doi. <https://doi.org/10.1007/s10340-024-01750-9>.
- Li, J., Mao, Y., Yi, J., Wu, H & Liu, J. 2023.** Induced expression modes of genes related to Toll, Imd, and JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in *Spodoptera frugiperda* infected with *Beauveria bassiana*. *Front. Physiol.*, 14, 1249662.doi. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1249662>
- Lima, L. F., Torres, A. Q., Jardim, R., Mesquita, R. D & Schama, R. 2021.** Evolution of Toll, Spatzle and MyD88 in insects: the problem of the Diptera bias. *BMC genomics*, 22, 1-21. doi. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07886-7>.

- Little, T. J & Kraaijeveld, A. R. 2004.** Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.*, 192, 58-60. doi. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011>
- Liu, W., Liu, J., Lu, Y., Gong, Y., Zhu, M., Chen, F & Gong, C. 2015.** Immune signaling pathways activated in response to different pathogenic micro-organisms in *Bombyx mori*. *Mol. Immunol.*, 652, 391-397. doi. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.018>
- Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., Wang, Q & Li, Y. 2021.** Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *Int. J. Pest Manag.*, 671, 65-72. doi. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W & Ling, E. 2014.** Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front. Physiol.*, 5, 97412. doi. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252>
- Macedo, N., & Lavoretti, N. 2004.** Novo método de amostragem de intensidade de infestação da broca da cana de açúcar (*Diatraea saccharalis*). *STAB*, 22(3), 32-41.
- Mackenzie, D. K., Bussière, L. F & Tinsley, M. C. 2011.** Senescence of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, 4611, 853-859. doi. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.07.004>
- Mahanta, D. K., Bhoi, T. K., Komal, J., Samal, I., Nikhil, R. M., Paschapur, A. U. & Yele, Y. 2023.** Insect-pathogen crosstalk and the cellular-molecular mechanisms of insect immunity: uncovering the underlying signaling pathways and immune regulatory function of non-coding RNAs. *Front. Immunol*, 14, 1169152. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1169152>
- Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H & Falabella, P. 2021.** Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cell Mol Life Sci.*, 789, 4259-4282. doi. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
- Maria Do Rosário, T., Da Fonseca, A. P. P., Da Silva, E. L., Mendonça, A. L., Da Silva, C. E., Mendonça, A. L., ... & Sant'ana, A. E. G. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Fla Entomol*, 89(4), 539-540.
- Mascarin, G. M., Lopes, R. B., Delalibera Jr, Í., Fernandes, É. K. K., Luz, C., & Faria, M. 2019.** Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.*, 165, 46-53. doi. <https://doi.org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- Melcarne, C., Lemaitre, B & Kurant, E. 2019.** Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 109, 1-12. doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>

- Milutinović, B., Peuß, R., Ferro, K & Kurtz, J. 2016.** Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *J. Zool.*, 1194, 254-261. doi. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.03.006>
- Molter, A., Bezerra, J. I., Rafikova, E., Nava, D. E., & Rafikov, M. 2023.** Dynamics and biological control of the sugarcane borer with two parasitoids. *Ecol. Modell.*, 481, 110371.
- Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Di Somma, A., Vogel, H., Pucci, P & Falabella, P. 2020.** A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly BSF *Hermetia illucens* Diptera: Stratiomyidae. *Sci. Rep.*, 101, 16875. doi. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74017-9>
- Myllymäki, H., Valanne, S & Rämetsä, M. 2014.** The *Drosophila* imd signaling pathway. *J. Immunol.*, 1928, 3455-3462. doi. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M & Vilcinskas, A. 2016.** Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B, Biol. Sci.*, 3711695, 20150290. doi. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
- Nakhleh, J., El Moussawi, L., & Osta, M. A. 2017.** The melanization response in insect immunity. *Adv Insect Physiol.*, 52, 83-109. doi. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.11.002>
- Nam, H. J., Jang, I. H., You, H., Lee, K. A & Lee, W. J. 2012.** Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Hsyan protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *EMBO J.*, 315, 1253-1265. doi. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.476>
- Nesa, J., Sadat, A., Buccini, D. F., Kati, A., Mandal, A. K & Franco, O. L. 2020.** Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms. *RSC Adv.*, 101, 512-523. doi. <https://doi.org/10.1039/C9RA06864C>
- O'Shea, J.J., D.M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I.B. McInnes & A. Laurence. 2015.** The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu. Rev. Med.* 66: 311–328. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Potter, K. A & Woods, H. A. 2012.** *Trichogramma* parasitoids alter the metabolic physiology of *Manduca* eggs. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.*, 2791742, 3572-3576. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1050>
- Qamar, Z., Nasir, I. A., Abouhaidar, M. G., Hefferon, K. L., Rao, A. Q., Latif, A., ... & Shahid, A. A. 2021.** Novel approaches to circumvent the devastating effects of pests on sugarcane. *Sci. Rep.*, 11(1), 12428. doi. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91985-8>
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M & Harrison, D. A. 2004.** The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.*, 1178, 1281-1283. doi. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. 2010.** *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. *Trends Microbiol.*, 18(5), 189-194. doi. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>

- Ribeiro, C., & Brehélin, M. 2006.** Insect haemocytes: what type of cell is that?. *J. Insect Physiol.*, 525, 417-429. doi. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Rodrigues, A., Pereira, F. F., Barbosa, P. R., Silva-Torres, C. S & Torres, J. B. 2021.** Parasitism behavior of *Tetrastichus howardi* Hymenoptera: Eulophidae on larvae and pupae of sugarcane borers. *J. Insect Behav.*, 343, 71-81. doi. <https://doi.org/10.1007/s10905-021-09770-4>
- Roh, K. B., Kim, C. H., Lee, H., Kwon, H. M., Park, J. W., Ryu, J. H & Lee, B. L. 2009.** Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *Int. J. Biol. Chem.*, 28429, 19474-19481. doi. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007419>
- Rosales, C & Vonnice, S. 2017.** Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect Physiol. Ecol.*, 103, 182-190. doi. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2004.10.004>
- Rossato, de J. Jr, J. A., Costa, G. H., Madaleno, L. L., Mutton, M. J., Higley, L. G., & Fernandes, O. A. 2013.** Characterization and impact of the sugarcane borer on sugarcane yield and quality. *J. Agron.*, 105(3), 643-648. doi. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0309>
- Roy, M. C & Kim, Y. 2022.** Toll signal pathway activating eicosanoid biosynthesis shares its conserved upstream recognition components in a lepidopteran *Spodoptera exigua* upon infection by *Metarhizium rileyi*, an entomopathogenic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, 188, 107707. doi. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107707>
- Sadd, B. M & Schmid-Hempel, P. 2006.** Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*, 1612, 1206-1210. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Sadd, B. M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R & Schmid-Hempel, P. 2005.** Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol. Lett.*, 14, 386-388. doi. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0369>
- Sato, R. 2023.** Mechanisms and roles of the first stage of nodule formation in lepidopteran insects. *Journal of Insect Science*, 234, 3. doi. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iead049>
- Satyavathi, V. V., Minz, A & Nagaraju, J. 2014.** Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Signal.*, 268, 1753-1763. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.024>
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Natural insect host–parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. *Bioessays*, 2710, 1026-1034. doi. <https://doi.org/10.1002/bies.20282>
- Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. 2020.** Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, 111, 238-246. doi. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137>

- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M & Kavanagh, K. 2018.** Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences?. *Virulence*, 91, 1625-1639. doi. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>
- Shelomi, M., Jacobs, C., Vilcinskas, A & Vogel, H. 2020.** The unique antimicrobial peptide repertoire of stick insects. *Dev Comp Immunol.*, 103, 103471. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103471>
- Shia, A. K., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A. N., Reichhart, J. M & Ligoxygakis, P. 2009.** Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spatzle secreted by haemocytes. *J. Cell Sci.*, 12224, 4505-4515. doi. <https://doi.org/10.1242/jcs.049155>
- Shrestha, S & Kim, Y. 2007.** Factors affecting the activation of hemolymph prophenoloxidase of *Spodoptera exigua* Lepidoptera: Noctuidae. *J Asia Pacific Entomol.*, 102, 131-135. doi. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60343-X](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60343-X)
- Silva, M., M.P. Campana & M. Guimaraes. 1999.** Avaliação de clones de híbridos iac de cana-de-açúcar, série 1985, na região de jaú sp. *Bragantia* 58: 335-340.
- Silva-Brandão, K. L., Almeida, L. C., Moraes, S. S., & Cônsoli, F. L. 2013.** Using population genetic methods to identify the origin of an invasive population and to diagnose cryptic subspecies of *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae). *Bull. Entomol. Res.*, 103(1), 89-97. doi. <https://doi.org/10.1017/S0007485312000430>.
- Silva-Torres, C. S., Pontes, I. V., Torres, J. B & Barros, R. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* L. Lepidoptera: Plutellidae in Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.*, 39, 835-838. doi. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500028>
- Silverman, N., & Maniatis, T. 2001.** NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 1518, 2321-2342. doi. <https://doi.org/10.1101/gad.909001>
- Solis, M. A., & Metz, M. A. 2016.** An illustrated guide to the identification of the known species of *Diatraea Guilding* (Lepidoptera, Crambidae, Crambinae) based on genitalia. *ZooKeys*, (565), 73. doi. <https://doi.org/10.3897/zookeys.565.6797>.
- Stokes, B. A., Yadav, S., Shokal, U., Smith, L. C & Eleftherianos, I. 2015.** Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front. Microbiol.*, 6, 19. doi. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00019>
- Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.*, 15(1), 1-14. doi. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Sulek, M., Kordaczuk, J & Wojda, I. 2021.** Current understanding of immune priming phenomena in insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 185, 107656. doi. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107656>

- Tang, H. 2009.** Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. Fly, 31, 105-111. doi. <https://doi.org/10.4161/fly.3.1.7747>
- Tanji, T & Ip, Y. T. 2005.** Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. Trends Immunol., 264, 193-198. doi. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.006>
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., & Amparyup, P. 2015.** Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. Dev. Comp. Immunol., 482, 324-341. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.020>
- Tawar, K. B., Jadhav, D. R & Armes, N. J. 1996.** *Tetrastichus howardi* Olliff Hymenoptera: Eulophidae, a hyperparasitoid of tachinid natural enemies of *Helicoverpa armigera* Hubner Lepidoptera: Noctuidae in India. J Biol Control., 101-2, 9-13.
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B & Moret, Y. 2019.** Trans-generational immune priming in invertebrates: current knowledge and future prospects. Front. Immunol, 10, 473922. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01938>
- Tidbury, H. J., Pedersen, A. B & Boots, M. 2010.** Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci., 2781707, 871-876. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>
- Tidbury, H. J., Pedersen, A. B., & Boots, M. 2011.** Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci., 278(1707), 871-876. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>
- Trauer-Kizilelma, U & Hilker, M. 2015.** Impact of transgenerational immune priming on the defence of insect eggs against parasitism. Dev Comp Immunol., 511, 126-133. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.004>
- Tsakas, S., & Marmaras, V. J. 2010.** Insect immunity and its signalling: an overview. Invertebr. Surv. J., 72, 228-238. ISSN 1824-307X
- Tzou, P., De Gregorio, E & Lemaitre, B. 2002.** How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol., 51, 102-110. doi. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00294-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00294-1)
- Valanne, S., Wang, J. H & Rämet, M. 2011.** The *Drosophila* toll signaling pathway. J. Immunol., 1862, 649-656. doi. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Vargas, E. L., Pereira, F. F., Tavares, M. T & Pastori, P. L. 2011.** Record of *Tetrastichus howardi* Hymenoptera: Eulophidae parasitizing *Diatraea* sp. Lepidoptera: Crambidae in sugarcane crop in Brazil. Entomotropica, 263, 143-146. ISSN 1317-5262
- Vilcinskis, A., Mukherjee, K & Vogel, H. 2013.** Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci., 2801750, 20122113. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2113>

- Weidemüller, P., Kholmatov, M., Petsalaki, E., & Zaugg, J. B. 2021.** Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation. *Proteomics*, 21(23-24), 2000034.
- Wu, Q., Patočka, J & Kuča, K. 2018.** Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 1011, 461. doi. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- Xu, J., Luo, X., Fang, G., Zhan, S., Wu, J., Wang, D., & Huang, Y. 2020.** Transgenic expression of antimicrobial peptides from black soldier fly enhance resistance against entomopathogenic bacteria in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 127, 103487. doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103487>
- Yang, L., Qiu, L. M., Fang, Q., Stanley, D. W & Ye, G. Y. 2021a.** Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids. *Insect Sci.*, 28(5), 1208-1227. doi. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12863>
- Yang, L., Xing, B., Wang, L., Yuan, L., Manzoor, M., Li, F & Wu, S. 2021b.** Identification of serine protease, serine protease homolog and prophenoloxidase genes in *Spodoptera frugiperda* Lepidoptera: Noctuidae. *J Asia Pacific Entomol.*, 244, 1144-1152. doi. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12863>
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D & Yu, X. Q. 2014.** Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 5807-5822. doi. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Zhang, W., Tettamanti, G., Bassal, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I & Mohamed, A. 2021.** Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cell. Signal.*, 83, 110003. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003>
- Zhang, Y., Li, B. X., Mao, Q. Z., Zhuo, J. C., Huang, H. J., Lu, J. B & Lu, G. 2023.** The JAK-STAT pathway promotes persistent viral infection by activating apoptosis in insect vectors. *PLoS Pathog.*, 193, e1011266. doi. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011266>
- Zheng, Y., dos Santos Luciano, A. C., Dong, J., & Yuan, W. 2021.** High-resolution map of sugarcane cultivation in Brazil using a phenology-based method. *Earth Syst. Sci. Data Discuss.*, 2021, 1-25. doi. <https://doi.org/10.5194/essd-14-2065-2022>
- Zhou, L., Meng, G., Zhu, L., Ma, L & Chen, K. 2024.** Insect Antimicrobial Peptides as Guardians of Immunity and Beyond: Int. J. Mol. Sci., 257, 3835. doi. <https://doi.org/10.3390/ijms25073835>
- Zuk, M., & Stoehr, A. M. 2002.** Immune defense and host life history. *Am. Nat.*, 160S4, S9-S22. doi. <https://doi.org/10.1086/342131>

CAPÍTULO 2

HOW *Diatraea saccharalis* MODULATES ITS HUMORAL RESPONSE AGAINST BIOLOGICAL CONTROL AGENTS: GENE EXPRESSION ANALYSIS OF KEY HUMORAL PATHWAY GENES¹

MANOELY ABREU REIS²

²Departamento de Agronomia- Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 556
Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Reis, M.A. How *Diatraea saccharalis* modulates its humoral response against biological control agents: gene expression analysis of key humoral pathway genes.

ABSTRACT - The humoral response plays a crucial role in insect defense against parasites and pathogens, typically producing antimicrobial peptides through the Toll, IMD, and Jak-STAT signaling pathways, as well as melanization via phenoloxidases. These pathways are well-described in model organisms. However, many studies use non-pathogenic or opportunistic organisms and often infect insects in non-natural ways, such as piercing or injecting the pathogen into the hemocoel. Our study aimed to characterize the modulation of the main humoral pathway genes during the interaction of a non-model organism, *Diatraea saccharalis* (the sugarcane borer), with different biological control agents. We identified and evaluated the expression of *DsDorsal* (Toll pathway), *DsRelish* (IMD pathway), *DsSTAT* (JAK/STAT pathway), *DsPPO1*, and *DsPPO2* (PO pathway). The biocontrol agents used were the fungus *Metarhizium anisopliae*, the bacterium *Bacillus thuringiensis*, and the parasitoid *Tetrastichus howardi*. The interaction with the pathogens/parasitoid was conducted by the natural infection way. Our results showed that *B. thuringiensis* induced the expression of *DsRelish* at 24 hours and *DsSTAT* at 48 hours. In contrast, treatment with *M. anisopliae* decreased the expression of *DsDorsal* and *DsSTAT* at 24 hours post-inoculation compared to the control. Additionally, *DsDorsal*, *DsSTAT*, *DsPPO1*, and *DsPPO2* were induced in larvae but not in pupae parasitized by *T. howardi*. Notably, no immune-related genes tested were modulated during the pupae-parasitoid interaction. Therefore, we have determined the expression profile of the main humoral response genes in *D. saccharalis* challenged with different biocontrol agents. Additionally, we provide a rationale for why *T. howardi* has better parasitism success in *D. saccharalis* pupae than in larvae. The data generated here open new perspectives for improving pest management using biocontrol agents.

KEY WORDS: Toll, IMD, Jak-STAT, Phenoloxidases, Humoral immunity, biological control

COMO *Diatraea saccharalis* MODULA SUA RESPOSTA HUMORAL CONTRA AGENTES
DE CONTROLE BIOLÓGICO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DAS VIAS DE
RESPOSTA HUMORAL

RESUMO - A resposta humoral desempenha um papel crucial na defesa dos insetos contra parasitas e patógenos, tipicamente produzindo peptídeos antimicrobianos através das vias de sinalização Toll, IMD e JAK-STAT, assim como a melanização via fenoloxidasas. Essas vias são bem descritas em organismos modelo. No entanto, muitos estudos utilizam organismos não patogênicos ou oportunistas e frequentemente infectam os insetos de maneiras não naturais, como perfuração ou injeção do patógeno na hemocele. Este estudo objetivou caracterizar a modulação dos principais genes das vias humorais durante a interação de um organismo não-modelo, *Diatraea saccharalis* (a broca da cana-de-açúcar), com diferentes agentes de controle biológico. Inicialmente, identificou-se os genes e depois avaliou-se a expressão de *DsDorsal* (via Toll), *DsRelish* (via IMD), *DsSTAT* (via JAK/STAT), *DsPPO1* e *DsPPO2* (via das fenoloxidasas) após a interação com controles biológicos. Os agentes de controle biológico utilizados foram o fungo *Metarhizium anisopliae*, a bactéria *Bacillus thuringiensis* e o parasitoide *Tetrastichus howardi*. A interação com os patógenos/parasitoide foi conduzida pelas vias de infecção naturais. Os resultados mostraram que *B. thuringiensis* induziu a expressão de *DsRelish* 24 h e de *DsSTAT* 48 h após o início do tratamento. Em contraste, o tratamento com *M. anisopliae* diminuiu a expressão de *DsDorsal* e *DsSTAT* 24 h após a inoculação, em comparação com o controle. Além disso, *DsDorsal*, *DsSTAT*, *DsPPO1* e *DsPPO2* foram induzidos em lagartas, mas não em pupas parasitadas por *T. howardi*. De fato, nenhum gene relacionado à imunidade testado foi modulado durante a interação pupa-parasitoide. Portanto, neste trabalho determinamos o perfil de expressão dos principais genes da resposta humoral em *D. saccharalis* durante interação com diferentes agentes de controle biológico. Além

disso, fornecemos uma justificativa para o sucesso de parasitismo de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* em comparação com as lagartas. Os dados gerados aqui abrem novas perspectivas para melhorar o manejo de pragas utilizando agentes de controle biológico.

PALAVRAS-CHAVE: Toll, IMD, JAK-STAT, Fenoloxidasas, imunidade humoral, controle biológico

Introduction

Insects, in contrast to mammals, lack an adaptive immune system and rely solely on a well-developed innate immune system (Sheehan 2018, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020). This system exhibits efficient defense mechanisms capable of identifying and eliminating invading microorganisms and parasites (Hoffmann 2003, Lemaitre & Hoffmann 2007, Lazzaro 2008). It encompasses specific cellular and humoral responses that collaboratively act against infections (Elrod-Erickson *et al.* 2000, Rosales & Vonnice 2017). Upon breaching the insect's initial line of defense, composed of physical barriers such as the robust cuticle layer of the exoskeleton, the respiratory system comprising spiracles and tracheae, and the digestive system, including the peritrophic membrane, and reaching the hemocoel, a signaling cascade is initiated (Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003, Lamaitre & Hoffmann 2007). This cascade is triggered by the recognition of foreign microorganisms through pattern recognition receptors (PRRs), leading to cellular and humoral effector responses (Royet *et al.* 2011, Wang *et al.* 2019).

Insect cellular defense responses are orchestrated through the mobilization of hemocytes towards infection and injury sites. In these locals, hemolymph cells can perform activities such as phagocytosis, nodulation, and encapsulation of the invading agent (Williams 2007, Strand 2008, Stanley *et al.* 2023).

Humoral immunity is conferred by the synthesis of toxic compounds, such as melanin, through the activation of the prophenoloxidase (proPOs or PPOs) pathway, in which prophenoloxidase (PPO) is converted into active phenoloxidase (PO), and by the expression of genes encoding antimicrobial peptides (AMPs) (Tsakas & Marmaras 2010, Wu *et al.* 2010, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020). The synthesis of these compounds occurs mainly in epithelial tissues, the fat body, and hemocytes (Staczek *et al.* 2023).

In *Drosophila melanogaster* (Meigen), each of the humoral pathways has been identified as specifically responding to different pathogens (Hoffmann 2003, Sheehan *et al.* 2018). However, both in *Drosophila* and other insects, cross-activation can occur depending on the pathogen or parasite (Nishide *et al.* 2019, Yang *et al.* 2021).

The Toll pathway is initially activated by the recognition of molecular patterns associated with β -1,3-glucan type fungi, and Gram-positive bacteria, such as lysine-type peptidoglycans (Lys-PGN). After recognition, a proteolytic cascade is triggered, culminating in the activation of the cytokine Spätzle, which binds to the extracellular portion of the Toll receptor, activating it (Lemaitre & Hoffmann 2007, Valanne *et al.* 2022). After Toll activation, a series of interactions and phosphorylations in intracellular proteins (*MyD88-Tube-Pelle-Cactus-Dorsal/DIF*) follows, culminating in the translocation of transcription factors *Dorsal/DIF* (NF- κ B family) to the nucleus, inducing the expression of antimicrobial peptides (Lavine & Strand 2002, Hoffman 2003, Ferrandon *et al.* 2007, Sun *et al.* 2016, Sheehan *et al.* 2018).

The IMD (immune deficiency) pathway in *Drosophila* is primarily induced by Gram-negative bacteria and is responsible for regulating the production of a set of AMPs, including dipterecin, drosocin, cecropins, and attacins (Hoffman 2003). The main receptor of this pathway is a transmembrane peptidoglycan recognition protein (PGRP-LC) belonging to the PGRP family, which recognizes DAP-peptidoglycan (DAP-PGN) from Gram-negative bacteria and some Gram-positive bacteria like those of the *Bacillus* genus (Leullier *et al.* 2003, Kaneko *et al.* 2004). The IMD protein, after which the pathway is named, is the first intracellular protein that interacts with the inner portion of PGRP-LC, proceeding with signaling. The *FADD* and *DREDD* proteins activate IMD, which interacts with *Tab2* and *TAK1* to phosphorylate the *Relish* transcription factor (Yu *et al.* 2022). Relish has a C-terminal domain that masks the nuclear localization signal and the dimerization domain. The C-terminal portion of *Relish* is cleaved, allowing dimerization and

translocation to the nucleus (Lemaitre & Hoffmann 2007). Upon reaching the nucleus, Relish promotes the expression of AMPs (Hoffmann 2003).

While Jak-STAT is a pathway conserved throughout evolution in various organisms, in insects, especially *Drosophila*, it is reported as a route that responds to viral infections and parasitoids (Dostert *et al.* 2005, Yang *et al.* 2021). The Jak-STAT pathway has three main components: a Cytokine receptor called *Domeless* (*Dome*), a *Janus Kinase* (*JAK*) called *Hopscotch* (*Hop*), and the *STAT* transcription factor (O'shea *et al.* 2015, Yu *et al.* 2022). Initially, a cytokine interacts with *Dome*, inducing its dimerization. *Drosophila* has a single *JAK* protein (*Hop*), which is constitutively associated with *Dome* intracellularly. When *Dome* dimerization occurs, *Hop* is activated. *Hop* activation induces autophosphorylation and *Dome* phosphorylation, allowing *STAT* to bind to *Dome* (Yu *et al.* 2022). After binding to *Dome*, *STAT* is phosphorylated by *Hop*, and this phosphorylation induces *STAT* dimerization, allowing translocation to the nucleus and the subsequent activation of proteins involved in humoral and cellular responses (O'shea 2013, O'Shea *et al.* 2015, Morin-Paulard *et al.* 2013).

To date, many studies unraveling the humoral mechanisms of the insect immune system have been conducted in *Drosophila*, a dipteran model insect, especially using non-natural or opportunistic pathogens such as *Escherichia coli* (Escherich), *Staphylococcus aureus* (Ogston), *Saccharomyces cerevisiae* (Pasteur), among others, primarily by injecting these organisms directly into the hemolymph (Lemaitre & Hoffmann 2007). However, how the activation of immune system pathway occur with natural parasites and pathogens in non-model insects? Does it work the same way? To try to answer this question, we chose entomopathogenic microorganisms such as the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) and the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner). We also tested the generalist parasitoid *Tetrastichus howardi*, (Crawford) and used *Diatraea saccharalis* (Fabricius) as our insect host. Few studies have addressed the humoral

response of *D. saccharalis* (Rocha *et al.* 2016, Merlin & Cônsoli 2019). Currently, the proteomic profile of *D. saccharalis* hemolymph has been identified when treated with microorganisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, revealing the presence of proteins involved in *D. saccharalis* immune response (Rocha *et al.* 2016). Additionally, Merlin & Cônsoli (2019) provided the first transcriptome of *D. saccharalis*, analyzing the regulation and gene expression when larvae were exposed to the larval endoparasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron).

Thus, we identified the main genes of the immune system pathways in *D. saccharalis* from an genome and intestinal transcriptome, focusing on the transcription factors of the Toll (*Dorsal*), IMD (*Relish*), and Jak-STAT (*STAT*) pathways, as well as the phenoloxidases *PPO1* and *PPO2*. After identifying these genes, we determined the functional domains and phylogenetic relationships of the predicted proteins. Finally, we investigated whether these transcription factors and phenoloxidases are positively or negatively regulated during the initial infection period of the fungus *M. anisopliae* (topical infection in larvae), *B. thuringiensis* (oral infection in larvae), and parasitism by *T. howardi* in larvae and pupae of *D. saccharalis*.

Material and Methods

Insect rearing. *D. saccharalis* was reared under controlled conditions of humidity ($70 \pm 10\%$ RH), photoperiod (12h Light: 12h Dark), and temperature (adults were kept at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; larvae, pupae, and eggs at $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). During the larval phase, the insects were fed an artificial diet detailed by Hensley & Hammond (1986), with modifications suggested by Araújo *et al.* (1985). Neonate larvae were kept in sealed tubes with hydrophobic cotton containing the artificial diet. Upon reaching the third instar, they were transferred to compartmentalized trays containing diet cubes, where they remained until the pupal stage. Pupae were kept in containers with moistened cotton to maintain humidity until the emergence of adults. Adults were placed in cylindrical cages lined with white

paper for oviposition, a 10% honey solution for feeding, and moistened cotton to maintain humidity. The collected eggs were disinfected with 3% formaldehyde and 1% copper sulfate, then stored in Petri dishes containing cotton with water to maintain humidity.

Identification of immune system pathways genes. To identify the main genes belonging to the Toll, IMD, and JAK-STAT pathways, as well as the prophenoloxidases *PPO1* and *PPO2* in *D. saccharalis*, we used protein sequences from *Bombyx mori* (Lineu) (Tanaka *et al.* 2008). The *B. mori* sequences were used as queries to search the orthologs proteins from *D. saccharalis* in the genome (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_918026875.4/), and in a midgut transcriptome (Noriega *et al.* 2020) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_918026875.4/). Searches in the genome were done using BlastP against nr database restricted to *D. saccharalis*. Searches in the transcriptome were done using tBlastN in the Bioedit Software. All searches were done with an e-value cutoff of 10^{-3} and using BLOSUM62 matrix. The prediction of Open Reading Frames (ORFs) in the obtained transcriptome sequences was accomplished using the ORFfinder tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder). Subsequently, the predicted proteins from sequences from *D. saccharalis* transcriptome ORFs were confirmed through BlastP against the NCBI nr database restricted to *D. saccharalis*.

Protein domain analysis. Functional domains of the proteins Dorsal, Relish, STAT, PPO1, and PPO2 were identified using the HMMER algorithm (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>). Domain images were generated using the PROSITE 'My Domains' tool (prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains).

Phylogenetic analyses. For the construction of the phylogenetic tree, sequences of the transcription factors Dorsal, Relish, STAT, and the prophenoloxidasases PPO1 and PPO2 from *D. saccharalis* were selected. These sequences were used to retrieve at least 20 sequences from different species of Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Blattodea, and Crustacea from the NCBI database.

All acquired amino acid sequences were processed and aligned using the MUSCLE algorithm in the MEGA X program. The tree was built using maximum likelihood (ML) in PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), utilizing reliability parameters aLRT SH-like and Bootstrap (1000 repetitions). The trees were edited and visualized using the FigTree software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Biological control agents

Metarhizium anisopliae. The E9 isolate of the fungus *M. anisopliae* was obtained from the entomopathogen collection at the Laboratory of Insect Pathology and Microbial Control at the University of São Paulo (ESALQ-USP). This isolate is commonly employed for controlling the sugarcane spittlebug (*Mahanarva fimbriolata*) (Stal) in sugarcane fields and can occasionally come into contact with *D. saccharalis* eggs and early instar larvae. The fungus was cultured on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium, and the plates were kept in an incubator at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for 8 to 10 days to allow for sporulation.

Bacillus thuringiensis. For the bioassay with *B. thuringiensis*, we used the commercial product Agree® (Biocontrole, SP), containing 500 g/kg (50% w/w) of the active ingredient, which comprises spores and crystals from the strain *B. thuringiensis* var. *aizawai* GC-91. This strain also possesses the plasmid from the *B. thuringiensis* var. *kurstaki* strain (introduced by transconjugation). The presence of both plasmids enables this strain to produce the toxins Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, and Cry2Aa.

Tetrastichus howardi. The parasitoid *T. howardi* individuals were sourced from the Insect Biological Control laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco. They were maintained under controlled conditions of humidity ($70 \pm 10\%$ RH), temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), and a 12-hour light: 12-hour dark photoperiod. The parasitoids were reared by parasitizing pupae of *D. saccharalis*.

RNA extraction and cDNA synthesis. Total RNA extraction and cDNA synthesis were conducted as follows: Insects were ground in liquid nitrogen, followed by extraction using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's specifications. RNA samples were quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and visualized using 1% agarose gel electrophoresis. cDNA synthesis was performed using 1.5 μg of total RNA treated with DNase I, utilizing the iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, USA) according to the recommended protocol. The cDNA samples were stored at -20°C until use.

Gene expression evaluation by RT-qPCR. The RT-qPCR conditions for all experiments in this study are described below. Each reaction had a final volume of 10 μL , comprising 5 μL of 2x SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 2 μL of cDNA diluted at a 1:10 ratio, 0.2 μM (0.2 μL) of each primer (forward and reverse, Table 1), and 2.6 μL of ultrapure water. Tests were conducted on the QuantStudio5 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA) with two technical replicates and three biological replicates for each treatment, along with negative controls for each primer pair. Reactions were carried out using the following program: (i) initial denaturation at 95°C for 15 minutes; (ii) 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute; (iii) a final stage with melting curve analysis for each primer pair from 60 to 94°C , increasing by 0.5°C per second. The two most stable genes among GAPDH, β -tubulin, and RPS10 (Noriega et al. 2020) (Table 1) were used as expression normalizers.

Evaluation of immune system gene expression after *D. saccharalis* larvae ingestion of *B. thuringiensis*. To evaluate the response of previously selected genes in *D. saccharalis* to infection with *B. thuringiensis* via feeding, the following experiment was conducted. We applied the lethal concentration for 30% of individuals (LC₃₀) of the product Agree®. Approximately 115 µg/mL of the active ingredient (spores and crystals) was incorporated into the diet for the bioassays, only to stimulate the immune system of *D. saccharalis* (Damasceno *et al.* unpublished data). Third instar larvae of *D. saccharalis* were placed in Petri dishes containing 4.5 g of diet, with or without *B. thuringiensis*. The bioassay consisted of 3 replicates for each treatment, with each replicate containing 10 larvae. The plates were maintained at a temperature of 28°C ± 1°C, 70 ± 10% relative humidity, and a 12-hour photoperiod. Total RNA extraction was performed at 24 and 48 hours post-inoculation, followed by cDNA synthesis and RT-qPCR, as previously described.

Evaluation of *D. saccharalis* larvae immune gene expression after topical application of *M. anisopliae*. To evaluate which *D. saccharalis* humoral immune pathways are activated or repressed upon infection or parasitism by biological control agents, we selected the transcription factors *Dorsal* (Toll pathway), *Relish* (IMD pathway), and *STAT* (Jak-STAT pathway). Additionally, we assessed the expression of two prophenoloxidasases critical to the melanization pathway (PPO1 and PPO2). To determine if these genes are modulated by the topical application of the fungus *M. anisopliae* in *D. saccharalis*, a 0.05% Tween 80 solution was prepared for conidia dilution and subsequent quantification using a Neubauer chamber. Third instar *D. saccharalis* larvae were sprayed with a sublethal concentration of 1x10⁷ conidia/mL, which was determined in pre-tests not to cause insect mortality. For the control treatment, only the Tween solution was applied to the larvae. Each treatment (*M. anisopliae* and control) was conducted with 24 larvae, divided into three replicates per treatment. Plates were maintained under larvae rearing conditions. Total RNA

extraction was performed at 24 and 48 hours post-inoculation, followed by cDNA synthesis and RT-qPCR, as previously described.

Evaluation of immune system gene expression after oviposition attempt of *T. howardi* in *D. saccharalis* larvae and pupae. To verify whether the selected genes in each studied immune pathway of *D. saccharalis* respond to parasitism by *T. howardi*, the following experiments were conducted. Third instar larvae were divided into three treatments: control, mechanical injury, and parasitoid. Each treatment consisted of three biological replicates, each containing eight larvae. The control treatment involved larvae fed with artificial diet only. The mechanical injury treatment aimed to assess gene expression resulting from cuticle damage, simulating ovipositor insertion. The injury was inflicted four times on each larva over 24 hours, using a sterile entomological pin. The parasitoid treatment involved exposing larvae to female parasitoids at a ratio of 8 larvae to 15 females (Pereira *et al.* 2015). After 24 hours of exposure, the parasitoid females were removed. Insects were collected in sets of three larvae for each replicate of each sample of each treatment, 24 and 48 hours after removing the parasitoid females. In a second experiment, 1-day-old *D. saccharalis* pupae were offered to female parasitoids *T. howardi* under the same conditions as the larval treatment. Both experiments were conducted under controlled temperature and humidity conditions, as described earlier.

Statistical analysis of gene expression results. To calculate the relative expression of each gene under each experimental condition, the Cq values were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak & Schmittgen, 2001) with the online SATQPCR program (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/home.cgi>; Rancurel *et al.* 2019). The relative expression results obtained were then subjected to Student's t-test ($P < 0.05$) for statistical analysis.

Results

***D. saccharalis* possesses the key genes involved in the pathways of the humoral immune response.** After investigating the genome and transcriptome of *D. saccharalis* based on gene models from *B. mori*, we identified and confirmed many genes with contigs (transcriptome). We focused on genes encoding proteins that act intracellularly and successfully identified genes for the Toll pathway (*Toll*, *MyD88*, *Pelle*, *Tube*, *Cactus*, and *Dorsal*), the IMD pathway (*Imd*, *DREDD*, *Tak1*, *FADD*, *Tab2*, *IKKb*, *IKKg*, and *Relish*), and the JAK-STAT pathway (*Domeless*, *Hopscotch*, and *STAT*). Interestingly, *Domeless* was found only in the *D. saccharalis* transcriptome. Additionally, we identified two genes for Prophenoloxidase (*PPO1* and *PPO2*), which are the final enzymes activated in the melanization process. Detailed information on all identified genes is presented in Table 2. For further characterization, we focused on transcription factor genes, specifically those whose proteins play a direct role in activating the transcription of antimicrobial peptides (AMPs) and other molecules related to the humoral response. In this context, we selected *DsDorsal* for the Toll pathway, *DsRelish* for the IMD pathway, and *DsSTAT* for the JAK-STAT pathway. Since the melanization pathway functions as a proteolytic cascade, we chose the phenoloxidase genes *DsPPO1* and *DsPPO2*, the final proteolytically activated enzymes, for further characterization.

Structural and phylogenetic characteristics of selected sequences. The predicted protein for *DsDorsal*, the transcription factor in the Toll pathway, consists of 717 amino acids (aa) in the genomic sequence and a partial sequence of 616 aa in the larval midgut transcriptome. Phylogenetic analysis using sequences from insects of different orders (Figure 1A) grouped *DsDorsal* in the Lepidoptera clade, specifically clustering with other species of the Crambidae family, including *Chilo suppressalis* (Walker) and *Ostrinia furnacalis* (Meyrick) (Figure 1B). *DsDorsal* possesses

the Rel homology domain for DNA binding, characteristic of transcription factors, and the dimerization domain, which is important to form a dimer (Figure 1C). All the chosen lepidopteran *Dorsal* sequences presented both domains, with the proteins varying only in the number of amino acids.

For the IMD pathway, *DsRelish* has a predicted protein of 939 aa in the genomic sequence and 938 aa in the midgut transcriptome. The phylogenetic analysis showed that *DsRelish* is part of the Lepidoptera clade (Figure 2A), along with two other species from the Crambidae family, *C. suppressalis* and *O. furnacalis* (Figure 2B). *DsRelish*, like *DsDorsal*, contains the Rel homology and dimerization domains. However, *DsRelish* also has ankyrin domains, which are characteristic and distinctive of *Relish* compared to the *Dorsal* transcription factor (Figure 2C). Some lepidopterans also exhibit more than one ankyrin domain (Figure 2C), a common feature in insects.

In the JAK-STAT pathway, the predicted protein for *DsSTAT* consists of 780 aa in both the genome and transcriptome sequences. Phylogenetic analysis placed *DsSTAT* within the Lepidoptera clade (Figure 3A), alongside other members of the Crambidae family (Figure 3B). *DsSTAT* also exhibited the four characteristic domains of STAT: the STAT protein interaction domain (STAT_int), the all-alpha domain (STAT_alpha), the DNA-binding domain (STAT_bind), and the SH2 domain (Figure 3C). Interestingly, all the lepidopteran sequences evaluated in this study had STAT proteins of very similar size, around 770 aa.

Regarding the melanization pathway, the *D. saccharalis* genome has two *PPO* genes. The predicted protein sequences for *DsPPO1* and *DsPPO2* possess 681 and 691 aa, respectively. These genome sequences were confirmed in the midgut transcriptome. Interestingly, phylogenetic analysis revealed that Lepidoptera PPOs are divided into two well-defined groups (Figure 4A). Within both groups, we identified a Crambidae family cluster that includes *D. saccharalis* PPOs (Figure 4B).

Additionally, both *DsPPO1* and *DsPPO2* contain the Hemocyanin all-alpha (Hemocyanin_N), Hemocyanin copper-containing (Hemocyanin_M), and Hemocyanin Ig-like (Hemocyanin_C) domains (Figure 4C).

***DsRelish* and *DsSTAT* are upregulated in *B. thuringiensis* infected larvae.** Analysis of insects fed on a diet containing a low concentration of *B. thuringiensis* (LC30) revealed significant upregulation of *DsRelish* (IMD pathway) in treated insects, with expression levels approximately four times higher than the control group at 24 hours post-treatment (Figure 5A). Additionally, *DsSTAT* (JAK/STAT pathway) expression increased approximately sixfold in treated insects compared to the control group at 48 hours post-treatment (Figure 5B).

***M. anisopliae* treatment downregulates *DsDorsal* and *DsSTAT* in the initial stage of infection.**

The analysis of relative expression levels of selected genes in *D. saccharalis* following topical application of a sublethal concentration of *M. anisopliae* conidia revealed notable findings. At 24 hours post-application, the expression levels of *DsDorsal* (Toll pathway) and *DsSTAT* (JAK-STAT pathway) were significantly reduced compared to the control treatment (Figure 6A). However, no significant differences in gene expression were observed at 48 hours post-treatment (Figure 6B).

Humoral response genes of *D. saccharalis* are activated in larvae, but not in pupae, during *T.*

***howardi* parasitism.** *T. howardi* is a generalist parasitoid that preferentially parasitizes the pupae of *D. saccharalis* and rarely parasitizes the larvae. We evaluated the expression of selected genes in *D. saccharalis* larvae and pupae that were confined with *T. howardi* for 24 hours, at both 24 and 48 hours after the confinement. As an additional control, we also evaluated the expression of immune-related genes in insects injured on the cuticle with a sterile entomological pin to simulate the injury caused by the parasitoid ovipositor. In fourth instar larvae, both mechanical injury and

parasitoid treatment resulted in a significant upregulation (~5x and ~4x, respectively) of *DsDorsal* (Toll pathway) expression after 24 hours compared to the control (Figure 7A). *DsRelish* (IMD pathway) expression also showed a significant increase in parasitoid-treated insects compared to the control (Figure 7A). Moreover, after 48 hours, a significant increase in gene expression was observed exclusively in *T. howardi*-treated insects, with *DsDorsal* showing a 7-fold increase, while *DsSTAT* (JAK-STAT pathway) recorded a 5-fold increase when compared to control or mechanically injured insects (Figure 7B). Interestingly, *DsPPO1* was downregulated in parasitoid-treated insects compared to mechanically injured insects at 24 hours after treatment (Figure 7A). However, both PPO genes were upregulated at 48 hours after parasitoid treatment when compared with the control (Figure 7B).

Subsequently, the expression of the same genes was analyzed in one-day-old pupae, following the same experimental procedures used for larvae. After 24 hours of treatment, in contrast to larvae, pupae showed a reduced expression of *DsDorsal* in both parasitoid-treated and mechanically injured pupae compared to the control (Figure 7C). However, after 48 hours, no significant difference was observed for *DsDorsal* (Figure 7D). For the other genes evaluated, no variation in expression was observed in *D. saccharalis* pupae (Figures 7C, 7D).

Discussion

Insects survive the attack of microorganisms and other parasites through a sophisticated cellular and humoral immune system. Cellular and humoral responses successfully eliminate most microorganisms and parasites. However, there are organisms capable of circumventing insect defenses, efficiently infecting and causing their death—known as entomopathogens and parasitoids. In this study, we investigated the molecular immune response of *D. saccharalis*, a significant

sugarcane pest, to biological control agents such as the fungus *M. anisopliae*, the bacterium *B. thuringiensis*, and the generalist parasitoid *T. howardi*.

After identifying many genes composing the three humoral response pathways (Toll, IMD, and Jak-STAT), we selected the transcription factors *DsDorsal* (via Toll), *DsRelish* (via IMD), and *DsSTAT* (via Jak-STAT) as markers for the response to each control agent. These transcription factors represent the final stages of signal transduction in each pathway, integrating the transcription complex into the nucleus and specifically regulating gene expression in response to physiological or environmental conditions (Gunaratna & Jiang 2013, Krautz *et al.* 2014, Guo *et al.* 2018). Additionally, we analyzed the expression of the proteins *PPO1* and *PPO2* in parasitized larvae and pupae of *D. saccharalis*. These proteins play a crucial role in melanization cascade in response to the invading organism, simultaneously stimulating cellular and humoral immune responses (Lu *et al.* 2014).

Analyses of copy number, functional domains, and phylogenetics confirmed that genes involved in insect humoral responses are well-conserved within the insect group, including Lepidoptera. Protein domain analysis of *Dorsal*, *Relish*, and *STAT* in *B. mori*, *M. sexta*, and *O. furnacalis* demonstrated that the copy numbers of genes and protein domains are similar to those identified in *D. saccharalis* (Table 2) (Tanaka *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2016, Chen *et al.* 2021). These findings are supported by the arrangement of phylogenetic trees for *Dorsal*, *Relish*, *STAT*, as well as for *PPO1* and *PPO2*, where sequences formed compact groups, typically with insects from the same family clustering together.

To identify which pathways are activated in response to different biocontrol agents, we initially tested the response of *D. saccharalis* to *B. thuringiensis*. Only *DsRelish* was induced at 24h in treated insects. Although bacteria of the genus *Bacillus* are Gram-positive, they possess DAP-peptidoglycan recognized by PGRP-LC, signaling through the IMD pathway (Leullier *et al.*

2003, Kaneko *et al.* 2004). Similar results were observed in *Helicoverpa zea* (Meyrick) infected by *B. thuringiensis* (Black *et al.* 2022) and *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lin *et al.* 2020). Interestingly, *DsSTAT* was induced 48 hours after the start of larval feeding on a diet containing *B. thuringiensis*. Lin *et al.* (2020) showed that the *Domeless* gene, the receptor of the Jak-STAT pathway, was similarly more expressed in *P. xylostella* larvae fed by *B. thuringiensis*. This occurs because the Jak-STAT pathway is induced by cellular damage caused by pathogenic infection in the intestine (Buchon *et al.* 2009, Kingsolver *et al.* 2013) to help regenerate intestinal cells after Cry toxin damage (Wang *et al.* 2024).

For fungal challenge we used a generalist *M. anisopliae* isolate (ESALQE9) that was little virulent to *D. saccharalis*. Furthermore, the ESALQE9 isolate takes 24-32 hours to germinate (Gotti *et al.* 2023), which could prolong the exposure of fungal conidia to biotic and abiotic stressors. Thus, to be effective, propagules must deal with the physical environment on the host surface, and with insect innate immune responses (Dubovskiy *et al.* 2023). Even though ESALQE9 cannot start the infection, the insect could still sense it. However, we observed a reduction in the expression of *DsDorsal* and *DsSTAT* genes in the first 24 hours, and no alteration at 48 hours. In *O. furnacalis*, a species in the same family of *D. saccharalis*, infection with *Beauveria bassiana* (Bassi) significantly increased Toll-1 mRNA levels, although *Dorsal* levels remaining unchanged (Liu *et al.* 2014). In *B. mori*, the expression of two Jak-STAT pathway components, named *BmHOP* and *BmSTAT*, was positively regulated in the early stages of *B. bassiana* infection (Geng *et al.* 2016). Therefore, in *Locusta migratoria* (Linnaeus) infected by *Metarhizium acridum*, (Allan & Humber) Toll pathway genes *MyD88* and *Cactus* are highly expressed at 24 and 48 hours after infection (Zhang *et al.* 2020). Why are the immune genes negatively regulated in *D. saccharalis* if the isolate ESALQE9 cannot develop the infection in this insect (low virulence)? One hypothesis for these results is that the action of molecules released by the fungus, such as proteins or secondary

metabolites, interfere with the host's immune system. Indeed, entomopathogenic fungi have mechanisms to establish infection and mitigate the effects of the insect's immune system (Lacedena *et al.* 2007, Olombrada *et al.* 2017). Some *M. anisopliae* isolates are known to produce destruxins, cyclic thermostable peptides produced as secondary metabolites, which have both insecticidal and anti-nutritional actions (Amiri *et al.* 1999, Liu *et al.* 2014). Destruxins can suppress cellular and humoral defenses, contributing to increased virulence in the producing fungus (Pal *et al.* 2007, Wang *et al.* 2012, Hu *et al.* 2016, Xu *et al.* 2016, Pedrini 2022). Gôlo (2014), evaluating *in vitro* destruxin production by different *Metarhizium spp.* isolates, recognized ARSEF 2575 for producing these enzymes. In *B. bassiana*, a fungal ribotoxin (Rib), an extracellularly secreted virulence factor, inhibits the immune system of silkworm larvae (*B. mori*) and of fruit fly adults (*D. melanogaster*) after infection (Yuan *et al.* 2020). Interestingly, the prophenoloxidase genes were not activated in response to *M. anisopliae*. This may have occurred because the fungi did not penetrate the insect cuticle after 48 h in order to be recognized by the insect receptors.

We also investigated the immune gene expression of *D. saccharalis* in response to a parasitoid, a field with significantly fewer studies compared to those on entomopathogenic fungi and Bt. The Toll pathway transcription factor gene *DsDorsal* had also increased its expression in *D. saccharalis* larvae at 24 and 48 h after parasitism by the endoparasitoid *T. howardi* compared to the control treatment. However, mechanical injury with a pin also increased the expression of *DsDorsal* at 24 h but not at 48 h. This is expected because the Toll pathway can be activated by sterile mechanical injury (Evans *et al.* 2022). So, probably the early activation of *DsDorsal* during parasitism is a response to the mechanical injury caused by the ovipositor of the parasitoid female. However, after 48 hours, Toll remains activated only in larvae parasitized by *T. howardi*, and, in this case, this is probably due to maternal factors injected along with the eggs, such as venom and other proteins present in the ovary fluid or on the surface of the eggs (Meng *et al.* 2018, Vallane *et*

al. 2022). Similarly, *DsSTAT* expression increased only in larvae parasitized by *T. howardi* at 48 h, indicating a response to oviposition rather than to mechanical injury caused by the ovipositor. The Jak-STAT pathway is also activated in *Drosophila* larvae attacked by parasitoids (Sorrentino *et al.* 2004, Wertheim *et al.* 2005, Yang *et al.* 2021). The prophenoloxidases *DsPPO1* and *DsPPO2* showed a significant increase in expression levels at 48 h after treatment in the parasitized group. This late increase suggests a delayed response in prophenoloxidase expression. It is common to observe an increase or maintenance in prophenoloxidase expression after parasitism, followed by a gradual decrease 72 hours after parasitism (Wu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2017, Fathy *et al.* 2023). The delayed response may be associated with the larval instar, as the immune response can vary markedly within the larval stage. The reduced survival of insects in more mature larvae is linked to a decrease in humoral and cellular defense responses compared to less developed larvae (Eleftherianos *et al.* 2008).

Interestingly, none of the genes analyzed in this study showed a significant expression increase in pupae parasitized by *T. howardi*, nor due to mechanical injury. Tang *et al.* (2014) reported that in *Octodonta nipae* (Raffray) (Coleoptera: Chrysomelidae), several genes involved in the humoral response had their expression reduced in pupae parasitized by *Tetrastichus brontispae* (Crawford). Indeed, specific parasitoids of *D. saccharalis* larvae, such as *C. flavipes*, can suppress the insect's immune system and efficiently parasitize the host (Merlin & Consoli 2019). On the other hand, *T. howardi* is a generalist parasitoid that has more success parasitizing pupae than larvae, as reported by Rodrigues *et al.* (2021). These authors noted that the larvae can defend themselves with movements and attacks on the parasitoid, or by hiding or camouflaging, which partly explains the success of *T. howardi* parasitism in pupae compared to larvae. Aggressive behavior is indeed a common defense mechanism in larvae of the Crambidae family (Takasu & Overholt 1997). Additionally, the pupal stage exhibits little movement, and its immune defenses may be reduced

possibly due to metabolic resources being directed toward forming the adult insect, favoring the parasitoid progeny (Sun *et al.* 2016, Rodrigues *et al.* 2021). Thus, from this work, we would like to include the humoral response as one of the reasons for the resilience of *D. saccharalis* larvae to *T. howardi*.

In conclusion, this work identified the transcription factor genes of the main humoral response pathways in *D. saccharalis* and determined their expression profiles when challenged by the bacterium *B. thuringiensis*, the fungus *M. anisopliae*, and the parasitoid *T. howardi*. The genes responded differently depending on the control agent, highlighting the intrinsic relationship each pathogen or parasite has with its host and how the host responds molecularly. Therefore, our studies contribute to elucidating the activation of the immune response pathways in the lepidopteran *D. saccharalis* to different biocontrol agents. Furthermore, this study opens new perspectives for the development of new tools, the improvement of existing ones, enhancing insect control.

Acknowledgments

We would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support. We also thank the Biological Control Laboratory for providing the parasitoid.

Reference List

- Ali Mohammadie Kojour, Maryam; Han, Yeon Soo; Jo, Yong Hun.2020.** An overview of insect innate immunity. Entomol. Res., v. 50, n. 6, p. 282-291. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12437>.
- Amiri, B., Ibrahim, L., & Butt, T. M. 1999.** Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. Biocontrol Scie Technol. 9(4). 487-498. <https://doi.org/10.1080/09583159929451>.

- Araújo, J. R., Botelho, P. S. M., Araújo, S. M. S. S., Almeida, L. C., & Degaspari, N. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC*. 36. 45-48.
- Black, J. L., Clark, M. K., & Sword, G. A. 2022.** Physiological and transcriptional immune responses of a non-model arthropod to infection with different entomopathogenic groups. *Plos One*. 17(2). e0263620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263620>.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. 2009.** *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe*. 5(2). 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Chen, K., Chen, J., Tang, T., Jiang, H., Han, Z., Wang, L., & Feng, C. 2021.** Characterization and functional analysis of a Relish gene from the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Arch Insect Biochem Physiol*. 108(2). e21841. <https://doi.org/10.1002/arch.21841>.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., & Imler, J. L. 2005.** The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*. 6(9). 946-953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>.
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M. A., Kryukov, V. Y., Yaroslavtseva, O. N., Grizanov, E. V., Greig, C., ... & Butt, T. 2013.** More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.*, 280(1763), 20130584. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0584>
- Eleftherianos, I., Baldwin, H., & Reynolds, S. E. 2008.** Developmental modulation of immunity: changes within the feeding period of the fifth larval stage in the defence reactions of *Manduca sexta* to infection by *Photographus*. *J. Insect Physiol*, 54(1), 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.10.003>.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., & Schneider, D. 2000.** Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol*. 10 (13). 781-784. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00569-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00569-8).
- Evans, C. J., Liu, T., Girard, J. R., & Banerjee, U. 2022.** Injury-induced inflammatory signaling and hematopoiesis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci*. 119(12). e2119109119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2119109119>.
- Fathy, R., Zohdy, N., Abd-El-Samie, E. M., Abou-Elfadl, H., Moamen, S., & Younes, A. 2023.** Effects of parasitism by the braconid wasp, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), on the host hemolymph and phenoloxidase activation of the rice moth, *Corcyra cephalonica* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 33(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00678-z>.

- Ferrandon, D., J-L. Imcler, C. Hetru & A. Hoffman. 2007.** The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol* 7. 862-874. <https://doi.org/10.1038/nri2194>.
- Geng, T., Lv, D. D., Huang, Y. X., Hou, C. X., Qin, G. X., & Guo, X. J. 2016.** Jak/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana*. *Gene*. 595(1). 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.043>.
- Gôlo, P. S. 2014.** *Metarhizium spp.*: Caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas. Tese de Doutorado, UFRRJ, Rio de Janeiro, 116p.
- Gotti, I. A., Moreira, C. C., Delalibera Jr, I., & De Fine Licht, H. H. 2023.** Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* Are Not Always as Virulent as Conidia Are towards *Spodoptera frugiperda* Caterpillars and Use Different Infection Mechanisms. *Microorganisms*, 11(6), 1594. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>.
- Gunaratna, R. T., & Jiang, H. 2013.** A comprehensive analysis of the *Manduca sexta* immunotranscriptome. *Dev. Comp. Immunol.* 39(4). 388-398. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.004>
- Guo, Z., Qin, J., Zhou, X., & Zhang, Y. 2018.** Insect transcription factors: a landscape of their structures and biological functions in *Drosophila* and beyond. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(11), 3691.doi. <https://doi.org/10.3390/ijms19113691>
- Hoffmann, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426. 33-38.
- Hoffmann, J.A., & J.M. Reichhart. 2002.** *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3. 121-126.
- Hu, T., Jiang, C., Huang, Q., & Sun, F. 2016.** A comb-like branched β -d-glucan produced by a *Cordyceps sinensis* fungus and its protective effect against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Carbohydr. Polym.* 142. 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.036>.
- Hultmark, D. 2003.** *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol*, 15(1), 12-19.doi. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00005-5)
- Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., & Silverman, N. 2004.** Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity*. 20(5). 637-649. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00104-9).
- Kingsolver, M. B., Huang, Z., & Hardy, R. W. 2013.** Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* 425(24). 4921-4936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.006>.

- Krautz, R., Arefin, B., & Theopold, U. 2014.** Damage signals in the insect immune response. *Front. Plant Sci.* 5. 342. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>.
- Lacadena, J., Álvarez-García, E., Carreras-Sangrà, N., Herrero-Galán, E., Alegre-Cebollada, J., García-Ortega, L., ... & Martínez del Pozo, Á. 2007.** Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(2). 212-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00063.x>.
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9).
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10), 1295-1309.doi. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Lazzaro, B. P. 2008.** Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Curr. Opin Microbiol.* 11(3). 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.001>.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25. 697-743. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Leullier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., ... & Lemaitre, B. 2003.** The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* 4(5). 478-484. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00104-9).
- Lin, J., Yu, X. Q., Wang, Q., Tao, X., Li, J., Zhang, S., ... & You, M. 2020.** Immune responses to *Bacillus thuringiensis* in the midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Dev. Comp. Immunol.* 107. 103661. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103661>.
- Liu, Y., Shen, D., Zhou, F., Wang, G., & An, C. 2014.** Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. *PLoS One.* 9(1). e86436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086436>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., ... & Ling, E. 2014.** Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front. Physiol.*, 5, 252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252>.
- Meng, E., Qiao, T., Tang, B., Hou, Y., Yu, W., & Chen, Z. 2018.** Effects of ovarian fluid, venom and egg surface characteristics of *Tetrastichus brontispae* (Hymenoptera: Eulophidae)

- on the immune response of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Insect Physiol. 10. 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.006>.
- Merlin, B. L., & Cônsoli, F. L. 2019.** Regulation of the larval transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by maternal and other factors of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Front. Physiol. 10. 1106. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01106>.
- Morin-Paulard, I., A. Vicent & M. Crozatien. 2013.** The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. Jak-Stat 2. e25700-1/8 <https://doi.org/10.4161/jkst.25700>.
- Nishide, Y., Kageyama, D., Yokoi, K., Jouraku, A., Tanaka, H., Futahashi, R., & Fukatsu, T. 2019.** Functional crosstalk across IMD and Toll pathways: insight into the evolution of incomplete immune cascades. Proc. Royal Soc. B. 286(1897). 20182207. <https://doi.org/10.1038/ni922>.
- Noriega, D.D., Arraes, F.B.M., Antonino, J.D., Macedo, L.L.P., Fonseca, F.C.A., Togawa, R.C., Grynberg, P., Silva, M.C.M., Negrisoni, A.S., Morgante, C.V., Grossi- De-Sa, M.F., 2020b.** Comparative gut transcriptome analysis of *Diatraea saccharalis* inresponse to the dietary source. PLoS One. 15. e0235575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235575>.
- Olombrada, M., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á., & García-Ortega, L. 2017.** Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. Biol. Chem. 398(1). 135-142. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0119>.
- O'shea, J. J., D.M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I. B. McIner & A. Lourence. 2015.** The jak-stat pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention. Annu Rev Med. 66. 311-328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>.
- O'shea, J.J., S.M. Molland & L.M. Staudt. 2013.** Jaks and Stats in immunity immunodeficiency, and cancer. N Engl J Med. 368. 161-170p. <https://doi.10.1056/NEJMra1202117>.
- Pal, S., Leger, R. J. S., & Wu, L. P. 2007.** Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem. 282(12). 8969-8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605927200>.
- Pedrini, N. 2022.** The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: expression of genes encoding secondary metabolites during pathogenesis. J. Fungus. 8(5). 488. <https://doi.org/10.3390/jof8050488>.
- Pereira, F. F., Kassab, S. O., Calado, V. R. F., Vargas, E. L., de Oliveira, H. N., & Zanuncio, J. C. 2015.** Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. Fla. Entomol. 98(1). 377-380. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.2207>.

- Rocha, I. F., Maller, A., Simão, R. D. C. G., Kadowaki, M. K., Alves, L. F. A., Huergo, L. F., & da Conceição Silva, J. L. 2016.** Proteomic profile of hemolymph and detection of induced antimicrobial peptides in response to microbial challenge in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473(2). 511-516. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.09>.
- Rodrigues, A., Pereira, F. F., Barbosa, P. R., Silva-Torres, C. S., & Torres, J. B. 2021.** Parasitism behavior of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae and pupae of sugarcane borers. *J. Insect Behav.* 34(3). 71-81. <https://doi.org/10.1007/s10905-021-09770-4>.
- Rosales, C., & Vonnice, S. 2017.** Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect Physiol. Ecol.* 179-212. <http://dx.doi.org/10.5772/6107>.
- Royet, J., Gupta, D., & Dziarski, R. 2011.** Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11(12). 837-851. <https://doi.org/10.1038/nri3089>.
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. 2018.** Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence.* 9(1). 1625-1639. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>.
- Sorrentino, R. P., Melk, J. P., & Govind, S. 2004.** Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics.* 166(3). 1343-1356. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1343>.
- Stączek, S., Cytryńska, M., & Zdybicka-Barabas, A. 2023.** Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *nt. J. Mol. Sci.*, 24(6), 5753. <https://doi.org/10.3390/ijms24065753>.
- Stanley, D., Haas, E., & Kim, Y. 2023.** Beyond Cellular Immunity: On the Biological Significance of Insect Hemocytes. *Cells*, 12(4), 599. <https://doi.org/10.3390/cells12040599>.
- Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15(1). 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>.
- Sun, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Li, X., Yang, R., Yu, Z., & Qin, L. 2016.** The Toll signaling pathway in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*: innate immune responses to different microorganisms. *PLoS One.* 11(8). e0160200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160200>.
- Takasu, K., & Overholt, W. A. 1997.** Aggressive behaviour of *Chilo partellus* (Swinhoe) larvae against the parasitoid, *Cotesia flavipes* Cameron. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 17(1). 131-135. <https://doi.org/10.1017/S1742758400022244>.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., & Yamakawa, M. 2008.** A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate

- immunity of *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38(12). 1087-1110.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.001>.
- Tang, B., Chen, J., Hou, Y., & Meng, E. 2014.** Transcriptome immune analysis of the invasive beetle *Octodonta nipae* (Maulik)(Coleoptera: Chrysomelidae) parasitized by *Tetrastichus brontispae* Ferrière (Hymenoptera: Eulophidae). PLoS One. 9(3). e91482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091482>.
- Tsakas, S & V.J. Marmares. 2010.** Insect immunity and its signalling: an overview. Invertebrate Surviv J 7: 228-238. ISSN 1824-307X.
- Valanne, S., Vesala, L., Maasdorp, M. K., Salminen, T. S., & Rämet, M. 2022.** The *Drosophila* Toll Pathway in Innate Immunity: from the Core Pathway toward Effector Functions. J. Immunol. 209(10). 1817-1825. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200476>.
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., & Wang, C. 2012.** Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. Proc. Natl Acad Sci. 109(4). 1287-1292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1115983109>.
- Wang, Q., Ren, M., Liu, X., Xia, H., & Chen, K. 2019.** Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. Mol. Immunol. 106. 69-76.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.021>.
- Wang, Z., Yang, Y., Li, S., Ma, W., Wang, K., Soberón, M., & Zhang, J. 2024.** JAK/STAT signaling regulated intestinal regeneration defends insect pests against pore-forming toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. PLoS Pathog., 20(1), e1011823.doi.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011823>
- Wertheim, B., Kraaijeveld, A. R., Schuster, E., Blanc, E., Hopkins, M., Pletcher, S. D., ... & Godfray, H. C. J. 2005.** Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. Genome Biol. 6(11). 1-20. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-11-r94>.
- Williams, M. J. 2007.** *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. J. Immunol. 178(8). 4711-4716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711>.
- Wu, S. F., Sun, F. D., Qi, Y. X., Yao, Y., Fang, Q., Huang, J., ... & Ye, G. Y. 2013.** Parasitization by *Cotesia chilonis* influences gene expression in fatbody and hemocytes of *Chilo suppressalis*. PLoS One, 8(9), e74309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074309>.
- Wu, S., Zhang, X., He, Y., Shuai, J., Chen, X., & Ling, E. 2010.** Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. Dev. Comp. Immunol. 34(11). 1191-1198.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.013>.
- Xu, Y. J., Luo, F., Li, B., Shang, Y., & Wang, C. 2016.** Metabolic conservation and diversification of *Metarhizium* species correlate with fungal host-specificity. Front Microbiol. 7. 2020.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02020>.

- Yang, L., Qiu, L. M., Fang, Q., Stanley, D. W., & Ye, G. Y. 2021.** Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids. *Insect Sci.* 28(5). 1208-1227. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12863>.
- Yu, X., Zhu, D., Luo, B., Kou, W., Cheng, Y., & Zhu, Y. 2022.** IFN γ enhances ferroptosis by increasing JAK-STAT pathway activation to suppress SLCA711 expression in adrenocortical carcinoma. *Oncol. Rep.* 47(5). 1-12. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8308>.
- Yuan, Y., Huang, W., Chen, K., & Ling, E. 2020.** *Beauveria bassiana* ribotoxin inhibits insect immunity responses to facilitate infection via host translational blockage. *Dev. Comp. Immunol.* 106. 103605. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103605>.
- Zhang, H., Ji, X. Y., Wan, N. F., & Jiang, J. X. 2017.** Prophenoloxidase encoding genes in *Spodoptera exigua*: molecular cloning and immune response to the challenge of nucleopolyhedrovirus and/or *Microplitis pallidipes*. *Biocontrol Sci Technol.*, 27(3), 408-423. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1296107>.
- Zhang, S., Hong, F., Song, H., Wang, L., Liu, Q., & An, C. 2016.** Cloning, expression, and characterization of prophenoloxidases from asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Günée). *J. Immunol. Res.*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1781803>.
- Zhang, X., Li, S., Si, Y., Hu, J., & Xia, Y. 2020.** Locust can detect β -1, 3-glucan of the fungal pathogen before penetration and defend infection via the Toll signaling pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 106. 103636. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103636>.
- Zhong, X., Rao, X. J., Yi, H. Y., Lin, X. Y., Huang, X. H., & Yu, X. Q. 2016.** Co-expression of Dorsal and Rel2 negatively regulates antimicrobial peptide expression in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Sci. Rep.* 6(1). 1-12. <https://doi.10.1038/srep20654>.

Table 1. Primers list used in RT-qPCR experiments.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>DsDorsal</i>	Dsac_Dorsal_Fw	CAGAAGTCAGCCGCAGAGTAT
	Dsac_Dorsal_Rv	ACGATCGGTTGTAGTGACAT
<i>DsRelish</i>	Dsac_Relish_Fw	GCAACTGATGAGGAATGGTGC
	Dsac_Relish_Rv	TCCCTAGCAACTTCCAAGCAG
<i>DsSTAT</i>	Dsac_Stat_Fw	GTATCACTATCGCCTGGGTCG
	Dsac_Stat_Rv	AGCTGAGGGAGATCCAAGACT
<i>DsGAPDH</i>	Dsac_GAPDH_Fw	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG
	Dsac_GAPDH_Rv	GTTGTCATTGAGTGAGATACCG
<i>DsRPS10</i>	Dsac_RPS10_Fw	TGATCGCTTCAGTGTTGCTG
	Dsac_RPS10_Rv	TCTCAAATCCAGGGGTACG
<i>DsB-Tubulin</i>	Dsac_B-tub_Fw	CAAGAACTCGTCCTACTTCGTC
	Dsac_B-tub_Rv	CGGTGAACTGTTCCGAGATG
<i>DsPPO1</i>	Dsac_PPO1_Fw	CAGCACGACGAGTTCCAATAC
	Dsac_PPO1_Rv	G TTCAGTGGCTGCGAGA ACT
<i>DsPPO2</i>	Dsac_PPO2_Fw	ACGACAGGCCAATATGAGATG
	Dsac_PPO2_Rv	GTCGATAGTCAGTGGCATGGT

All the primers were designed to have an annealing temperature of 60 °C.

Table 2. Immune-related gene models in *Bombyx mori* and *Diatraea saccharalis* genomes and *D. saccharalis* transcriptome.

Pathway	Gene	<i>Bombyx mori</i> gene model	<i>B. mori</i> Chromosome	<i>Diatraea saccharalis</i> gene model	<i>D. accharalis</i> Chromosome	Predicted Protein	<i>D. saccharalis</i> transcriptome	<i>D. saccharalis</i> gene name
Toll	<i>Toll</i>	KWMTBOMO14085	23	DIATSA_LOCUS11921	6	CAG9794556.1	contig_8799	<i>DsToll</i>
	<i>MyD88</i>	KWMTBOMO06029	10	DIATSA_LOCUS1648	11	CAG9783480.1	contig_28298	<i>DsMyD88</i>
	<i>Tube</i>	KWMTBOMO05260	9	DIATSA_LOCUS10580	5	CAG9793115.1	contig_24456	<i>DsTube</i>
	<i>Pelle</i>	KWMTBOMO15850	26	DIATSA_LOCUS12165	7	CAG9794818.1	contig_21714	<i>DsPelle</i>
	<i>Cactus</i>	KWMTBOMO07538	12	DIATSA_LOCUS3416	14	CAG9785377.1	contig_12805	<i>DsCactus</i>
	<i>Dorsal</i>	KWMTBOMO06982	12	DIATSA_LOCUS3861	14	CAG9785863.1	contig_9577	<i>DsDorsal</i>
Imd	<i>Imd</i>	KWMTBOMO02883	5	DIATSA_LOCUS13665	9	CAH0766399.1	contig_33509	<i>DsImd</i>
	<i>Dredd</i>	KWMTBOMO05514	10	DIATSA_LOCUS2082	11	CAG9783955.1	contig_21755	<i>DsDredd</i>
	<i>Tak1</i>	KWMTBOMO01385	3	DIATSA_LOCUS6572	2	CAH0755862.1	contig_743	<i>DsTak1</i>
	<i>Fadd</i>	KWMTBOMO13093	22	DIATSA_LOCUS3101	13	CAG9785045.1	contig_13471	<i>DsFadd</i>
	<i>Tab2</i>	KWMTBOMO01480	3	DIATSA_LOCUS6663	2	CAG9788882.1	contig_27587	<i>DsTab2</i>
	<i>IKKb</i>	KWMTBOMO10785	18	DIATSA_LOCUS6195	19	CAG9788393.1	contig_24518	<i>DsIKKb</i>
	<i>IKKg</i>	KWMTBOMO11717	19	DIATSA_LOCUS12765	8	CAG9795506.1	contig_32762	<i>DsIKKg</i>
	<i>Relish</i>	KWMTBOMO05207 /BGIBMGA002464-TA	9	DIATSA_LOCUS12454	7	CAG9795155.1	contig_4655	<i>DsRelish</i>
Jak-STAT	<i>Domeless</i>	KWMTBOMO10133	17	no hit	--	--	contig_3548	<i>DsDomeless</i>
	<i>Hopscotch</i>	KWMTBOMO11561	19	DIATSA_LOCUS13023	8	CAG9795783.1	contig_12106	<i>DsHop</i>
	<i>STAT</i>	KWMTBOMO06125	11	DIATSA_LOCUS8312	23	CAG9790649.1	contig_21765	<i>DsSTAT</i>
Melanization	<i>PPO</i>	KWMTBOMO09392	16	DIATSA_LOCUS8776	3	CAG9791144.1	contig_32805	<i>DsPPO1</i>
		KWMTBOMO09393	16					
		KWMTBOMO09804	16				contig_7829	<i>DsPPO2</i>

The gene model from *Bombyx mori* was obtained from Tanaka *et al.* (2008) and confirmed at SilkBase (<https://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Gene models from *D. saccharalis* was obtained from (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_918026875.4/) and contigs from midgut transcriptome (Noriega *et al.* 2020).

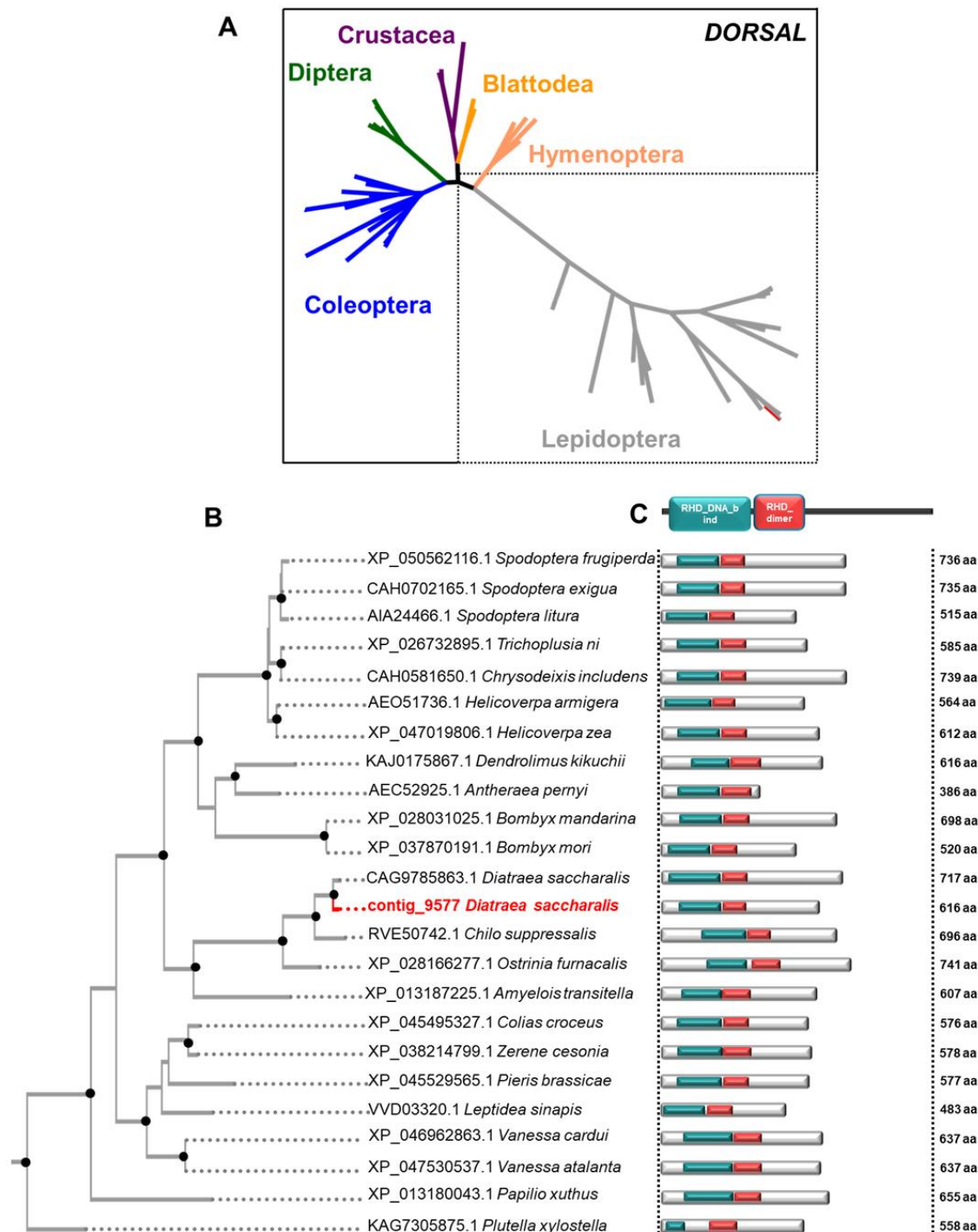


Figure 1. Phylogenetic analysis of the *Dorsal* transcription factor (Toll pathway). (A) Amino acid sequences of *Dorsal* proteins from different groups (Coleoptera, Blattodea, Hymenoptera, Diptera,

Crustacea, and Lepidoptera) were used to construct the maximum likelihood (ML) tree. **(B)** A second tree with an emphasis on Lepidoptera is displayed, where branches represent bootstrap values obtained through 1000 repetitions. Only values exceeding 70 are shown (black circles). **(C)** The functional domains of Dorsal from Lepidoptera; the DNA-binding domain homologous to Rel (RHD_DNA_binding) is marked in green, and the dimerization domain (RHD_dimer) is marked in red.

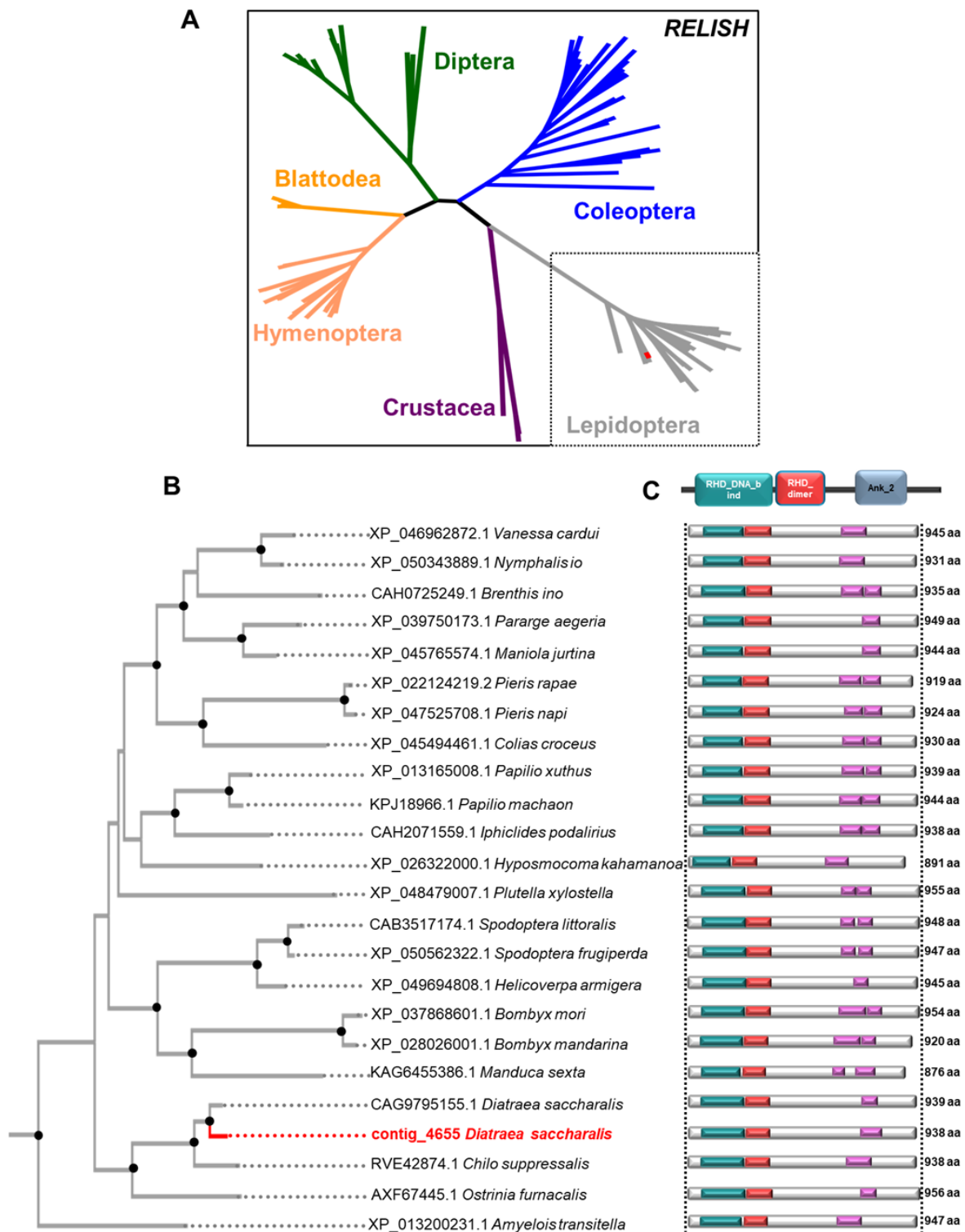


Figure 2. Phylogenetic analysis of the Relish transcription factor (IMD pathway). **(A)** Amino acid sequences of *Relish* proteins from different groups (Coleoptera, Blattodea, Hymenoptera, Diptera,

Crustacea, and Lepidoptera) were used to construct the maximum likelihood (ML) tree. **(B)** A second tree with an emphasis on Lepidoptera is displayed, where branches represent bootstrap values obtained through 1000 repetitions. Only values exceeding 70 are shown (black circles). **(C)** The functional domains of relish from Lepidoptera; the DNA-binding domain homologous to Rel (RHD_DNA_binding) is marked in green, and the dimerization domain (RHD_dimer) is marked in red. and the ankyrin domain (Ank_2) in lilac.

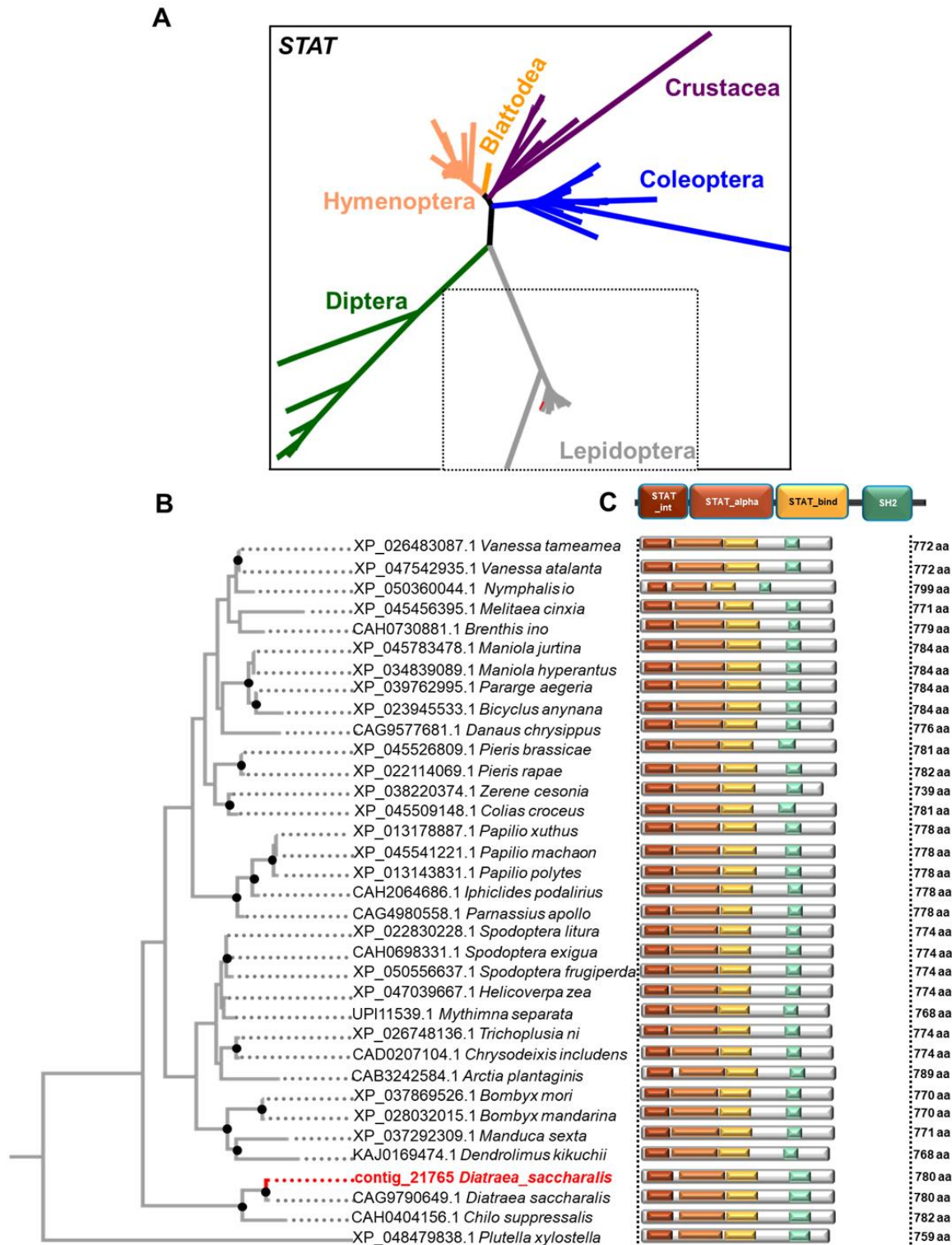


Figure 3. Phylogenetic analysis of the STAT transcription factor (Jak-STAT pathway). (A) Amino acid sequences of STAT proteins from different groups (Coleoptera, Blattodea, Hymenoptera,

Diptera, Crustacea, and Lepidoptera) were used to construct the maximum likelihood (ML) tree. **(B)** A second tree with an emphasis on Lepidoptera is displayed, where branches represent bootstrap values obtained through 1000 repetitions. Only values exceeding 70 are shown (black circles). **(C)** The functional domains of STAT from Lepidoptera; the DNA-binding domain homologous to Rel (RHD_DNA_binding) is marked in green, and the dimerization domain (RHD_dimer) is marked in red. and the ankyrin domain (Ank_2) in lilac. The protein interaction domain (STAT_int) is marked in dark red, the alpha domain of STAT (STAT_alpha) in light red, the DNA-binding domain (STAT_bind) in light orange, and the Src homology 2 domain (SH2) in green.

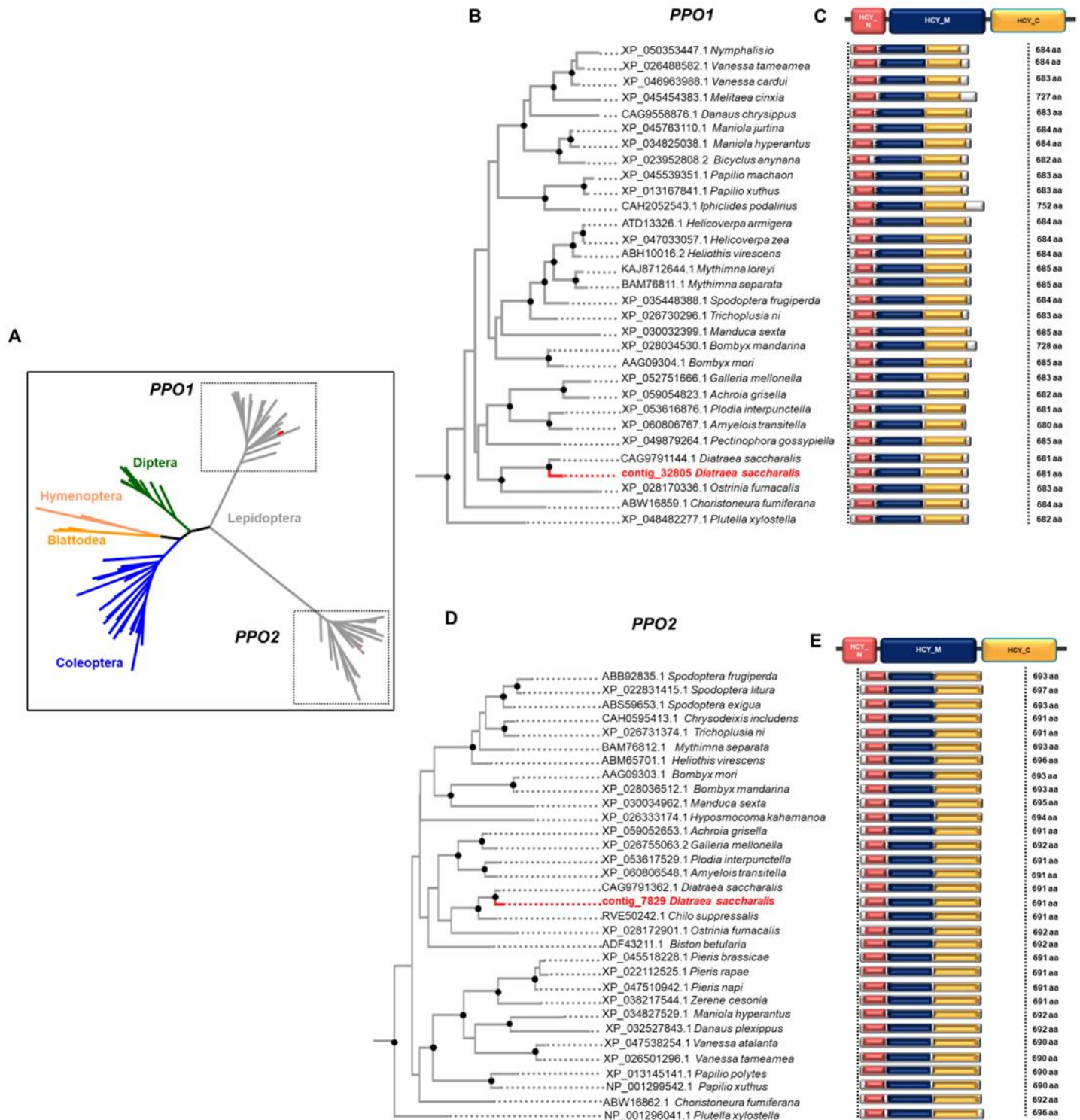


Figure 4. Phylogenetic analysis of *PPO1* e *PPO2* precursors (melanization pathway). (A) Amino acid sequences of PPO proteins from different groups (Coleoptera, Blattodea, Hymenoptera, Diptera, Crustacea, and Lepidoptera) were used to construct the maximum likelihood (ML) tree.

(B) A second tree with an emphasis on Lepidoptera *PPO1* is displayed, where branches represent bootstrap values obtained through 1000 repetitions. Only values exceeding 70 are shown (black circles). **(C)** Second tree with emphasis on *PPO2*. **(D)** The functional domains of *PPO* from Lepidoptera; the Hemocyanin all-alpha domain (Hemocyanin_N) is marked in pink, the Hemocyanin copper-containing domain (Hemocyanin_M) in blue, and the Hemocyanin ig-like domain (Hemocyanin_C) in yellow.

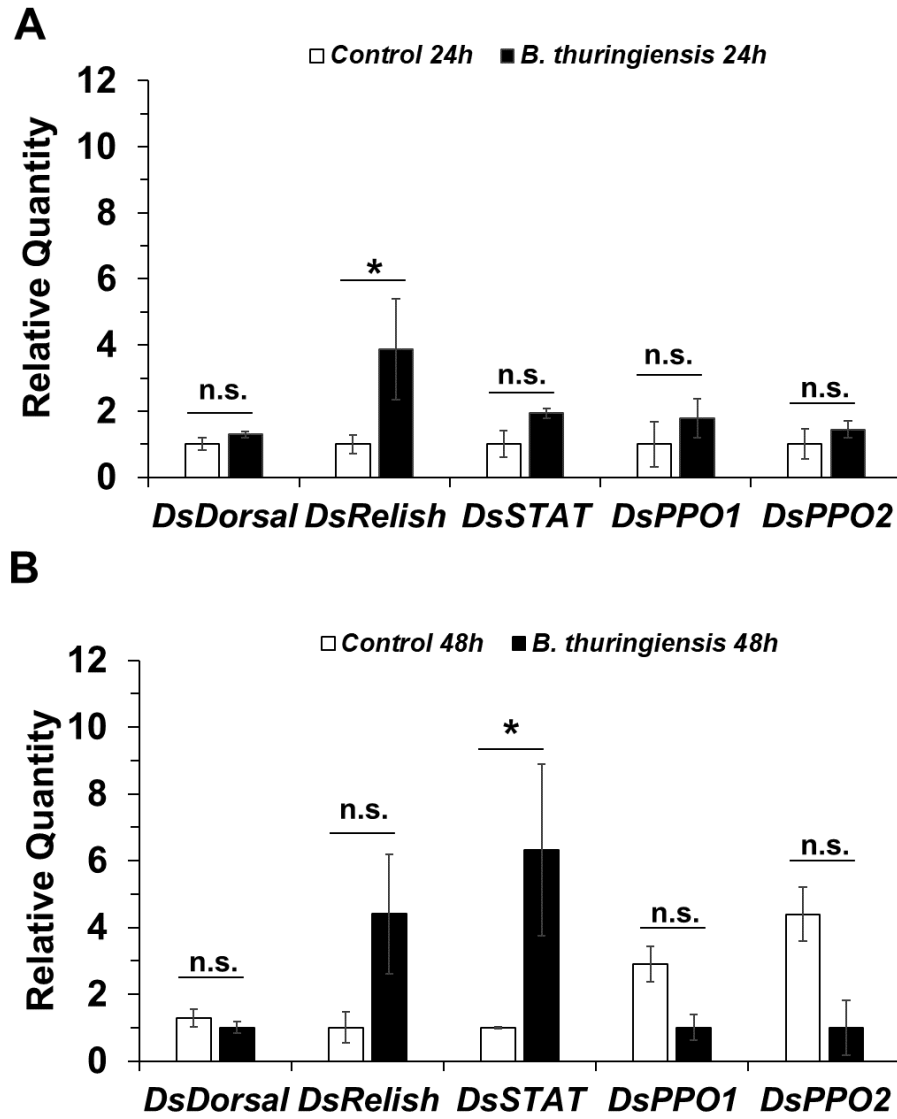


Figure 5. Analysis of the expression of transcription factor genes from the humoral response pathways and the profenoloxidases *PPO1* and *PPO2* of *Diatraea saccharalis* in 3rd instar larvae at 24h (A) and 48h (B) after feeding on lethal concentration for 30% of individuals of *Bacillus thuringiensis*. Expression data were analyzed using SATqPCR with the $\Delta\Delta C_t$ method and Student's t-test.

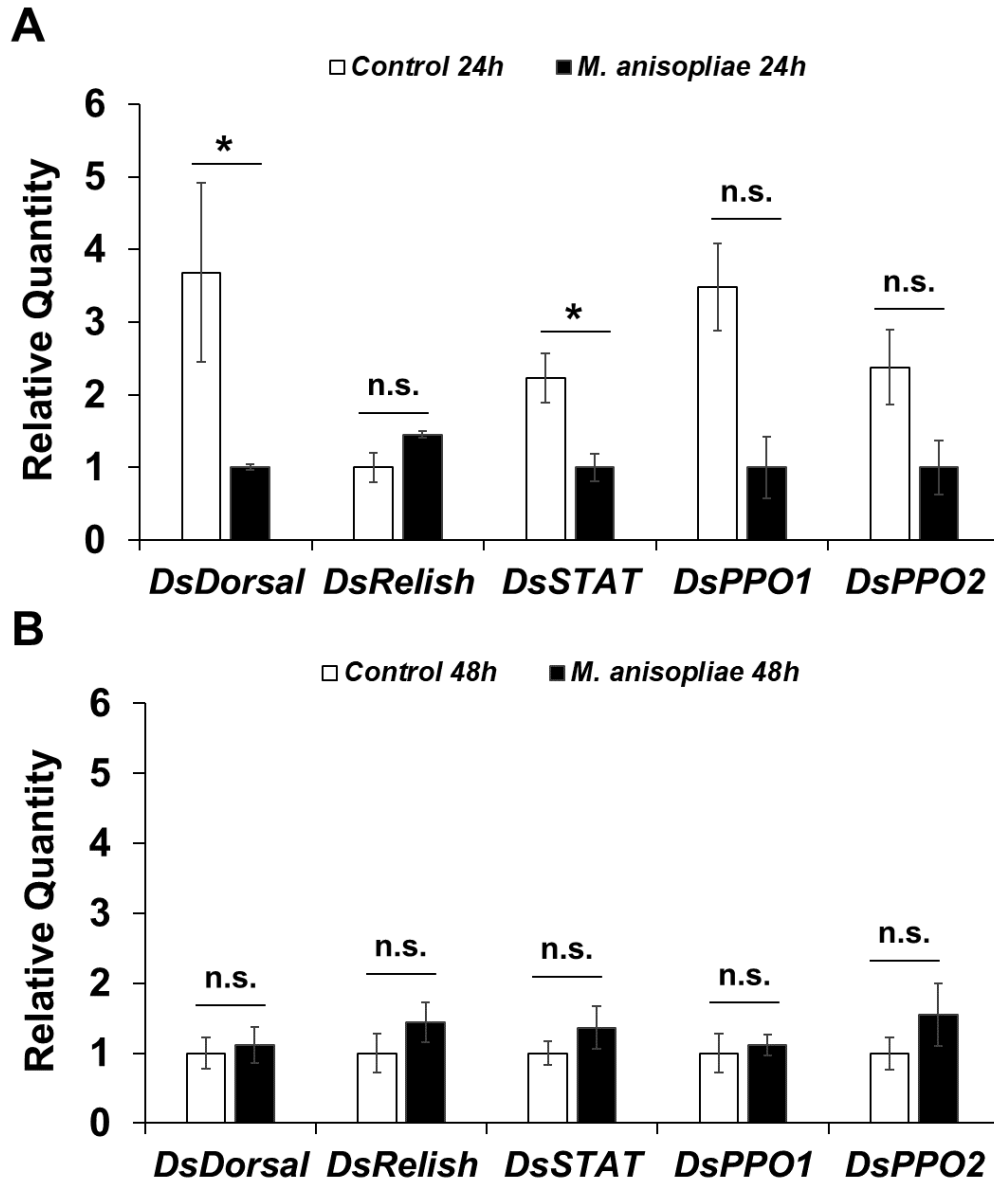


Figure 6. Analysis of the expression of transcription factor genes from the humoral response pathways and the profenoloxidases *PPO1* and *PPO2* of *Diatraea saccharalis* in 3rd instar larvae after topical application of *Metarhizium anisopliae* conidia, at 24h (A) and 48h (B). Expression data were analyzed using SATqPCR with the $\Delta\Delta C_t$ method and Student's t-test.

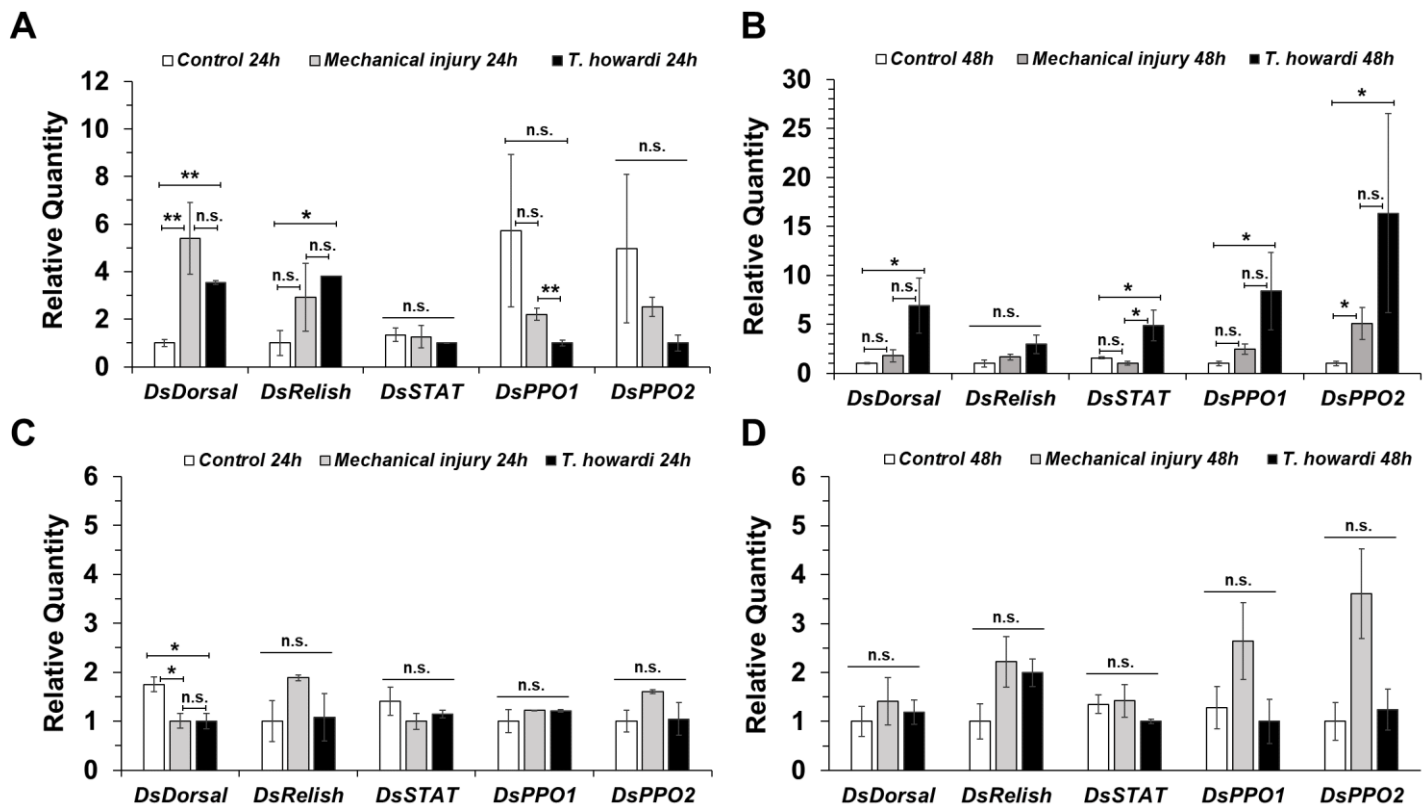


Figure 7. Analysis of the expression of transcription factor genes from the humoral pathways and the profenoloxidases *PPO1* and *PPO2* of *Diatraea saccharalis* in 4th instar larvae at 24h (**A**) and 48h (**B**), and 1-day pupae also at 24h (**C**) and 48h (**D**) after parasitism by *Tetrastichus howardi*. Controls included insects without any intervention (Control) and those treated with mechanical injury using a pin to simulate the ovipositor of the female *T. howardi*. Expression data were analyzed using SATqPCR with the $\Delta\Delta C_t$ method and Student's t-test.

CAPÍTULO 3

IMUNIDADE PARA DENTRO DA CABEÇA: UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO É INDUZIDO NA CABEÇA DE *Diatraea saccharalis* QUANDO O INSETO INGERE CANA- DE-AÇÚCAR OU *Bacillus thuringiensis*¹

MANOELY ABREU REIS²

²Departamento de Agronomia- Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 556

Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Reis, M.A. Imunidade para dentro da cabeça: um peptídeo antimicrobiano é induzido na cabeça de *Diatraea saccharalis* quando o inseto ingere cana-de-açúcar ou *Bacillus thuringiensis*

RESUMO - Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são a principal resposta humoral dos insetos frente à invasão de microrganismos, atuando principalmente no intestino e hemolinfa. Neste trabalho, inicialmente, realizamos a identificação do número e da diversidade de peptídeos antimicrobianos em três espécies de brocas da cana-de-açúcar: *Diatraea saccharalis* e *Diatraea impersonatella* (Lepidoptera: Crambidae), e *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae). Para isso, utilizamos dados de transcrito das três espécies e dados genômicos de *D. saccharalis*. Posteriormente, a partir da análise do transcrito intestinal de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com cana-de-açúcar identificamos a indução de um gene cópia única do AMP lebecina (*DsLeb*). A expressão de *DsLeb* foi caracterizada no corpo inteiro e em diferentes partes como cabeça, intestino e carcaça de lagartas de 4º ínstar de *D. saccharalis*, para determinar o local e as condições de expressão. Para tanto, as lagartas foram mantidas em jejum ou alimentadas com cana ou dieta artificial (DA), e, por fim, com DA acrescida com *Bacillus thuringiensis* (Bt). A expressão de *DsLeb* foi quantificada por RT-qPCR. Inicialmente, verificou-se que *DsLeb* é mais expressa em insetos que se alimentaram de cana-de-açúcar do que DA ou que ficaram em jejum. Considerando as partes do corpo, foi verificado que a expressão foi maior na carcaça (que contém a hemolinfa) do que no intestino. A cabeça possuía expressão intermediária entre carcaça e intestino. O mesmo padrão de expressão foi observado tanto em insetos alimentados com cana quanto com DA. Quando as partes do corpo foram comparadas de forma isolada, a única diferença significativa foi verificada na expressão na cabeça, onde insetos alimentados com cana apresentaram expressão da *DsLeb* quase três vezes maior do que aqueles alimentados com DA. Como esperado, *DsLeb* foi altamente expresso em insetos infectados por Bt. Entretanto, a maior expressão não foi no intestino, mas na carcaça. Curiosamente, ao comparar as partes do corpo isoladas de insetos tratados ou não com Bt, observou-se uma indução de expressão na cabeça e na carcaça em insetos tratados. Este estudo demonstrou como um único gene de AMP pode ser modulado de diferentes formas dependendo da

condição ambiental, e que as defesas humorais de *D. saccharalis* atuam desde a cabeça, provavelmente nas glândulas salivares.

PALAVRAS-CHAVE: AMP, lelocina, brocas da cana, defesa humoral, transcrito

TO HEAD WITH THE IMMUNITY: AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE IS INDUCED IN THE
HEAD OF *Diatraea saccharalis* WHEN THE INSECT INGESTS SUGARCANE OR *Bacillus*
thuringiensis

ABSTRACT - Antimicrobial peptides (AMPs) are the insects' primary humoral response against microbial invasion, acting mainly in the gut and hemolymph. In this work, we initially identified the number and diversity of antimicrobial peptides in three species of sugarcane borers: *Diatraea saccharalis* and *Diatraea impersonatella* (Lepidoptera: Crambidae), and *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae), using transcriptomic data (for all three species) and genomic data (for *D. saccharalis*). Subsequently, from the analysis of the intestinal transcriptome of *D. saccharalis* larvae fed with sugarcane, we identified the induction of a single-copy gene of the AMP lebecin (*DsLeb*). The expression of *DsLeb* was characterized in the whole body and in different parts such as the head, gut, and carcass of 4th instar larvae of *D. saccharalis* to determine the location and conditions of expression. The larvae were either starved or fed with sugarcane or an artificial diet (AD), and finally with AD supplemented with *Bacillus thuringiensis* (Bt) Crystals and spores. Gene expression was quantified by RT-qPCR. Initially, it was found that *DsLeb* is more expressed in insects that fed on sugarcane compared to those on AD or those that were starved. Considering the body parts, it was observed that the expression was higher in the carcass (containing the hemolymph and fat bodies) than in the gut. Comparing the body parts, the head showed intermediate expression between the carcass and the gut. The same expression pattern occurred in insects fed on both sugarcane and AD. When comparing the body parts in different diets, the only significant difference was observed in the head, where insects fed on sugarcane had almost three times higher *DsLeb* expression than those fed on AD. As expected, *DsLeb* was highly expressed in insects infected with Bt. However, the highest expression was not in the gut but in the carcass. Interestingly, also when comparing isolated body

parts of Bt-treated and untreated insects, a *DsLeb* induction was observed in the head and carcass of treated insects. This study demonstrated how a single AMP gene can be modulated in different ways depending on the environmental condition and that the humoral defenses of *D. saccharalis* act from the head, likely in the salivary glands.

KEYWORDS: AMP, lebocin, sugarcane borers, humoral response, transcriptome

Introdução

Os insetos possuem um sofisticado sistema imunológico humoral, que envolve atividades como coagulação, melanização, síntese de peptídeos, entre outras (Strand 2008, Dudzic *et al.* 2015, Melcarne *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2021). Esses mecanismos são fundamentais para o combate, eliminação de agentes patogênicos, e para a manutenção da homeostase do inseto (Vilcinskas 2013, Schwenke *et al.* 2016). Dentre esses processos, a síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) é especialmente relevante e tem sido amplamente estudada devido à sua aplicabilidade em diferentes áreas (Wu *et al.* 2018, Yi *et al.* 2014, Manniello *et al.* 2021, Dho *et al.* 2023). Na área da saúde, esses peptídeos são pesquisados para o desenvolvimento de novos antibióticos, enquanto na agricultura, são considerados de interesse como genes-alvo de nocalte em insetos-praga, o que os tornam mais vulneráveis e aumenta a eficácia dos métodos de controle de pragas (Yi *et al.* 2014).

Os AMPs de insetos são pequenas moléculas, compostas por aproximadamente 7 a 100 aminoácidos (Bulet & Stocklin 2005, Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). Embora geralmente sejam catiônicos, também podem ser aniônicos e podem passar por modificações pré e/ou pós-traducionais antes de serem liberados como peptídeos ativos (Tassanakajon *et al.* 2015, Yi *et al.* 2014, Mylonakis *et al.* 2016). Esses peptídeos são produzidos principalmente nos corpos gordurosos, mas também podem ser sintetizados pelos hemócitos e secretados diretamente no local de ação (Wu *et al.* 2018, Manniello *et al.* 2021, Dho *et al.* 2023). Os AMPs agem desestabilizando e rompendo as membranas dos microrganismos, além de interferirem no seu metabolismo e nas organelas citoplasmáticas (Yi *et al.* 2014, Dho *et al.* 2023). O modo como os AMPs permeabilizam e se inserem na membrana microbiana varia, dependendo da sequência peptídica e da composição da membrana do microrganismo (Tassanakajon *et al.* 2015).

A quantidade de AMPs presentes em cada espécie de inseto varia consideravelmente (Mylonakis *et al.* 2016, Azmiera *et al.* 2022). A joaninha *Harmonia axyridis* (Linnaeus), por

exemplo, possui mais de 50 AMPs, enquanto a barata *Periplaneta americana* (Linnaeus) codifica 86 AMPs (Kim *et al.* 2016, Moretta *et al.* 2020, Dho *et al.* 2023). Em contrapartida, o pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum* (Linnaeus) ainda não teve nenhum AMP identificado em seu genoma (Moretta *et al.* 2020). Estudos em insetos não-modelo revelaram um panorama promissor de AMPs. A mosca-soldado-negra *Hermetia illucens* (Linnaeus) contém 68 genes de AMPs (Moretta *et al.* 2020), enquanto o bicho-pau *Peruphasma schultei* (Conle & Hennemann) apresentou 19 sequências de AMPs (Dho *et al.* 2023). Essa diversidade demonstra a importância de estudar insetos não-modelo para desvendar o contexto funcional dos AMPs, além de descobrir novos peptídeos com potencial biotecnológico.

Na ordem Lepidoptera, diversas famílias de AMPs foram identificadas (Badapanda & Chikara 2015, Nesa *et al.* 2020). Entre as mais importantes estão as cecropinas, atacinas, moricinas, as lebecinas, gloverinas, defensinas, que em sua maioria possuem atividades antibacteriana e antifúngica. Outros peptídeos semelhantes às defensinas também foram identificados como spodopterina, heliomicina, gallerimicina e galiomicina, também possuindo ação antimicrobiana (Badapanda & Chikara 2015, Nesa *et al.* 2020). Entretanto, existem alguns AMPs, que são encontrados exclusivamente em algumas ordens de insetos (Sackton 2019, Manniello *et al.* 2021). Por exemplo, as moricinas, gloverinas e lebecinas, são peptídeos exclusivos da ordem Lepidoptera (Nesa *et al.* 2020, Manniello *et al.* 2021). As lebecinas, em particular, destacam-se por sua capacidade de combater tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, além de fungos (Yi *et al.* 2014, Manniello *et al.* 2021). Embora o mecanismo preciso de ação das lebecinas ainda não esteja completamente elucidado, sabe-se que elas induzem a ruptura da membrana bacteriana, levando à morte do patógeno (Nesa *et al.* 2020).

Identificar e caracterizar os AMPs é crucial, porém entender como se dá a modulação da expressão em resposta a diferentes estímulos é igualmente importante. Isso permite compreender

como sua expressão é afetada por diversos microrganismos e até mesmo por diferentes fontes de alimentação. Além da indução pela presença de patógenos, os AMPs podem ser induzidos pelo tipo de alimentação do inseto (Wu *et al.* 2010, Cheng *et al.* 2006). Estudos como os de Candian *et al.* (2023) e Candian & Tedeschi (2023) demonstram essa relação crucial entre a dieta e a produção de AMPs em espécies como *Hermetia illucens* (Linnaeus) e *Tenebrio molitor* (Linnaeus).

Nesse contexto, devido a relevância agrícola das brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Diatraea impersonatella* (Schaus) e *Telchin licus* (Fabricius), identificou-se e caracterizou-se AMPs em transcritomas intestinais destas espécies. No caso de *D. saccharalis*, investigamos a regulação da expressão gênica de uma lebocina, que teve sua expressão aumentada quando o inseto se alimentou de cana-de-açúcar. Realizamos uma análise comparativa das regiões de expressão da lebocina em duas condições: alimentação com cana-de-açúcar e posterior tratamento com a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), bioinseticida comumente utilizado no controle de lagartas. A lebocina, além de ser expressa na hemolinfa, também foi encontrada na cabeça dos insetos, tanto quando se alimentaram com cana quanto quando ingeriram esporos e cristais de Bt.

Material e Métodos

Criação de *Diatraea saccharalis*. Para os experimentos, foram utilizados insetos provenientes de uma criação mantida em laboratório sob condições controladas de umidade ($70 \pm 10\%$ de UR), fotoperíodo (12h de luz: 12h de escuridão) e temperatura adequada aos estágios de vida dos insetos (adultos foram mantidos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, enquanto lagartas, pupas e ovos foram mantidos a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). As lagartas de *D. saccharalis* foram alimentadas com dieta artificial estabelecida por Hensley & Hammond (1986) e ajustada por Araújo *et al.* (1985). Quando atingiram a fase adulta, foram colocados em gaiolas cilíndricas revestidas com papel branco para a oviposição, com algodão

umedecido na base para manter a umidade. Para alimentação, foi fornecida uma solução de mel a 10%. A coleta de ovos foi realizada a partir de três dias após montagem da gaiola. Os ovos foram esterilizados em formol a 3% e sulfato de cobre a 1%, e posteriormente armazenados em placas de Petri contendo algodão umedecido com sulfato de cobre para manter a umidade e manter o ambiente desinfetado até a eclosão.

Identificação e caracterização de genes dos peptídeos antimicrobianos nas brocas da cana-de-açúcar. As análises foram conduzidas para AMPs comumente identificados em Lepidoptera, incluindo atacinas, cecropinas, defensinas, gloverinas, lebecinas e moricinas. As sequências peptídicas foram inicialmente recuperadas da espécie modelo de Lepidoptera, *Bombyx mori* (Linnaeus), utilizando o software de bioinformática Silkbase (<https://silkbase.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Essas sequências foram utilizadas como “iscas” para a busca nos transcritomas do intestino de larvas de quarto ínstar de *D. saccharalis* (Noriega *et al.* 2020a), *D. impersonatella* (dados não publicados) e *T. licus* (Noriega *et al.* 2020b), por meio do software BioEdit. Utilizou-se a função tBlastN com um e-value de corte de 10^{-3} e a matriz BLOSUM62. No genoma de *D. saccharalis*, foram identificados AMPs e comparados outras espécies como *Manduca sexta* (Linnaeus), *B. mori* e *Danaus plexippus* (Linnaeus).

Para avaliar a integridade das sequências identificadas nos transcritomas e determinar as proteínas preditas, utilizamos a ferramenta Expasy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>). Para a predição das janelas de leitura abertas (ORFs) estabelecemos parâmetros específicos, exigindo um tamanho mínimo de 75 aminoácidos para as ORFs. A identificação dos peptídeos sinal foi realizada usando o software Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) e validada através do SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>), seguindo critérios que incluíam uma probabilidade superior a 0,5 e a ausência de um domínio transmembrana no N-terminal. A

massa molecular e o ponto isoeletrico teóricos das proteínas preditas foram determinados pelo software ExPASy Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/). Os principais domínios proteicos das proteínas identificadas foram determinados utilizando o software HMMER Versão 3.1 pelo modo de busca “hmmsearch” (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) e o Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Análises filogenéticas. Para as análises filogenéticas baseadas em sequências de aminoácidos (aa), além das sequências obtidas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* ou *T. licus*, foram acrescentadas outras sequências de diferentes espécies de Lepidoptera, obtidas no banco de dados do NCBI, através de BlastP contra o banco "nr" e o algoritmo BLOSUM62. Para isso, as sequências das espécies de interesse mencionadas anteriormente foram utilizadas como "iscas". Todas as sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas utilizando o software MEGA 7 com o algoritmo MUSCLE. A construção das árvores filogenéticas foi realizada pelo PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) utilizando o método de máxima verossimilhança (ML), com os parâmetros de confiabilidade aLRT SH-like e Bootstrap (1000 repetições). O Smart Model Selection (SMS) foi empregado para a escolha do modelo de substituição mais adequado. As imagens das árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Localização cromossômica de genes de peptídeos antimicrobianos em *D. saccharalis*. A localização dos loci gênicos de atacinas, cecropinas, gloverinas e moricinas no genoma de *D. saccharalis* foi identificada utilizando o mapa gráfico do genoma de referência depositado no NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_918026875.4/).

Efeito de diferentes dietas na expressão do AMP leucocina em *D. saccharalis*. Lagartas de 4º ínstar foram individualizadas em placas de Petri, com cada tratamento determinado pelo tipo de

alimentação: Jejum, Dieta Artificial e Cana-de-açúcar. Um total de 24 lagartas por tratamento foram utilizadas, distribuídas em 3 repetições, resultando em 8 lagartas por repetição para cada tratamento. Durante um período de 5 dias, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial e cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar utilizada pertence à variedade RB04-1443, cultivada em casa de vegetação sob condições físicas naturais de 12 a 13 horas de fotofase, com 23 a 30 °C, e irrigada conforme necessário. A cana coletada na casa de vegetação, com aproximadamente 10 meses de idade, foi higienizada com água e detergente, cortada na porção mediana em rodela de 3,5–4,0 cm, e deixada para secar em fluxo laminar por no mínimo 30 minutos sob luz ultravioleta (UV). As lagartas do grupo de jejum não receberam alimento durante o mesmo período. Após o período do tratamento, realizou-se a extração do RNA total do corpo inteiro das lagartas, utilizando um conjunto de 5 lagartas por repetição, com 3 repetições no total.

Efeito da dieta artificial contendo cana de açúcar na expressão do AMP leucina em *D. saccharalis*. Neste estudo, foram realizados 2 tratamentos. No primeiro as lagartas foram alimentadas com a dieta artificial conforme descrito no tópico "Criação de Insetos". No segundo, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial descrita para *D. impersonatella*, acrescida de parte do colmo de cana-de-açúcar triturado. Neste tratamento, esperava-se eliminar qualquer microrganismo endofítico presente na cana, uma vez que ela passou por esterilização por calor e recebeu antibiótico na dieta artificial. As lagartas foram mantidas nestes tratamentos desde a eclosão. Ao atingirem o 4º ínstar, procedeu-se à extração de RNA total de corpo inteiro das lagartas. Para essa extração, foram utilizadas um conjunto de 5 lagartas em cada uma das 3 repetições realizadas.

Efeito da cana de açúcar na expressão de leucina em diferentes tecidos de *D. saccharalis*. Lagartas de 3º ínstar foram separadas em placas de Petri contendo colmos de cana-de-açúcar ou

dieta artificial para alimentação e mantidas nessas condições por 8 dias. Foi realizada a troca dos colmos a cada 2 dias para evitar a fermentação e contaminação. No total, foram utilizadas 10 placas, com 5 lagartas cada, totalizando 50 lagartas por tratamento. Quando as lagartas atingiram o 4º ínstar, foram realizadas as extrações de RNA total. Para isso, foi coletado um conjunto de 10 lagartas por repetição, com 3 repetições no total. As lagartas tiveram suas cabeças, intestinos e carcaças dissecadas.

***Bacillus thuringiensis*.** Estudos com *B. thuringiensis* (Bt) empregaram o produto comercial Agree® (Biocontrole, SP), formulado com 500 g/kg (50% p/p) de ingrediente ativo composto por esporos e cristais da cepa *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* GC-91. A natureza transconjugada da cepa, resultante da formação de um plasmídeo da cepa *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, permite a expressão de diversas toxinas: Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da e Cry2Aa. Essa transconjugação possibilita a ação sinérgica das toxinas codificadas por ambos os plasmídeos em um único inseticida. Este inseticida biológico causa efeitos nas lagartas desde o primeiro até o terceiro estágio de desenvolvimento, induzindo lesões no sistema digestivo que resultam na morte do inseto.

Avaliação da expressão de leucocina após alimentação com dose subletal de *B. thuringiensis* em *D. saccharalis*. No presente estudo, o inseticida comercial Agree® foi utilizado como fonte de esporos e cristais de cepa *B. thuringiensis* var. *aizawai* GC-91, na concentração de 115 µg/g de dieta. Essa concentração é considerada subletal para *D. saccharalis* conforme determinado por Damasceno *et al.* em 2022 (dados não publicados). Lagartas de 4º ínstar de *D. saccharalis* foram expostas aos tratamentos de alimentação com e sem Bt incorporado a dieta. Para isso, foram utilizadas 10 lagartas de 3º ínstar acondicionadas em placas de Petri contendo dieta com ou sem Bt, com três repetições para cada tratamento, totalizando 60 lagartas utilizadas. A extração de RNA

total do corpo inteiro das lagartas foi realizada 24 e 48 horas após o início do tratamento, com um conjunto de 3 lagartas por repetição.

Análise da expressão de lelocina em diferentes tecidos de *D. saccharalis* após ingestão de *B. thuringiensis* (Bt). Neste experimento, as lagartas foram tratadas da mesma forma que no experimento anterior. No entanto, após 24 horas, foram dissecadas a cabeça, o intestino e a carcaça das lagartas. O RNA total foi extraído de um conjunto de 10 lagartas por repetição, com 3 repetições no total.

Extração de RNA total e síntese de cDNA. Para extrair RNA, os insetos ou suas partes dissecadas foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados com TRIzol (Thermo Fisher Scientific, USA). A extração se seguiu conforme protocolo do fabricante. Após a extração do RNA total, este foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, O RNA (1,5 µg) foi tratado com DNase I (Ambion™, EUA) e serviu de molde para a síntese de cDNA com o Kit iScript gDNA clear (BIO-RAD, EUA) de acordo como protocolo do fabricante.

Análise da expressão gênica por RT-qPCR. A expressão gênica foi quantificada por RT-qPCR utilizando um termociclador QuantStudio5 (ThermoFisher Scientific, EUA). A análise foi realizada com duas replicatas técnicas e três biológicas por tratamento, além de controles negativos para cada par de primers. Cada reação tinha 10 µL de volume total, sendo composta por 5 µL de 2x SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA), 0,2 µM de cada primer (direto e reverso, Tabela 1) (0,2 µL), 2,6 µL de água destilada e cDNA diluído 1:10. As condições da RT-qPCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por

1 minuto, e curva de melting de 60 a 94 °C, aumentando 0,5 °C por segundo. GAPDH e RPS10 foram utilizados como genes normalizadores de expressão (Noriega *et al.* 2020; Tabela 1).

Análise estatística da expressão gênica. A expressão gênica relativa em diferentes condições experimentais foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando o software online SATQPCR (<https://satqpcr.sophia.inrae.fr>; Rancurel *et al.* 2019). A expressão gênica comparada utilizando o teste t de Student com $P \leq 0,05$).

Resultados

Identificação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) nas brocas da cana-de-açúcar. Foram identificados AMPs em todas as espécies estudadas. A análise do genoma de *D. saccharalis* revelou a presença de vários genes que codificam AMPs, como atacina, cecropina, defensina, gloverina, lebecina e moricina. A quantidade de genes para cada tipo de AMP varia entre as espécies com genoma disponível. *M. sexta* possui um maior número de genes, quase o dobro dos identificados em *D. saccharalis* (Tabela 2). Dos 22 genes AMPs identificados no genoma de *D. saccharalis*, 7 são de atacina, 3 de cecropina, 1 de defensina, 4 de gloverina, 1 de lebecina e 3 de moricina, e estão descritos em detalhes na Tabela 3. No transcrito intestinal de *D. saccharalis* foram identificados apenas 15 genes (Tabela 4), número menor do que o encontrado para *D. impersonatella* (18 genes) (Tabela 5) e *T. licus licus* (25 genes) (Tabela 6). Interessante que o número de AMPs específicos varia quando comparadas as sequências encontradas no genoma e transcrito intestinal de *D. saccharalis* (Tabela 2), isso pode indicar que nem todos os genes são expressos no intestino.

Análise filogenética dos peptídeos antimicrobianos nas três espécies de brocas da cana-de-açúcar.

Atacinas. Foram identificados dois tipos de atacina nas espécies estudadas, ambos com aproximadamente 200 aminoácidos antes do processamento. O primeiro tipo, que é o mais frequente, possui um peptídeo sinal e dois domínios funcionais (Figura 1A). A segunda, que conta com apenas um gene em cada espécie, não possui peptídeo sinal, e possui apenas um domínio (Figura 1B). Entretanto, ambas são ricas em aminoácidos glicina e prolina característica comum das atacinas. Além disso, as sequências de *T. licus* apresentaram o sítio de processamento intracelular (RXXR), região onde ocorre o processamento da proteína para sua forma madura (Figura 1A). Ao analisarmos a árvore filogenética das atacinas, observamos que o número de genes varia entre as diferentes espécies de Lepidoptera (Figura 1C). Todas as sequências de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* agruparam-se com os membros da família Crambidae, com o esperado, e *T. licus* com os respectivos membros de famílias de borboletas, concordando com a filogenia da espécie (Figura 1C). Além disso, na mesma árvore, observamos que as atacinas que apresentaram apenas um único domínio, agruparam-se separadamente formando um único cluster (Figura 1C).

Cecropinas. Todas cecropinas identificadas no genoma de *D. saccharalis* e nos transcritomas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus* apresentaram peptídeo sinal, e cada uma delas possui tamanho aproximado de 65 aa na sua forma não processada (Figura 2A). Além disso, todas as cecropinas identificadas apresentam uma prolina conservada (Figura 2A), e a maioria possui um triptofano característico, conservado na região onde ocorre o processamento para formação das cecropinas maduras (Figura 2A). Na análise filogenética, observamos a formação de dois clusters principais contendo a maioria das sequências (Figura 2B). No primeiro agrupamento encontramos também as sequências de *Chilo suppressalis* (Walker) e *Ostrinia furnacalis* (Guenee) (Família Crambidae) e outros lepidópteros. No entanto, um grupo menor de sequências apresentou

divergência, formando um cluster à parte com apenas uma sequência para cada organismo (Figura 2B).

Defensinas. Neste estudo, as defensinas identificadas nas brocas da cana-de-açúcar são de cópia única, possuindo em média 100 aa. Todas as sequências apresentaram um peptídeo sinal e as seis cisteínas responsáveis pelas pontes dissulfeto que estabilizam o peptídeo maduro (Figura 3A). Após análise filogenética, observou-se que nas espécies avaliadas de Lepidoptera, a maioria possui apenas uma cópia de defensina, com exceção de *Plutella xylostella* (Linnaeus) e *Pieris brassicae* (Linnaeus) (Figura 3B). Mais uma vez, as sequências de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* se agruparam em um cluster da família Crambidae, enquanto *T. licus* se agrupou externamente (Figura 3B).

Gloverinas. As sequências homólogas para gloverina em *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus* possuem em média 170 aa antes do processamento, com todas apresentando peptídeo sinal e o sítio de processamento RXXR. Assim, como as atacinas, as gloverinas são ricas em glicina, (Figura 4A). As sequências de gloverina das espécies estudadas formam dois clusters distintos na árvore filogenética (Figura 4B). Entretanto, no primeiro cluster estão presentes as sequências de *P. xylostella*, espécie mais basal presente na análise. Em ambos os agrupamentos as espécies do gênero *Diatraea* se agrupam, porém as sequências de *O. furnacalis* e *C. suppressalis* estão presentes apenas em um deles (Figura 4B).

Lebocinas. As sequências de lebocina das espécies estudadas possuem em média 230 aa antes do processamento. As sequências possuem peptídeo sinal e 5 sítios de processamento proteolítico RXXR. O processamento do pre-peptídeo resulta em peptídeos maduros com em média 32 aa. Cada peptídeo maduro é rico em prolinas, típico de lebocinas, distribuídas ao longo de sua extensão

(Figura 5A). A análise filogenética das lebecinas identificadas revelou que *D. saccharalis* e *D. impersonatella* possuem apenas uma cópia de lebecina, enquanto outros membros da família Crambidae como *O. furnacalis* e *C. suppressalis* possuem pelo menos duas cópias (Figura 5B).

Moricinas. As moricinas encontradas nas espécies estudadas possuem de 60 a 70 aa. Todas possuem peptídeo sinal (Figura 6A). Destaca-se aqui a espécie *T. licus* que possui 7 genes, número muito maior que as demais espécies de brocas da cana. A análise filogenética evidenciou que as moricinas de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* se agruparam em um grande clado da família Crambidae, que também inclui diversos genes de moricinas de *O. furnacalis* (11 cópias) e *C. suppressalis* (2 cópias) (Figura 6B). As moricinas de *T. licus*, por sua vez, se agruparam em dois clusters distintos, possivelmente com origens diferentes (Figura 6B).

Nas análises filogenéticas de todos os AMPs identificados foi interessante notar que as sequências encontradas no genoma de *D. saccharalis* na maioria das vezes não se agrupou com as sequências do transcrito. Com exceção das lebecinas, em todos os outros AMPs, as sequências do transcrito de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* eram mais próximas do que as sequências oriundas do genoma de *D. saccharalis*. Isso nos leva a hipótese de que a espécie do genoma não é a mesma espécie do transcrito.

Localização cromossômica dos loci gênicos de peptídeos antimicrobianos no genoma de *D. saccharalis*. Foi caracterizada a localização cromossômica dos loci gênico dos diferentes AMPs no genoma de *D. saccharalis*. De forma interessante, todas as cópias de genes de um mesmo AMP estão no mesmo cromossomo e próximos fisicamente. Por exemplo, as atacinas estão distribuídas em uma pequena porção do cromossomo 4 (Figura 7A). Seis genes estão em sequência, e o sétimo está intercalado por poucos genes. Na mesma região e próximos atacinas estão os genes de

gloverina, onde três são sucessivos depois das atacinas e um fica logo antes da primeira atacina (Figura 7A). Outro ponto é que as atacinas e gloverinas são AMPS ricos em glicina, e as gloverinas são específicas de Lepidoptera. Este conjunto de informações nos leva a supor que as gloverinas provavelmente evoluíram a partir das atacinas. Já no cromossomo 7 encontramos as cecropinas, possuindo três loci todos em sequência. Um deles possui 4 possibilidades de *splicing* alternativo (Figura 7B). Outro ponto interessante é que um dos locus fica dentro do íntron de um outro locus de cecropina (Figura 7B). Por fim, as moricinas estão localizadas no cromossomo 18, também em sequência (Figura 7C).

A lebocina de *D. saccharalis* aumenta a expressão quando o inseto se alimenta de cana-de-açúcar. Após a identificação dos AMPs, decidimos dar foco a espécie *D. saccharalis*, analisando os genes diferencialmente expressos no trabalho prévio de Noriega *et al.* (2020a). Dos 15 genes de AMP identificados no transcrito de *D. saccharalis*, apenas 4 foram diferencialmente expressos na comparação de transcritomas intestinais de lagartas de 3º ínstar que se alimentaram de dieta artificial ou cana-de-açúcar (Tabela 7). Duas cecropinas e a defensina tiveram sua expressão diminuída nos insetos que se alimentaram de cana, e apenas a lebocina teve a expressão aumentada na mesma condição, quando comparados a insetos que se alimentaram de dieta artificial. Desta forma, decidimos validar por RT-qPCR apenas a expressão do gene que teve sua expressão aumentada quando as lagartas ingeriram cana, ou seja, a lebocina (*DsLeb*).

Na avaliação por qPCR, inicialmente averiguamos a expressão no corpo inteiro de lagartas que se alimentaram ou de cana ou de dieta artificial. Após a análise, confirmamos que *DsLeb* é aproximadamente 35 vezes mais expressa em insetos que se alimentaram de cana-de-açúcar, do que naqueles que estavam em jejum, ou se alimentaram de dieta artificial (Figura 8A). Apesar de se ter comprovado os dados do transcrito, ainda ficou a dúvida se *DsLeb* estava sendo induzido pela

cana ou por algum microrganismo endofítico. Assim, em um segundo experimento, oferecemos dieta artificial contendo antifúngicos e antibióticos, acrescida de bagaço de cana. Mesmo assim, *DsLeb* foi aproximadamente 3 vezes mais expresso na dieta com bagaço do que na dieta sem (Figura 8B). Posteriormente, verificou-se a expressão de *DsLeb* em diferentes porções do corpo de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com cana ou dieta artificial. Foram analisadas três regiões do corpo da lagarta: a cabeça, o intestino, e a carcaça (que compreende o restante do corpo, como traqueias, hemolinfa, corpos gordurosos e cutícula). Tantos nos insetos que se alimentaram de dieta ou de cana, o perfil de expressão de *DsLeb* foi idêntico, com maior expressão significativa na carcaça em comparação ao intestino. A expressão de *DsLeb* na cabeça não foi diferente nem da expressão no intestino, nem na carcaça (Figura 8C e 8D). Por fim, analisamos a expressão nas porções do corpo de forma isolada comparando o tipo de alimentação. Neste caso, tivemos diferença de expressão significativa para *DsLeb* apenas na cabeça (Figura 8E), onde foi 3 vezes maior nos insetos que se alimentaram de cana. Não houve diferença de expressão entre os tratamentos no intestino (Figura 8F) ou na carcaça (Figura 8G).

***Bacillus thuringiensis* induz a expressão de *DsLeb* na carcaça e cabeça, mas não no intestino de *D. saccharalis*.** Uma vez que *DsLeb* foi mais expresso na carcaça em comparação com o intestino, e a indução provocada pela alimentação com cana era provavelmente restrita apenas à cabeça do inseto, foi investigado se esse AMP é ativado no intestino em resposta a um agente patogênico. Para isso, selecionou *B. thuringiensis* (Bt), uma bactéria que age principalmente no intestino para ser utilizada. No primeiro experimento, avaliamos se o Bt era capaz de ativar a expressão de *DsLeb*. Nos dois tempos testados (24 e 48 h após oferta de dieta com Bt), observou-se uma alta expressão de *DsLeb* (acima de 60 vezes) nos insetos que se alimentaram de dieta com Bt em comparação aos que se alimentaram de dieta sem Bt (Figura 9A). Em um segundo momento,

identificamos em qual parte do corpo se dava a maior expressão de *DsLeb* quando os insetos ingeriam Bt. De forma interessante, a expressão foi significativamente maior na carcaça (cerca de 20x) do que no intestino ou na cabeça (Figura 9B). Não houve diferença entre a expressão na cabeça e no intestino. Finalmente, identificamos a expressão em cada parte do corpo analisada de forma isolada, comparando insetos que ingeriram ou não Bt. Neste caso, observamos diferença de expressão na cabeça, onde insetos que ingeriram Bt tiveram uma expressão 6 vezes maior de *DsLeb* (Figura 9C) e na carcaça, onde a expressão foi 12 vezes maior no mesmo tratamento (Figura 9E). De forma inesperada, não se obteve diferença significativa de *DsLeb* no intestino do inseto (Figura 9D).

Discussão

Os peptídeos antimicrobianos são os principais efetores de resposta do sistema imunológico humoral em insetos e atuam eliminando fungos, bactérias, vírus e parasitas. Quase metade dos AMPs identificados pertencem a insetos (Yi *et al.* 2014). A caracterização destas proteínas tem uma série de aplicações seja na interação inseto-patógeno ou até mesmo na busca de moléculas antibióticas para a saúde humana. Neste trabalho identificamos uma série de AMPs, com foco para os seis tipos mais comuns: atacinas, cecropinas, defensinas, gloverinas, lebecinas e moricinas.

Os transcritomas intestinais fornecem informações sobre diversos processos, incluindo a expressão de genes do sistema imune (Zhong *et al.* 2017, Lei *et al.* 2021). Além disso, a região do intestino médio pode ser considerada um órgão imunológico, atuando na primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos e protegendo contra patógenos que infectam através da cavidade oral (Li *et al.* 2022). Nos transcritomas intestinais das brocas da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*, encontrou-se respectivamente 15, 18 e 25 genes de AMPs. No genoma de *D. saccharalis* foram 22 genes no total. Ao comparar com outros lepidópteros, este número seria um intermediário pois *M. sexta* possui 43, *B. mori* possui 31, enquanto *D. plexippus*

tem apenas 14 AMPs (Tanaka *et al.* 2008, He *et al.* 2015, Zhou *et al.* 2024). O número de genes encontrados nos transcritomas é geralmente menor do que nos genomas, pois representa apenas um tecido ou órgão do indivíduo. No transcrito de *D. saccharalis*, encontramos apenas 15 genes de AMPs. No entanto, o número de genes de AMPs foi diferente no transcrito de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas pelo parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron). Neste transcrito foram encontrados 19 AMPs sendo mais expressos em lagartas parasitadas (Merlin & Cônsoli 2019). Essa variação pode ser explicada devido ao transcrito ter sido feito a partir de tecidos diferentes. Essa diversidade no número e tipos de AMPs pode refletir o modo de vida do inseto, relacionada à ecologia evolutiva, na qual a cascata de defesa do hospedeiro pode estar vinculada a mudanças adaptativas na história de vida, influenciadas por comportamentos e pelo ambiente externo (Schmid-Hempel 2005). Dessa forma, as respostas imunológicas minimizam o risco de infecções (Schmid-Hempel 2005), garantindo a sobrevivência de *D. saccharalis* e sua capacidade de infestar a cultura da cana-de-açúcar

Outro ponto interessante foi o fato de que os AMPs são dispostos em grandes clusters nos cromossomos de *D. saccharalis*. Esta característica também foi identificada em *M. sexta*, onde principalmente atacinas e cecropinas são dispostas em clusters (He *et al.* 2015). Esses clusters, formados provavelmente por sucessivas etapas de duplicação gênica, junto com o grande número de genes, indicam que os AMPs são um grupo de proteínas que evolui rapidamente (Tanaka *et al.* 2008). A presença de leucocinas, gloverinas e moricinas apenas em espécies de Lepidoptera indica que esses genes são relativamente jovens em comparação, por exemplo, às defensinas, que estão presentes em plantas e animais, sugerindo que elas existem desde antes da divergência entre plantas e animais (Aerts *et al.* 2008).

Em geral, a análise filogenética dos AMPs das brocas da cana-de-açúcar está em concordância com a filogenia das espécies. No entanto, foi interessante observar que, na maioria dos casos, as

sequências encontradas no genoma de *D. saccharalis* não se agrupam com as do transcrito. Em vez disso, as sequências do transcrito de *D. saccharalis* agrupam com as sequências de *D. impersonatella*. Na verdade, as sequências do genoma de *D. saccharalis* ficam posicionadas externamente em relação às sequências transcritômicas de *D. impersonatella* e *D. saccharalis*. Esses dados levantam a hipótese de que o espécime do qual o genoma foi sequenciado pode não ser a mesma espécie do que o transcrito, uma vez que o genoma foi obtido a partir de uma população dos EUA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMEA10332734/>) e o transcrito de uma população do Brasil (Noriega *et al.* 2020a). Porém, uma análise mais aprofundada será necessária para testar esta hipótese.

Após a análise do transcrito, descobrimos que uma leucocina (*DsLeb*) era mais expressa em insetos que se alimentavam de cana-de-açúcar do que em dieta artificial. Esses dados foram confirmados por qPCR, mas a expressão foi observada na cabeça e não no intestino. Um dado semelhante foi identificado por Li *et al.* (2022), que relataram um aumento na expressão de um gene de leucocina em lagartas de *B. mori* alimentadas com folhas de amoreira.

Não é comum a expressão de leucocinas na cabeça do inseto; é mais provável que a expressão ocorra no intestino ou na hemolinfa (Zhang *et al.* 2019). Mas por que a dieta natural (plantas) aumenta a expressão de AMPs em insetos? Primeiramente, isso pode ser devido à presença de fatores antinutricionais nas plantas. Ghosh *et al.* (2023) relataram que lagartas de *Trichoplusia ni* (Guenée) alimentadas com dieta contendo altos níveis de isotiocianato (ITC) apresentaram maior expressão de uma leucocina e uma galericina, embora a imunidade celular tenha sido inibida. Compostos antinutricionais prejudicam o desenvolvimento e imunidade celular dos insetos, mas podem sinalizar para ativação da defesa humoral. Existe ainda a possibilidade da própria composição da dieta (alimento), como dietas enriquecidas com lignina sulfonada, celulose, quitina,

entre outros, podem aumentar os níveis de expressão de AMPs em alguns insetos, incluindo *D. saccharalis* (Vogel *et al.* 2018, Candian *et al.* 2023, Candian & Tedeschi 2023).

As lebecinas são peptídeos ricos em prolina que são ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Yi *et al.* 2014). Sua identificação foi realizada em *B. mori* após a injeção de *Escherichia coli* (Escherich) na hemolinfa do inseto (Hara & Yamakawa 1995a). As lebecinas são traduzidas como pre/pro-proteínas que necessitam ser processadas para ser ativadas (Veenstra 2000). Estes AMPs possuem vários motivos RXXR que são sítios de processamento intracelular reconhecidos por proteases do tipo furin (furin-like) (Veenstra 2000). Assim, investigamos a expressão de um AMP em resposta a um patógeno natural. Ao contrário das abordagens clássicas, testamos um patógeno natural por via natural, ou seja, através da ingestão de esporos e cristais de *B. thuringiensis*. Observamos que *DsLeb* é ativado quando as lagartas ingerem Bt. No entanto, de maneira interessante, o intestino não é a região de maior expressão e, na verdade, nem chega a ser induzido. A indução ocorre na cabeça e na carcaça, que inclui os corpos gordurosos e a hemolinfa. A expressão de lebecina na hemolinfa induzida por bactérias é consistente com o que foi identificado anteriormente para este AMP (Hara & Yamakawa 1995b). Outros relatos como em *Samia cynthia ricini* (Guérin-Méneville) e em *M. sexta* onde as lebecinas são expressas no corpo gorduroso e nos hemócitos de lagartas após a infecção com *E. coli*, *Micrococcus luteus* (Zopf) ou *Saccharomyces cerevisiae* (Cagniard) (Bao *et al.* 2005, Rao *et al.* 2012).

Uma questão importante é porque *DsLeb* é expressa na cabeça do inseto em ambas as situações (ingestão de cana e de *Bacillus thuringiensis*). Isso pode indicar uma defesa inespecífica ativada pela alimentação. Porém, não observamos diferença de expressão entre insetos em jejum e aqueles que ingeriram a dieta artificial (Figura 8A). Um estudo mais minucioso será necessário para identificar em qual órgão ou tecido da cabeça *DsLeb* é expresso. Outra questão é qual a real contribuição de *DsLeb* para a imunidade de *D. saccharalis*. Estratégias de silenciamento gênico por

RNAi para validação funcional seria uma alternativa, porém o RNAi se mostrou muito ineficiente em *D. saccharalis* (Reis *et al.* 2022). Outra solução seria a edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9, mas protocolos para utilização desta metodologia em *D. saccharalis* ainda precisam ser desenvolvidos. A caracterização de AMPs é crucial para entender a evolução desses peptídeos e como isso contribui para a imunidade dos insetos. No contexto das pragas de insetos, é igualmente importante identificar quais moléculas são ativadas para desenvolver ou aprimorar estratégias de manejo.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.*, 65, 2069-2079.doi. <http://www.birkhauser.ch/CMLS>
- Araújo, J. R., Botelho, P. S. M., Araújo, S. M. S. S., Almeida, L. C., & Degaspari, N. 1985. Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC.* 36. 45-48.
- Azmiera, N., Krasilnikova, A., Sahudin, S., Al-Talib, H & Heo, C. C. 2022. Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications. *J Asia Pacific Entomol.*, 252, 101892.doi. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101892>
- Badapanda, C & Chikara, S. K. 2015. Lepidopteran antimicrobial peptides AMPs: overview, regulation, modes of action, and therapeutic potentials of insect-derived AMPs. 141-163. In *Short Views on Insect Genomics and Proteomics: Insect Proteomics*, Vol. 2. doi. https://10.1007/978-3-319-24244-6_6
- Bao, Y., Yamano, Y., & Morishima, I. 2005. A novel lebocin-like gene from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*, that does not encode the antibacterial peptide lebocin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 140(1), 127-131.doi. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.022>

- Bulet, P & Stocklin, R. 2005.** Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.*, 121, 3-11.doi. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Candian, V., & Tedeschi, R. 2023.** Impact of the diet on the mortality and on gene expression of the antimicrobial peptide tenecin 3 in *Tenebrio molitor* larvae infected by *Beauveria bassiana*. *Insects*, 14(4), 359.doi. <https://doi.org/10.3390/insects14040359>
- Candian, V., Savio, C., Meneguz, M., Gasco, L., & Tedeschi, R. 2023.** Effect of the rearing diet on gene expression of antimicrobial peptides in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Insect Sci.*, 30(4), 933-946. doi. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13165>.
- Casanova-Torres, Á. M & Goodrich-Blair, H. 2013.** Immune signaling and antimicrobial peptide expression in Lepidoptera. *Insects*, 43, 320-338. <https://doi.org/10.3390/insects4030320>
- Cheng, T., Zhao, P., Liu, C., Xu, P., Gao, Z., Xia, Q., & Xiang, Z. 2006.** Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Genomics*, 87(3), 356-365.
- Dho, M., Candian, V & Tedeschi, R. 2023.** Insect antimicrobial peptides: advancements, enhancements and new challenges. *Antibiotics*, 126, 952. doi. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060952>
- Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M & Lemaitre, B. 2015.** *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol.*, 13, 1-16.doi. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>
- Ghosh, E., Tafesh-Edwards, G. S., Eleftherianos, I., Goldin, S. L., & Ode, P. J. 2023.** The plant toxin 4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate decreases herbivore performance and modulates cellular and humoral immunity. *Plos one*, 18(8), e0289205.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289205>
- Hara, S., & Yamakawa, M. 1995a.** A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem J*, 310(2), 651-656.doi. <https://doi.org/10.1042/bj3100651>
- Hara, S., & Yamakawa, M. 1995b.** Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the Silkworm, *Bombyx mori* (*). *J. Biol. Chem.*, 270(50), 29923-29927.doi. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.29923>
- He, Y., Cao, X., Li, K., Hu, Y., Chen, Y. R., Blissard, G., & Jiang, H. 2015.** A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in *Manduca sexta*. *nsect Biochem. Mol. Biol.*, 62, 23-37.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.015>
- Kim, I. W., Lee, J. H., Subramaniam, S., Yun, E. Y., Kim, I., Park, J & Hwang, J. S. 2016.** De novo transcriptome analysis and detection of antimicrobial peptides of the American cockroach *Periplaneta americana* Linnaeus. *PLoS One*, 115, e0155304.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155304>

- Lei, Y., Li, Y., Yang, X., Zhu, X., Zhang, X., Du, J., ... & Duan, J. 2021.** A gut-specific LITAF-like gene in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) involved in the immune response to three pathogens. *J. Econ. Entomol.*, 114(5), 1975-1982. doi. <https://doi.org/10.1093/jee/toab155>.
- Li, J., Chen, C., & Zha, X. 2022.** Midgut and head transcriptomic analysis of silkworms reveals the physiological effects of artificial diets. *Insects*, 13(3), 291. doi. <https://doi.org/10.1093/jee/toab155>
- Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H & Falabella, P. 2021.** Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cell Mol Life Sci.*, 789, 4259-4282. doi. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
- Melcarne, C., Lemaitre, B & Kurant, E. 2019.** Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 109, 1-12. doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>
- Merlin, B. L., & Cônsoli, F. L. 2019.** Regulation of the larval transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by maternal and other factors of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Front. Physiol.*, 10, 446542.
- Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Di Somma, A., Vogel, H., Pucci, P & Falabella, P. 2020.** A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly BSF *Hermetia illucens* Diptera: Stratiomyidae. *Sci. Rep.*, 101, 16875. doi. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74017-9>
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M & Vilcinskis, A. 2016.** Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B, Biol. Sci.*, 3711695, 20150290. doi. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
- Nesa, J., Sadat, A., Buccini, D. F., Kati, A., Mandal, A. K & Franco, O. L. 2020.** Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms. *RSC Adv.*, 101, 512-523. doi. <https://doi.org/10.1039/C9RA06864C>
- Noriega, D. D., Arraes, F. B., Antonino, J. D., Macedo, L. L., Fonseca, F. C., Togawa, R. C & Grossi-de-Sa, M. F. 2020a.** Comparative gut transcriptome analysis of *Diatraea saccharalis* in response to the dietary source. *PLoS One*, 15(8), e0235575.
- Noriega, D. D., Arraes, F. B., Antonino, J. D., Macedo, L. L., Fonseca, F. C., Togawa, R. C & Grossi-de-Sa, M. F. 2020b.** Transcriptome analysis and knockdown of the juvenile hormone esterase gene reveal abnormal feeding behavior in the sugarcane giant borer. *Front. Physiol.*, 11, 588450.
- Rancurel, C., Van Tran, T., Elie, C., & Hilliou, F. 2019.** SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. *Mol Cell Probes*, 46, 101418. doi. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.07.001>

- Rao, X. J., Xu, X. X., & Yu, X. Q. 2012.** Functional analysis of two lebecin-related proteins from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42(4), 231-239.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.12.005>
- Reis, M. A., Noriega, D. D., dos Santos Alves, G., Coelho, R. R., Grossi-de-Sa, M. F., & Antonino, J. D. 2022.** Why is oral-induced RNAi inefficient in *Diatraea saccharalis*? A possible role for DsREase and other nucleases. *Pestic Biochem Physiol.*, 186, 105166.
- Sackton, T. B. 2019.** Comparative genomics and transcriptomics of host–pathogen interactions in insects: evolutionary insights and future directions. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 31, 106-113.doi. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.12.007>
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.*, 50(1), 529-551.doi. <https://doi.org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>
- Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P & Wolfner, M. F. 2016.** Reproduction–immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol*, 61, 239-256. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023924>
- Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.*, 15(1), 1-14.doi. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., ... & Yamakawa, M. 2008.** A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12), 1087-1110.doi. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.001>
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., & Amparyup, P. 2015.** Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 482, 324-341. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.020>
- Veenstra, J. A. 2000.** Mono-and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 43(2), 49-63.doi. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(200002\)43:2%3C49::AID-ARCH1%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(200002)43:2%3C49::AID-ARCH1%3E3.0.CO;2-M)
- Vilcinskas, A. 2013.** Evolutionary plasticity of insect immunity. *J. Insect Physiol.*, 592, 123-129. doi. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.018>
- Vogel, H., Müller, A., Heckel, D. G., Gutzeit, H., & Vilcinskas, A. 2018.** Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Dev Comp Immunol.*, 78, 141-148.doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>
- Wu, Q., Patočka, J & Kuča, K. 2018.** Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 1011, 461. doi. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>

- Wu, S., Zhang, X., He, Y., Shuai, J., Chen, X., & Ling, E. 2010.** Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. *Dev Comp Immunol.*, 34(11), 1191-1198.doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.013>
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D & Yu, X. Q. 2014.** Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 5807-5822.doi. <https://doi.10.1007/s00253-014-5792-6>
- Zhang, J., Li, Q., Wei, G., Wang, L., Qian, C., Sun, Y., ... & Liu, C. 2019.** Identification and function of a leibocin-like gene from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *J. Invertebr. Pathol.*, 166, 107207.doi. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107207>
- Zhang, W., Tettamanti, G., Bassal, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I & Mohamed, A. 2021.** Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cell. Signal.*, 83, 110003. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003>
- Zhong, H., Li, F., Chen, J., Zhang, J., & Li, F. 2017.** Comparative transcriptome analysis reveals host-associated differentiation in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Sci. Rep.*, 7(1), 13778.doi. <https://doi:10.1038/s41598-017-14137-x>
- Zhou, L., Meng, G., Zhu, L., Ma, L., & Chen, K. 2024.** Insect Antimicrobial Peptides as Guardians of Immunity and Beyond: A Review. *International J. Mol. Biol.*, 25(7), 3835.doi. <https://doi.org/10.3390/ijms25073835>

Tabela 1. Primers utilizados nos experimentos de análise de expressão gênica RT-qPCR. Os primers foram projetados para possuírem temperatura de anelamento de 60 °C.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>DsGAPDH</i>	Dsac_GAPDH_Fw	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG
	Dsac_GAPDH_Rv	GTTGTCATTGAGTGAGATACCG
<i>DsRPS10</i>	Dsac_RPS10_Fw	TGATCGCTTCAGTGTGCTG
	Dsac_RPS10_Rv	TCTCAAATCCAGGGGTTACG
<i>DsLebocina</i>	DsLeb_c10179_qPCR_Fw	CCGACCCATCCTGGATATAAT
	DsLeb_c10179_qPCR_Rv	GTACATCACGTGCGTGTCTTG

Tabela 2. Número de peptídeos antimicrobianos (AMPs) identificados em genomas e transcritomas de diferentes espécies de Lepidoptera.

Espécie	Número de genes (CDS) de peptídeos antimicrobianos (AMPs)						Total
	Atacina	Cecropina	Defensina	Gloverina	Lebocina	Moricina	
<i>Diatraea saccharalis</i> – Genoma	7	3*	1	4	1	3	22
<i>Diatraea saccharalis</i> - Transcritoma intestinal	4	6*	1	2	1	1	15
<i>Diatraea impersonatella</i> - Transcritoma intestinal	6	6*	1	2	1	2	18
<i>Telchin licus</i> - Transcritoma intestinal	4	7*	1	4	2	7	25
<i>Manduca sexta</i> - Genoma	11	15	6	1	4	6	43
<i>Bombyx mori</i> - Genoma	2	13	2	4	1	9	31
<i>Danaus plexippus</i> - Genoma	3	5	1	1	1	3	14

* Há (provavelmente) cópias oriundas de *splicing* alternativo. Os números dos genes AMPs de *M. sexta*, *B. mori* e *D. plexippus* foram extraídos dos dados de He *et al.* 2015.

Tabela 3. Detalhes dos genes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) identificados no genoma de *Diatraea saccharalis*.

AMP	GenBank	Locus	Cromossomo	Posição	Tamanho do gene (nt)	Nº de éxons	Fita de DNA	Nº de acesso da proteína predita	Tamanho da proteína predita (aa)	Peptídeo sinal	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
Atacina	OU893335.1	DIATSA_LOCUS9946	4	25.317.997-25.319.619	1.623	3	+	CAG9792417.1	203	SIM	19,67	9,87
		DIATSA_LOCUS9947	4	25.323.621-25.325.395	1.775	3	+	CAG9792418.1	203	SIM	19,73	9,48
		DIATSA_LOCUS9948	4	25.330.569-25.331.558	990	3	+	CAG9792419.1	203	SIM	19,54	9,65
		DIATSA_LOCUS9949	4	25.334.260-25.335.480	1.221	3	-	CAG9792420.1	203	SIM	19,52	9,6
		DIATSA_LOCUS9950	4	25.336.871-25.337.693	823	3	+	CAG9792421.1	203	SIM	19,5	9,65
		DIATSA_LOCUS9951	4	25.340.063-25.341.078	1.016	3	-	CAG9792422.1	203	SIM	19,56	9,7
		DIATSA_LOCUS9954	4	25.551.403-25.553.341	1.939	3	-	CAG9792425.1	193	NÃO	20,37	9,69
Cecropina	OU893338.1	DIATSA_LOCUS12222	7	8.783.657-8.787.591	3.935	2	-	CAG9794880.1	65	SIM	4,69	10,64
		DIATSA_LOCUS12224	7	8.805.849-8.806.541	693	2	+	CAG9794881.1	63	SIM	4,46	10,38
		DIATSA_LOCUS12223	7	8.800.983-8.820.012	19.030	2	-	CAG9794882.1	64	SIM	4,93	8,43
		DIATSA_LOCUS12223	7	8.800.983-8.820.012	19.030	2	-	CAH0763473.1	62	SIM	4,16	9,44
		DIATSA_LOCUS12223	7	8.800.983-8.820.012	19.030	2	-	CAH0763475.1	64	SIM	4,93	8,43
		DIATSA_LOCUS12223	7	8.800.983-8.820.012	19.030	2	-	CAH0763477.1	64	SIM	4,93	8,43
Defensina	OU893343.1	DIATSA_LOCUS2471	12	8.345.938-8.347.092	1.155	2	+	CAG9784370.1	100	SIM	8,63	5,1
Gloverina	OU893335.1	DIATSA_LOCUS9945	4	25.272.109-25.274.930	2.822	4	-	CAG9792416.1	178	SIM	17,86	6,57
		DIATSA_LOCUS9957	4	25.631.527-25.634.799	3.273	4	+	CAG9792428.1	166	SIM	16,08	9,82
		DIATSA_LOCUS9958	4	25.643.586-25.646.185	2.600	4	+	CAG9792429.1	166	SIM	16,11	9,69
		DIATSA_LOCUS9959	4	25.659.314-25.662.052	2.739	4	+	CAG9792430.1	174	SIM	17,04	9,6
Lebocina	OU893342.1	DIATSA_LOCUS1983	11	13.876.725-13.877.971	1.247	1	+	CAG9783844.1	229	SIM	23,46	9,55
Moricina	OU893349.1	DIATSA_LOCUS5614	18	8.648.264-8.656.280	8.017	3	+	CAG9787752.1	60	SIM	3,74	10,12
		DIATSA_LOCUS5615	18	8.687.608-8.728.343	40.736	3	+	CAG9787753.1	70	SIM	4,86	10,3
		DIATSA_LOCUS5616	18	8.744.927-8.746.083	1.157	2	-	CAG9787754.1	70	SIM	4,89	10,22

Tabela 4. Caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos (AMPs) identificados no transcrito de *Diatraea saccharalis*.

Espécie	AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto Isoelétrico Predito
<i>Diatraea saccharalis</i>	Atacina	5030_c1_g1_i1	SIM*	~599	~199	SIM	~19,13	~9,52
		5030_c4_g4_i1	SIM	612	203	SIM	19,96	9,7
		25529_c3_g1_i1+	SIM	612	203	SIM	19,62	9,65
		25529_c3_g4_i1						
		15062_c0_g1_i2	SIM	596	193	NÃO	20,27	9,65
	Cecropina	9003_c0_g1_i1	SIM	198	65	SIM	4,72	11,05
		9031_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4,86	8,43
		10150_c0_g2_i1	SIM	192	63	SIM	4,47	10,21
		22194_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,44	10,46
		22398_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,44	10,12
		40013_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4,82	8,38
	Defensina	338_c0_g1_i2	SIM	306	101	SIM	9,06	5,14
	Gloverina	9917_c0_g3_i2	SIM*	~515	~171	SIM	~16,71	~9,47
		7828_c0_g2_i5+ c0_g1_i2	SIM	537	178	SIM	17,77	5,93
	Lebocina	10179_c0_g1_i1	SIM	699	232	SIM	23,65	9,85
	Moricina	3963_c0_g1_i1	SIM	183	60	SIM	3,84	10,17

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit do banco nr (NCBI) via BlastP.

Tabela 5. Caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos (AMPs) identificados no transcrito de *Diatraea impersonatella*.

Espécie	AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
<i>Diatraea impersonatella</i>	Atacina	DN10632_c0_g1_i1	SIM	612	203	SIM	19,4	9,48
		DN10632_c0_g3_i1	SIM	612	203	SIM	19,62	9,65
		DN10632_c0_g2_i4	SIM	612	203	SIM	19,58	9,6
		DN10632_c0_g2_i5	SIM	621	206	SIM	19,54	9,44
		DN10632_c0_g2_i6	SIM*	~584	~194	SIM	~18.48	~8.22
		DN11424_c1_g1_i1	SIM	582	193	NÃO	20,22	9,35
	Cecropina	DN13090_c1_g4_i1	SIM	198	65	SIM	4,72	11,05
		DN24339_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,4	10,12
		DN30886_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,47	10,21
		DN6973_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,45	10,46
		DN26728_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4,87	8,43
		DN6628_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4,86	8,43
	Defensina	DN3868_c0_g1_i1	SIM	306	101	SIM	9,03	5,14
	Gloverina	DN7500_c0_g1_i1	SIM	537	178	SIM	17,86	5,93
		DN11105_c2_g1_i4	SIM	501	166	SIM	16,15	9,74
	Lebocina	DN13690_c2_g1_i1	SIM	690	229	SIM	23,33	9,79
	Moricina	DN756_c0_g1_i1	SIM	183	60	SIM	3,83	10,12
		DN18833_c0_g1_i1	SIM*	~186	~62	SIM	~4.03	~9.88

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit do banco nr (NCBI) via BlastP.

Tabela 6. Caracterização in silico de peptídeos antimicrobianos (AMPs) identificados no transcrito de *Telchin licus*.

Espécie	AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal?	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
<i>Telchin licus</i>	Atacina	36814_c0_g2_i1	SIM*	~782	~260	SIM	~26.12	~9.4
		26482_c1_g1_i1	SIM	738	245	SIM	24,17	9,25
		44650_c1_g4_i1 + c1_g3_i1	SIM*	~704	~234	SIM	~22.51	~6.59
		34440_c0_g1_i1	SIM	594	197	NÃO	21,12	9,07
	Cecropina	20504_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4,66	10,12
		36589_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4,77	10,28
		914_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4,62	10,46
		29261_c1_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,24	10,56
		22662_c0_g1_i1	SIM	204	67	SIM	4,82	8,07
		19818_c1_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4,3	11,59
		28783_c0_g1_i1	SIM	225	74	SIM	5,56	4,65
	Defensina	46333_c0_g1_i2	SIM	315	104	SIM	9,26	7,05
	Gloverina	12527_c0_g1_i1	SIM	525	174	SIM	16,71	9,4
		36362_c0_g1_i1	NÃO	320 (parcial)	106 (parcial)	SIM	na	na
		17541_c0_g1_i2	SIM	525	174	SIM	17,72	8,21
		31627_c0_g1_i1	NÃO	383 (parcial)	127 (parcial)	SIM	na	na
	Lebocina	46404_c1_g1_i1	SIM	711	236	SIM	24,74	10,62
		29451_c0_g2_i1	SIM	531	176	SIM	18,03	9,9
	Moricina	17349_c0_g1_i1	SIM	204	67	SIM	4,7	11,36
		37241_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4,57	10,22
		25619_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4,54	10,18
		23166_c0_g2_i1	SIM	195	64	SIM	4,4	10,29
		5661_c0_g2_i1	SIM	186	61	SIM	3,77	10,12
		49626_c1_g1_i1	SIM	186	61	SIM	3,75	10,12
		32031_c0_g2_i1	SIM	186	61	SIM	3,88	10,38

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit no banco nr (NCBI) via BlastP.

Tabela 7. Lista de genes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) que foram diferencialmente expressos (DEGs) na comparação de transcritomas intestinais de lagartas de 3º ínstar de *Diatraea saccharalis* que se alimentaram de dieta artificial ou cana-de-açúcar (Noriega *et al.* 2020).

Gene	AMP	logFC	P-Value	FDR	Expressão em cana-de-açúcar
DsLeb_c10179	Lebocina	2,296	0,000094	0,000094	upregulated
DsCec_c9003	Cecropina	-2,388	0,000002	0,000139	downregulated
DsCec_C10150	Cecropina	-3,270	0,000000	0,000026	downregulated
DsDef_c338	Defensina	-3,001	0,000024	0,001093	Downregulated

A

```

DsaG_CAG9792417.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaAtt_c25529      --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g311  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaG_CAG9792418.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaAtt_c5030_c4g411  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g111  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaG_CAG9792419.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaG_CAG9792422.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaG_CAG9792421.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaG_CAG9792420.1  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g213  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g214  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DsaAtt_c5030_c1g111  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g215  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
DiAtt_DN10632_c0g216  --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
TlAtt_c36814      --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
TlAtt_c44650      --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--
TlAtt_c26482      --MMSLCMTLVLL--CA-----GVHSQRNAASFSLNSDGTSLFSSKLGLAHNDKNAISALFSKSS--

DsaG_CAG9792417.1  --NGAIGKGFALDTASGHLGSLTHASVPGFQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaAtt_c25529      --NGAIGKGFALDTAGGNGLSLTHSTSPGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g311  --NGAIGKGFALDTAGGNGLSLTHSTSPGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaG_CAG9792418.1  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaAtt_c5030_c4g411  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g111  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaG_CAG9792419.1  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaG_CAG9792422.1  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaG_CAG9792421.1  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaG_CAG9792420.1  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g213  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g214  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DsaAtt_c5030_c1g111  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g215  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
DiAtt_DN10632_c0g216  --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
TlAtt_c36814      --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
TlAtt_c44650      --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID
TlAtt_c26482      --TGVMKGLALDNANGHGLSQHASPVGFTQTQLTGAGKLNINNAHNLNANGLFTRNM  PNIPEVKVFNFNTYGGNLDYMFKNKVGATIGAARTPFLDRDYDAMKLNLFHSPSSSID

DsaG_CAG9792417.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaAtt_c25529      --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g311  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaG_CAG9792418.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaAtt_c5030_c4g411  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g111  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaG_CAG9792419.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaG_CAG9792422.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaG_CAG9792421.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaG_CAG9792420.1  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g213  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g214  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DsaAtt_c5030_c1g111  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g215  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
DiAtt_DN10632_c0g216  --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
TlAtt_c36814      --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
TlAtt_c44650      --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---
TlAtt_c26482      --LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---LSAGVSKSISPHF-NTNWQPSGGLTF-TKFW---

```

B

```

DsaG_CAG9792425.1  --MEASGLNHLKESDLSL---SKDPLTAVFVNYKDNHNAFKVTSQDSFASAGA
DsaAtt_c15062      --MEASGLNHLKESDLSL---SKDPLTAVFVNYKDNHNAFKVTSQDSFASAGA
DiAtt_DN10632_c0g111  --MEASGLNHLKESDLSL---SKDPLTAVFVNYKDNHNAFKVTSQDSFASAGA
DsaG_CAG9792426.1  --SLSQRPDQPG-GLSLDTHIDFNGVTSGRANILDNHNAVAHAFSVKVSPTIRY
DsaAtt_c15062      --SLSQRPDQPG-GLSLDTHIDFNGVTSGRANILDNHNAVAHAFSVKVSPTIRY
DiAtt_DN10632_c0g111  --SLSQRPDQPG-GLSLDTHIDFNGVTSGRANILDNHNAVAHAFSVKVSPTIRY
DsaG_CAG9792427.1  --SHHQGVNYSFQDQAGASVSHVIAKTEHSISGVNLAKTPTSOLDIANTSMTQ
DsaAtt_c15062      --SHHQGVNYSFQDQAGASVSHVIAKTEHSISGVNLAKTPTSOLDIANTSMTQ
DiAtt_DN10632_c0g111  --SHHQGVNYSFQDQAGASVSHVIAKTEHSISGVNLAKTPTSOLDIANTSMTQ
DsaG_CAG9792428.1  --FNSHWQHSISFTFKQF
DsaAtt_c15062      --FNSHWQHSISFTFKQF
DiAtt_DN10632_c0g111  --FNSHWQHSISFTFKQF
DsaG_CAG9792429.1  --FNSHWQHSISFTFKQF
DsaAtt_c15062      --FNSHWQHSISFTFKQF
DiAtt_DN10632_c0g111  --FNSHWQHSISFTFKQF

```

C

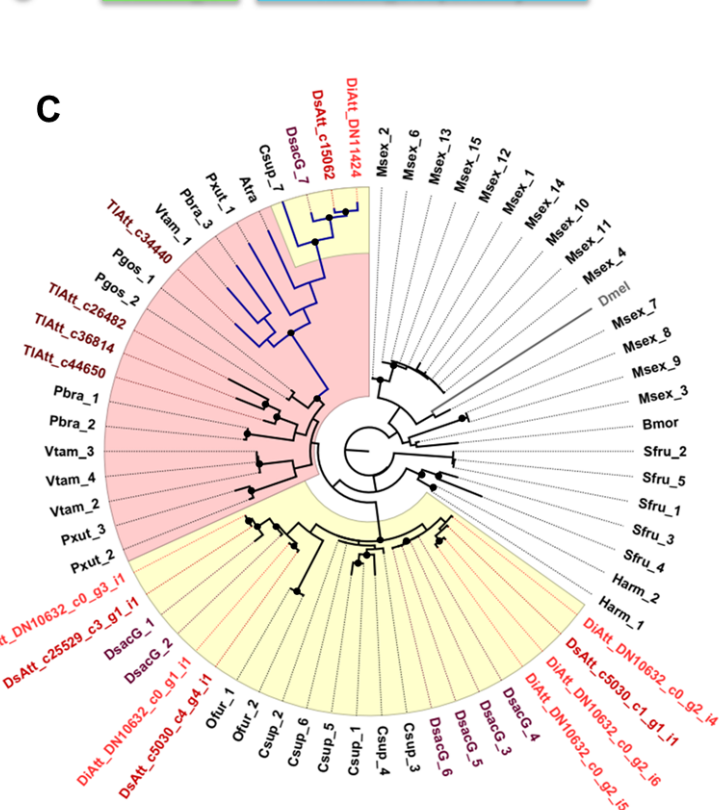


Figura 1. Sequências de Atacinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A) Alinhamento das sequências proteicas previstas de atacinas via Clustal Omega. A maioria das atacinas encontradas

possuem dois domínios funcionais (N e C terminal) e peptídeo sinal (Sublinhado nas sequências do alinhamento). O sítio de reconhecimento de processamento intracelular (RXXR) está marcado em verde quando presente. **(B)** Alinhamento de grupo específico de atacinas que não possuem nem peptídeo sinal e nem o domínio N terminal. As atacinas maduras são ricas nos aminoácidos glicina (azul) e prolina (lilás). (*) aminoácido conservado (:) aminoácidos que conservam as mesmas propriedades. **(C)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Atacinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvo deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o cluster da família Crambidae. Destaque em vermelho denota o cluster que contém as sequências de *Telchin licus*. Dentro deste cluster existe um clado (marcado em azul) que representa as sequências destacadas em (B). Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Amyelois transitella*: Atra; *Bombyx mori*: Bmor; *Chilo suppressalis*: Csup, *Diatraea impersonatella*: Di; *Diatraea saccharalis*, transcritoma: Ds; *Diatraea saccharalis*, genoma: DsacG; *Helicoverpa armigera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex; *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam. *Drosophila melanogaster*: Dmel (Diptera).

A

```

DsaG_CAG9794880.1 MDFGKVLFFVFACFMVSMV--AGAPEPRWKGWKIEKIGQHIRDGI IKAGPAVAVVGQTQGI IKGR-----
DiCec_DN13090      MDFGKVLFFVFACFMVSMV--AGAPEPRWKGWKIEKIGQHIRDGI IKAGPAVAVVGQTQGI IKGR-----
DsaCec_c9003       MDFRVLFFVFACFMVSMV--AGAPEPRWKGWKIEKIGQHIRDGI IKAGPAVAVVGQTQGI IKGR-----
DsaG_CAG9794881.1 MNFAKIFFFLFAMFLATTTV--SAAPK--WKILKRIEKMGRNVRDGI IKAGPAVEVVGQAATIIYKTG-----
DsaCec_c10150      MNFAKIFFFLFAMFLATSTV--SAAPK--WKIFKKIEKMGRNVRDGI IKAGPAVEVVGQAATIIYKTG-----
DiCec_DN30886      MNFAKIFFFLFAMFLATSTV--SAAPK--WKIFKKIEKMGRNVRDGI IKAGPAVEVVGQAATIIYKTG-----
DsaCec_c22194      MNFAKIFFFLFAMFLATTTV--SAAPK--WFLKKIEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKTG-----
DiCec_DN6973       MNFAKIFFFLFAMFLATTTV--SASP--WKLKKFEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKTG-----
DsaCec_c22398      MNFAKIFFFLFAMFLATSTV--SAAPK--WKIFKKIEKVGGRNVRDGI IKAGPAVEVVGQAATIIYKL-----
DiCec_DN24339      MNFAKIFFFLFAMFLATSTV--SAAPK--WKILKKLERVGNVRDGI IKAGPAVEVVGQAATIIYKL-----
TlCec_c914         MNFSRLFFVFACIMALTTV--SASPSPK--WFKKIEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
TlCec_c20504       MNFSRLFFVFACFLALATV--SAAPEPR--WPFKKLEKVGGRNVRDGI IKAGPAVAVVGQAATIIYKGGK-----
TlCec_c36589       MNFSRLFFVFACFLALATV--SAAPEPR--WPFKKLEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYRGGK-----
TlCec_c29261       MNFSRLFFVFACFLALATV--SASPSPK--WPFKKLEKVGGRNVRDGI IKAGPAVAVVGQAATIIYKGGK-----
TlCec_c22662       MNFSRLFFVFACFLALATV--SASPSPK--WPFKKLEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
TlCec_c28783       MNFSRLFFVFACFLALATV--SASPSPK--WPFKKLEKVGGRNVRDGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaG_CAH0763473.1 MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaG_CAH0763475.1 MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaG_CAG9794882.1 MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaG_CAH0763477.1 MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaCec_c9031       MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DiCec_DN26728      MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DiCec_DN6628       MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
DsaCec_c40013      MKFSKVVFFVFAMMAMSTT--SARPE---NFFKELEKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
TlCec_c19818       MNYTKIFACFFICFLAISTV--TAAPAPK--WFLKRVKAGRNVDRGI IKAGPAVQVVGQAATIIYKGGK-----
* : : : * : : : . * . * : * : * : * : * : * : * :

```



B

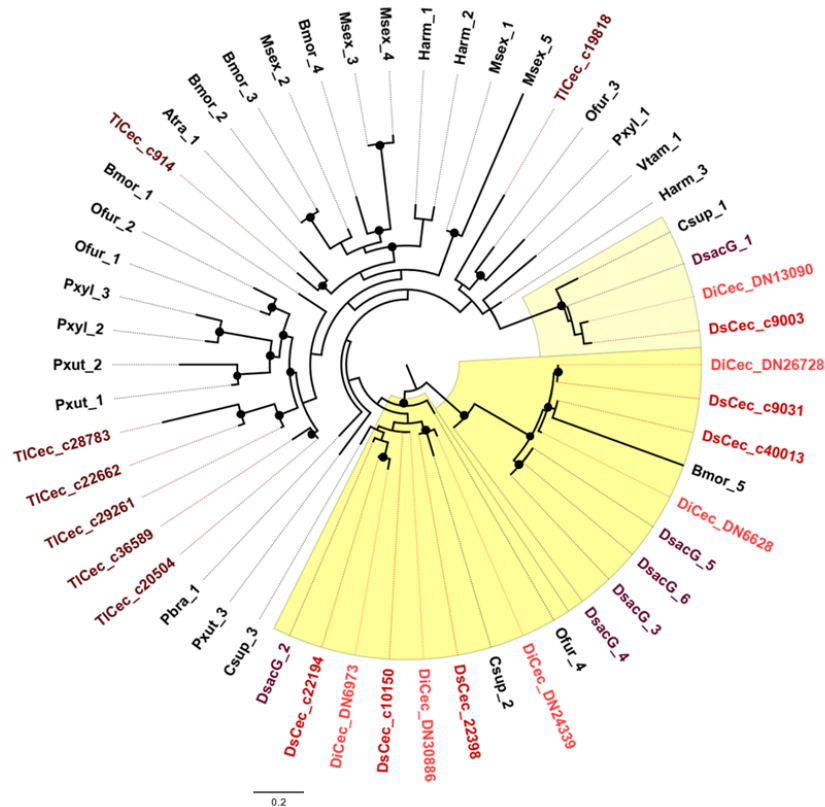


Figura 2. Sequências de Cecropinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A) Alinhamento das sequências proteicas previstas de cecropinas via Clustal Omega. Os peptídeos sinal estão

sublinhados, os triptofanos conservados estão marcadas em amarelo e as prolinas em cinza. Cecropinas possuem apenas um domínio funcional. (*) aminoácido conservado (:) aminoácidos que conservam as mesmas propriedades. (B) Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Cecropinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota os agrupamentos da família Crambidae. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Amyelois transitella*: Atra; *Bombyx mori*: Bmor; *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, transcritoma: Ds, *Diatraea saccharalis*, genoma: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex; *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

A

DsacG_CAG9784370.1	MEFRICVILSIAL-VSLAHNAICLPDVAVVKSESVTDI-HNSLT--AQGKLDHQA--IA
DsDef_c338	MKFRICVIFSIALFVSLAHNAICLPDETIVVKSESVDVT-HNPLN--SQRKLDHQD--LA
DiDef_DN3868	MKFRICVVFVIALFVSLAHNAICLPDETIVVKSESVADT-HNSLN--SQRKLDHQD--IA
TlDef_c46333	MEFRVGYVFIVIALVFFVENILGLPRNSGVVKTENVVPINHESLEFIEKKKFNNNEDNIT
	*:***: :: : * :..* : ***: ***:*.*. *:.* : *:::: ::
DsacG_CAG9784370.1	TEFYIPGRTWQNDGSEPNEVDICEKHCIPIKGYSGFCISNMCSCI
DsDef_c338	TELHIPGRTWQNDGSEPSEDIICEKHCIPIKGYSGFCISNICSCI
DiDef_DN3868	TELHIPGRTWQNDGSEPSEVDICEKHCIPIKGYSGFCISNMCSCI
TlDef_c46333	HKYKIPGRVSCKEYE--EPTEDPVCQEHCIPIKGYMHGLCVSKICSCI
	: ****. *: : **. ** :*:***** :*:*****

B

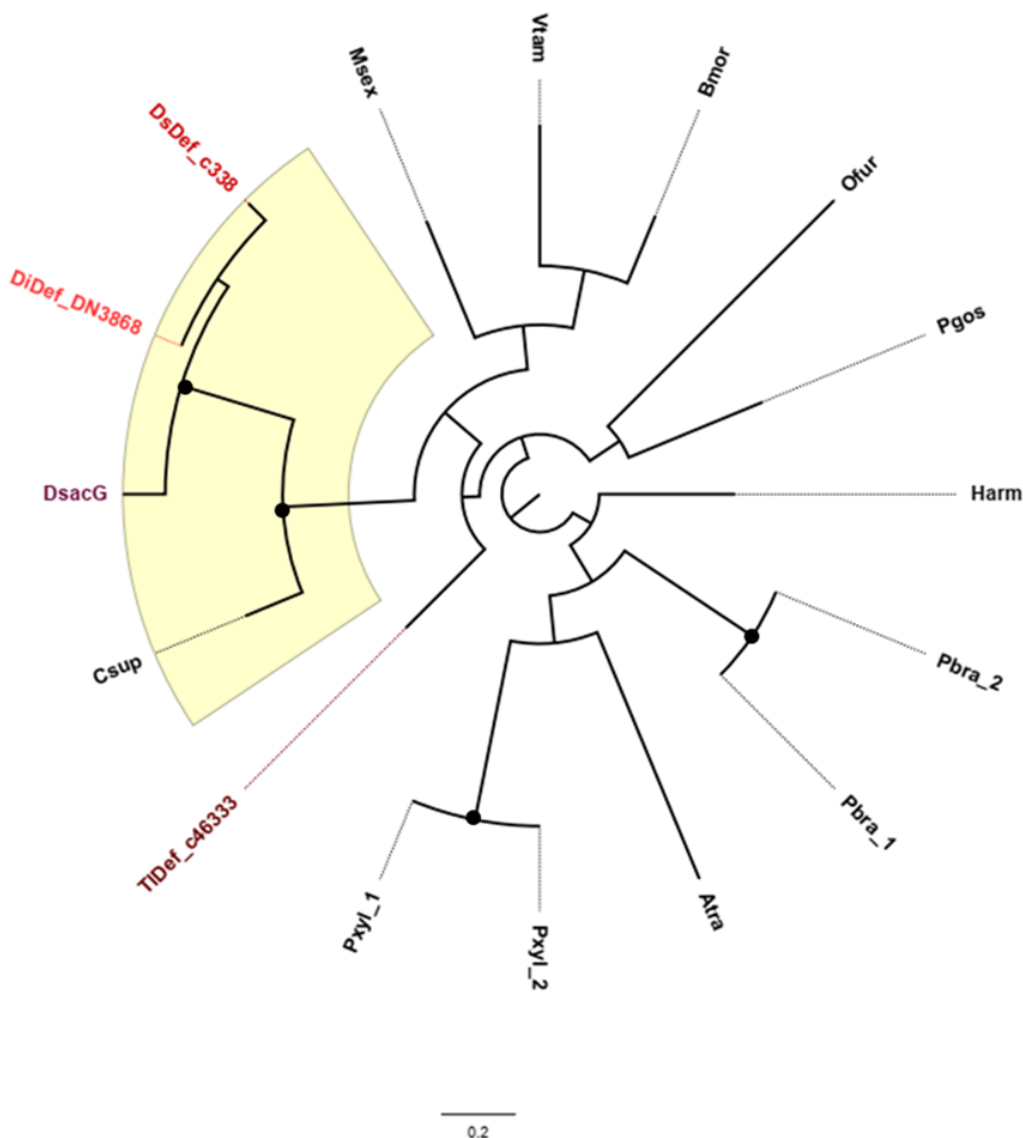


Figura 3. Sequências de Defensinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A) Alinhamento das sequências proteicas previstas de defensinas via Clustal Omega. Os peptídeos sinal estão

sublinhados; as cisteínas conservadas que formam as pontes dissulfeto estão em vermelho. **(B)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Defensinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o cluster da família Crambidae. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di; *Diatraea saccharalis*, transcritoma: Ds; *Diatraea saccharalis*, genoma: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

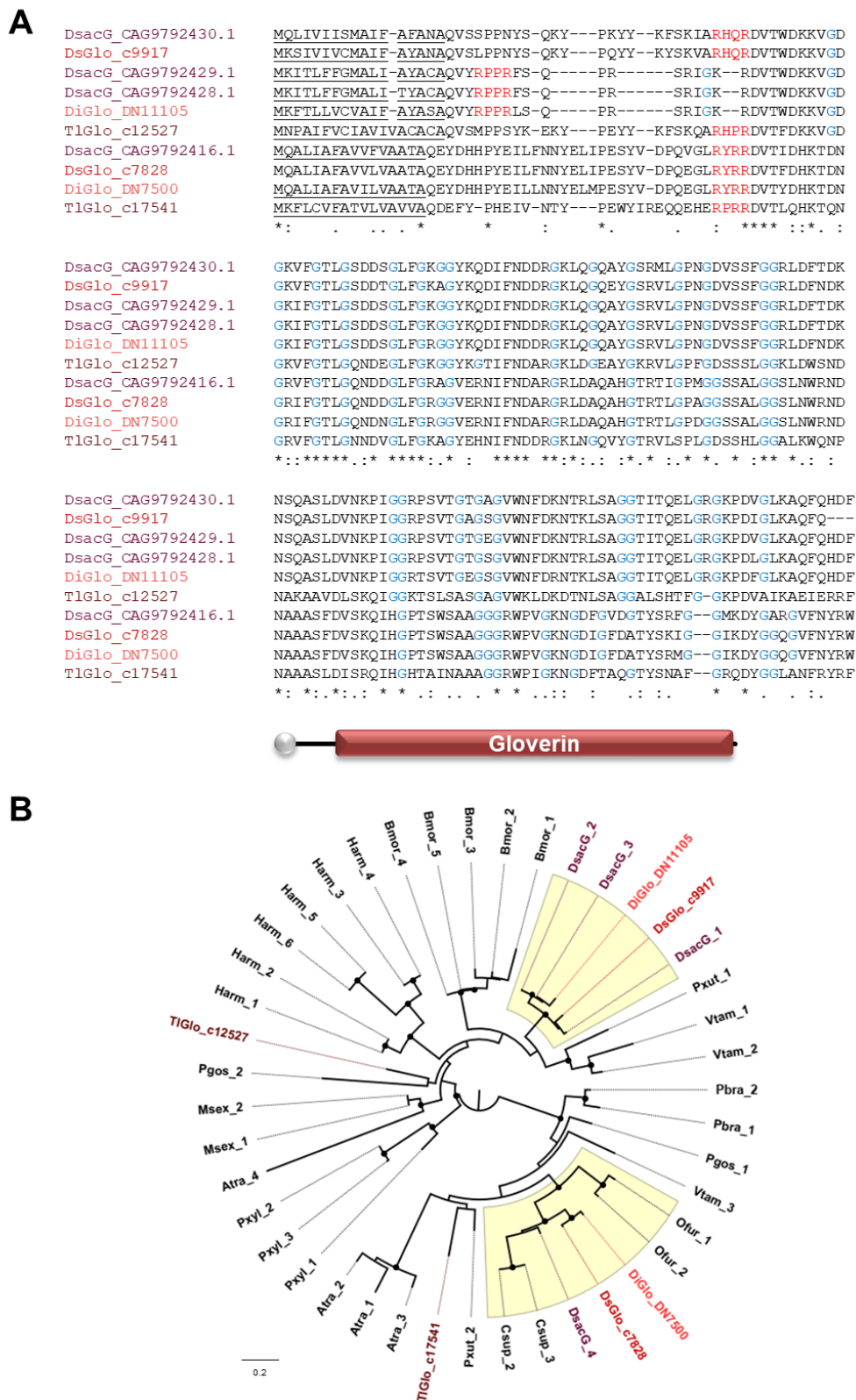


Figura 4. Sequências de Gloverinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A)

Alinhamento das sequências proteicas previstas de gloverinas via Clustal Omega. Os peptídeos sinal estão

sublinhados, os sítios de reconhecimento de processamento intracelular (RXXR) estão marcados em vermelho, e as glicinas em azul. As gloverinas possuem apenas um domínio funcional, e assim como as atacinas são ricas em glicina. **(B)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Gloverinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaques em amarelo denota os clusters da família Crambidae. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Amyelois transitella*: Atra; *Bombyx mori*: Bmor; *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di; *Diatraea saccharalis*, transcritoma: Ds; *Diatraea saccharalis*, genoma: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex; *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam

A

```

DsacG_CAG9783844.1 MLRGTSILLGCVLLVFI AESSQR-ITPA-----VYRREL--PPSPPK--TIRARDIN
DiLeb_DN13690      MLRGTSILLGCVLLVFI AESSQR-ITPA-----VYRREL--PSFSPPK--TIRARDIN
DsLeb_c10179      MSRGTSILLGCVLLVFI AESSQR-ITPA-----VYRREL--PPSLEPK--TIRVRDIN
TlLeb_c46404      MLK-LSVSLGLLLVSFI TDSSQRFIQPTFRPSVDREVFIRETYRPPVLREN--PIRTV RDVN
TlLeb_c29451      MLK-LTVSLGLFFVAFI ADSSCQTLIQPTIKPA---VFEPMPGRPPFRPTLPIRRV RDIN
                  * :  : * * . : : * : * * : * : * * . * . * * * : *

DsacG_CAG9783844.1 E-EPLWLYKGDDINRA PATGDHPEYLPFYIDDVKLDPNTRYTRSVDSFSAKRGGGSHSTSSSSR
DiLeb_DN13690      D-EPLWLYKGDDIKRAPATGDHPEYLPFYIDDVKLDPNTRYARSVDSPSAKRGGGSHSTSSSSR
DsLeb_c10179      D-EPLWLYKGDDIKRAPATGDHPEYLPFYIDDVKLDPNTRYARSVDSPSAKRGGGSHSTSSSSR
TlLeb_c46404      DQQPLWLYQGDNI PRAPSSGDHPILPSIIDDVKFNEDRRYARSVDSPSARRGGGSHTTSTSSR
TlLeb_c29451      DQEPLLLYK-D-IELAPTSGDH-----TT-----
                  : * * * : * * * : * * : * * : * : * : *

DsacG_CAG9783844.1 NTGPNHPGYNR RNARSIH TFS--EFTVPSPTFFR--PTNPFERPELPGPRIFFPVYARHARDV
DiLeb_DN13690      NTGPTHPGYNR RNARSIH TFS--EFTIPSPPTFFK--PTNPFPRDLPGRPIFFPVYARHARDV
DsLeb_c10179      NTGPTHPGYNR RNARSIH NPS--EFTIPSPPTFFK--PTNPFERPELPGPRIFFPVYARHARDV
TlLeb_c46404      NTGATHPGYNR RNARDI RLFTFGPLR-PSPTFFKPEPINPF-EPSIF-PRTTYPIYARTTRDI
TlLeb_c29451      -----YNR RHARDIVITTFEPLR-PSPPFFG--PLNPF-EPRIE-PHFYPTYLRTVRAV
                  * * * : * * * : * : * * * * * * * : * * * : * * : * :

DsacG_CAG9783844.1 QLSGFLQKPTHYDITFTGFNPNARVQPWQKV--KVRTGDIHEDIDEDEIEEF AFESTD---V
DiLeb_DN13690      QLSGFLQKPTHYDITLTGWNPNARVQPWQKI--KVRTGDIHDDIDDEEIKESAFESSD---M
DsLeb_c10179      QLSGFLQKPTHYDITLTGFNPNARVQPWQKI--KVRTGDIHDDIDDEEIKKSVFGSSEEDSV
TlLeb_c46404      QIPG-VRQPSHRDVIIPNWNPHVKTNPWQRIGVKPRNTRSV-EMLDDDEQEYVEF-----
TlLeb_c29451      QIPG--RQPSYQDIVIPTWNWNLQSK--KKIGGKPRNTRSV-EMFDDNEQE-----
                  * : . * : * : : * : : : : : * * . * : : * : * :

```

B

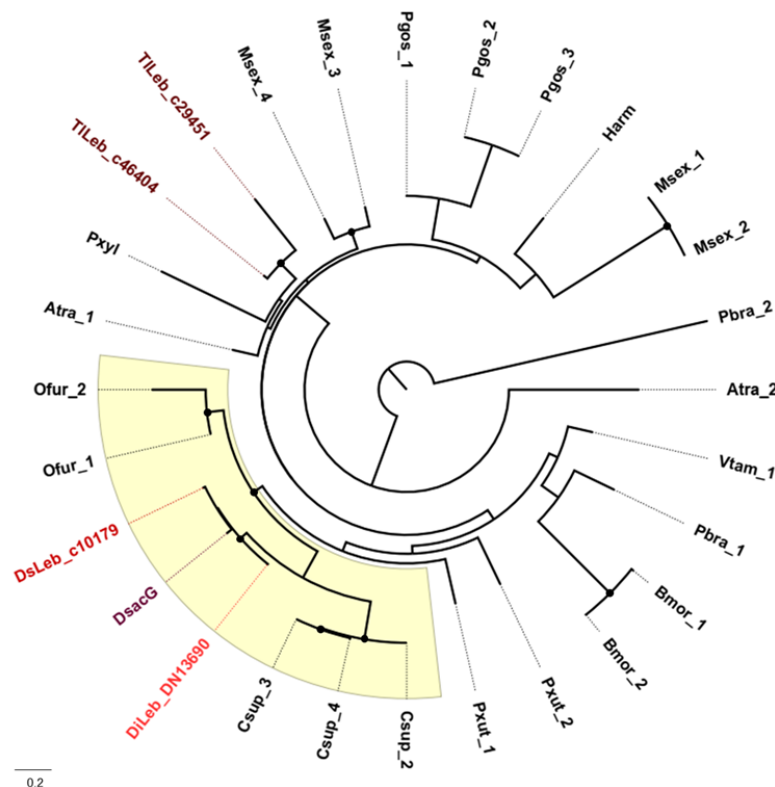


Figura 5. Sequências de Lebocinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A) Alinhamento das sequências proteicas previstas de lebocinas via Clustal Omega. Os peptídeos sinal estão

sublinhados, os sítios de reconhecimento de processamento intracelular (RXXR) estão marcados em vermelho, e as prolinas em cinza. **(B)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Lebobinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o cluster da família Crambidae. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor; *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di; *Diatraea saccharalis*, transcritoma: Ds; *Diatraea saccharalis*, genoma: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm; *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

A

```

DsacG_CAG9787752.1 MKFTALFAIVLAILALLAGESQA----AP-KVP----VKKIGKAIKTGLGVLGAAGTAHEVYESVKNRG---
DiMor_DN756        MKFAALFAIVLAVLAMFVGSQHA----EP-KVP----VKKIGKAIKTGLGVLGAAGTAHEVYQNVKNRG---
DsMor_c3963        MKFKVFISIVLAMLALFIVGGHA----DP-KLP----VKQIGKGIKTGIGIAGAAGTAKEVDHVRNRG---
DsacG_CAG9787753.1 MKISIIFVLALAFFGMLLGGQAAPAPDP-KLP SGKT IKKVGKAIKTGFGILSAAGTAHEVYTSVKNRKNN-
DsacG_CAG9787754.1 MKISIIFVLAMAFFGMLLGGQAAPAPDP-KLP SGKT IKKVGKAIKTGFGILSAAGTAHEVYTNLKNRNNN-
DiMor_DN18833      MKISVIFVLAMAFGMLLGGQAAPAPDP-KLP SGKT FKKVGKAIKTGFSIFSAGTAHEVYN-----
TlMor_c5661        MQLFKFALLILGVLGMLSGSHA----SP-K---GGGLKKVAKVVKAGIGAIGAIGTGHEIYENVKNRG---
TlMor_c32031       MKLFSLVMMVFVAVLALMLGSGHA----AP-K---GGSFKKVVKGVKVLGAIGALGTGHEIYERVKNRG---
TlMor_c49626       MKLLSLVMMVFVAVLALMLSGSHA----AP-K---GGGLKKVAKAVKAGIGAIGAIGTGHEIYEHVKNRG---
TlMor_c23166       MKLTGLFLMIMAVLALFAGSGEA----NP-KLN-LGAITAAGKIIKKGFGIIGAADKAHDIFNEVKNRRH--
TlMor_c25619       MKFTGLFVMIMAVLALFAGSCEAKP--AP-KIN-LGALKKTGKLIKKGLEIIGVGTADHDYSSAKNKQN--
TlMor_c37241       MKFAGLFVMIMAVLALFVGSSEANP--KP-KLN-LGALKKTGKIIKNGLQAIGAIGTAHEVYNQAKNNQN--
TlMor_c17349       MKLSKIFFVIMGVIALLVGTGEA----APGKIP-VKAIKKGGQIIGKGLRALNIAS TVHDIASQFRPKKKKH
*:: : : : : : : : . * * * . . : : * : . . : : :

```

B

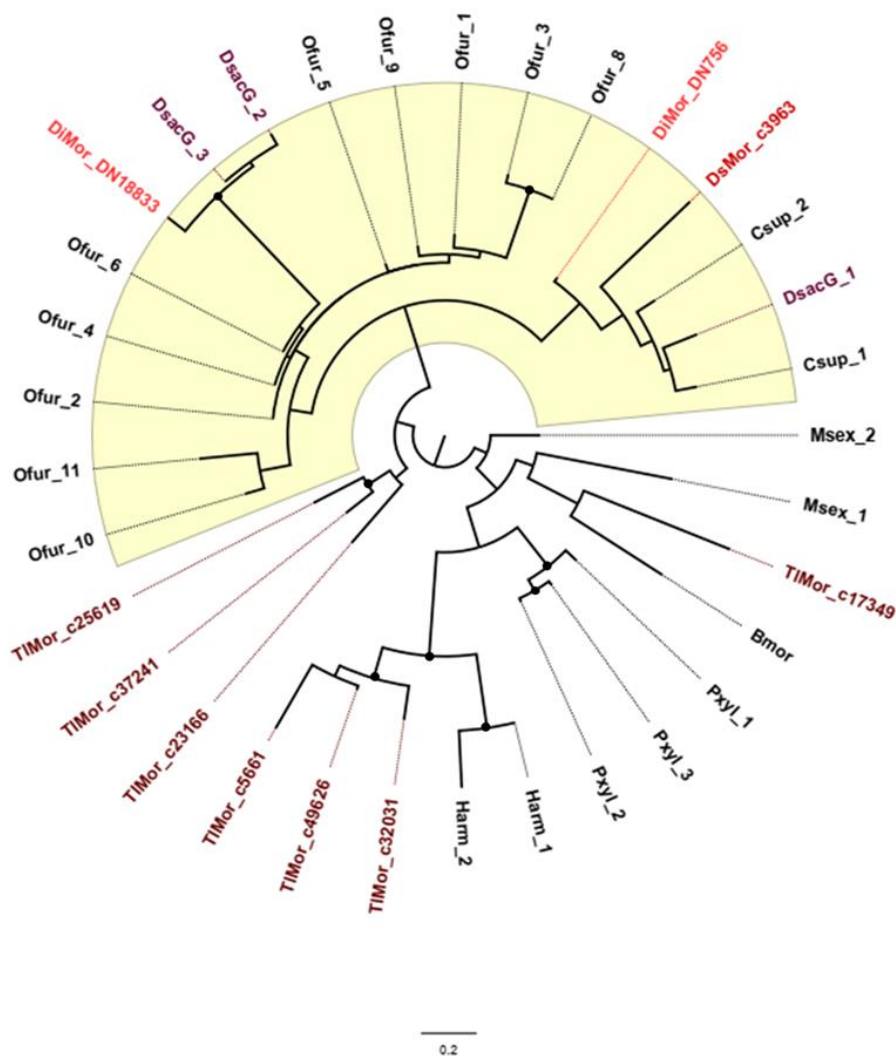


Figura 6. Sequências de Moricinas encontradas nas espécies de broca da cana-de-açúcar. (A) Alinhamento das sequências proteicas previstas de moricinas via Clustal Omega. Os peptídeos sinal estão

sublinhados. **(B)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Moricinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados nos ramos (círculos pretos). As abreviações do nome das espécies estão descritas a seguir: *Bombyx mori*: Bmor; *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di; *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm; *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Plutella xylostella*: Pxyl.

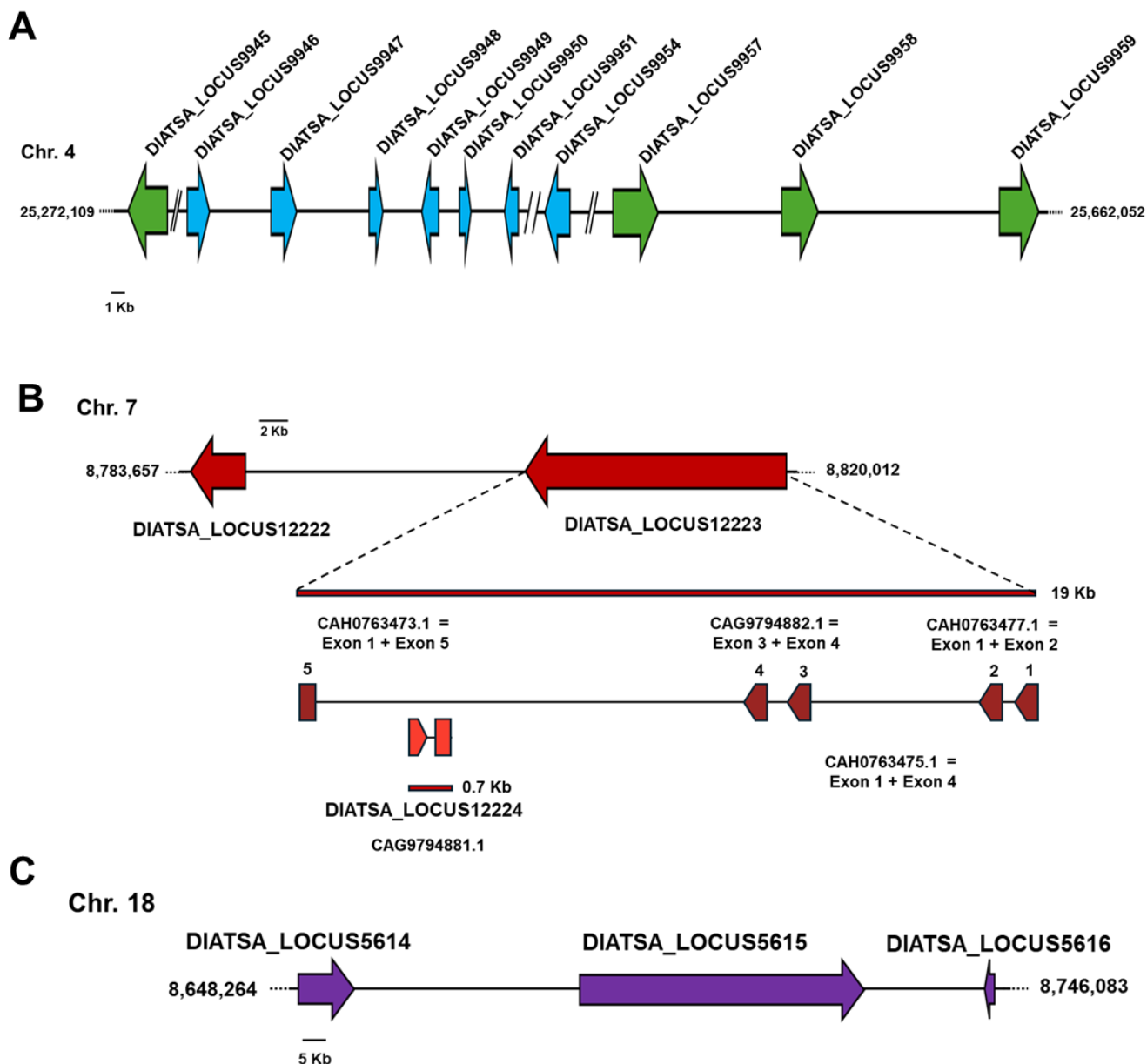


Figura 7. Localização cromossômica dos genes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) no genoma de *Diatraea saccharalis*. (A) Loci de genes de atacina (azul) e gloverina (verde); as setas indicam o tamanho e a orientação do gene no cromossomo 4; atacinas e gloverinas são genes ricos em glicina. (B) Loci dos genes de cecropina com as setas indicando o tamanho e a orientação dos genes no cromossomo 7; O locus DIATSA_LOCUS12223 compreende 4 isoformas de *splicing* alternativo e um locus

(DIATSA_LOCUS12224) dentro de um íntron, entre os exons 4 e 5. (C) Loci dos genes de moricina com as setas indicando o tamanho e a orientação dos genes no cromossomo 18.

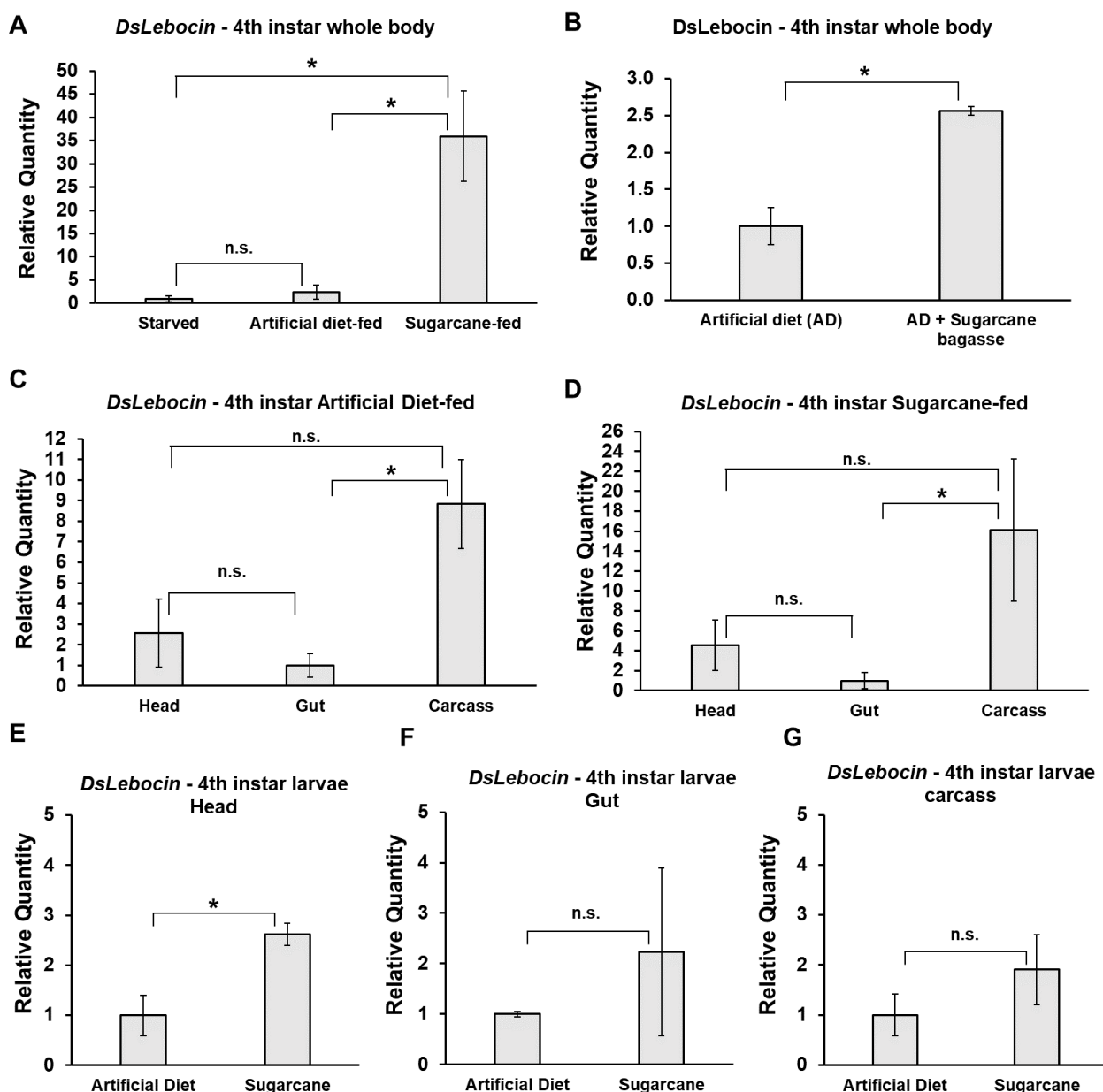


Figura 8. Análise da expressão do peptídeo antimicrobiano Lebocina de *Diatraea saccharalis* (*DsLeb*) sob diferentes condições de alimentação. (A) Expressão em lagartas de 4º ínstar (corpo inteiro) em jejum, alimentadas com dieta artificial ou cana-de-açúcar. (B) Expressão em lagartas de 4º ínstar (corpo inteiro) alimentadas com dieta artificial ou dieta artificial contendo bagaço de cana-de-açúcar. (C) Expressão em cabeça, intestino ou carcaça de lagartas de 4º ínstar alimentadas com dieta artificial. (D) Expressão em cabeça, intestino ou carcaça de lagartas de 4º ínstar alimentadas com cana-de-açúcar. (E) Expressão na

cabeça, (F) intestino ou (G) carcaça de lagartas que se alimentaram ou com dieta artificial ou cana-de-açúcar. As médias foram comparadas pelo teste t utilizando o software SATqPCR (<https://satqpcr.sophia.inrae.fr/>). * $P \leq 0,05$; n.s. não significativo.

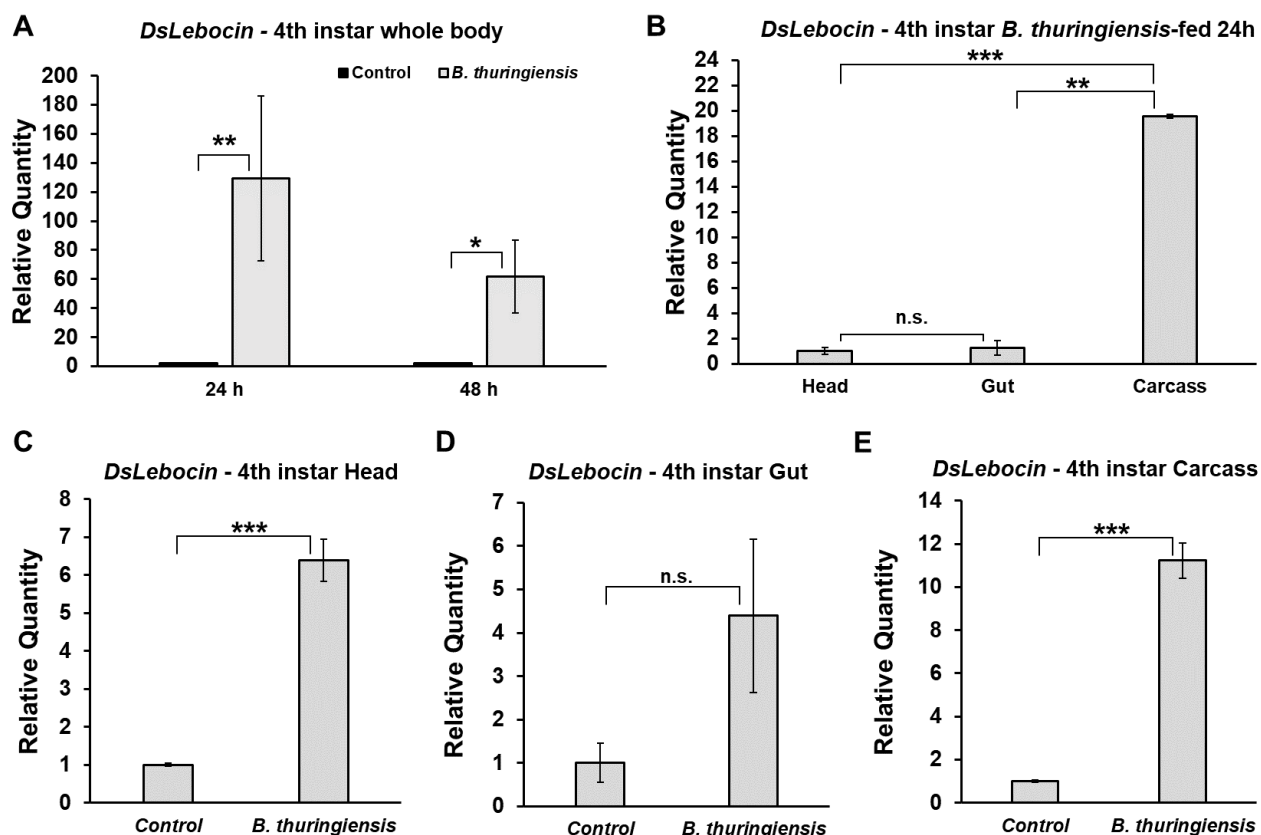


Figura 9. Análise da expressão do peptídeo antimicrobiano lebecina (*DsLeb*) em resposta a ingestão de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* (Bt). (A) Expressão em lagartas de 3º ínstar (corpo inteiro) com 24h e 48h de alimentação com concentração subletal de Bt. (B) Expressão em cabeça, intestino ou carcaça de lagartas de 3º ínstar que ingeriram dieta com Bt. (C) Comparação de expressão de *DsLeb* na cabeça, (D) Intestino, ou (E) carcaça de insetos tratados ou não com Bt. As médias foram comparadas pelo teste t utilizando o software SATqPCR (<https://satqpcr.sophia.inrae.fr/>). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s. não significativo.

CAPÍTULO 4

QUANDO (RE)CONHECER O INIMIGO NÃO É VANTAJOSO: TENTATIVA DE PRIMING IMUNOLÓGICO EM ADULTOS DE *Diatraea saccharalis* COM PARASITOIDE RESULTA NA REDUÇÃO DA IMUNIDADE DA PROLE

MANOELY ABREU REIS²

²Departamento de Agronomia- Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 556 Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Reis, M.A. Quando (re)conhecer o inimigo não é vantajoso: Tentativa de priming imunológico em adultos de *Diatraea saccharalis* com o parasitoide *Tetrastichus howardi* resulta em redução da imunidade da prole

RESUMO - O *priming* imunológico ocorre quando um contato ou infecção prévia resulta na resposta imune mais efetiva em uma segunda exposição. Esse fenômeno é muito bem caracterizado na interação insetos-microrganismos, principalmente no *priming* materno com efeitos verificados na prole (*priming* transgeracional). Porém, são raros os estudos desse fenômeno na interação hospedeiro-parasitoide. Assim, fez-se uma tentativa de *priming* transgeracional em adultos de *Diatraea saccharalis*, a broca-da-cana, induzido por *Tetrastichus howardi*, um parasitoide de lagartas e preferencialmente de pupas. Machos (♂) ou fêmeas (♀) recém-emergidos foram colocados em gaiolas com fêmeas de *T. howardi* na razão de 1:1 por 24 h. Em seguida, formaram-se casais nos arranjos ♂ e ♀ não confinado (controle), ♂ confinado e ♀ não-confinada, ♂ não-confinado e ♀ confinada, e ♂ e ♀ confinados (♂P x ♀P). Foram avaliados a sobrevivência, e o tempo de desenvolvimento lagarta-adulto da prole de cada arranjo. Além disso, foi avaliada a expressão dos genes do sistema imune que respondem a *T. howardi* (*DsDorsal* – via Toll, *DsSTAT* – via Jak-STAT, *DsPPO1* e *DsPPO2* - via da fenoloxidase) na prole de todos os arranjos. Por fim, avaliou-se o parasitismo de lagartas dos arranjos controle e ♂P x ♀P. Observou-se resultados significativos apenas no arranjo ♂P x ♀P, mas diferente do esperado, os efeitos foram negativos. Neste arranjo, houve uma menor taxa de sobrevivência resultando em um menor número de adultos viáveis. Além disso, quando as lagartas foram confiadas com o parasitoide, a expressão dos genes de defesa foi reduzida no arranjo ♂P x ♀P, comparada aos outros tratamentos. Por fim, a taxa normal de parasitismo de lagartas de *D. saccharalis* por *T. howardi* no controle é baixa (2,5%), porém na prole do arranjo ♂P x ♀P foi de 22,5%. A análise dos dados mostra que o contato prévio dos parentais com o parasitoide resulta no comprometimento da imunidade da prole, tornando-a mais suscetível ao parasitoide, não ocorrendo *priming*.

PALAVRAS-CHAVE: Imunidade humoral, desenvolvimento, broca-da-cana, *Tetrastichus howardi*

WHEN RECOGNIZING THE ENEMY IS NOT ADVANTAGEOUS: ATTEMPT OF
IMMUNOLOGICAL PRIMING IN ADULTS OF *Diatraea saccharalis* BY THE PARASITOID
Tetrastichus howardi RESULTS IN OFFSPRING WITH REDUCED IMMUNITY

ABSTRACT - Immunological priming occurs when a prior contact or infection results in a more effective immune response upon a second exposure. This phenomenon is well-characterized in insect-microorganism interactions, particularly in maternal priming with effects observed in the offspring (transgenerational priming). However, studies of this immune mechanism in host-parasitoid interactions are rare. Therefore, an attempt was made to induce transgenerational priming in adults of *Diatraea saccharalis*, the sugarcane borer, using *Tetrastichus howardi*, a generalist parasitoid of larvae and, preferably, pupae. Newly-emerged males (♂) or females (♀) were placed in cages with female *T. howardi* at a 1:1 ratio for 24 h. Subsequently, pairs were formed in the following arrangements: untreated ♂ and ♀ (control), treated ♂ and untreated ♀, untreated ♂ and treated ♀, and both ♂ and ♀ treated (♂P x ♀P). The survival and larva-to-adult development time of the offspring from each arrangement were evaluated. Additionally, the expression of immune system genes that respond to *T. howardi* (*DsDorsal* – Toll pathway, *DsSTAT* – Jak-STAT pathway, *DsPPO1* and *DsPPO2* – phenoloxidase pathway) was assessed in the offspring of all arrangements. Finally, parasitism of larvae from the control and ♂P x ♀P arrangements was evaluated. Significant results were observed only in the ♂P x ♀P arrangement, but contrary to expectations, the effects were negative. In this arrangement, there was a lower survival rate, resulting in fewer viable adults. Additionally, when the larvae were challenged with the parasitoid, the expression of the analyzed defense genes was reduced in the ♂P x ♀P arrangement compared to the other treatments. Finally, the normal parasitism rate of *D. saccharalis* larvae by *T. howardi* in the control was low (2.5%), but in the offspring of the ♂P x ♀P arrangement, it was 22.5%. Data analysis shows that

prior contact of the parents with the parasitoid did not result in priming, but compromised the immunity of the offspring, making them more susceptible to the parasitoid.

KEYWORDS: Humoral immunity, development, sugarcane borer, *Tetrastichus howardi*

Introdução

Os insetos são o grupo de animais mais abundantes e de maior diversidade na Terra (Scudder 2017, Stork 2018, Eggleton 2020). Parte desse sucesso se deve à sua capacidade de resposta imunológica rápida e altamente eficaz, capaz de identificar, inativar e eliminar patógenos (Dunn 1986, Schmid-Hempel 2005a).

O sistema imunológico dos insetos difere dos mamíferos, principalmente pela ausência de resposta imune adaptativa mediada por anticorpos (Lavine & Strand 2002, Strand 2008, Tsakas & Marmaras 2010, Sheehan *et al.*, 2018). Ao invés disso, o sistema imune dos insetos é baseado em um sistema inato, que gera respostas eficazes para combater ameaças por meio de processos celulares (fagocitose, nodulação e encapsulamento) e humorais com a produção de peptídeos antimicrobianos, lisozimas e fenoloxidasas (Tsakas & Marmaras 2010, Stokes *et al.* 2015, Ali Mohammadie Kojour *et al.* 2020).

Evidências cumulativas demonstram que o sistema imunológico inato dos insetos pode produzir respostas com memória, sejam elas específicas ou não-específicas (Milutinovic *et al.* 2016, Boraschi & Italiani, 2018). Conhecida como *priming* imunológico, este tipo de resposta imune ocorre quando um contato ou infecção prévia resulta em uma resposta imune mais efetiva em uma segunda exposição, seja com organismos patogênicos ou parasitas (Arala-Chaves & Sequeira 2000, Little & Kraaijeveld 2004, Kurtz 2005, Sadd & Schmid-Hempel 2006, Contreras-Garduño *et al.* 2016). Por exemplo, lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) que entraram em contato com a levedura *Candida albicans* (Robin) demonstraram proteção contra a própria *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Linnaeus), evidenciando uma resposta antimicrobiana aprimorada e ampla (Sheehan *et al.* 2020). Em *Bombus terrestris* (Linnaeus) (Hymenoptera: Apidae), a exposição prévia a bactérias patogênicas como *Pseudomonas fluorescens* (Migula), *Paenibacillus alvei* (Ash) e *Paenibacillus larvae* (Ash) resultou em um aumento significativo na sobrevivência durante uma segunda infecção (Schmid-Hempel 2005b, Sadd & Schmid-Hempel 2006).

A preparação imunológica prévia a uma infecção ou parasitismo oferece vantagens para a sobrevivência dos insetos; contudo, essas melhorias na resposta imunológica podem ter custos adaptativos, impactando o tempo de desenvolvimento e a fecundidade (Rauw 2012, Spiering 2015, Schwenke *et al.* 2016). É crucial ressaltar que o *priming* imunológico não é universal entre os insetos (Pigeault *et al.* 2015, Schulz *et al.* 2019). Em algumas espécies, hábitos de colônia compensam o investimento em *priming* individual através de defesas coletivas, enquanto outras, com ciclos de vida curtos, não podem arcar com os custos significativos desse mecanismo (Armitage *et al.* 2011, Sheehan *et al.* 2020).

A defesa aprimorada pode persistir durante todo o ciclo de vida dos insetos hospedeiros ou até mesmo ser transmitida para a próxima geração (Contreras-Garduño *et al.* 2016, Dhinaut *et al.* 2018). Os parentais que enfrentam desafios imunológicos podem preparar seus descendentes para uma defesa reforçada contra futuras ameaças, mesmo que esses descendentes nunca experimentem esses desafios diretamente (Sadd *et al.* 2005, Trauer-Kizilelma & Hilker 2015). A este tipo de *priming* imunológico chamamos *priming* imunológico transgeracional, e pode ser transmitido pela mãe, pelo pai, ou por ambos (Vilcinskas 2021). O *priming* transgeracional é bastante estudado com microrganismos. Em *Manduca sexta* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae) quando suas pupas são tratadas com peptidoglicano (PGN), um componente da parede celular de bactérias como *Micrococcus luteus* (Wiesner), os ovos da próxima geração mostram uma defesa mais eficiente contra o parasitismo de *Trichogramma evanescens* (Westwood) (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

A experiência imunológica é transmitida para a prole pela transferência de fatores de imunidade, como proteínas e peptídeos antimicrobianos (Tetreau *et al.* 2020). Entretanto, o *priming* transgeracional pode ser mediado também por alterações epigenéticas, como demonstrado por Gegner *et al.* (2019).

Apesar de ser bem estudado na relação microrganismo-hospedeiro, o *priming* transgeracional induzido por parasitoides é muito pouco estudado. Segundo Bozler *et al.* (2020), fêmeas de *Drosophila*

melanogaster (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) que foram confinadas com parasitoide de larvas são capazes de gerar descendentes com maior aptidão imunológica contra parasitoides (Bozler *et al.* 2020). Interessante que esta resposta é induzida em *Drosophila* após contato visual com o parasitoide (Kacsoh *et al.* 2013).

Neste contexto, este trabalho se propôs a investigar a ocorrência de *priming* imunológico intrageracional e transgeracional em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil, após a exposição ao parasitoide generalista *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae). No entanto, não foi encontrada evidência de *priming* imunológico nem intrageracional, nem transgeracional em *D. saccharalis*. Na tentativa de *priming* de lagarta para pupas não houve diferença na biologia do parasitoide que parasitou pupas, previamente expostas na fase de lagarta, em comparação com as que não foram expostas. Por fim, na tentativa de *priming* transgeracional, as lagartas da geração F1, cujos parentais foram ambos confinados com o parasitoide, tiveram maiores taxas de mortalidade e parasitismo, além de menor expressão de genes do sistema imune durante a interação com o parasitoide.

Material e Métodos

Criação de *D. saccharalis*. Os experimentos utilizaram uma população mantida em laboratório com umidade de $70 \pm 10\%$ UR, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura controlada conforme a fase do inseto (adultos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; demais fases a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). As lagartas neonatas foram mantidas em tubos de ensaio com dieta artificial composta por farelo de soja, gérmen de trigo, açúcar, vitaminas, sais de Wesson, ácido ascórbico e água, conforme descrito por Hensley & Hammond (1968), com adaptações de Araújo *et al.* (1985). No terceiro ínstar, as lagartas foram transferidas para bandejas com dieta em cubos até a fase de pupa. As pupas foram colocadas em recipientes com algodão umedecido para manter a umidade e papel branco. Os adultos foram mantidos em gaiolas com paredes revestidas de papel branco,

uma solução de mel (10%) fornecida para alimentação, e a base forrada com algodão umedecido e papel branco. Os ovos foram coletados a cada três dias e posteriormente desinfetados com formol e sulfato de cobre, e armazenados em placas de Petri com algodão umedecido com sulfato de cobre até a eclosão das lagartas.

Criação de *Tetrastichus howardi*. Os parasitoides da espécie *T. howardi* foram provenientes de uma criação de laboratório. As condições de criação foram controladas, com umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Os parasitoides foram mantidos em pupas de *D. saccharalis*, conforme estabelecido por Vargas *et al.* (2011). Após a emergência dos parasitoides adultos, sete fêmeas e um macho foram transferidos para tubos de vidro vedados com papel filtro e com pequenas perfurações. Dentro dos tubos, foram aplicados filetes de mel puro nas paredes para alimentação, além de uma pupa de *D. saccharalis* ou *T. molitor* para o parasitismo. Os parasitoides permaneceram nos tubos até a emergência da próxima geração, repetindo-se esse ciclo sucessivamente.

Experimento 1 – Tentativa de *priming* imunológico intrageracional em *D. saccharalis* induzido por *T. howardi*. Para avaliar a ocorrência de *priming* imunológico induzido por *T. howardi* em lagartas, com efeito em pupas de *D. saccharalis*, lagartas de quarto ínstar foram expostas individualmente com quatro fêmeas de *T. howardi* por 48 horas. Após este período, os parasitoides foram descartados e as lagartas continuaram seu desenvolvimento até a fase de pupa. Um segundo grupo com tratamento controle (injúria mecânica) em lagartas foi realizado utilizando um alfinete para simular o aparelho ovipositor do parasitoide. As injúrias foram feitas quatro vezes ao dia, em intervalos regulares, durante 48 horas. Após este período, os insetos continuaram seu desenvolvimento até a fase de pupa. Pupas com 24 h de formação dos dois grupos anteriores foram expostas individualmente a duas fêmeas de *T. howardi* por um período de 24 horas. O grupo controle consistiu em pupas individualizadas expostas com duas fêmeas de *T. howardi*, mas sem o contato prévio na fase larval com os parasitoides, e sem injúrias mecânicas.

No total, foram utilizadas 30 lagartas para cada condição avaliada. Um resumo do experimento é mostrado na Figura 1. Neste experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade de lagartas, número de lagartas que não empuparam, porcentagem de pupas parasitadas, porcentagem de pupas parasitadas com emergência de parasitoides, tempo de desenvolvimento dos parasitoides, número de progênie do parasitoide, razão sexual do parasitoide, e número de adultos viáveis de *D. saccharalis* (sobrevivência total).

Experimento 2 - Tentativa de *priming* imunológico transgeracional (ou intergeracional) em *D. saccharalis* induzido por *T. howardi*. Para avaliar a ocorrência de *priming* imunológico transgeracional em *D. saccharalis*, adultos machos ou fêmeas recém-emergidos foram confinados, separadamente, com fêmeas de parasitoides na proporção de 1:1 em gaiolas por 24 h. Após este período, foram formadas gaiolas com as quatro combinações de casais possíveis: (i) machos x fêmeas não confinados com parasitoide (não-*primed*) (σ^{NP} x φ^{NP}); (ii) machos confinados com parasitoides (*primed*) x fêmeas não confinadas (σ^{P} x φ^{NP}); (iii) machos não confinados x fêmeas confinadas (σ^{NP} x φ^{P}); e (iv) machos confinados x fêmeas confinadas (σ^{P} x φ^{P}). Foram colocados 5 casais por gaiola e após três dias da formação dos casais, iniciou-se a coleta de ovos de cada arranjo de casais. Um resumo do experimento é mostrado na Figura 2.

- *Análise de desenvolvimento da geração F1 dos diferentes arranjos de casais que sofreram ou não tentativa de priming na geração parental.*

Foi acompanhado e avaliado o desenvolvimento de pelo menos 30 indivíduos, da fase larval até a fase adulta, da F1 de cada arranjo de casais. Na avaliação do desenvolvimento, foram considerados os seguintes parâmetros: mortalidade larval, tempo de desenvolvimento lagarta-pupa, mortalidade de pupas, peso das pupas, razão sexual, tempo de desenvolvimento lagarta-adulto (dias) e viabilidade dos adultos viáveis.

- *Análise de parasitismo por T. howardi da geração F1 dos diferentes arranjos de casais que sofreram ou não tentativa de priming na geração parental.*

Neste experimento foram utilizados apenas a F1 dos arranjos ♂NP x ♀NP e ♂P x ♀P. Após a eclosão as lagartas foram criadas conforme o experimento anterior, e ao chegar ao 3º ínstar foram expostas ao *T. howardi*. As lagartas de cada tratamento foram expostas de forma individual com fêmeas de *T. howardi* na proporção de 1 lagarta: 4 fêmeas de parasitoide por 48 horas. Após este período os parasitoides foram descartados e o desenvolvimento das lagartas foi acompanhado até a fase adulta. Foram avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade de lagartas e pupas, porcentagem de lagartas parasitadas, tempo de desenvolvimento lagarta-pupa e peso de pupa.

- *Análise da expressão dos genes do sistema imune que respondem ao parasitismo de T. howardi na F1 dos diferentes arranjos de casais que sofreram ou não tentativa de priming na geração parental.*

Lagartas de 3º ínstar da F1 de cada arranjo de casais foram expostas por 24 h com fêmeas de *T. howardi* na proporção 1 lagarta 4 parasitoides. Após esse período, os parasitoides foram descartados, o RNA total foi extraído das lagartas 48 h após a retirada dos parasitoides. Para a extração de RNA total, um conjunto de 3 lagartas foi processado como uma repetição de cada tratamento. Cada tratamento constou de três repetições biológicas. As lagartas foram maceradas em nitrogênio líquido, e o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme protocolo do fabricante. As amostras de RNA total foram quantificadas no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA) e visualizadas em gel de eletroforese a 1% para avaliar a sua integridade. Um µg do RNA total de cada amostra foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguido pela síntese de cDNA utilizando o kit iScript gDNA Clear (BIO-RAD, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação da expressão por qPCR foi feita em reações com volume final de 10 µL, contendo às seguintes reagentes: 2,6 µL de água bidestilada, 5 µL de 2x SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA), 0,2 µM (0,2 µL) de cada primer (Tabela 1), e 2 µL de cDNA diluído na proporção de

1:10. As reações foram conduzidas no equipamento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, EUA), com cada tratamento contendo duas replicatas técnicas e três replicatas biológicas, além dos controles negativos para cada par de primers. As reações seguiram os seguintes parâmetros: (i) desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos; (ii) 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto; (iii) etapa final com análise da curva de "melting" de cada par de primers, com temperatura variando de 60 a 94°C, com aumento de 0,5°C por segundo. Os genes avaliados foram aqueles que tiveram sua expressão aumentada durante a tentativa de parasitismo de *T. howardi* (Capítulo 2), *DsDorsal*, *DsSTAT*, *DsPPO1* e *DsPPO2*. Os genes normalizadores de expressão foram *GAPDH* e *RPS10* (Tabela 1).

- *Análise da infecção de Metarhizium anisopliae em insetos da geração F1 dos diferentes arranjos de casais que sofreram ou não tentativa de priming na geração parental por T. howardi.*

Para investigar se os efeitos causados pela tentativa de *priming* na geração parental eram específicos para o parasitoide *T. howardi*, lagartas de 3º ínstar da F1 dos arranjos ♂NP x ♀NP e ♂P x ♀P foram injetadas com 1 µL de uma solução de conídios de *M. anisopliae* isolado ESALQ E9 na concentração de 1×10^3 conídios/mL. Como controle foi utilizado a solução de conídios na mesma concentração, porém inativados por calor. Cada tratamento foi feito em repetições, com 10 lagartas por repetição. Observou-se a curva de sobrevivência para cada tratamento.

Análise estatística. Os dados das análises biológicas foram analisados de acordo com sua distribuição. Os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis foram utilizados para dados sem distribuição normal, e teste t ou análise de variância (ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey para dados com distribuição normal. Para analisar os dados de expressão gênica, foi utilizado o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen 2001) através da ferramenta online SATQPCR (<http://satqpcr.sophia.inrae.fr/cgi/home.cgi>). Para análise estatística da expressão comparativa foi utilizado o teste t de Student ($P < 0,05$).

Resultados

Exposição prévia de lagartas ao parasitoide *T. howardi* não induz *priming* em pupas de *D. saccharalis*. Lagartas que foram expostas ao parasitoide *T. howardi* por 48 h, apesar de terem uma mortalidade de 17%, esta não diferiu significativamente dos tratamentos controle (Tabela 2). Todas as lagartas mortas foram parasitadas e tiveram emergência de adultos do parasitoide. Interessante que o tratamento com injúria mecânica apresentou lagartas que não empuparam e permaneceram vivas na fase larval durante toda a avaliação do experimento. Durante a fase de pupa, lagartas que passaram por injúria mecânica tiveram significativamente menos indivíduos parasitados por *T. howardi* (Tabela 2). Isso refletiu na quantidade de mariposas que emergiram (~28 %), valor muito diferente dos outros dois tratamentos onde a emergência de mariposas não passou de 3 %. Apesar destas diferenças no hospedeiro, o número de parasitoides emergidos, o tempo de desenvolvimento e a sua razão sexual foram semelhantes nos três tratamentos (Tabela 2). Assim, verificou-se que a exposição prévia de lagartas ao parasitoide não altera os parâmetros de parasitismo de *T. howardi* nas pupas, concluindo-se que não ocorre *priming* de lagarta para pupa. Entretanto, o tratamento com injúrias mecânicas perturba o desenvolvimento das lagartas e pupas, resultando em uma taxa menor de parasitismo.

Confinamento dos parentais adultos de *D. saccharalis* com o parasitoide *T. howardi* aumenta a mortalidade da geração F1. Ao avaliar o desenvolvimento de quatro subpopulações de lagartas (F1), cujos parentais tiveram contato prévio com parasitoides na fase adulta, observou-se uma maior taxa de mortalidade no tratamento na F1 do arranjo ♂P x ♀P (~26%) em comparação com as lagartas controle (♂NP x ♀NP) (Tabela 3). Os demais parâmetros avaliados como tempo de desenvolvimento lagarta-pupa, mortalidade de pupas, peso das pupas, razão sexual das pupas, tempo de desenvolvimento lagarta-adulto, não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados. Por fim, o número de adultos viáveis foi significativamente menor (~50%) na geração F1 dos indivíduos do arranjo ♂P x ♀P (Tabela

3) em comparação com o tratamento controle (~87%), ou seja, indivíduos F1 do cruzamento ♂P x ♀P possuem uma taxa menor de sobrevivência. Indivíduos F1 dos tratamentos dos cruzamentos ♂P x ♀NP ou ♂NP x ♀P obtiveram valores intermediários estatisticamente iguais entre si, e iguais a F1 tratamento controle ou a F1 de ♂P x ♀P (Tabela 3).

A expressão dos genes do sistema imune é comprometida em lagartas da geração F1 de *D. saccharalis* cujos parentais foram confinados com *T. howardi*. Para avaliarmos os efeitos da tentativa de *priming* parental com *T. howardi* na expressão dos genes de resposta imune nos insetos da geração F1 de todos os cruzamentos (♂NP x ♀NP, ♂P x ♀NP, ♂NP x ♀P e ♂P x ♀P), lagartas de 3º ínstar foram ou não expostas ao parasitoides por 24 h. Observou-se que não houve diferença significativa para os quatro genes avaliados (*DsDorsal*, *DsSTAT*, *DsPPO1* e *DsPPO2*) em indivíduos F1 oriundos dos quatro cruzamentos (Figura 3a) que não foram expostas ao parasitoide. Entretanto, quando as lagartas foram expostas ao parasitoide, houve uma redução na expressão dos genes *DsDorsal*, *DsSTAT*, *DsPPO1* na F1 de ♂P x ♀P em comparação com ♂NP x ♀NP e ♂NP x ♀P, do gene *DsPPO2* em ♂P x ♀P comparados com os outros três tratamentos (Figura 3b). Isto demonstra que o efeito cumulativo do tratamento dos parentais machos e fêmeas, resultam no maior comprometimento da expressão dos genes de defesa na descendência.

A geração F1 cujos parentais foram confinados com *T. howardi* são mais suscetíveis ao parasitoide.

A partir dos resultados anteriores, neste experimento utilizou-se apenas lagartas da geração F1 dos cruzamentos ♂NP x ♀NP e ♂P x ♀P. As lagartas de *D. saccharalis* raramente são parasitadas por *T. howardi*. Porém, na geração F1 de ♂P x ♀P, aproximadamente 27 % das lagartas morreram, com 22 % de lagartas com emergência de parasitoides (Tabela 4). Enquanto nas lagartas F1 de ♂NP x ♀NP (controle) os valores foram 5 % para mortalidade e 2,5 % para parasitismo (Tabela 4). Também foi

avaliado o desenvolvimento das lagartas sobreviventes. Não se observou diferença entre os tratamentos no tempo de desenvolvimento lagarta-pupa, porém quando a pupas fêmeas F1 do cruzamento ♂P x ♀P foram significativamente mais leves do que as do cruzamento ♂NP x ♀NP (Tabela 4).

Aparentemente, o aumento de susceptibilidade é específico para o parasitoide. Ao testarmos as lagartas de F1 de ambas as populações injetadas com conídios de *Metarhizium anisopliae*, ambos tratamentos obtiveram curvas de sobrevivência semelhantes (Figura 4).

Discussão

O priming imunológico ocorre em diversos insetos, geralmente induzido por microrganismos (Tidbury *et al.* 2011, Wu *et al.* 2016). Este estudo investigou o fenômeno de priming imunológico em *Diatraea saccharalis* induzido pelo parasitoide *Tetrastichus howardi*. Embora se esperasse que as pupas expostas ao parasitoide na fase de lagarta fossem mais tolerantes ao parasitismo, os resultados mostraram que a porcentagem de pupas parasitadas e a sobrevivência de adultos viáveis foram semelhantes aos do grupo controle. Além disso, avaliou-se o desempenho do parasitoide nas pupas tratadas, mas não foram observadas mudanças no tempo de desenvolvimento nem no número de parasitoides emergidos em comparação com o grupo controle. Assim, o priming imunológico não parece ter um efeito significativo na tolerância das pupas de *D. saccharalis* ao parasitismo pelo *T. howardi*.

Os resultados obtidos neste estudo para o sistema hospedeiro-parasitoide diferem daqueles encontrados em sistemas hospedeiro-microrganismo. Outros lepidópteros como *G. mellonella*, *Bombyx mori* (Linnaeus) (Bombycidae), *Plodia interpunctella* (Hübner) (Pyralidae), *M. sexta* e *Trichoplusia ni* (Hübner) (Noctuidae), apresentaram respostas imunes celulares e humorais elevadas em uma segunda infecção por fungo, bactéria ou vírus (Bergin *et al.* 2006, Tidbury *et al.* 2011, Wu *et al.* 2015, Wu *et al.* 2016, Huang *et al.* 2020, Vertyporokh & Wojda 2020, Roesel *et al.* 2020, Shikano *et al.* 2016). Mas isso não é regra, pois resultados variados podem ocorrer até mesmo na mesma espécie. Em *Drosophila*,

indivíduos que sofreram *priming* com dose subletal de *Streptococcus pneumoniae* (Villemin) (bactéria Gram-positiva), sobreviveram a uma injeção secundária com uma dose potencialmente letal do patógeno (Pham *et al.* 2007). No entanto, a exposição anterior a um vírus de RNA ou às bactérias *Photorhabdus luminescens* (Boemare) e *Photorhabdus asymbiotica* (Gerritsen) não proporcionou proteção contra infecções subsequentes (Longdon *et al.* 2013, Patnogić *et al.* 2018). Em *D. saccharalis*, Reis *et al.* (Capítulo 2) identificaram que os genes do sistema imune são ativados durante as tentativas de parasitismo de *T. howardi* em lagartas, porém o mesmo não acontece com a pupa. Essa diferença de expressão nos genes do sistema imune em pupas comparadas com lagartas pode ser uma das causas de não ocorrer *priming* de lagartas para pupas em *D. saccharalis*. Porém, variações podem ocorrer dependendo da espécie de parasitoide, pois Vogelweith *et al.* (2017) demonstrou que larvas de 4º ínstar de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) que foram expostas ao parasitoide *Campoplex capitator* (Fabricius) (Hymenoptera: Ichneumonidae) não apresentaram aumento da concentração de hemócitos, nem da atividade de fenoloxidase, concluindo que não há ajuste imune em resposta ao parasitoide. Esses achados sugerem que o *priming* imunológico pode variar consideravelmente devido a espécie de inseto, o tipo de organismo parasita/patogênico, e até mesmo a forma de infecção.

Verificou-se que nos testes com injúrias mecânicas ocorreu a redução da porcentagem de pupas parasitadas e aumento da taxa de emergência de mariposas, elevando as chances de sobrevivência desses indivíduos. Apesar de estudos comprovarem que as injúrias mecânicas também são capazes de ativar os sistemas de defesa de insetos (Márkus *et al.* 2005, Krautz *et al.* 2014, Huse 2017), provavelmente o que aconteceu foi que as lagartas aceleraram o desenvolvimento como forma de defesa não imunológica (Vogelweith *et al.* 2013), dessincronizando parcialmente o ciclo de desenvolvimento do hospedeiro e do parasitoide.

Em um segundo momento, testamos o *priming* transgeracional. Os resultados indicam que o *priming* transgeracional não ocorreu nas lagartas (F1), independentemente de os pais terem sido confinados com o parasitoide. Lagartas oriundas de pais expostos ao parasitoide individualmente apresentaram um desenvolvimento semelhante ao de lagartas de pais não expostos, sem custos adaptativos aparentes. No entanto, quando ambos os pais foram expostos ao parasitoide, houve um aumento significativo na mortalidade da prole, especialmente nos ínstares iniciais, com uma redução de ~50% na viabilidade dos adultos. Apesar dessa mortalidade inicial, as lagartas que sobreviveram completaram o ciclo normalmente. A expressão dos genes do sistema imunológico não mostrou diferenças significativas entre as proles dos diferentes cruzamentos. Contudo, ao serem desafiadas com o parasitoide, as lagartas descendentes de pais expostos individualmente apresentaram maior mortalidade e parasitismo, coincidente com uma menor expressão dos genes de defesa.

O *priming* imunológico transgeracional é uma resposta adaptativa que pode ser transmitida para a prole tanto pela mãe quanto pelo pai, entretanto, a contribuição de cada progenitor pode diferir (Gegner *et al.* 2019, Tetreau *et al.* 2019). Estudos sobre o *priming* transgeracional demonstram resultados bastante variados. Em *M. sexta* observou-se que a prole de pais tratados com peptidoglicano (PGN) na fase larval apresentou maior atividade de fenoxidase e atividade antibacteriana (Trauer & Hilker 2013). Ainda em *M. sexta*, os ovos oriundos de pais injetados com PGN de *Micrococcus luteus* (Wiesner) na fase de pupa demonstraram melhor eficiência na defesa contra o parasitismo de *T. evanescens*. Os ovos imunizados suprimiram o desenvolvimento do parasitoide e a taxa de emergência de forma mais eficiente do que os ovos de pais não estimulados (Trauer-Kizilelma & Hilker 2015). Além disso, os padrões de expressão gênica em descendentes de *M. sexta* cujas mães foram expostas na fase de pupa à bactéria *Serratia marcescens* (Bizio), tanto viva quanto inativada por calor, demonstraram impactos significativos na regulação positiva da proteína de reconhecimento de peptidoglicano, do receptor toll-like 9 e do peptídeo antimicrobiano cecropina (Roesel *et al.* 2020). Mas, nem sempre o resultado é positivo. Em *Culex pipiens*

(Linnaeus) (Diptera: Culicidae) a prole oriunda de mãe infectada por *Plasmodium relictum* (Grassi & Feletti) não apresentou proteção contra a infecção do protozoário, mas sim custos, como a alteração na fecundidade que resultou em uma perda três vezes maior na prole infectada proveniente de mães infectadas do que na prole infectada proveniente de mães não infectadas (Pigeault *et al.* 2015).

No caso de *priming* transgeracional induzido por parasitoides, o principal relato até o momento aconteceu em *D. melanogaster*. Quando a geração parental (adultos) foi exposta ao endoparasitoide *Leptopilina heterotoma* (Thomson) (Hymenoptera: Figitidae), a prole apresentou produção acelerada de lamelócitos, o que se correlaciona com o aumento na taxa de sobrevivência após parasitismo, conferindo maior proteção a prole contra parasitoides (Bozler *et al.* 2020). Porém, este não foi o caso de *D. saccharalis* e *T. howardi*, onde em experimento semelhante ao de Bozler *et al.* (2020), verificamos o efeito contrário, não só não houve proteção da prole, como os insetos ficaram mais suscetíveis ao parasitoide. Além do aumento da susceptibilidade, as lagartas fêmeas sobreviventes tiveram peso reduzido após a metamorfose.

Segundo Gegner *et al.* (2019), o efeito do *priming* transgeracional pode ser específico, ou seja, a prole pode apresentar resposta imune aprimorada contra determinados patógenos, mas não todos. Em *M. sexta*, observou-se que o efeito na imunidade da prole depende do tipo de bactéria encontrada pelos parentais. De forma semelhante, em *D. saccharalis*, verificamos que a redução da resposta imune na prole de parentais confinados com *T. howardi* são específicas para o parasitoide. Isso ficou evidenciado pelo fato de que a prole de parentais confinados com *T. howardi*, quando desafiados com o fungo *M. anisopliae*, apresentou tempo de sobrevivência similar a prole de parentais que não foram confinados com o parasitoide.

Um ponto a ser abordado é que apesar da existência de diversos estudos sobre memória imunológica em insetos, há grandes diferenças metodológicas entre eles (Tetreau *et al.* 2019). Essas diferenças incluem o organismo utilizado, a fase de desenvolvimento em que o *priming* é aplicado, e o

uso de patógenos não-naturais antes da aplicação de um patógeno específico para insetos, seja vivo ou inativado. Além disso, a forma de infecção (oral, injeção ou aspersão) varia, dificultando a afirmação conclusiva sobre a ocorrência de *priming* em determinadas espécies. Isso pode ser uma das razões de resultados variados em diferentes insetos.

Portanto, neste trabalho, demonstrou-se que, mesmo na ausência de parasitismo direto do adulto de *Diatraea saccharalis* pelo parasitoide, o mero confinamento entre eles não resultou em *priming* da prole, além de afetar negativamente parâmetros imunológicos e biológicos. Esse resultado sugere novas possibilidades para o controle da praga. No entanto, para aplicar essa estratégia, é crucial entender como o inseto adulto percebe o parasitoide, seja por contato direto ou por sinais químicos. Em *Drosophila*, a percepção é mediada por contato visual (Kacsoh *et al.* 2013), mas essa hipótese é improvável para *D. saccharalis*, que tem hábitos noturnos. Se a percepção for baseada em sinais químicos, será necessário identificar as moléculas envolvidas e, potencialmente, sintetizá-las para testar se produzem efeitos semelhantes aos do parasitoide. Novos estudos são necessários para identificar as moléculas sinalizadoras e esclarecer esses mecanismos.

Neste trabalho relatou-se que o parasitoide *T. howardi* não induz *priming* imunológico em *D. saccharalis*, seja intra- ou transgeracional. Além disso, a tentativa de *priming* transgeracional em adultos resultou em uma prole com maior susceptibilidade ao parasitoide e com custos no seu desenvolvimento, o contrário do esperado. Até onde sabemos, este é o primeiro caso de efeito negativo na prole de um lepidóptero em tentativa de *priming* transgeracional com parasitoide. Estes resultados contribuem para elucidar um pouco mais sobre o *priming* imunológico induzido por parasitoides, e abrem novas perspectivas de aplicação deste conhecimento no controle de pragas.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

- Ali Mohammadie Kojour, M., Han, Y. S & Jo, Y. H. 2020.** An overview of insect innate immunity. *Entomol. Res.*, 506, 282-291.doi. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12437>
- Arala-Chaves, M & Sequeira, T. 2000.** Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates?. *Aquac. Res.*, 1911-3, 247-258.doi. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00430-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00430-0)
- Araújo, J. R., Botelho, P. S. M., Araújo, S. M. S. S., Almeida, L. C., & Degaspari, N. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC.* 36. 45-48.
- Armitage, S. A., Broch, J. F., Marín, H. F., Nash, D. R., & Boomsma, J. J. 2011.** Immune defense in leaf-cutting ants: a cross-fostering approach. *Evolution*, 65(6), 1791-1799. doi. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01241.x>
- Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., & Kavanagh, K. 2006.** Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect.*, 8(8), 2105-2112. doi. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.005>
- Boraschi, D., & Italiani, P. 2018.** Innate immune memory: time for adopting a correct terminology. *Frontiers in immunology*, 9, 799. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00799>
- Bozler, J., Kacsoh, B. Z., & Bosco, G. 2020.** Maternal priming of offspring immune system in *Drosophila*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(1), 165-175. doi. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400852>
- Contreras-Garduño, J., Lanz-mendoza, H. U. M. B. E. R. T. O., Franco, B., Nava, A., PEDRAZA-REYES, M. A. R. I. O & Canales-Lazcano, J. O. R. G. E. 2016.** Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol. Entomol.*, 414, 351-366.doi. <https://doi.org/10.1111/een.12300>
- Dhinaut, J., Chogne, M & Moret, Y. 2018.** Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *J. Anim. Ecol.*, 872, 448-463. doi. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661>.
- Dunn, Peter E. 1986.** Aspectos bioquímicos da imunologia de insetos. *Revista anual de entomologia*, v. 31, n. 1, pág. 321-339.

- Eggleton, P. 2020.** The state of the world's insects. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 45, 61-82.doi. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012420-050035>
- Gegner, J., Baudach, A., Mukherjee, K., Halitschke, R., Vogel, H., & Vilcinskas, A. 2019.** Epigenetic mechanisms are involved in sex-specific trans-generational immune priming in the lepidopteran model host *Manduca sexta*. *Front. Physiol.*, 10, 428383. doi. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00137>
- Huang, X. W., Xu, M. N., Zheng, H. X., Wang, M. L., Li, L., Zeng, K., & Li, D. D. 2020.** Pre-exposure to *Candida glabrata* protects *Galleria mellonella* against subsequent lethal fungal infections. *Virulence*, 11(1), 1674-1684. doi. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1848107>
- Huse, M. 2017.** Mechanical forces in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 17(11), 679-690. doi. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.74>
- Kacsoh, B. Z., Lynch, Z. R., Mortimer, N. T., & Schlenke, T. A. 2013.** Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*, 339(6122), 947-950. doi. <https://doi.org/10.1126/science.1229625>
- Krautz, R., Arefin, B., & Theopold, U. 2014.** Damage signals in the insect immune response. *Front. Plant Sci.*, 5, 103421. doi. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>
- Kurtz, J. 2005.** Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.*, 264, 186-192.doi. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 3210, 1295-1309. doi. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Little, T. J & Kraaijeveld, A. R. 2004.** Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.*, 192, 58-60. doi. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011>
- Longdon, B., Cao, C., Martinez, J., & Jiggins, F. M. 2013.** Previous exposure to an RNA virus does not protect against subsequent infection in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 8(9), e73833.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073833>
- Márkus, R., Kurucz, É., Rus, F., & Andó, I. 2005.** Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Lett.*, 101(1), 108-111. doi. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.03.021>
- Milutinović, B., Peuß, R., Ferro, K., & Kurtz, J. 2016.** Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, 119(4), 254-261. doi. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.03.006>
- Patrnogic, J., Castillo, J. C., Shokal, U., Yadav, S., Kenney, E., Heryanto, C., ... & Eleftherianos, I. 2018.** Pre-exposure to non-pathogenic bacteria does not protect *Drosophila* against the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus*. *PLoS One*, 13(10), e0205256. doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205256>

- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. 2007.** A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. PLoS Pathog., 3(3), e26. doi. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>
- Pigeault, R., Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., & Rivero, A. 2015.** Transgenerational effect of infection in Plasmodium-infected mosquitoes. Biol. Lett., 11(3), 20141025. doi. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.1025>
- Rancurel, C., Van Tran, T., Elie, C., & Hilliou, F. 2019.** SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. Mol Cell Probes, 46, 101418. doi. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.07.001>
- Rauw, W. M. 2012.** Immune response from a resource allocation perspective. Front. Genet., 3, 267. doi. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00267>
- Roesel, C. L., Rosengaus, R. B., Smith, W., & Vollmer, S. V. 2020.** Transcriptomics reveals specific molecular mechanisms underlying transgenerational immunity in *Manduca sexta*. Ecol. Evol., 10(20), 11251-11261. ISSN 1317-5262. doi. <https://doi.org/10.1002/ece3.6764>
- Sadd, B. M & Schmid-Hempel, P. 2006.** Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. Curr Biol, 1612, 1206-1210. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Sadd, B. M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. 2005.** Trans-generational immune priming in a social insect. Biol. Lett., 1(4), 386-388. doi. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0369>
- Schmid-Hempel, P. 2005a.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol., 50, 529-551. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>
- Schmid-Hempel, P. 2005b.** Natural insect host–parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. Bioessays, 2710, 1026-1034. doi. <https://doi.org/10.1002/bies.20282>
- Schulz, N. K., Sell, M. P., Ferro, K., Kleinhölting, N., & Kurtz, J. 2019.** Transgenerational developmental effects of immune priming in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Front. Physiol., 10, 98. doi. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00098>
- Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., & Wolfner, M. F. 2016.** Reproduction–immunity trade-offs in insects. Annu. Rev. Entomol., 61, 239-256. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023924>
- Scudder, G. G. 2017.** The importance of insects. Insect Biodivers.: science and society, 9-43. doi. <https://doi.org/10.1002/9781118945568.ch2>
- Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. 2020.** Immune priming: the secret weapon of the insect world. Virulence, 111, 238-246. doi. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137>

- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M & Kavanagh, K. 2018.** Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences?. *Virulence*, 91, 1625-1639. doi. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>
- Shikano, I., Hua, K. N., & Cory, J. S. 2016.** Baculovirus-challenge and poor nutrition inflict within-generation fitness costs without triggering transgenerational immune priming. *J. Invertebr. Pathol.*, 136, 35-42.
- Spiering, M. J. 2015.** Primer on the immune system. *Alcohol research: current reviews*, 37(2), 171.
- Stokes, B. A., Yadav, S., Shokal, U., Smith, L. C & Eleftherianos, I. 2015.** Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front. Microbiol.*, 6, 19. doi. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00019>
- Stork, N. E. 2018.** How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? Annual review of entomology, 63, 31-45. doi. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.*, 15(1), 1-14. doi. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Galinier, R., Audant-Lacour, P., Voisin, S. N., Arafah, K., & Gourbal, B. 2020.** Deciphering the molecular mechanisms of mother-to-egg immune protection in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *PLoS Pathog.*, 16(10), e1008935. doi. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008935>
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B., & Moret, Y. 2019.** Trans-generational immune priming in invertebrates: current knowledge and future prospects. *Front. Immunol.*, 10, 473922. doi. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01938>
- Tidbury, H. J., Pedersen, A. B., & Boots, M. 2011.** Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.*, 278(1707), 871-876. doi. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>
- Trauer, U., & Hilker, M. 2013.** Parental legacy in insects: variation of transgenerational immune priming during offspring development. *PLoS One*, 8(5), e63392. doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063392>
- Trauer-Kizilelma, U., & Hilker, M. 2015.** Impact of transgenerational immune priming on the defence of insect eggs against parasitism. *Dev Comp Immunol.*, 51(1), 126-133. doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.004>
- Tsakas, S., & Marmaras, V. J. 2010.** Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebr. Surv. J.*, 72, 228-238. ISSN 1824-307X
- Vargas, E. L., Pereira, F. F., Tavares, M. T., & Pastori, P. L. 2011.** Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. *Entomotropica*, 26(3), 143-146. ISSN 1317-5262

- Vertyporokh, L., & Wojda, I. 2020.** Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. J. Invertebr. Pathol., 170, 107327.doi. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107327>
- Vilcinskas, A. 2021.** Mechanisms of transgenerational immune priming in insects. Dev Comp Immunol., 124, 104205.doi. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104205>
- Vogelweith, F., Moret, Y., Thiery, D., & Moreau, J. 2013.** *Lobesia botrana* larvae develop faster in the presence of parasitoids. PLoS One, 8(8), e72568.doi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072568>
- Vogelweith, F., Moret, Y., Thiéry, D., Delbac, L., & Moreau, J. 2017.** No evidence of an immune adjustment in response to a parasitoid threat in *Lobesia botrana* larvae. J. Insect Physiol., 102, 7-11.doi. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.010>
- Wu, G., Li, M., Liu, Y., Ding, Y., & Yi, Y. 2015.** The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. J. Insect Physiol., 81, 60-68.doi. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.004>
- Wu, G., Xu, L., & Yi, Y. 2016.** *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses. Immunol. Lett., 174, 45-52.doi. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.04.013>

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

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>DsDorsal</i>	Dsac_Dorsal_Fw	CAGAAAGTCAGCCGCAGAGTAT
	Dsac_Dorsal_Rv	ACGATCGGTTGTAGTGCACAT
<i>DsSTAT</i>	Dsac_Stat_Fw	GTATCACTATCGCCTGGGTCG
	Dsac_Stat_Rv	AGCTGAGGGAGATCCAAGACT
<i>DsGAPDH</i>	Dsac_GAPDH_Fw	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG
	Dsac_GAPDH_Rv	GTTGTCATTGAGTGAGATACCG
<i>DsRPS10</i>	Dsac_RPS10_Fw	TGATCGCTTCAGTGTTGCTG
	Dsac_RPS10_Rv	TCTCAAATCCAGGGGTTACG
<i>DsPPO1</i>	Dsac_PPO1_Fw	CAGCACGACGAGTTCCAATAC
	Dsac_PPO1_Rv	GTTCAAGTGGCTGCGAGAACT
<i>DsPPO2</i>	Dsac_PPO2_Fw	ACGACAGGCCAATATGAGATG
	Dsac_PPO2_Rv	GTCGATAGTCAGTGGCATGGT

Tabela 2. Parâmetros biológicos de lagartas e pupas de *Diatraea saccharalis* após tentativa de *priming* imunológico em lagartas de 4º ínstar incubadas com o parasitoide *Tetrastichus howardi* por 48 h. O segundo momento de parasitismo foi em pupas com 1 d, com os parasitoides permanecendo em contato por 24 h.

<i>Priming</i> em lagartas	Lagartas controle	Lagartas <i>primed</i> com <i>T. howardi</i>	Lagartas submetidas a injúria mecânica	Teste Estatístico	Resultados
Nº inicial de lagartas	29	29	29	x	x
Mortalidade de lagartas (%)	0,00 ± 0,00 a	17,41 ± 3,76* a	0,00 ± 0,00 a	Kruskal-Wallis	H=7,624; GL= 2; P=0,071
Lagartas vivas que não empuparam (%)	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	13,33 ± 8,82 a	Kruskal-Wallis	H=4,500; GL= 2; P=0,361
Nº inicial de pupas	29	24	25	x	x
Porcentagem de pupas parasitadas (%)	96,30 ± 2,62 a	95,24 ± 3,37 a	67,20 ± 4,22 b	Anova; Tukey test	F_{2,6}=11,358; P=0,009
Porcentagem de pupas parasitadas com emergência de parasitoides (%)	86,67 ± 9,43 a	100,00 ± 0,00 a	94,44 ± 3,93 a	Anova	F _{2,6} =0,645; P=0,558
Tempo de desenvolvimento do parasitoide (d)	17,25 ± 1,04 a	16,52 ± 1,00 a	16,81 ± 1,02 a	Kruskal-Wallis	H=0,041; GL= 2; P=0,980
Nº de progênie do parasitoide por pupa	81,50 ± 11,68 a	70,83 ± 11,00 a	66,44 ± 13,12 a	Kruskal-Wallis	H=0,779; GL= 2; P=0,678
Razão sexual	0,87 ± 0,04 a	0,91 ± 0,01 a	0,90 ± 0,02 a	Kruskal-Wallis	H=0,212; GL= 2; P=0,899
Sobrevivência total – adultos viáveis de <i>Diatraea saccharalis</i> (%)	3,70 ± 3,70 a	3,70 ± 3,70 a	27,77 ± 4,00 b	Anova; Tukey test	F_{2,6}=13,331; P=0,006

Tabela 3. Parâmetros biológicos de lagartas da geração F1 de *Diatraea saccharalis* cujos parentais sofreram tentativa de *priming* imunológico na fase adulta com o parasitoide *Tetrastichus howardi*.

Biologia de larvas F1 de Parentais Adultos <i>primed</i>	Machos e Fêmeas não- <i>primed</i>	Machos <i>Primed</i>	Fêmeas <i>Primed</i>	Machos e Fêmeas <i>Primed</i>	Teste Estatístico	Resultados
Mortalidade de lagartas (%)	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	10,02 ± 4,09 ab	26,66 ± 4,07 b	Kruskal-Wallis; teste de Tukey	H=15,055, GL=3, P=0,002
Tempo de desenvolvimento lagarta-pupa (dias)	20,27 ± 0,080 a	20,07 ± 0,45 a	21,13 ± 0,82 a	20,44 ± 1,09 a	Kruskal-Wallis	H=0,987, GL= 3, P=0,804
Mortalidade de pupas (%)	13,32 ± 8,16 a	26,68 ± 6,66 a	18,68 ± 10,98 a	27,00 ± 3,39 a	Kruskal-Wallis	H=3,112, GL= 3, P=0,375
Peso das pupas (mg)	149,00 ± 4,50 a	129,00 ± 9,00 a	142,00 ± 11,00 a	128,00 ± 4,00 a	Anova	F _{3,16} =1,734, P=0,200
Razão sexual	0,60 ± 0,08 a	0,45 ± 0,08 a	0,59 ± 0,07 a	0,56 ± 0,08 a	Anova	F _{3,16} =0,913, P=0,457
Tempo de desenvolvimento lagarta-adulto (dias)	29,37 ± 1,32 a	27,87 ± 0,59 a	29,26 ± 0,46 a	27,92 ± 0,53 a	Anova	F _{3,16} =1,047, P=0,399
Adultos viáveis (%)	86,68 ± 8,16 a	76,32 ± 6,66 ab	73,33 ± 12,02 ab	53,34 ± 3,34 b	Kruskal-Wallis; teste de Tukey	H=8,607, GL= 3, P=0,035

Tabela 4. Parâmetros biológicos e de parasitismo de lagartas da geração F1 de *Diatraea saccharalis* cujos parentais sofreram tentativa de *priming* imunológico na fase adulta com o parasitoide *Tetrastichus howardi*. As lagartas foram desafiadas ou não (controle) no 3ª instar com o parasitoide.

Biologia e Parasitismo de lagartas	F1 de parentais não-primed	F1 de parentais primed	Teste Estatístico	Resultados
Mortalidade de lagartas (%)	5,00 ± 2,88	27,50 ± 8,54	Teste t	t = -2,496; GL = 6; P = 0,047
Lagartas parasitadas (%)	2,50 ± 2,50	22,50 ± 6,29	Teste t	t = -2,954; GL = 6; P = 0,025
Tempo de desenvolvimento lagarta-pupa (dias)	23,95 ± 0,28	23,78 ± 0,68	Teste t	t = 0,281; GL = 65; P = 0,780
Peso pupas machos (mg)	108,00 ± 2,79	98,90 ± 4,11	Mann-Whitney	U=174,000; T=364,000; P = 0,063
Peso pupas fêmeas (mg)	167,00 ± 8,57	143,00 ± 5,97	Teste t	t = 2,298; GL = 18; P = 0,034

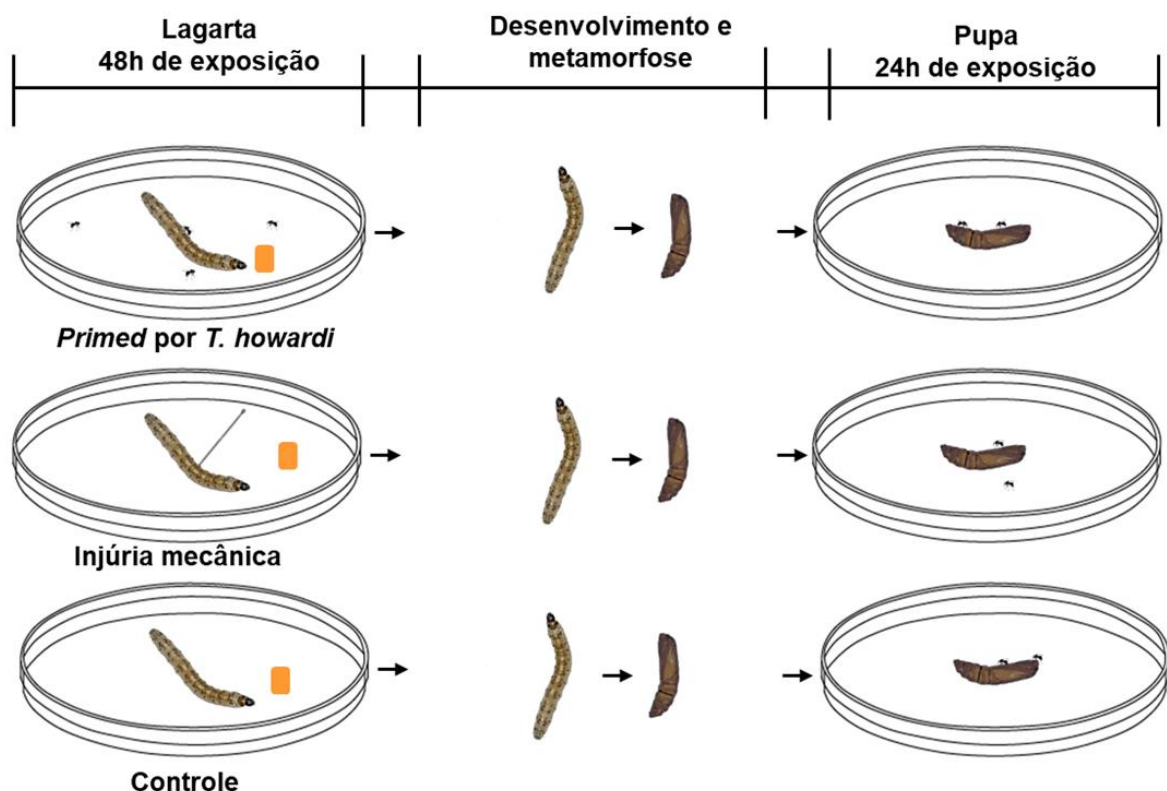


Figura 1. Esquema do experimento de tentativa de *priming* intrageracional em *Diatraea saccharalis* induzido por *Tetrastichus howardi*. Foram realizados três tratamentos. No primeiro as lagartas de 4^o ínstar, de forma individualizada, foram confinadas com 4 fêmeas de *T. howardi* por 48 h. Em seguida, os parasitoides foram removidos da placa e permitiu-se o desenvolvimento das lagartas até a fase de pupa. Vinte quatro horas após a metamorfose, as pupas, de forma individual, foram confinadas com duas fêmeas de *T. howardi*. Após o período de confinamento, os parasitoides foram retirados da placa, e a pupa observada diariamente até a emergência dos parasitoides. Nos outros dois tratamentos o experimento foi feito de forma semelhante, diferindo apenas na parte inicial. No tratamento de injúria mecânica, as lagartas eram perfuradas brevemente com um alfinete entomológico estéril para simular o efeito do ovipositor do parasitoide. No tratamento controle as lagartas não sofreram nenhuma intervenção. Neste experimento foram analisados diversos parâmetros biológicos do hospedeiro e do parasitoide.

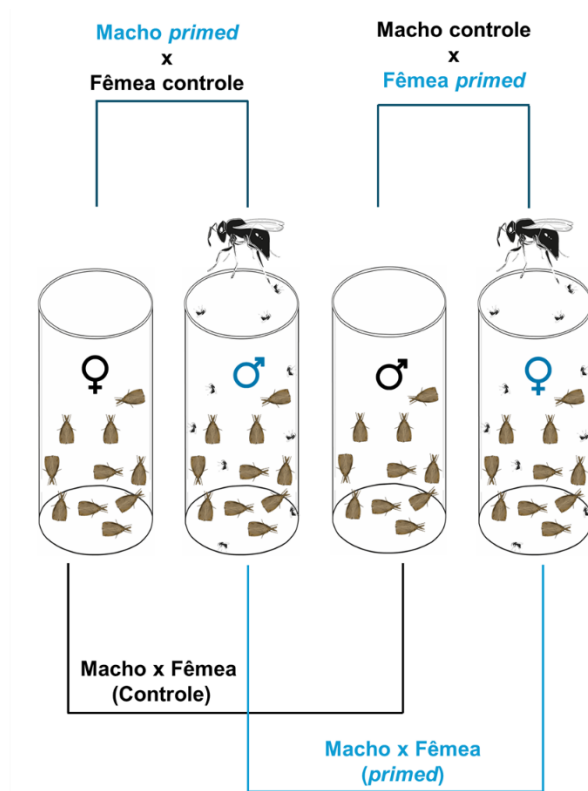


Figura 2. Esquema do experimento de tentativa de *priming* transgeracional em adultos de *Diatraea saccharalis* induzido por *Tetrastichus howardi*. Machos ou fêmeas de *D. saccharalis* foram confinados com o parasitoide por 24 h. Após este período, foram formados casais nas quatro possibilidades existentes e os ovos de cada cruzamento foram coletados por 7 dias. Após a eclosão das lagartas, o desenvolvimento dos insetos foi acompanhado até a fase de emergência dos adultos, para a análise de diversos parâmetros biológicos conforme descrito nos materiais e métodos.

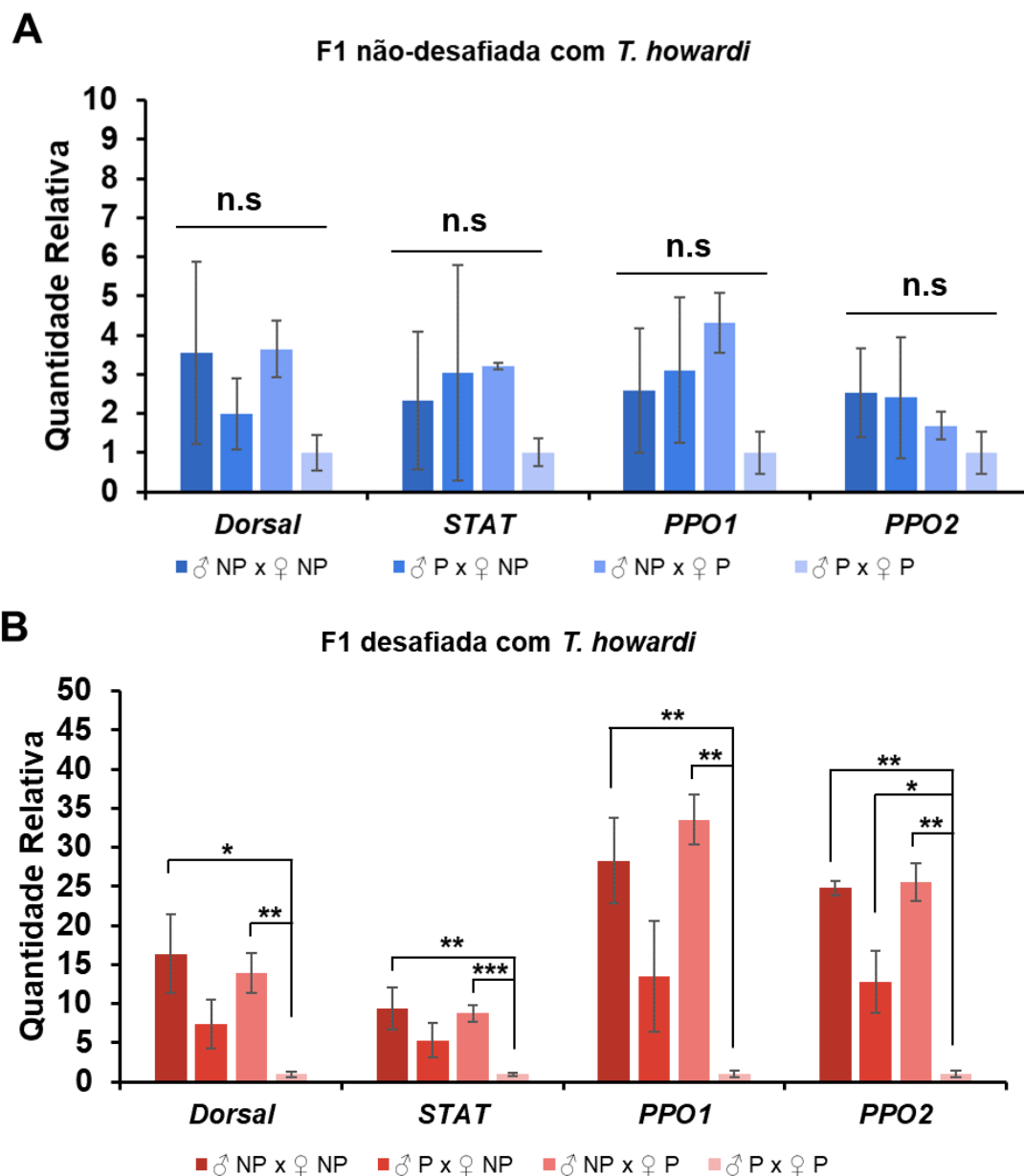


Figura 3. Análise da expressão de genes do sistema imune humoral de *Diatraea saccharalis* em larvas de 3º ínstar desafiadas ou não com o parasitoide *Tetrastichus howardi*. **(A)** Larvas F1 quando não-desafiadas com *T. howardi*. **(B)** Larvas F1 desafiadas com *T. howardi*. As larvas são oriundas de diferentes tratamentos na geração parental, quando nenhum (♂ NP x ♀ NP), ou apenas machos (♂ P x ♀ NP), ou apenas fêmeas (♂ NP x ♀ P), ou machos e fêmeas (♂ P x ♀ P) foram confinados com o parasitoide por 24 h. P significa “primed”; NP significa “não primed”. Os dados de expressão foram analisados por teste t com o software SATqPCR. n.s.: não significativo; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

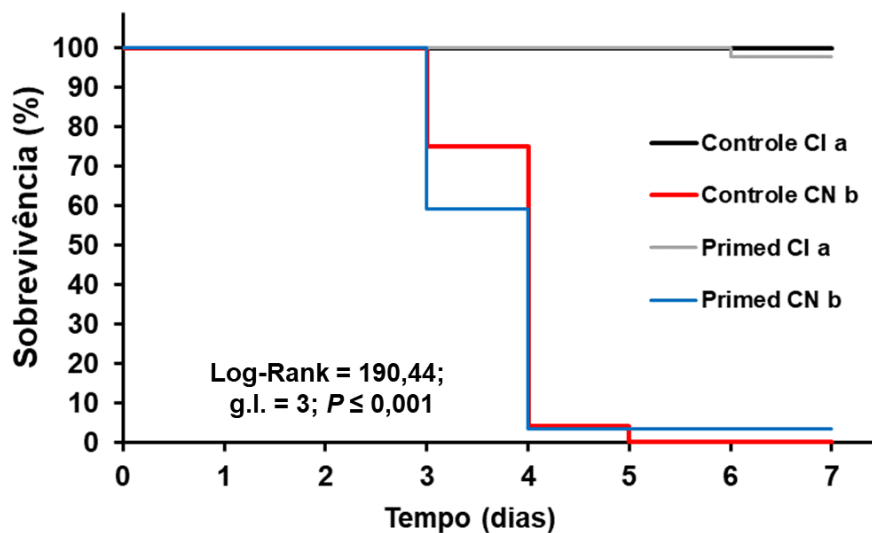


Figura 4. Sobrevivência após injeção de 1×10^3 conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em larvas de 4º ínstar de *Diatraea saccharalis*, cujos pais na fase adulta foram confinados com o parasitoide *Tetrastichus howardi* por 24 h. Como controle do experimento com *M. anisopliae* foi utilizado conídios inativados por calor. CI – conídios inativados, CN – conídios normais, *Primed* – tratamento onde a geração parental foi confinada por 24 h na presença do parasitoide (*priming*). Controle - tratamento onde a geração parental não foi confinada com o parasitoide. Curvas de sobrevivência seguidas pela mesma letra não diferem entre si após análise de Log-Rank e Teste de Holm-Sidak ($P \leq 0,05$)

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese investigou de maneira direcionada e inovadora o sistema imunológico de *Diatraea saccharalis* (Guenée), a praga mais importante da cana-de-açúcar no Brasil. Organizada em quatro capítulos, o primeiro foi destinado a uma revisão bibliográfica, enquanto os três capítulos restantes mostraram os dados experimentais. Cada capítulo trouxe contribuições significativas acerca do tema, permitindo uma caracterização mais aprofundada do sistema imunológico de *D. saccharalis*.

No primeiro capítulo, foi elaborada uma revisão bibliográfica, abordando diversos elementos do sistema imunológico, como vias de sinalização, peptídeos antimicrobianos de insetos e *priming* imunológico. Explorou-se como essas vias de sinalização são cruciais para a resposta imune dos insetos, destacou-se a identificação, caracterização e ação dos peptídeos antimicrobianos que combatem patógenos e a importância do *priming* imunológico para a memória imunológica dos insetos. Esse capítulo tentou estabelecer as bases teóricas e contextuais necessárias para a compreensão dos capítulos subsequentes.

O segundo capítulo concentrou-se na identificação e caracterização das vias do sistema imune humoral em *D. saccharalis*, que são bem caracterizadas em *Drosophila* como Toll, IMD e JAK/STAT, além da via da melaninização (fenoloxidase) que é bem caracterizada em detalhes em *Manduca sexta* (Linnaeus). Estas vias desempenham papéis específicos na resposta do inseto contra diferentes tipos de infecções por patógenos e parasitoides. Analisamos a expressão de genes chave de cada via (*DsDorsal*, *DsRelish*, *DsSTAT*, *PPO1* e *PPO2*) durante a interação com diferentes agentes de controle biológico. Os resultados revelaram padrões distintos de expressão gênica em resposta às interações com fungos,

bactérias e parasitoides, oferecendo percepções importantes sobre a modulação dos genes de defesa do inseto durante interações naturais. Essas descobertas não apenas ampliam o entendimento da dinâmica da expressão gênica de *D. saccharalis*, mas também têm o potencial de informar e aprimorar estratégias de controle biológico. Ao identificar como esses agentes afetam genes específicos como *DsDorsal*, *DsRelish* e *DsSTAT*, nosso estudo abre novas possibilidades para o desenvolvimento de métodos mais eficazes e sustentáveis para o manejo integrado de pragas agrícolas. Além disso, identificamos que uma das razões prováveis do parasitoide *Tetrastichus howardi* (Crawford) não ser eficiente em parasitar lagartas de *D. saccharalis* é a resposta imune do inseto.

No terceiro capítulo, investigou-se o produto das vias de sinalização, a identificação de AMPs (peptídeos antimicrobianos) em brocas da cana-de-açúcar, especificamente em *D. saccharalis*, *Diatraea impersonatella* (Guenée) e *Telchin licus licus* (Guenée). Através da análise dos transcritomas das três espécies e do genoma de *D. saccharalis*, foram identificados e caracterizados seis tipos distintos de AMPs. Em seguida, focou-se especialmente no AMP lebecina (*DsLeb*), um AMP específico de Lepidoptera, cuja expressão foi investigada em *D. saccharalis* sob diferentes condições. Observamos que ao se alimentar de cana-de-açúcar as lagartas aumentavam a expressão de *DsLeb*, com maior indução na cabeça das lagartas. Esse padrão também foi evidente em lagartas expostas a *Bacillus thuringiensis* (Berliner), onde ocorreu maior indução na cabeça e na carcaça (que contém a hemolinfa e corpos gordurosos), e não no intestino como se esperava.

Por fim, no quarto capítulo, buscou-se estimular o *priming* imunológico em *D. saccharalis*, um fenômeno que intensifica a resposta imune contra um patógeno ou parasita após exposição prévia. Avaliamos o *priming* intra e transgeracional induzido pelo parasitoide *T. howardi*, analisando desenvolvimento, sobrevivência e expressão de genes do sistema imune como *Dorsal*, *STAT*, *PPO1* e *PPO2*. Nossos resultados indicaram que o *priming* não é induzido em *D. saccharalis* por *T. howardi*, nem intra nem transgeracionalmente. Entretanto, na tentativa de *priming* transgeracional, observou-se

uma maior taxa de mortalidade e parasitismo em lagartas expostas ao parasitoide cujos pais foram confinados com o parasitoide. Esta maior taxa de parasitismo provavelmente é devida a uma regulação negativa dos genes do sistema imune. A maior susceptibilidade foi observada especificamente para *T. howardi*, evidenciando a complexidade do sistema imunológico dos insetos.

Uma melhor compreensão do sistema imunológico dos insetos, especialmente em espécies não-modelo com importância econômica, é fundamental para o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliem no manejo de pragas. Os dados gerados nesta tese não só ampliam nosso conhecimento sobre os mecanismos de defesa de *D. saccharalis*, mas também promovem avanços significativos que permitirão fundamentar ou alicerçar o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem no manejo sustentável de pragas.