

**ALEX RODRIGUES BORGES**

**ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DA GLÂNDULA  
MANDIBULAR DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA-MINAS GERAIS  
2019**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Borges, Alex Rodrigues, 1975-

B732p  
2019

Análise proteômica e metabolômica da glândula mandibular  
de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) /  
Alex Rodrigues Borges. – Viçosa, MG, 2019.

57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Proteômica. 2. Metabolômica. 3. Glândulas.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 572.6

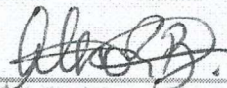
ALEX RODRIGUES BORGES

**ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DA GLÂNDULA  
MANDIBULAR DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**

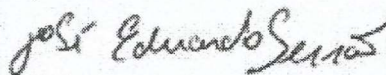
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de novembro de 2019.

Assentimento:



Alex Rodrigues Borges  
Autor



José Eduardo Serrão  
Orientador

**A minha mãe Dulcinéia (*in  
memoriam*), as minhas  
irmãs Patrícia e Ivone. A  
*Belle de Jour*, (Débora).**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento (001).

Agradeço a Deus pela vida e por me iluminar nesta trajetória.

À Universidade do Estado de Mato Grosso – (UNEMAT), pela concessão do afastamento das atividades docente para qualificação profissional.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Serrão, pela orientação dedicada, por apresentar novos caminhos na pesquisa, pela compreensão nos momentos difíceis. Profunda gratidão.

À Dra. Aparecida das Dores Teixeira (irmã do coração) pelo apoio constante no desenvolvimentos dos experimentos pelos diálogos valorosos e amizade.

Ao Dr. Luis Carlos Martinez Castrillon pela tutoria no desenvolvimento dos experimentos, pela compreensão e amizade.

Ao corpo técnico-administrativo do Núcleo de Análises de Biomoléculas – NUBIOMOL (UFV), Dr. Edvaldo Barros, Dr. Pedro Marcus Pereira Vidigal, M.Sc. Cláudia de Souza Lima Pontes e a Dr. Nívea Moreira Vieira pela assessoria nas análises de proteômica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos do departamento de química pelo auxílio na identificação dos compostos químicos na cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e a técnica Neide Graciano Zério do laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq (USP), pelo fornecimento das larvas de *Diatraea saccharalis*.

À Profa Dra. Veruska Pobikrowska Tardivo (UNEMAT) e Marcelo Guerreiro pela amizade e incentivo.

À Profa. Dra. Daniela de Oliveira Pinheiro da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela amizade e contato junto ao laboratório de Biologia dos Insetos da Esalq.

Aos colegas do laboratório de Ultraestrutura Celular por propiciar um ambiente agradável para o desenvolvimento das atividade de pesquisa, em especial a Jamile e Lídia pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Rogério Benedito Añez da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), amigo em todos momentos na jornada de qualificação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## RESUMO

BORGES, Alex Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2019. **Análise proteômica e metabolômica da glândula mandibular de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão.

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é um dos insetos que no estágio larval apresentam alta capacidade de herbivoria, sendo a cana-de-açúcar a principal planta a sofrer com as ações desse inseto. O dessas ações são injúrias com a abertura de orifícios deixando-a vulnerável a entrada de microrganismos patogênicos que afetam a produção, resultando em prejuízos econômicos. Conectado ao par de mandíbulas das larvas, a glândula mandibular se dispõe adjacente ao tubo digestório e glândula labial estendendo-se até os últimos segmentos abdominais, cuja a composição química da secreção é desconhecida. O objetivo desse trabalho é identificar diferentes compostos químicos da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis*. A primeira análise foi a identificação de proteínas do extrato total das glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF, que constatou 22 proteínas previstas em 11 classes funcionais envolvidas principalmente no transporte e metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos, além de outras classes relacionadas à modificação pós-traducional, conversão de energia, tráfico intracelular, transcrição, tradução e citoesqueleto. A segunda análise foi para identificação de compostos não proteicos do extrato total das glândulas mandibulares de larvas *D. saccharalis* por cromatografia gasosa acoplado a um detector de massas. No extrato total das glândulas constatou uma mistura de hidrocarbonetos: C<sub>4</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> e C<sub>18</sub>, que correspondem a grupos funcionais álcoois, éter, alcano e éster. Em ambas as análises revelou diferentes compostos que sugerem potenciais elicitadores na interação inseto-planta, que podem contribuir para discussão do papel multifuncional da glândula mandibular de larvas de lepidópteros.

Palavras-chave: Proteômica. Metabolômica. Glândula Mandibular. *Diatraea saccharalis*

## ABSTRACT

BORGES, Alex Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2019. **Proteomic and metabolic analysis of the mandibular gland *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae.** Adviser: José Eduardo Serrão.

*Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) is one of the insects that in the larval stage has high herbivory capacity, with sugar cane being the main plant to suffer from the actions of this insect. These actions are injuries with the opening of holes leaving it vulnerable to the entry of pathogenic microorganisms that affect production, resulting in economic losses. Connected to the pair of larval jaws, the mandibular gland is adjacent to the digestive tract and labial gland extending to the last abdominal segments, whose chemical composition of the secretion is unknown. The first analysis was the identification of proteins from the total extract of the mandibular glands of *D. saccharalis* larvae by mass spectrometry of the type MALDI-TOF / TOF mass spectrometry. Which found 22 proteins predicted in 11 functional classes mainly involved in carbohydrate transport and metabolism lipids, amino acids and nucleotides, as well as other classes related to post-translational modification, energy conversion, intracellular trafficking, transcription, translation and cytoskeleton. The second analysis was to identify non-protein compounds from the total extract of the *D. saccharalis* larval mandibular glands by gas chromatography coupled to a mass detector. In the total extract of the glands found a mixture of hydrocarbons: C4, C11, C12, C14 and C18, which correspond to functional groups alcohols, ether, alkane and ester. In both analyzes revealed different compounds that suggest potential elicitors in insect-plant interaction, which may contribute to discussion of the multifunctional role of the mandibular gland of lepidopteran larvae.

Keywords: Proteomic. Metabolomic. Mandibular Gland. *Diatraea saccharalis*.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	8
BIBLIOGRAFIA.....	10
CAPÍTULO 1- PROTEÔMICA DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LARVAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e Métodos.....	17
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	30
5. Conclusão.....	34
6. Bibliografia.....	34
CAPÍTULO 2- CROMATOGRAFIA GASOSA DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LARVAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	
Resumo.....	42
Abstract.....	43
1. Introdução.....	44
2. Material e Métodos.....	45
3. Resultados.....	47
4. Discussão.....	48
5. Conclusão.....	50
6. Bibliografia.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

## INTRODUÇÃO GERAL

A interação inseto-planta é uma relação coevolutiva entre duas ou mais espécies, onde insetos e plantas interagem tão intimamente que cada uma delas age como força seletiva sobre a outra. Nesta interação, insetos e plantas desenvolveram diversas estratégias de sobrevivência conjunta que envolvem ataque e defesa das espécies. A herbivoria por insetos constitui um dos principais ataques às plantas provocado pelo consumo de massa foliar e de outras partes, como caule, raiz e flor. Os insetos provocam o ataque inicialmente por injúrias mecânicas realizadas pelo par de mandíbulas o que causa danos diretos na estrutura da planta e indiretos quando os insetos abrem galerias no interior da planta tornando-as mais suscetíveis a diversos organismos patogênicos, como: fungos, vírus e bactérias patogênicas (Erb et al., 2012; Chuang et al., 2013; Reddy e Guerreiro, 2004; Felton e Tumlinson, 2008)

As plantas também ao longo do processo de coevolução desenvolveram estratégias de defesa induzida que é expressa somente depois do início do processo de injúria provocado pelos insetos. A emissão de compostos voláteis é um mecanismo de defesa, os quais podem repelir os insetos ou atrair inimigos naturais predadores dos insetos herbívoros (Afsheen et al., 2008; Murali-Bascaran et al., 2017). Quando existe um desequilíbrio numérico na população de insetos, um grande aumento populacional, pode ter efeitos danosos às plantas de culturas agrícolas com a queda na produção e grande prejuízo econômico ao setor produtivo específico daquela cultura. Os lepidópteros constituem o principal grupo de insetos com potencial herbívoro, causando diversos prejuízos a diferentes culturas agrícolas (Neveu et al., 2002; Reddy e Guerreiro, 2004; Pinto-Zevallos et al., 2013)

Na agricultura convencional o uso de inseticidas no Brasil nos últimos anos tem se intensificado para o controle de diversos insetos considerados “pragas agrícolas”, para propiciar o aumento de produção no país. O que também tem causado uma série de prejuízos ambientais, como a contaminação de mananciais, solo, fauna e flora. Uma das alternativas para diminuir o uso intensivo de inseticidas nas culturas agrícolas tem sido a utilização de métodos de controle biológico, onde outros organismos como exemplo: insetos, vírus, bactérias, fungos etc; podem erradicar ou controlar a população dos insetos considerados “pragas agrícolas” proporcionando assim, uma diminuição ou até eliminação do uso de inseticidas (Lovatto et al., 2012).

A *D. saccharalis* é uma das principais “pragas agrícolas” dessa cultura no Brasil se mantém como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, produção que é convertida em açúcar e álcool, trazendo desenvolvimento e geração de riqueza para as principais

regiões produtoras, liderada pelos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. As larvas de *D. saccharalis* atacam a planta de cana-de-açúcar formando extensas galerias, deixando a planta com estrutura frágil e vulnerável a entrada de diversos microrganismos, ocasionando doenças. (Ferreira et al., 2004; Cruz, 2007; Sandoval e Senô, 2010; Boiça-Junior et al., 2011; Souza et al., 2014; Calado et. al., 2014).

No cultivo da cana-de-açúcar um agente importante no controle biológico é a vespa *Cotesia flavipes* (Hemynoptera: Braconidae), em que as fêmeas alcançam as larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) nas galerias da planta, depositando inúmeros ovos na hemocele do hospedeiro. O desenvolvimento do parasitoide no corpo do hospedeiro ocorre através de três instares larvais culminando com o rompimento do tegumento e morte do hospedeiro, fora do corpo da broca da sequência a fase de pupação e origem dos adultos, que sobrevivem poucos dias (Ferreira et al., 2004; Cruz, 2007; Sandoval e Senô, 2010; Boiça-Junior et al., 2011; Souza et al., 2014; Calado et. al., 2014).

A maioria dos estudos realizado com *D. saccharalis*, abordam aspectos de criação, dinâmica populacional e relações parasitoides-hospedeiros, em atividades de campo e laboratoriais, visando otimizar o controle biológico. O conhecimento dos aspectos biológicos deste inseto podem fornecer subsídios para melhorar e aprimorar os métodos de controle biológico. Entretanto, não existem estudos da composição química das glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis*, análises de glândulas mandibulares larvas de outros lepidópteros tem demonstrado a presença de cairômonios *Ephestia kuehniella* e *Anagasta kuehniella* (Cobert, 1971; Cobert, 1973; Mudd e Corbet, 1982; Mudd, 1984), secreção lipídica-lubrificação e esterase início da digestão *Galleria melonella* (Wroniszewska, 1966), proteínas quimiosensoriais *Vanessa gonerilla* (Celorio-Mancera et al., 2012), feromônio de trilha *Cactoblastis cactorum* (Fitzgerald et al., 2014) feromônio e elicitores de oviposição *Anagasta kuehniella*, *Ephestia cautela*, *Plodia interpunctella* e *Ephestia elutella* (Mudd e Corbet, 1973)

A função da glândula mandibular em larvas de lepidópteros ainda é discutível, sendo a função atribuída a produção de saliva, enquanto a glândula labial tem seu envolvimento na produção de seda para a construção do casulo. O objetivo desse trabalho é identificar diferentes compostos químicos da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* do 5º instar que possam contribuir para a discussão da função das glândulas mandibulares em lepidópteros.

## BIBLIOGRAFIA

Afsheen, S., Xia, W., Ran, L., Zhu, C-S., Lou, Y.G. 2008. Differential attraction of parasitoids in relation to specificity of kairomones from herbivores and their by-products. *Insect Science*, 15(5):381–397.

Boiça Junior, A.L., Leonelo, A.F., De Jesus, F.G. 2011. Dietas artificiais incorporadas ou não a colmos triturados de variedades de cana-de-açúcar na biologia de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). *Seminário Agrário*, 32(1):39–48.

Calado, V.R.F., Pereira, F.F., Vargas, E.L., Glaeser, D.F., Olivira, F.G. 2014. Características biológicas de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) nos hospedeiros *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biotemas*, 27 (1): 71-77.

Celorio-Mancera, M de la P., Sundmalm, S.M., Vogel, H., Rutishauser, D., Ytterberg A.J., Zubarev, R.A., Janz, N. 2012. Chemosensory proteins, major salivary factors in caterpillar mandibular glands. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(10):796–805.

CORBET, S.A. 1971. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella* contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a hymenopteran parasite. *Nature* 232(5311):481–484.

CORBET, S.A. 1973. Oviposition pheromone in larval mandibular glands of *Ephesia kuehniella*. *Nature* 243(5409):537–538

Chuang, W.P., Ray S., Acevedo, F.E., Peiffer, M., Felton G.W., Luthe, D.S. 2014. Herbivore cues from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) larvae trigger direct defenses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(5):461–470.

Cruz, I., 2007. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Circular Técnica. Embrapa Milho e Sorgo. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Brasil, Governo Federal, 90:12.

Erb M, Meldau, S., Howe, G.A. 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5):250–259.

Felton, G.W., Tumlinson J.H. 2008. Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4):457–63.

- Ferreira, E., Barrigossi, J.A.F., Castro, E.M., Santos, A.B. 2004. Perdas de produção pela broca-do-colmo (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 34 (2): 99-103.
- Fitzgerald, T.D., Wolfen, M., Rossi, F., Carpenter, J.E., Pescador-Rubio, A. 2014. Trail marking by larvae of the cactus moth, *Cactoblastis cactorum*. *Journal of Insect Science*, 14(64):1-15.
- Lovatto, P.B., Schiedeck, G., Garcia, F.R.M. 2012. A interação co-evolutiva entre insetos e plantas como estratégia ao manejo agroecológico em agroecossistemas sustentáveis. *Interciencia*, 37(9):657–663.
- Mudd, A., and Cobert, S.A. 1973. Mandibular gland secretion of larvae of stored products pests *Anagasta kuehniella*, *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella* and *Ephestia elutella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 16:291–293.
- Mudd, A., Walters, J.H.H., Corbet, S.A. 1984. Relative kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3-diones in eliciting oviposition behavior from the parasite *Nemeritis canescens* (Grav.). *Journal of Chemical Ecology*, 10: 1597–1616.
- Mudd, A., Corbet, S.A. 1982. Response of the ichneumonid parasite *Nemeritis canescens* to kairomones from the flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Chemical Ecology*, 8(5):843–850.
- Murali-Baskaran, R.K., Sharma, K.C., Kaushal, P., Kumar, J., Parthiban, P., Senthil-Nathan, S., Markin R.W. 2017. Role of kairomone in biological control of crop pests-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101:3–15.
- Neveu, N., Grandgirard, J., Nenon, J.P., Cortesero, A.M. 2002. Systemic release of herbivore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* (L.). *Journal Chemical Ecology*, 28(9):1717–1732.
- Pinto-Zevallos, D.M., Martins, C.B.C., Pellegrino, A.C., Zarbin, P.H.G. 2013. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, 36(9):1395–1405.
- Reddy, G.V.P., Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science*, 9(5):253–261.
- Sandoval, S.S., Senô, K.C.A. 2010. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. *Nucleus*, 7(1): 243 -258
- Souza, J.R., Boiça Junior, A.L., Perecin, D., Da Costa, J.T., Peixoto, M.L. 2014. Preferência de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) por lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) alimentadas com diferentes cultivares de cana-de-açúcar. *Revista Ceres*. 61(6):916–923.

Wronizewska, A. 1966. Mandibular glands of the wax moth larva, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Insect Physiology*, 12:509–522.

## **CAPÍTULO 1**

### **PROTEÔMICA DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

## RESUMO

A *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1974 (Lepidoptera: Crambidae) é um dos principais insetos que atacam a cultura da cana-de-açúcar no mundo. O estudo do proteoma da glândula mandibular no estágio larval de *D. saccharalis* é uma estratégia importante que pode levar a um melhor entendimento do papel funcional dessa glândula, a fim de subsidiar o desenvolvimento de novas formas de controle populacional deste inseto. O perfil eletroforético do gel bidimensional revelou 91 *spots* obtidos do extrato das glândulas mandibulares de larvas de 5º instar de *D. saccharalis*, dos quais 33 *spots* foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF, sendo 22 identificados. As proteínas foram preditas em 11 classes funcionais envolvidas principalmente no transporte e metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos, além de outras classes relacionadas à modificação pós-traducional, conversão de energia, tráfego intracelular, transcrição, tradução e citoesqueleto. Este estudo identificou e caracterizou proteínas nas suas respectivas classes funcionais contribuindo assim com informações sobre o papel funcional da glândula mandibular de lepidópteros.

Palavras-chave: Glândula Mandibular. Proteínas. *Diatraea saccharalis*.

## ABSTRACT

*Diatraea saccharalis* Fabricius, 1974 (Lepidoptera: Crambidae) is one of the main insects that attack the sugarcane crop in the world. Studying the mandibular gland proteome in the larval stage of *D. saccharalis* is an important strategy that may lead to a better understanding of the functional role of this gland in order to support the development of new forms of population control of this insect. The electrophoretic profile of the two-dimensional gel revealed 91 spots obtained from the extract of the mandibular glands of *D. saccharalis* 5th instar larvae, of which 33 spots analyzed by MALDI-TOF / TOF mass spectrometry, 22 of which identified. Proteins predicted in 11 functional classes mainly involved in carbohydrate, lipid, amino acid and nucleotide transport and metabolism, as well as other classes related to post-translational modification, energy conversion, intracellular trafficking, transcription, translation and cytoskeleton. This study identified and characterized proteins in their respective functional classes, thus contributing information on the functional role of the lepidopteran mandibular gland.

Keywords: Mandibular Gland. Proteins. *Diatraea saccharalis*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os lepidópteros apresentam no seu desenvolvimento larval glândulas exócrinas adjacentes ao tubo digestório: a glândula mandibular e glândula labial ou da seda. A glândula mandibular é uma estrutura par com forma cilíndrica onde a região posterior pode se estender até os últimos segmentos torácicos ou abdominais da larva dependendo da espécie (Parthasarathy e Gopinathnan, 2005; Vegliante e Hasenfuss, 2012).

As glândulas mandibulares são responsáveis pela produção de saliva, enquanto que as labiais produzem a seda, utilizada na confecção de abrigo e casulo (Lesperon, 1937; Wroniszeska, 1966; Vegliante e Hasenfuss, 2012; Victoriano et al., 2007; Chapmam, 2013). As enzimas encontradas na saliva de algumas espécies de lepidópteros como as amilases em *Bombyx mori* e as estereases em *Galleria mellonella* reforçam a hipóteses de atividade digestiva da secreção dessas glândulas, mas em outras lagartas a secreção parece ter função defensiva contra formigas e fungos patogênicos ou agem como ferômonio para a regulação da densidade populacional (Wroniszeska, 1966; Parthasarathy e Gopinathnan, 2005; Vegliante e Hasenfuss, 2012; Afshar et al., 2013).

Os estudos do proteoma da glândula mandibular de larvas da borboleta *Vanessa gonerilla* (Lepidoptera: Nymphalidae) revelaram abundância de proteínas quimiosensoriais na secreção salivar (Rivera-Veja et al., 2017; Acevedo et al., 2017; Celorio-Mancera et al., 2012). Esse resultado sugere que a função primária da glândula mandibular destes insetos é a quimiorrecepção, capacitando-os para a detecção de microrganismos na superfície da planta, o reconhecimento da planta hospedeira além de possibilitar a comunicação entre os seus pares (Celorio-Mancera et al., 2012).

Análises histoquímicas de glândula mandibular de larvas de *G. mellonella* (Wroniszeska, 1966) e estudos da ultraestrutura das células da região secretora da glândula mandibular de larvas de *Diatraea saccharalis* (Borges, 2001), demonstraram a presença de lipídios que possivelmente ajudam na ingestão dos alimentos e inicia o processo de digestão que será finalizado no intestino médio (Wroniszeska, 1966; Conte, 1985; Borges, 2001).

O conhecimento dos compostos químicos da glândula mandibular de larvas de lepidópteros pode subsidiar um melhor entendimento do funcionamento da glândula e sua interação com o meio ambiente (Borges, 2001). Há um número variado de lepidópteros que são considerados pragas para algumas culturas agrícolas, provocando perdas econômicas em função da sua atividade intensa de herbivoria (Gallo et al., 1988; Téran et al., 1983; Castilho, 1982). Dentre esses *D. saccharalis* ataca a cultura da cana-de-

açúcar provocando prejuízos em decorrência principalmente da formação de galerias pelas larvas, as quais deixam a planta vulnerável a patógenos e conseqüentemente reduzindo a qualidade e a produção de açúcar (Graça, 1976; Téran et al., 1983; Gallo et al., 1988; Vendramin, 1992; Arrigoni, 1992; Boiça Junior et al., 1997)

O conhecimento dos componentes da glândula mandibular de lagartas pode contribuir para a compreensão da função da glândula nas suas relações de interação inseto-planta, podendo assim, fornecer subsídios para desenvolver novas estratégias de controle desses insetos (Liet et al., 2010; Chen et al., 2010; Xu et al., 2011; Gundappa et al., 2014; Shashank et al., 2014; Singh et al., 2015). O objetivo desse trabalho foi identificar as proteínas da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* por meio de análises de proteômica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Insetos

As larvas de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) – Campus de Piracicaba, SP. As larvas foram alimentadas com dieta artificial desenvolvida por Henseley e Hammond (1968), mantidas a 27-30°C, umidade relativa 70±10% e fotoperíodo de 14 horas até a coleta das glândulas mandibulares no 5° instar larval.

### 2.2. Obtenção das glândulas mandibulares

As glândulas mandibulares foram dissecadas de larvas de *D. saccharalis* em 5° instar. As larvas foram crioanestesiadas a -6 °C durante 2 minutos para sua imobilização. Após a retirada, as glândulas foram transferidas para 180 µl de água ultrapura contendo 20 µl de coquetel inibidor de proteases (P2714 Sigma) 1% (v/v) e armazenadas a -20°C.

### 2.3. Extração e quantificação de proteínas totais das glândulas mandibulares

Para a extração proteica, as glândulas mandibulares foram submetidas a homogeneização mecânica (Pellet pestle, disposable/Sigma–Aldrich) e a sucessivos pulsos de ultrassom (2 min) intercalados por banhos no gelo, até a completa solubilização do material. As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g durante 20 minutos a -4 °C, e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C. A concentração de proteínas totais do

extrato obtido foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### 2.4. Eletroforese bidimensional

A primeira dimensão ou focalização isoeétrica foi realizada em fita contendo gel de poliacrilamida de pH imobilizado (Immobiline DryStrip, GE Healthcare), com 7 cm de comprimento e faixa de pH entre 3 e 10. As fitas foram reidratadas em 125 µl de solução de reidratação contendo 130 µg de proteínas, tampão de gradiente imobilizado de pH 3 a 10 (IPG buffer) (v/v), DTT 40mM e solução Destreak (GE-Healthcare, EUA) em IPGbox (GE Healthcare), por 20h, a temperatura ambiente.

A focalização isoeétrica foi realizada em equipamento IPGphor Ettan III em temperatura de 20°C e 50 µA, no modo linear de voltagem (1300 V por 16 h; 1000 V até acumular 300 V/h; 2000 V por 1 h; 2000 V até acumular 2000 V/h; 3000 V por 1,5 h; 3000 V até acumular 3000 V/h; 5000 V por 1,5 h; 5000 V até acumular 3000 V/h; 200 V por 1 h).

Após a focalização, as fitas Immobiline DryStrip pH 3-10 foram armazenadas a -80 até realização da segunda dimensão. Previamente à eletroforese as fitas foram reduzidas com DTT 1% (p/v) e alquiladas com iodoacetaminada 2,5% (p/v) em solução de equilíbrio (ureia 6M; Tris-HCl 75mM pH 8,8; glicerol 29,3% (v/v); dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (p/v); azul de bromofenol 0,002% (p/v) sob agitação durante 15 minutos respectivamente.

A segunda dimensão foi realizada em gel SDS-PAGE de poliacrilamida 12%, utilizando cuba de eletroforese vertical Mini Protean II (Bio Rad, EUA), sob corrente elétrica 80 V e 37 mV. Os géis foram mantidos sob agitação em solução fixadora (ácido acético 10% (v/v), metanol 40% (v/v) por 1 hora e em seguida, corados com solução de Coomassie Blue Coloidal (contendo Coomassie Blue G-250 0,08% (p/v), sulfato de amônio 8% (p/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v) e metanol 20% (v/v)) por 72 h. Na sequência, os géis foram submetidos à descoloração em solução de ácido acético 5% (v/v) e armazenados nessa mesma solução a temperatura ambiente.

## 2.5. Aquisição e análises das imagens

As imagens dos géis bidimensionais foram obtidas a partir do Scanner Image Scanner III, utilizando software LabScan 6.0 (GE Healthcare) com os seguintes parâmetros: resolução de 300 dpi, filtro vermelho (coloração) e modo transparente. As imagens obtidas de quatro géis foram analisadas a partir do software ImageMaster 2D *Platinum* 7.5 evidenciando o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular das proteínas (MW) (*spots*), com base no padrão de massa molecular utilizado como referência nos géis bidimensional. Outras características como a intensidade, a área e o volume dos *spots* foram avaliadas a fim de subsidiarem a escolha daqueles mais significativos para a digestão triptica.

## 2.6. Digestão das amostras

Os *spots* excisados manualmente foram colocados em microtubos de 0,6 mL contendo solução de acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônia (Ambic) 25mM (p/v) e submetidos a sucessivas lavagens até a sua completa descoloração. Os *spots* foram então desidratados em acetonitrila 100% (v/v) e centrifugados a vácuo (SpeedVac Concentrator Plus, Eppendorf®) a 45°C até a secagem completa dos géis.

A seguir, os *spots* foram incubados em solução contendo ditioneitol (DTT) 65 mM diluído em Ambic 100 mM (p/v), por 30 minutos a 53°C para a redução das proteínas. Após a remoção da solução anteriormente citada, os *spots* foram incubados em solução contendo iodoacetamida 200 mM diluída em Ambic 100 mM (p/v), por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, a fim de promover alquilação das proteínas. Ao fim deste período, as amostras foram lavadas com Ambic 100 mM, desidratadas em acetonitrila 100% e secas em centrifuga a vácuo como mencionado acima.

Os *spots* foram reidratados em solução contendo acetonitrila 10% (v/v), Ambic 40 mM e tripsina (25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (Promega®, Sequencing Grade Modified Trypsin), e incubados a 37 °C por 20 horas. Para a retirada dos peptídeos dos fragmentos dos géis estes foram tratados com solução contendo ácido fórmico 5% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v) seguido por pulsos em ultrassom. Os peptídeos foram concentrados e secos em centrifuga a vácuo 45°C e ressuspensos em 10  $\mu\text{L}$  de solução contendo acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (v/v).

As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiras ZipTip contendo resina C18 (Millipore®, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, secas a vácuo

45°C e ressuspendidas em 3 µL de solução contendo acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético a 0,1% (v/v).

## 2.7. Espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha) usando ácido  $\alpha$  ciano-4-hidroxicinâmico como matriz (10 mg mL<sup>-1</sup> em acetonitrila 50% (v/v) /ácido trifluoroacético 0,1% (v/v)). As amostras foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics, Alemanha) na proporção 1:1 (1µL de amostra para 1µL de matriz). Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha).

Na aquisição dos espectros de MS1 foi utilizado o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 (Da) e para a aquisição de MS2, foi usado o método LIFT no modo positivo, selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z). Os dados obtidos foram gerenciados pelo *software* Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do *software* FlexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascot generic format (mgf) pelo software BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

## 2.8. Identificação e caracterização das proteínas

As listas de massas foram comparadas no banco de dados de proteínas das espécies da classe Insecta e do reino Metazoa, depositadas no UniProt (<http://www.uniprot.org>) usando o software MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

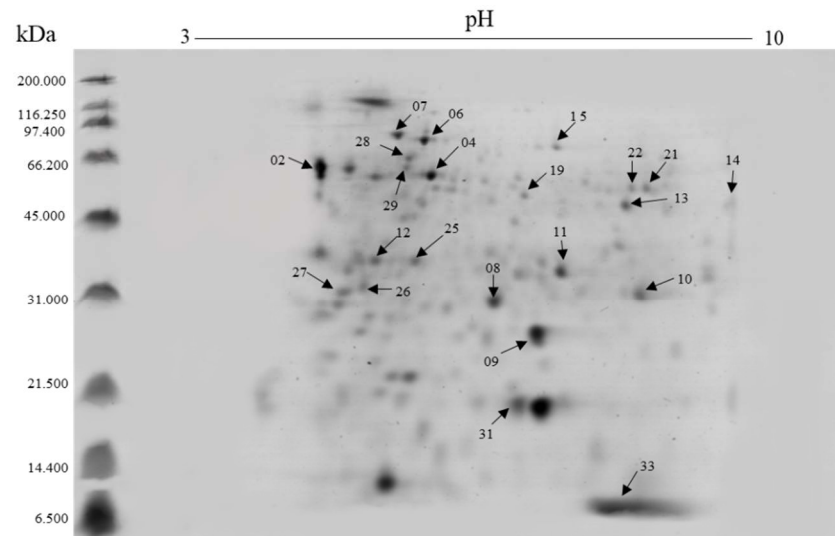
As proteínas identificadas pelo MASCOT como “Uncharacterized” foram analisadas usando o *software* BLASTp (proteína-proteína Blast), versão 2.4.0 (Altschul et al., 1990). Nesta análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundante (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

Os resultados obtidos pelo MASCOT foram validados pelo *software* SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INc., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (Keller *et al.*, 2002) e para as proteínas, o algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Como critério de aceitação, foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

Para a predição da função biológica, localização subcelular e presença de peptídeo sinal das proteínas identificadas, foram utilizados coleção de ortólogos de eucariotos anotadas no banco de dados Eukaryotic Orthologous Groups (KOG), e os softwares: CELLO v.2.5 (subcellular localization predictor) - <http://cello.life.nctu.edu.tw/>) e SIGNALP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), respectivamente.

### 3. RESULTADOS

O perfil eletroforético do gel bidimensional obtido dos extratos das glândulas mandibulares de larvas de 5º instar de *D. saccharalis* revelaram 91 *spots* (Figura 1). Destes, aqueles com maior abundância proteica foram excisados e analisados, correspondendo um total de 33 *spots* (figura 1, tabela 1). Dos 33 *spots*, 22 tiveram suas proteínas identificadas representando um total de 20 proteínas diferentes (tabela 1).



**Figura 1.** Representação da eletroforese 2D de proteínas extraídas das glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis*. Os *spots* numerados foram identificados por MALDI-TOF/TOF e estão listados na tabela 1.

**Tabela 1.** Identificação de proteínas extraídas da glândula mandibular de larvas do 5º instar de *D. saccharalis*.

Spot	Nome da Proteína (Organismo)	Banco de Dados/ Entradas	Número de Acesso	Score de Identificação (MS/MS)	Prob. (1)	Cobertura da Sequência (%)	Massa Molecular Teórico/Experimental	Ponto Isoelétrico	NPIV (3)	Sequência de Peptídeos	Prob. (2)
02	Calreticulin/ <i>Operophtera brumata</i> (winter moth)	Uniprot / Insecta	A0A0L7L560	208	100%	8,0	46.178/58.000	4.47/4.60	02	FKPFSNEGKPLVVQFSVK RDEICAVGLDLWQVK(S)	100% 99%
04	Putative heat shock cognate 70/ <i>Aedes albopictus</i> (Asian tiger mosquito) ( <i>Stegomyia albopicta</i> )	Uniprot / Insecta	A0A023EUP2	107	98%	3,0	72.440/56.000	5.09/5.31	01	VTHAVVTVPAYFNDAQR	98%
06	70kDa heat shock cognate protein/ (Chinese oak silk moth)	Uniprot / Insecta	A0A023RDH9	334	100%	6,0	71.732/77.000	5.38/5.96	03	TVQNAVITVPAYFNDSQR FELTGIPPAPR FEELNADLFR	100% 97% 96%
07	Putative heat shock cognate 70/ <i>Aedes albopictus</i> (Asian tiger mosquito) ( <i>Stegomyia albopicta</i> )	Uniprot / Insecta	A0A023EUP2	265	100%	6,0	72.440/80.000	5.09/5.65	03	DVDEIVLVGGSTR FDLTGIPPAPR VTHAVVTVPAYFNDAQR	99% 97% 97%
08	Heat shock protein 21.4/ <i>Sesamia inferens</i> (purple stem borer)	Uniprot / Insecta	A0A0A7RI59	266	100%	18,0	21.404/30.000	5.79/6.76	02	LGDFSVIDTEFSSIR(E) DGVLTVEAPLPQLAITDR	100% 100%
09	POX-C/ <i>Spodoptera exigua</i> (Beet rmyworm) ( <i>Noctua fulgens</i> )	Uniprot / Insecta	A0A088MGF5	332	100%	25,0	22.124/27000	6.30/6.70	03	GLFIIDDKQNLNLR PLQLTKPAPQFK IGCEVIGASTDSHFTHLAWINTPR	100% 100% 98%
10	Enoyl-CoA hydratase/ <i>Agrotis segetum</i> (Turnip moth)	Uniprot / Insecta	A0A068FKE8	225	99%	6,0	32.002/30.00	8.87/8.54	01	FGQPEINIGTIPAGGTQR	100%

11	Putative phosphatidylinositol transfer protein/ <i>Aedes albopictus</i> (Asian tiger mosquito) ( <i>Stegomyia albopicta</i> )	Uniprot / Insecta	A0A023ELM4	181	95%	7,0	30.376/33.000	5.97/7.60	01	GSLEVHEEAWNAYPYCR	100%
12	Annexin/ <i>Helicoverpa armigera</i> ( <i>Heliothis armigera</i> )	Uniprot / Insecta	F5BYI5	103	95%	4,0	36.300/35.000	5.08/5.34	01	TISAFYEQLYNK	98%
13	Isocitrate dehydrogenase <i>Aphis gossypii</i> ( <i>Cotton aphid</i> )	Uniprot / Insecta	A0A0C5QRX3	191	100%	7,0	46.925/46.000	6.19/8.36	02	ETSTNPIASIFAWTR LVTGWEEKPIIIGR	100% 97%
14	Putative medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase <i>Agrotis segetum</i> (Turnip moth)	Uniprot / Insecta	A0A068FRF0	139	98%	3,0	45.822/45.000	8.35/8.36	01	IYQIYEGTSQIQR	100%
14	Putative actin-related protein <i>Aedes albopictus</i> (Asian tiger mosquito) ( <i>Stegomyia albopicta</i> )	Uniprot / Insecta	A0A023EPU9	140	93%	4,0	46.306/45.000	8.54/8.36	01	SYELPDGQVITIGNER	93%
15	2-Hydroxyphytanoyl-CoA lyase <i>Danaus plexippus</i> ( <i>Plexippus</i> )	Uniprot / Insecta	A0A212FNE1	77	95%	6,0	62.536/72.000	6.26/7.51	01	GVPDESQYCVSTAR	98%
19	Putative enolase/ <i>Aedes albopictus</i> (Asian tiger mosquito) ( <i>Stegomyia albopicta</i> )	Uniprot / Insecta	A0A023ETA6	55	92%	4,0	46809/51000	6.28/7.10	01	AAVPSGASTGVHEALELR	92%
21	Imaginal discs growth factor/ <i>Chilo suppressalis</i> (Asiatic rice borer moth)	Uniprot / Insecta	T1WFZ2	139	99%	3,0	46.168/51000	6.57/8.60	01	EADYTSPLYTPQNR	99%

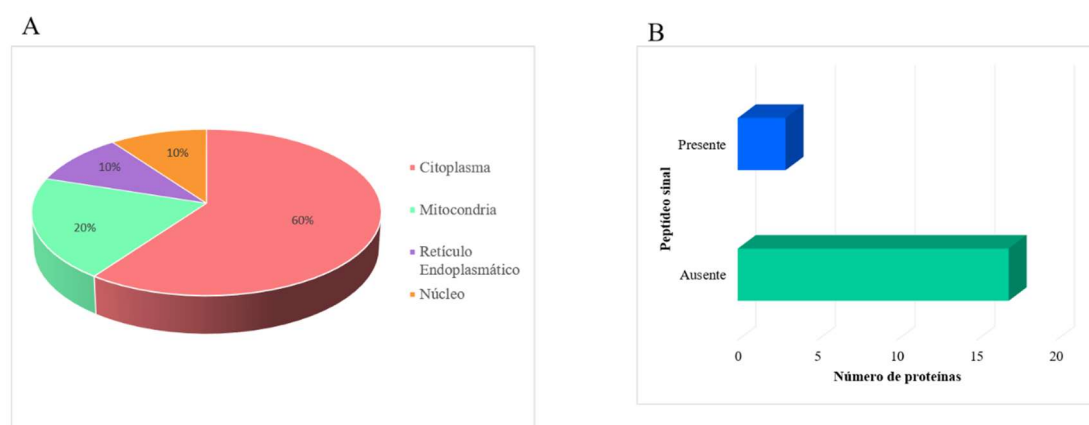
22	Imaginal discs growth factor/ <i>Chilo suppressalis</i> (Asiatic rice borer moth)	Uniprot / Insecta	T1WFZ2	138	99%	3,0	46.168/52.000	6.57/8.42	01	EADYTSPLYTPQNR	99%
25	Inorganic pyrophosphatase/ <i>Papilio xuthus</i> (Asian swallowtail butterfly)	Uniprot / Insecta	A0A0N0P9B8	65	95%	3,0	35.727/35.000	6.73/5.84	01	VIDEVHEFWR	96%
25	Inorganic pyrophosphatase ( <i>Danaus plexippus plexippus</i> )	Uniprot / Insecta	A0A212F0F5	85	95%	4,0	36.442/35000	5.76/5.84	01	GDNDPIDVIEIGER	99%
26	14-3-3 zeta <i>Spodoptera litura</i> (Asian cotton leafworm)	Uniprot / Insecta	A0A068JLL8	142	99%	6,0	28.170/31.000	4.84/5.15	01	EVTETGVELSNEER	100%
27	Elongation factor 1-beta	Uniprot / Insecta	H9JHC4	92	95%	6,0	24.600/30.000	4.49/4.88	01	WYNQIASYTPAER	99%
28	Heat shock protein 60 <i>Operophtera brumata</i> (winter moth)	Uniprot / Insecta	A0A0L7KY35	113	99%	3,0	61.284/64000	5.72/5.80	01	AAVEEGIVPGGGSALLR	98%
29	70kDa heat shock cognate protein/ <i>Antheraea pernyi</i> (Chinese oak silk moth)	Uniprot/ Insecta	A0A023RDH9	99	98%	2,0	71.732/60.000	5.38/5.76	01	FEELNADLFR	90%
31	Nucleoside diphosphate kinase <i>Choristoneura parallela</i> (Spotted fireworm moth)	Uniprot / Insecta	Q8MUR5	204	100%	19,0	17.142/17.000	6.75/6.33	03	QMLGATNPADSLPGTIR TFLMIKPDGVQR TFLMIKPDGVQR	99% 98% 94%
33	Uncharacterized protein <i>Drosophila erecta</i> (Fruit fly)	Uniprot / Insecta	B3PAY5	115	98%	4,0	39567/39000	6.50/6.27	01	IQDQEGIPPDQQR	92%

(1) Probabilidade de identificação para proteína (Scaffold); (2) Probabilidade de identificação para peptídeo (Scaffold); (3) NPV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffold)

Alguns *spots* compartilharam o mesmo número de acesso e, portanto, foram identificados como a mesma proteína, sendo os *spots* 04 e 07 correspondentes à 70kDa heat shock cognate protein, os *spots* 6 e 29 a Putative heat shock cognate 70 e os *spots* 21 e 22 a Imaginal discs growth fator (tabela 1). O *spot* 25 foi identificado como Inorganic pyrophosphatase, com dois números de acessos diferentes para mesma proteína (tabela 1). O *spot* 33, embora identificado como proteína não caracterizada pelo banco de dados do UNIPROT, apresentou 99% de identidade com a proteína Poliubiquitina-C-like de *Spodoptera litura* quando confrontada com o banco de dados do NCBI (acesso XP\_022824593.1).

Informações relativas à localização intracelular e à presença de peptídeo sinal nas proteínas identificadas foram avaliadas neste estudo levando em consideração o caráter secretor da glândula mandibular. A maior parte das proteínas identificadas apresentou localização no citosol (60%). As proteínas remanescentes se concentraram nas mitocôndrias (20%), retículo endoplasmático (10%) e núcleo (10%) (figura 2A, tabela 3).

Das 22 proteínas identificadas apenas três apresentaram a presença de peptídeo-sinal, que representa a sequência específica de aminoácidos que direcionam as proteínas para seu local de destino. As proteínas calreticulina (*spot* 02) e Putative heat shock 70 (*spots* 04 e 07) apresentaram peptídeo-sinal para o retículo endoplasmático, enquanto que o Imaginal discs growth factor (*spots* 21 e 22) apresentou peptídeo sinal que o direciona para vias secretoras (figura 2B, tabela 2).



**Figura 2.** Proteínas identificadas nas glândulas mandibulares de larvas de *Diatraea saccharalis*. (A) Classificação quanto à localização celular usando o software CELLO subcellular localization predictor. (B) Classificação quanto à presença ou ausência de peptídeo sinal pelo software SIGNAL P 4.1.

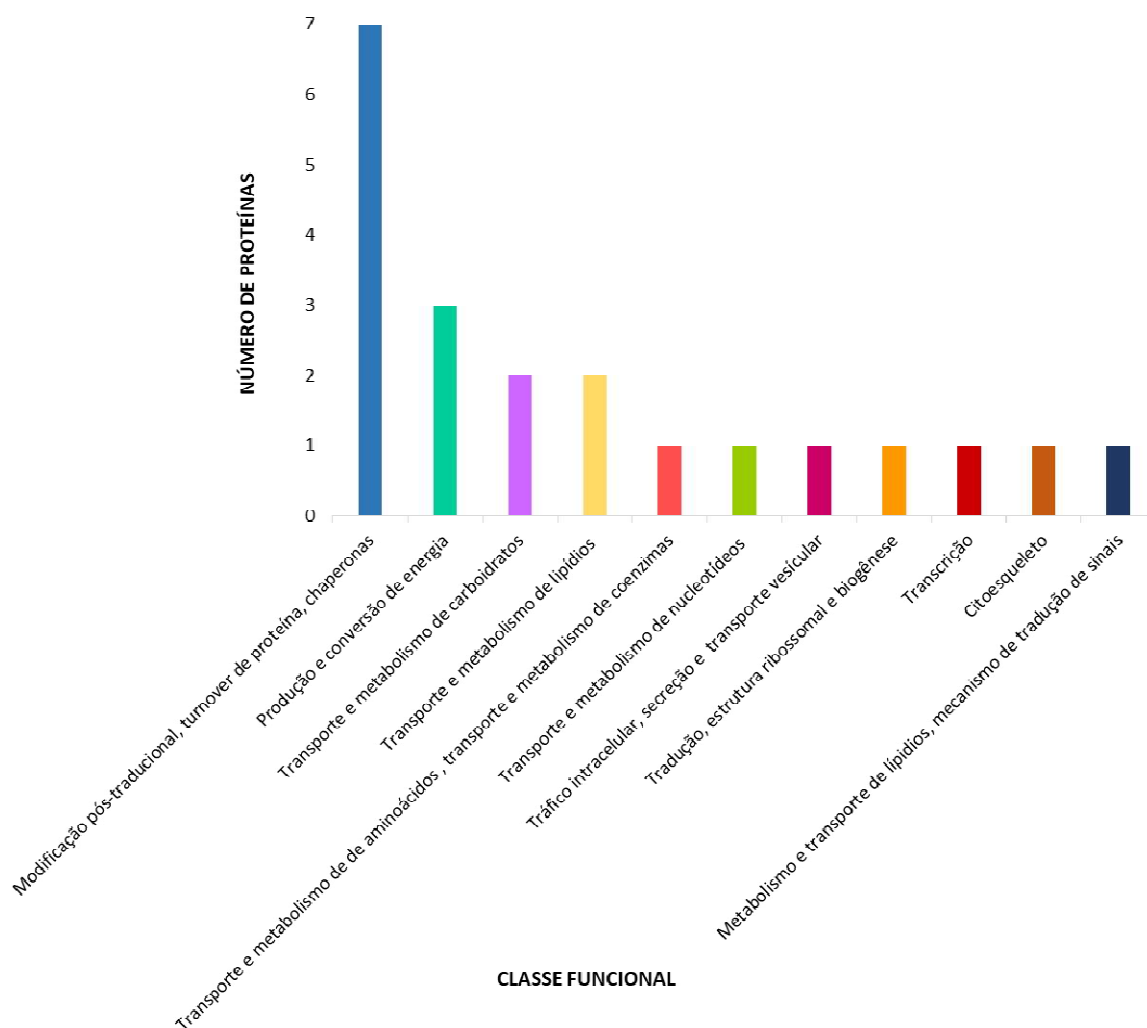
**Tabela 2.** Proteínas da glândula mandibular de *D. saccharalis* com identificação subcelular e peptídeo sinal.

Spots	Nome da Proteína	Localização celular	Peptídeo Sinal
02	Calreticulin	Retículo Endoplasmático	Presente
04	Putative heat shock cognate 70	Retículo Endoplasmático	Presente
06	70kDa heat shock cognate protein	Citosol	Ausente
07	Putative heat shock cognate 70	Retículo Endoplasmático	Presente
08	Heat shock protein 21.4	Núcleo	Ausente
09	POX-C	Citosol	Ausente
10	Enoyl-CoA hydratase	Mitocôndria	Ausente
11	Putative phosphatidylinositol transfer protein	Citosol	Ausente
12	Annexin	Citosol	Ausente
13	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Citosol	Ausente
14	Putative medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	Mitocôndria	Ausente
14	Putative actin-related protein	Citosol	Ausente
15	2- hydroxyphytanoyl-CoA lyase	Mitocôndria	Ausente
19	Putative enolase	Citosol	Ausente
21	Imaginal discs growth factor	Citosol	Presente
22	Imaginal discs growth factor	Citosol	Presente
25	Inorganic pyrophosphatase	Citosol	Ausente
25	Inorganic pyrophosphatase	Citosol	Ausente
26	14-3-3 zeta	Citosol	Ausente
27	Elongation factor 1-beta	Citosol	Ausente
28	Heat shock protein 60	Mitocôndria	Ausente
29	70kDa heat shock cognate protein	Citosol	Ausente
31	Nucleoside diphosphate kinase	Citosol	Ausente
33	Uncharacterized protein	Núcleo	Ausente

A predição classe funcional das proteínas pelo banco de dados Eukaryotic Orthologous Groups (KOG) permitiu categorizar as proteínas identificadas nas glândulas mandibulares de larvas de *D. sacchralis* dentro de 11 classes funcionais: Sete proteínas foram relacionadas às funções de modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas; três proteínas relacionadas à produção e conversão de energia; duas proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de carboidratos; duas proteínas atuando no transporte e metabolismo de lipídios. As demais proteínas foram distribuídas na proporção de uma para cada classe funcional: transporte, metabolismo de aminoácidos e coenzimas; transporte e metabolismo de nucleotídeo; tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; tradução, estrutura ribossomal e biogênese; transcrição; citoesqueleto; transporte e metabolismo de lipídios, mecanismos de tradução de sinais (tabela 3 e figura 3).

**Tabela 3.** Predição classe funcional das proteínas pelo banco de dados Eukaryotic Orthologous Groups (KOG)

Spots	UniProt ID	KOG ID	Descrição KOG	Classe funcional KOG	E-value
11	A0A023ELM4	KOG3668	Proteína de transferência fosfatidilinositol	Metabolismo e transporte de lipídios, Mecanismo de tradução de sinais	2.64e-139
14	A0A023EPU9	KOG0676	Actina e proteínas relacionadas	Citoesqueleto	0.0
19	A0A023ETA6	KOG2670	Enolase	Transporte de carboidratos e metabolismo	0.0
04/07	A0A023EUP2	KOG0100	Chaperonas molecular GRP78/BiP/KAR2	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	0.0
06/29	A0A023RDH9	KOG0101	Chaperonas molecular HSP70/HSC70	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	0.0
10	A0A068FKE8	KOG1680	Enoil-CoA hidratase	Transporte de lipídios e metabolismo	2.01e-122
14	A0A068FRF0	KOG0140	Acil-CoA desidrogenase cadeia-média	Transporte de lipídios e metabolismo	0.0
26	A0A068JLL8	KOG0841	Chaperona multifuncional (14-3-3 family)	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	1.73e-137
09	A0A088MGF5	KOG0852	Alquila hidroperóxido redutase	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	7.12e-131
08	A0A0A7RI59	KOG3591	Alfa cristalinas	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	1.94e-39
13	A0A0C5QRX3	KOG1526	Isocitrato desidrogenase NADP dependente	Produção de energia e conversão	0.0
28	A0A0L7KY35	KOG0356	Chaperonina mitocondrial	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	0.0
02	A0A0L7L560	KOG0674	Calreticulina	Modificação pós-traducional, turnover de proteína, chaperonas	0.0
25	A0A0N0P9B8	KOG1626	Pirofosfatase inorgânica/Fator de remodelação do nucleossomo	Produção de energia e conversão	1.57e-133
25	A0A212F0F5	KOG1626	Pirofosfatase inorgânica/Fator de remodelação do nucleossomo	Produção de energia e conversão	1.97e-136
15	A0A212FNE1	KOG1185	Enzima requerente de pirofosfato de tiamina	Transporte de aminoácidos e metabolismo, transporte de coenzimas e metabolismo	0.0
33	B3PAY5	KOG0004	Proteína ribossomal ubiquitina/40S S27a	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	5.93e-47
12	F5BYI5	KOG0819	Anexina	Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular	2.86e-165
27	H9JHC4	KOG1668	Fator de alongamento cadeia 1 beta/delta	Transcrição	1.44e-94
31	Q8MUR5	KOG0888	Nucleosideo difosfato quinase	Transporte de nucleotídeos e metabolismo	1.71e-80
22/23	T1WFZ2	KOG2806	Quitinase	Transporte de carboidratos e metabolismo	1.63e-91



**Figura 3.** Classificação funcional e abundância das proteínas identificadas das glândulas mandibulares de *D. saccharalis*, com base nas proteínas de eucariotos anotadas no KOG.

#### 4. DISCUSSÃO

Os *Spots* identificados pelas análises de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas revelaram um total de 22 proteínas, sendo 20 diferentes, agrupadas em 11 classes funcionais pela predição de proteínas do banco de dados do KOG. Essa é a primeira identificação de proteínas da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis*, as quais estão envolvidas na desintoxicação e metabolismo celular possibilitando uma melhor compreensão do papel funcional dessa glândula. Na saliva

de larvas de *Helicoverpa zea* foram identificadas 33 proteínas (Chen et al., 2010; Tian et al., 2012), enquanto análises do proteoma em conjunto das glândulas mandibular e labial de larvas de *Vanessa gonerilla*, identificaram-se 370 proteínas utilizando uma plataforma de espectrometria de massas com maior sensibilidade (Celorio-Mancera et al., 2012) que aquela aqui utilizada.

Das 20 proteínas identificadas na glândula mandibular de larvas *D. saccharalis*, apenas três apresentaram peptídeo-sinal. A calreticulina apresentou peptídeo sinal para o retículo endoplasmático, sendo esta organela maior sítio de localização dessa proteína, embora ela também possa ocorrer fora desse compartimento (Krause e Michalak 1997; Goo et al., 2005). A Putative heat shock cognate 70 também teve peptídeo sinal para o retículo endoplasmático, embora, estudos de caracterização molecular do gene HSC70 em células da glândula salivar de larvas de *Rhyconciara americana*, *Chironomus tentans* e *Chironomus yoshimatsui* indiquem que essa proteína apresenta sinal tanto de localização citosólica como nuclear (Karouna- Renier et al., 2003, De Andrade et al., 2009). Da mesma forma o fator de crescimento do disco imaginal (IDGF) tem um peptídeo sinal que o direciona para vias secretórias, assim como a IDGF de larvas de *Drosophila melanogaster* (Kawamura et al., 1999; Pesch et al., 2016).

Os resultados das análises de proteômica possibilitou a caracterização das proteínas em 11 classes funcionais previstas pelo banco de dados do KOG. A classe funcional mais numerosa foram as de modificação pós-traducional, de turnover de proteínas e de chaperonas com sete proteínas. Das proteínas previstas funcionalmente nesta classe a que se apresentou mais numerosa foi a Putative heat shock cognate 70 e a 70kDa heat shock cognate protein, as quais fazem parte da família de chaperonas de choque térmico (HSPs), envolvidas principalmente na termotolerância e outras formas de estresse (Zhang e Denlinger, 2010; Li et al., 2012; Lyupina et al., 2014; Singh et al., 2015; Liu et al., 2017).

A chaperona HSP70 foi encontrada nas glândulas salivares de *Nilaparvata lugens* (Kalume et al., 2005; Konishi et al., 2009), *Anopheles gambiae* (Liu et al., 2016) e *Bombyx mori* (Zhang et al., 2006) e na saliva de *Nephotettix cincticeps* (Hattori et al., 2015). A presença da HSP 70 nas glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* sugere como em outros estudos a provável função de resposta à exposição destes insetos à variações de temperaturas e outras situações de estresse (Zhang e

Denlinger, 2010; Shu et al., 2011; Li et al., 2012; Gu et al., 2012; Lyupina et al., 2014; Singh et al., 2015; De Andrade et al., 2017; Liu et al., 2017).

A calreticulina, presente na glândula mandibular de larvas *D. saccharalis*, também é encontrada na saliva de outros insetos, com função de modulação dos sistemas das plantas, além de favorecerem a circulação do floema, e assim, facilitar a alimentação e nutrição dos insetos (Krause e Michalak 1997; Will et al., 2013; Foyer et al., 2015; Guiguet et al., 2016). A calreticulina apresenta outras funções em insetos como envolvimento no sistema olfativo de *D. melanogaster* (Stoltzfus et al., 2003) e no sistema imunológico dos lepidópteros, *Bombyx mori*, *Pieris rapae* e na saliva do *Amblyomma americanum* (Jaworski et al., 1995; Goo et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014).

A proteína POX-C presente nas glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* integra a família das peroxirredoxinas, que são proteínas com função antioxidantes que atuam contra espécies reativas de oxigênio, além de atuarem como mensageiros celulares, ativando a proliferação e diferenciação celular (Lee et al. 2005; Wang et al., 2016). Em larvas de *B. mori* as peroxirredoxinas atuam na regulação do estresse oxidativo desencadeado geralmente por temperaturas extremas e infecções por microrganismos (Lee et al., 2005; Wang et al., 2016). Já no intestino de larvas de *Spodoptera litollaris* as peroxirredoxinas participaram na defesa contra radicais oxidativos exógenos (herbivoria) e endógenos (Krishnan e Kodrík, 2006; Lu et al., 2017). As peroxirredoxinas na saliva foram constatadas ainda em duas espécies de pulgões (Cooper et al., 2011), duas de lepidópteros (Afshar et al., 2013; Celorio-Mancera et al., 2011) e uma de díptera (Chen et al., 2008), embora nenhuma delas tenham sido caracterizadas funcionalmente (Guiguet et al., 2016).

A 14-3-3  $\zeta$  (Zeta) é uma isoforma da 14-3-3, família de proteínas ácidas conservada evolutivamente em diversos tipos celulares (Tabunoki et al., 2008; Feng et al., 2014) encontrada nas glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* também foi identificada em grande quantidade na glândula da seda de *B. mori* nas isoformas  $\zeta$  (Zeta) e  $\epsilon$  (Epsilon) podendo estarem envolvidas na expressão e regulação de genes. A isoforma 14-3-3  $\zeta$  Zeta em *S. litura*, parece estar envolvida na defesa imunológica, bem como no desenvolvimento larval (Feng et al., 2014). Os resultados com estudos em lepidópteros não são conclusivos, os quais demonstram que ainda são necessárias novas investigações para um melhor entendimento dessa proteína como adaptador molecular.

Na classe funcional produção e conversão de energia foram preditas três proteínas, duas dessas correspondem a pirofosfatase inorgânica e a isocitrato desidrogenase. A pirofosfatase inorgânica catalisa a hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi) para ortofosfato (Pi), impulsionando termodinamicamente reações como biossíntese de esteroides, metabolismo de nucleotídeos e a regulação da transcrição de genes (Motta et al., 2004; Cruz et al., 2017). Em *D. melanogaster*, a *Inorganic pyrophosphatase* é um componente do complexo de fatores de remodelação do nucleossoma (Gdula et al., 1998). No carrapato *Rhipicephalus microplus*, a pirofosfatase tem atividade polifosfatase, o que sugere sua participação no metabolismo de polifosfatos (Cruz et al., 2017).

A isocitrato desidrogenase é uma enzima do ciclo do ácido tricarboxílico que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar  $\alpha$ -cetoglutarato, usando NAD como acceptor de elétrons (Nelson e Cox, 2014). A isocitrato desidrogenase foi identificada como um componente supramolecular do complexo hormônio juvenil/proteína de ligação na hemolinfa em *G. mellonella*, protegendo o hormônio juvenil da degradação por hidrolases inespecíficas e servindo como transportador para fornecer o hormônio aos tecidos alvo (Zalewska et al., 2011). Na glândula salivar de larvas *D. melanogaster*, a isocitrato desidrogenase pode ser um fator apoptogênico (Zaleska et al., 2011; Duncan et al., 2017). Nas células da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* a pirofosfatase inorgânica e a isocitrato desidrogenase podem indicar uma elevada atividade metabólica por conversão energia, justificada pela intensa síntese e secreção celular nessa glândula.

As proteínas enolase putativa e a fator de crescimento de disco imaginal da classe funcional de transporte e metabolismo de carboidratos foram encontradas na glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis*. A enolase é uma proteína multifuncional que desempenha uma variedade de atividades baseadas na via glicolítica (Nelson e Cox, 2014; Liu et al., 2010; Laurino, et al., 2016). Essa proteína foi reportada nas glândulas salivares de *A. gambiae* (Kalume et al., 2005), *Mayetiola destructor* (Chen et al., 2008) e na saliva de *N. cincticeps* (Hattori et al., 2015); nas glândulas labial e mandibular de *V. gonerilla* (Celorio-Mancera et al., 2012) com atuação no metabolismo de carboidratos para conversão de energia. Na glândula labial de *Haemaphysalis flava* (Acari), a enolase age como receptor de plasminogênio, desempenhando um importante papel na prevenção e formação de coágulos sanguíneos durante a alimentação (Xu et al., 2016). A enolase em *B. mori* (Kikuchi et

al., 2017) e *Antheraea pernyi* (Liu et al. 2010) está associada ao desenvolvimento de testículos e ovários, enquanto em *Aphidius ervi* é sugerido que a enolase seja uma proteína coriônica do ovo maduro (Xu et al., 2011; Nguyen et al., 2013)

O fator de crescimento de disco imaginal em *D. melanogaster* (Varela et al. 2002, Broz et al, 2017) e em *Mamestra brassicae* (Zhang et al. 2006) é um importante fator trófico que promove a organização e sobrevivência celular. A caracterização de proteínas da glândula salivar de *S. frugiperda* também revelou a presença do fator de crescimento dos discos imaginais (Acevedo et al., 2017)

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo o perfil proteico das glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* foi definido por meio de espectrometria de massas. Um total de 22 proteínas foram identificadas e categorizadas dentro de 11 classes funcionais as quais podem estar envolvidas em atividades mais específicas na interação inseto-planta, desintoxicação e metabolismo celular. Esta é a primeira caracterização proteômica da glândula mandibular da broca da cana-de-açúcar, sendo uma importante contribuição para estudos futuros visando a compreensão das relações ecológicas e de alternativas de controle desta praga agrícola.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, F.E., Stanley, B.A., Stanley, A., Peiffer, M., Luthe, D.S., Felton, G.W. 2017. Quantitative proteomic analysis of the fall armyworm saliva. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86:81–92.

Afshar, K., Dube, F. F., Najafabadi, H. S., Bonneil, E., Thibault, P., Salavati, R., Bede, J. C. 2013. Insights into the insect salivary gland proteome: diet-associated changes in caterpillar labial salivary proteins. *Journal Insect Physiology*. 59:351-366.

Arrigoni, H. B., 1992. Cana-de-açúcar-broca-da-cana-de-açúcar: moscas e pequena vespa fazem o controle. In: Manual de controle Biológico. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, 21-22.

Boiça Junior, A.L., Lara, F.M., Bellodi, M.P. 1997. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia Favipes* (Cam.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(3):537-550.

Borges A.R., 2001. Morfologia ultra-estrutural da glândula mandibular de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae) em larvas normais e parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Botucatu –SP, 94p.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.

Broz, V., Kucerova, L., Rouhova, L., Fleischmannova, J., Strnad, H., Bryant, P.J., Zurovec, M. 2017. *Drosophila* imaginal disc growth factor 2 is a trophic factor involved in energy balance, detoxification, and innate immunity. *Scientific Reports*, 7:43273.

Castilho, H.J., 1982. Introdução de *Apanteles flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera, Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae), na região de Santa Bárbara d'Oeste, SP. Dissertação Mestrado, Entomologia - ESALQ/USP, 79p.

Celorio-Mancera, M de la P., Sundmalm, S.M., Vogel, H., Rutishauser, D., Ytterberg A.J., Zubarev, R.A., Jans, N., 2012. Chemosensory proteins, major salivary factors in caterpillar mandibular glands. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(10):796–805.

Chapman, R.F., Simpson, S. J., Douglas, A. E. 2013. *The insect: Structure e Function*. Cambridge University Press, 929p.

Chen, L.Z., Liang, G.M., Zhang, J., Wu, K.M., Guo, Y.Y., Rector, B.G. 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera*. *Archives Insect Biochemistry and Physiology*, 73(2):61–73.

Chen, M-S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15(2):111-114.

Conte H., 1985. Morfologia do tubo digestivo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae) durante o desenvolvimento larval. Estudo anatômico e Histológico. Dissertação Mestrado, Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Botucatu –SP, 94p.

Cooper, W.R., Dillwith, J.W., Puterka, G.J. 2011. Comparison of salivary proteins from five aphid (Hemiptera: Aphididae) species. *Environmental Entomology* 40: 151–156.

Cruz, C.S., Costa, E.P., Machado, J.A., Silva, J.N., Romeiro, N.C., Moraes, J., Silva, J.R., Fonseca, R.N., Vaz, I.S.Jr., Logullo, C., Campos, E. 2017. A soluble inorganic

pyrophosphatase from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* capable of hydrolysing polyphosphates. *Insect Molecular Biology*, 27(2): 260-267.

De Andrade, A., Siviero, F., Resende-Teixeira, P., Santelli, R.V., Machado-Santelli, G.M. 2009. Molecular characterization of a putative heat shock protein cognate gene in *Rhynchosciara americana*. *Chromosome Research*, 17(7): 935-945.

Duncan, D.M., Kiefel, P., Duncan, I. 2017. Mutants for *Drosophila* isocitrate dehydrogenase 3b are defective in mitochondrial function and larval cell death. *G3 (Bethesda)*, 7(3):789–799.

Feng, E., Chen, H., Li, Y., Jiang, W., Wang, Z., Yin, Y. 2014. Gene cloning, expression, and function analysis of SpL14-3-3zeta in *Spodoptera litura* and its response to the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemical and Molecular Biology*, 172–173:49–56.

Foyer, C.H., Rasool, B., Davey, J.W., Hancock, R.D. 2016. Cross tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: A focus on resistance to aphid infestation focus on resistance to aphid infestation. *Journal of Experimental Botany*, 67 (7): 2025-2037.

Gallo, D., Nakano O., Neto, S.S., Carvalho, P.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi R.A., Alves S.B., Vendramim J.D., 1988. Manual de entomologia agrícola. São Paulo. Agronômica Ceres, 649p.

Goo, T.W., Park, S., Jin, B.R., Yun, E.Y., Kim, I., Nho, S., Kang, S.W., Kwon, O.Y. 2005. Endoplasmic reticulum stress response of *Bombyx mori* calreticulin. *Molecular Biology Reports*, 32(3):133–139.

Graça, L.R. 1976. Estimativa econômica dos prejuízos causados pelo complexo broca-podridão da cana-de-açúcar no Brasil. *Brasil Açucareiro*, 88:12-34.

Gu, J., Huang, L.X., Shen, Y., Huang, L.H., Feng, Q.L. 2012. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Molecular Biology*, 21(5):535–543.

Guiguet, A., Dubreuil, G., Harris, M.O., Appel, H.M., Giron, D. 2016. Shared weapons of blood- and plant-feeding insects: Surprising commonalities for manipulating hosts. *Journal of Insect Physiology*, 84:4-21.

Hattori, M., Komatsu, S., Noda, H., Matsumoto, Y. 2015. Proteome analysis of watery saliva secreted by green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. 10(4): PLoS One. 10(4) 1-18.

Hensley, S.D., Hammond, A.M. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, 61(6):1742-1743.

Jaworski, D.C., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M.T., Needham, G.R. 1995. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal of Insect Physiology*, 41(4):369-375.

Kalume, D.E., Okulate, M., Zhong, J., Reddy, R., Suresh, S., Deshpande, N., Kumar, N., Pandey, A. 2005. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics*, 5(14):3765–3777.

Karouna-Renier, N.K., Yang, W.-J., Ranga Rao, K. 2003. Cloning and characterization of a 70kDa heat shock cognate gene (HSC70) from two species of *Chironomus*. *Insect Molecular Biology*, 12 (1): 19-26.

Kawamura, K., Shibata, T., Saget, O., Peel, D., Bryant, P.J. 1999. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* 126 (2): 211-219.

Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., Aebersold, R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*. 74(20), 5383–5392.

Kikuchi, A., Nakazato, T., Ito K., Nojima, Y., Yokoyama, T., Iwabuchi, K., Bono, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Sato, R., Tabunoki, H. 2017. Identification of functional enolase genes of the silkworm *Bombyx mori* from public databases with a combination of dry and wet bench processes. *BMC Genomics*, 18(83):1-12.

Konishi, H., Noda, H., Tamura, Y., Hattori M. 2009. Proteomic analysis of the salivary glands of the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera : Delphacidae) *Applied Entomology and Zoology*, 44(4):525–534.

Krause, K-H., Michalak, M. 1997. Calreticulin. *Cell*, 88: 439–443.

Krishnan, N., Kodrík, D., 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology*, 52(1):11–20.

Laurino, S., Grossi, G., Pucci, P., Flagiello, A; Bufo, S.A., Bianco, G., Salvia, R., Vinson, B., Vogel, H., Falabella, P. 2016. Identification of major *Toxoneuron nigriceps* venom proteins using an integrated transcriptomic/proteomic approach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 76: 49-61.

Lee, K.S., Kim, S.R, Park, N.S , Kim, I., Kang, P.D., Sohn, B.H., Choi, K.H., Kang, S.W., Je, Y.H., Lee, S.M., Sohn, H.D., Jin, B.R. 2005. Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1):73–84.

Li, J., Moghaddam, S.H., Du, X., Zhong, B.X., Chen, Y.Y. 2012. Comparative analysis on the expression of inducible HSPs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports* 39(4):3915–3923.

Liu, Y., Li Y., Wang, H., Xia R., Li, X., Wan H., Qin, L., Jiang, D., Lu, C., Xiang, Z. 2010. CDNA cloning and expression pattern of two enolase genes from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)*, 42(11):816–826.

Liu, Y., Su H., Li R., Li X., Xu Y., Dai X., Zhou Y., Wang, H., 2017. Comparative transcriptome analysis of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reveals novel insights into heat stress tolerance in insects. *BMC Genomics*, 18(1):974.

Lyupina, Y.V., Orlova, O.V., Abaturova, S.B., Beljelarskaya, S.N., Lavrov, A.N., Mikhailov, V.S. 2014. Egress of budded virions of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus does not require activity of *Spodoptera frugiperda* HSP/HSC70 chaperones. *Virus Research*, 192:1–5.

Motta, L.S., Da Silva, S., Oliveira, D.M.P., De Souza, W., Machado E.A. 2004. A new model for proton pumping in animal cells: The role of pyrophosphate. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1):19–27.

Nelson D.L., Cox M.M., 2018. *Princípios da Bioquímica de Lehninger*, 7ª edição. Porto Alegre: Artmed, p.1312.

Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(17), 4646–4658.

Nguyen, T.T., Magnoli, I., Cloutier, C., Michaud, D., Muratori, F., Hance T. 2013. Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts. *Journal of Insect Physiology*, 59(1)11-18.

Parthasathy, R., Gopinathan, K.P. 2005 Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expression Patterns*, 5:323-339.

Pesch, Y.-Y., Riedel, D., Patil, K. R., Loch, G., Behr, M. 2016. Chitinases and Imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. *Scientific Reports*, 6: 18340.

Rivera-Veja, L.J., Acevedo, F.E, Felton G.W. 2017. Genomics of Lepidoptera saliva reveals function in herbivory. *Current Opinion in Insect Science*, 19:61–69.

Shashank, P.R., Bollineni, H. 2014. Insect Proteomics: present and future prospective. *Current Biotica*, 7 (4):336-342.

Shu, Y., Du, Y., Wang, J. 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. *Comparative Biochemistry Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 158(1):102–110.

Singh, B., Crippen, T.L., Zheng, L., Field, A.T, Yu, Z., Ma, Q., Wood, T.K., Dowd, S.E., Flores, M., Tomberlin, J.K., Tarone, A.M. 2015. A metagenomic assessment of the bacteria associated with *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2):869–883.

Stoltzfus, J.R., Horton, W.J., Grotewiel, M.S. 2003. Odor-guided behavior in *Drosophila* requires calreticulin. *Journal Comparative Physiology A: Neuroethology Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 189(6):471–483.

Tabunoki, H., Shimada, T., Banno, Y., Sato, R., Kajiwara, H., Mita, K., Satoh, J. 2008. Identification of *Bombyx mori* 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Journal of Neuroscience Research*, 61(3):271–280.

Takahashi, T., Murakami, H., Imanishi, S., Miyazaki, M., Kamiie, K., Suzuki, K., Taira H., Yamachita T. 2006. Calreticulin is transiently induced after immunogen treatment in the fat body of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 75(2):79–84.

Téran, F.O., Precetti, A.A.C.M., Dernika, O. 1983. Broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: COPERSUCAR. Pragas da cana-de-açúcar. São Paulo, p.4-15.

Tian, D., Peiffer, M., Shoemaker, E., Tooker, J., Haubruge, E., Francis, F., Luthe, D. S., Felton, G. W. 2012. Salivary glucose oxidase from caterpillars mediates the induction of rapid and delayed-induced defenses in the tomato plant. *PLoS One*, 7(4):e36168.

Varela, P.F., Llera, A.S., Mariuzza, R.A., Tormo, J. 2002. Crystal structure of imaginal disc growth factor-2. A member of a new family of growth-promoting glycoproteins from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15):13229–13236.

Vegliante, F., Hasenfuss, I. 2012. Morphology and diversity of exocrine glands in lepidopteran larvae. *Annual Review of Entomology*, 57:187–204.

Victoriano, E., Pinheiro, D.O., Gregorio, E.A., 2007. Histochemical and ultrastructural evidence of lipid secretion by the silk gland of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). *Neotropical Entomology*, 36(5):707–11.

Wang, L., Fang, Q., Zhu, J., Wang, F., Rean Akhtar, Z., Ye, G. 2012. Molecular cloning and functional study of calreticulin from a lepidopteran pest, *Pieris rapae*. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(1):55–65.

Wang, L., Liu, D., Yang, L., Zhu, B., Liu, C., 2014. Expression patterns of calreticulin from *Bombyx mori* after immune challenge. *Pakistan Journal Zoology*, 46(6):1731–1737.

Wang, Q., Zhou, Y., Chen, K., Ju, X. 2016. Identification and characterization of an atypical 2-cys peroxiredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 25(4):347–354.

Wronizewska, A. 1966. Mandibular glands of the wax moth larva, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Insect Physiology*, 12:509–522.

Xu, W., Papanicolaou, A., Zhang, H.J., Anderson, A. 2016. Expansion of a bitter taste receptor family in a polyphagous insect herbivore. *Scientific Reports*, 6 (23666): 1-10.

Xu, Y., Fu, Q., Li, S., He, N. 2011. Silkworm egg proteins at the germ-band formation stage and a functional analysis of BmEP80 protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8):572–581.

Zalewska, M., Ozyhar, A., Kochman, M. 2011. Identification of specific interaction of juvenile hormone binding protein with isocitrate dehydrogenase. *Acta Biochimica Polonica*, 58(1):119–124.

Zhang, J., Iwai, S., Tsugehara, T., Takeda, M. 2006. MbIDGF, a novel member of the imaginal disc growth factor family in *Mamestra brassicae*, stimulates cell proliferation in two lepidopteran cell lines without insulin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(7):536–546.

Zhang, Q., Denlinger, D.L. 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of Insect Physiology*, 56(2):138–150.

## CAPÍTULO 2

CROMATOGRAFIA GASOSA DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LARVAS  
DE *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

## RESUMO

*Diatraea saccharalis* é um dos principais insetos que atacam a cultura canavieira no Brasil, causando danos consideráveis na produção, com importante impacto econômico. A glândula mandibular de larvas de lepidópteros é uma estrutura par, adjacente ao tubo digestório com possível função de auxiliar na ingestão, digestão dos alimentos e lubrificação de peças bucais. Com função ainda pouco definida, o presente trabalho tem como objetivo identificar a composição química do extrato de glândula mandibulares de larvas de no quinto instar de *D. saccharalis*. As glândulas foram removidas e extraídas para análises quantitativas e qualitativas do extrato, usando cromatografia gasosa acoplado a um detector de massas. No extrato das glândulas há uma mistura de hidrocarbonetos: C<sub>4</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> e C<sub>18</sub>, que correspondem a grupos funcionais álcoois, éter, alceno e éster. O ácido linolênico, principal composto identificado, quando conjugado com aminoácidos podem se tornar elicitador na interação inseto-planta. Resultados que contribui para discussão do papel funcional das glândulas mandibulares de larvas de lepidópteros.

Palavras-chave: Glândula Mandibular. Cromatografia Gasosa. *Diatraea saccharalis*.

## ABSTRACT

*Diatraea saccharalis* is one of the main insects that attack the sugarcane crop in Brazil, causing considerable damage to production, with significant economic impact. The mandibular gland of lepidopteran larvae is an even structure, adjacent to the digestive tract with a possible function to aid ingestion, digestion of food and lubrication of mouthparts. With a yet undefined function, the present work aims to identify the chemical composition of the mandibular gland extract of *D. saccharalis* fifth instar larvae. The glands removed and extracted for quantitative and qualitative analysis of the extract using gas chromatography coupled to a mass detector. In the extract of the glands, there is a mixture of hydrocarbons: C4, C11, C12, C14 and C18, which correspond to functional groups alcohols, ether, alkane and ester. Linolenic acid, the main compound identified, when conjugated with amino acids can become elicitor in the insect-plant interaction, a result that contributes to the discussion of the functional role of the mandibular glands of lepidopteran larvae.

Keywords: Mandibular gland. Gas Chromatography. *Diatraea saccharalis*.

## 1. INTRODUÇÃO

A glândula mandibular de larvas de lepidópteros é uma estrutura par e tubular adjacente a glândula labial e tubo digestório, podendo chegar aos primeiros segmentos torácicos ou abdominais das larvas dependendo da espécie (Wroniszewska, 1966; Parthasarthy e Gopinathan, 2005; Vegliante e Hasenfuss, 2012; Rivera-Vega et al., 2017). A função atribuída à glândula mandibular é auxiliar na ingestão, digestão dos alimentos e lubrificação de peças bucais; enquanto a glândula labial desempenha função de produção de seda para construção do casulo (Wroniszewska, 1966; Ali, 1997; Eberhard e Krenn, 2003; Celorio-Mancera et al., 2011; Fitzgerald et al., 2014; Bhawane e Pawwar, 2017)

A saliva desempenha um papel importante na interação inseto-planta, em função da presença de elicitadores que são responsáveis pela ativação dos mecanismos de defesa da planta, desencadeando a biossíntese de hormônios vegetais, emissões de voláteis e indução de genes de defesa (De Moraes et al., 2001; Reddy e Guerreiro, 2004; Musser et al., 2006; Felton et al., 2008; Diezel et al., 2009; Erb et al., 2012; Celorio-Mancera et al., 2012; Erb et al., 2012; Acevedo et al., 2015; Schmelz, 2015; Guiguet et al., 2016). Os ácidos graxos conjugados com aminoácidos, enzimas líticas e peptídeos são reconhecidos em lepidópteros como elicitadores que impulsionam mudanças complexas na planta para sua defesa (Halitschke et al., 2001; Spiteller e Boland, 2003; Aboshi et al., 2004; Roda et al., 2004; Maischak et al., 2007; Chuang et al., 2014; Schmelz, 2015)

Nas glândulas mandibulares de larvas de lepidópteros além de elicitadores foi demonstrado a presença de feromônio de oviposição que influencia o número e distribuição espacial dos ovos de *Ephestia kuehniella* (Cobert, 1973; Mudd e Cobert, 1973; Xu, et al., 2008) e em *Anagasta kuehniella* influencia o movimento de oviposição do parasitoide (Cobert, 1971). O caïromônio é um outro produto secretor da glândula mandibular de larvas de lepidópteros como em *Pseudaletia separata* (Takabayashi et al., 1985); *Ephestia kuehniella* (Strand et al., 1989) e *Plodia interpunctella* (Phillips e Strand, 1994), importante para os parasitoides reconhecerem seus hospedeiros e realizarem oviposição (Richard et al., 1976; Takabayashi et al., 1985; Strand et al., 1989; Phillips e Strand, 1994)

A secreção da glândula mandibular de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) não é totalmente conhecida, portanto, estudo de ultraestrutura das células

da região secretora revelou retículo liso bem desenvolvido, cuja secreção salivar é potencialmente lipídica (Borges, 2001). Esta glândula atinge até os últimos segmentos abdominais e se divide morfológicamente em ducto excretor, ampola e região secretora subdividida em porção anterior proximal, distal, média e posterior (Borges 2001).

A broca de cana-de-açúcar *D. saccharalis* é dos principais insetos que atacam a cultura canavieira no Brasil (Gallo et al., 1988; Téran et al., 1983; Castilho, 1982; Boiça Junior et al., 1997; Cruz, 2007). As larvas de *D. saccharalis* atacam a planta de cana-de-açúcar formando extensas galerias, deixando a planta com estrutura frágil e vulnerável a entrada de diversos microrganismos patogênicos ocasionando doenças que refletem na redução da produção e perdas econômicas (Vendramin, 1992; Arrigoni, 1992; Boiça Junior et al., 1997; Mena, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo identificar a composição química da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* no quinto instar, a fim de contribuir com a discussão do papel funcional da glândula mandibular de lepidópteros.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da larvas

As larvas de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) – Campus de Piracicaba, SP. As larvas foram alimentadas com dieta artificial desenvolvida por Henseley e Hammond (1968), mantidas a 27-30°C, umidade relativa 70±10% e fotoperíodo de 14 horas até a coleta das glândulas mandibulares no 5º instar larval.

### 2.2 cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)

Larvas de *D. saccharalis* foram crioanestesiadas à -4 °C durante 5 min e as glândulas mandibulares foram removidas. As glândulas foram extraídas em 100 µL de diclorometano em ultrassom durante 30 min. Os extratos de 10 glândulas foram combinados e colocados num frasco de vidro (1,5 mL) por triplicata. As análises quantitativas do extrato das glândulas mandibulares foram realizadas usando um cromatógrafo em fase gasosa (instrumento da série GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama (FID). AS condições cromatográficas utilizadas foram uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,22 mm) com uma fase ligada DB-5 (0,25 µm de espessura de película); gás transportador

N<sub>2</sub> a uma taxa de fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura do injetor 220 °C; Temperatura do detector 240 °C; temperatura da coluna programada para começar a 40 °C (isotérmica restante durante 2 min) e depois aumentar a 3 °C min<sup>-1</sup> a 240 °C (isotérmica restante a 240 °C durante 15 min); volume de injeção 1 µL (1% p / v em diclorometano); razão de divisão 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

Os compostos das glândulas mandibulares foram analisados qualitativamente utilizando um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas CG/MS (CGMS-QP 5050A; Shimadzu, Kyoto, Japão). As temperaturas do injetor e do detector foram 220 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C durante 3 min, com um aumento de temperatura programado de 3 °C/min para 300 °C, mantido durante 25 min. A proporção modo “split” foi de 1:10. Um microlitro do extrato das glândulas mandibulares contendo 1% (w/v em diclorometano) foi injetado, o hélio foi utilizado como gás transportador com uma constante de taxa de fluxo de 1,8 mL<sup>-1</sup> na coluna capilar Rtx®-5MS (30 m, 0,25 mm x 0,25 µm; Bellefonte, USA), utilizando a fase estacionária Crossbond® (35% difenil-dimetil polissiloxano 65%). O espectrômetro de massa foi programado para detectar massas na gama de 29-450 DA com 70 eV de energia de ionização.

Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massa disponíveis nas bibliotecas do “National Institute of Standards and Technology” (NIST08, NIST11), base de dados Wiley Spectroteca (7<sup>a</sup> edição) e pelos índices de retenção.

### 3. RESULTADOS

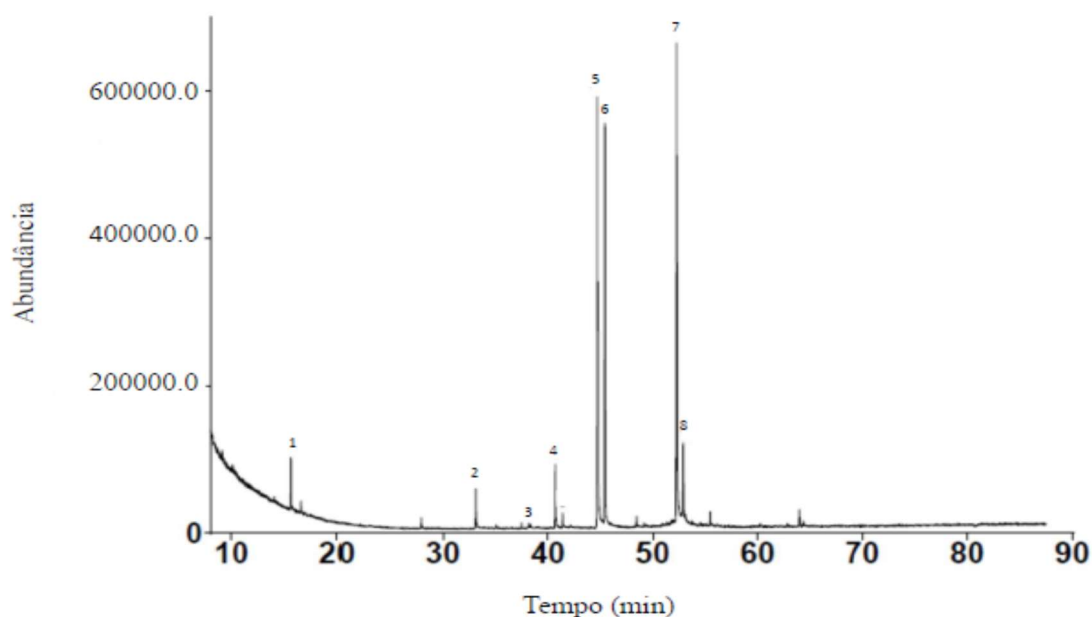
A composição do extrato das glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* apresentou um cromatograma com a identificação de 08 compostos: (1) 3-Butinol; (2) 2,3 – Epoxi-1-butanol; (3) 1,3 Butanodiol; (4) Undecano; (5) Dodecanol; (6) Tetradecano; (7) Ácido Linolênico (E, E); (8) Ácido Linolênico (Z, Z), (Tabela 1 e Figura 1).

Os compostos identificados com maior abundância relativa foram (5) Dodecanol; (6) Tetradecano; (7) Ácido Linolênico (E, E) e aqueles compostos de menor abundância foram o (1) Butinol; (2) 2,3 – Epoxi-1-butanol; (3) 1,3 Butanodiol; (4) Undecano; (8) Ácido Linolênico (Z, Z). O Ácido Linolênico foi identificado em 2 picos diferentes, o que corresponde aos isômeros E-Z; (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1.** Compostos químicos do extrato de glândulas mandibulares de larvas de *Diatraea saccharalis*.

Picos	Compostos	Fórmula	MM	Ri	Rt	m/z
1	3- Butinol	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	70	659	15.41	70.09
2	2,3-Epoxi-1-butanol	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	714	32.88	88.10
3	1,3 Butanodiol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90	824	38.09	90.12
4	Undecano	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156	1115	40.45	198.38
5	Dodecanol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	186	11456	44.50	198.38
6	Tetradecano	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198	1742	45.19	198.38
7	Ácido Linolênico (E, E) isômero	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278	2804	52.14	278.43
8	Ácido Linolênico (Z, Z) isômero	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278	2804	52.66	278.43

**MM-** Massa molecular; **Ri** – Índices de retenção; **Rt-** Tempo de retenção; **m/z** – Massa do fragmento/carga.



**Figura 1.** Cromatograma dos compostos identificados do extrato de glândulas mandibulares de larvas de *Diatraea saccharalis*: (1) 3-Butinol; (2) 2,3 – Epoxi-1-butanol; (3) 1,3 Butanodiol; (4) Undecano; (5) Dodecanol; (6) Tetradecano; (7) Ácido Linolênico (E, E); (8) Ácido Linolênico (Z, Z).

#### 4. DISCUSSÃO

A secreção da glândula mandibular de lepidópteros tem demonstrado uma grande diversidade de compostos químicos. O composto mais abundante em *D. saccharalis* foi o dodecanol, tetradecano e ácido linolênico, enquanto nas glândulas mandibulares de larvas de *Plodia interpunctella* o composto que destaca é o 2-acilciclohexano-1,3-diona (Phillips e Strand, 1994), semelhante aos lipídios cuticulares (Howard e Baker, 2004) que também foi encontrado nas glândulas mandibulares de larvas de *Ephestia kuehniella* (Cobert, 1973; Mudd e Cobert, 1981; Mudd e Corbet, 1982; Anderson e Hallberg, 1990) e *Anasgasta kuehniella* (Cobert, 1971; Mudd e Cobert, 1973), sendo considerado como cairômonio, ilicitador importante para atração dos parasitoides e estímulo da oviposição (Lewis et al., 1976; Takabayashi et al., 1985; Strand et al., 1989; Anderson e Hallberg, 1990; Phillips e Strand, 1994; Parra et al., 1995; Jiang et al., 2015). Em *Cactoblastis cactorum* este composto é relatado como feromônio de marcação de trilha (Fitzgerald et al., 2014).

As análises da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* revelam abundância de ácido linolênico como encontrado em *Spodoptera exigua* (Alborn et al., 1997; Spiteller e Boland, 2003; Chuang et al., 2014) *Spodoptera litura* (Aboshi et al., 2007), *Spodoptera frugiperda* (Carrol et al., 2006; Spiteller e Boland, 2003) e *Manduca sexta* (Halitschke et al., 2001, Lait et al., 2003). Os ácidos linolênico ou linoleico fazem parte da composição dos ácidos graxos conjugados com aminoácidos (N-linolenoil-L-glutâmico, N-linolenoil-L-glutamina e N- [17-hidroxilinoil] -L-glutamina) e são elicitadores capazes de induzir uma série de mudanças bioquímicas na planta hospedeira como a emissão de voláteis com função defensiva (Aborn et al., 1997; Pohnert et al., 1999; Halitschke et al., 2001; Lait et al., 2003; Spiteller e Boland, 2003; Roda et al., 2004; Arimura et al., 2005; Carrol et al., 2006; Wang et al., 2006; Aboshi et al., 2007; Maischak et al., 2007; Pinto-Zevanellos et al., 2013; Chuang et al., 2014).

O tetradecano, hidrocarboneto alceno presente em abundância na glândula mandibular de *D. saccharalis*, tem sido descrito em lepidópteros como um kairomônio de atração de parasitoides destes insetos, contribuindo com o controle populacional de insetos-praga (Bakthavatsalam et al., 1999; Murali-Baskaran et al., 2018) como relato para *Corcyra cephalonica* (Parthiban et al., 2016). Em fêmeas adulto de *S. exigua* o tetradecano foi encontrado em glândulas de feromônio sexual (Deisig et al., 2014; Mujiomo et al., 2015) em larvas de *S. frugiperda* está na glândula eversível ventral onde o produto secretor pode estar envolvido na defesa, dispersão, na resistência da seda e proteção do casulo (Severson et al., 1991). Em *Chlorochroa uhleri*, *Chlorochroa sayi*, e *Chlorochroa ligata* (Hemiptera: Pentatomidae) este composto ocorre nas glândulas metatóracica e abdominal caracterizado como composto defensivo (Hoo e Millar, 2001; Marques et al., 2007).

Os álcoois 3-Butinol, 2,3-Epoxi-1-butanol e 1,3 Butanediol presentes na glândula mandibular de *D. saccharalis* tem sido considerados como feromônios de atração sexual e agregação em lepidópteros e coleópteros (Lange e Fering, 1988; Ohmasa et al., 1991; Mori, 1998; Millar, 2000; Ben-Yehuda, 2002; Muto e Mori, 2003; Muto e Mori, 2005; Enders et al., 2005; Zarbin et al., 2007; Aldo et al., 2008; Bergmann et al., 2009; Hoddle et al., 2009; Wakamura et al., 2009; Birgersson et al., 2012; Pajares et al., 2013; Kumar et al., 2015). Entretanto esses compostos não foram encontrados na glândula mandibular de larvas de outros lepidópteros (Cobert, 1971; Cobert, 1973;

Mudd e Cobert, 1973; Richard et al., 1976; Takabayashi et al., 1985; Strand et al., 1989; Phillips e Strand, 1994; Fitzgerald et al., 2014; Bhawane e Pawar, 2017).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados das análises da glândula mandibular de larvas de *D. sacchralis* sugerem que o ácido linolênico principal composto identificado quando conjugado com aminoácido pode desempenhar um papel elicitador na interação inseto-planta, contribuindo para a discussão da ação multifuncional das glândulas mandibulares de lepidópteros.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Aboshi, T., Yoshinaga, N., Noge, K., Nishida, R., Mori, N. 2007. Efficient incorporation of unsaturated fatty acids into volicitin-related compounds in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(2):607–610.

Acevedo, F.E., Rivera-Vega L. J., Chung, S.H., Ray, S., Felton, G.W. 2015. Cues from chewing insects- The intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 26: 80-86.

Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G, Loughrin, J.H., Tumlinson, J.H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276(5314):945–949.

Ali, D.W. 1997. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *The Journal of Experimental Biology*, 200:1941–1949.

Anderson, P., Hallberg, E. 1990. Structure and distribution of tactile and bimodal taste/tactile sensilla on the ovipositor, tarsi and antennae of the flour moth, *Ephesia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 19: 13-23.

Ando, T., Kawai, T., Matsuoka, K. 2008. Epoxyalkenyl sex pheromones produced by female moths in highly evolved groups: Biosynthesis and its endocrine regulation. *Journal of Pesticide Science*, 33(1) 17-20.

Arimura, G.I., Kost, C., Boland, W. 2005 Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Biology of Lipids*, 1734(2):91–111.

Arrigoni, H. B. 1992. Cana-de-açúcar-broca-da-cana-de-açúcar: moscas e pequena vespa fazem o controle. In: *Manual de controle Biológico*. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, p.21-2.

Bakthavatsalam, N., Singh, S.P., Tadon, P.L., Chaudhary, M., Preethi, S. 1999. Behavioural responses of key parasitoids of *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) of the kairomones. *Journal Biological Control*, 13:7–14.

Ben-Yehuda, S., Tolasch, T., Francke, W., Gries, R., Gries, G., Dunkelblum, D., Mendel, Z. 2002. Aggregation pheromone of the almond bark beetle *Scolytus amygdali* (Coleoptera: Scolytidae). *International Organisation for Biological and Integrated Control (IOBC) - West Palaearctic Regional Section (WPRS) Bulletin*, 25:1–12.

Bergmann, J., Villar, J., Flores, M., Zarbin, P. 2009. Synthesis of Pheromones: Highlights from 2005-2007. *Current Organic Chemistry*, 13(7):683–719.

Bhawane, G. P., Pawar, N.T. 2017. Mandibular glands of bivoltine race of silkworm, *Bombyx mori* (CSR2XCSR4). *Bioscience Discovery*, 8(4): 791-795.

Birgersson, G., Dalusky, M.J., Espelie, K.E., Berisford, C.W. 2012. Pheromone production, attraction, and interspecific inhibition among four species of *Ips* bark beetles in the Southeastern USA. *Psyche A Journal of Entomology*, 6:1-14.

Boiça Junior A.L., Lara, F.M., Bellodi, M.P. 1997. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia Flavipes* (Cam.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(3):537-550.

Borges, A.R. 2001. Morfologia ultra-estrutural da glândula mandibular de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae) em larvas normais e parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Botucatu –SP, 94p.

Carroll, M.J., Schmelz, E.A., Meagher, R.L., Teal, P.E.A. 2006. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *Journal Chemical Ecology*, 32(9):1911–1924.

Castilho, H.J.1982. Introdução de *Apanteles flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera, Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatrea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae), na região de Santa Bárbara d'Oeste, SP. Dissertação Mestrado, Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, SP.79p. 1982.

Celorio-Mancera, M de la P., Courtiade, J., Muck, A., Heckel, D.G., Musser, R.O., Vogel, H. 2011. Sialome of a generalist lepidopteran herbivore: identification of transcripts and proteins from *Helicoverpa armigera* labial salivary glands. *PLoS One*, 6(10):e26676.

Celorio-Mancera, M de la P., Sundmalm, S.M., Vogel H., Rutishauser, D., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., Jans N. 2012. Chemosensory proteins, major salivary factors in caterpillar mandibular glands. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 42 (10):796–805.

Chuang, W-P., Ray, S., Acevedo, F.E., Peiffer, M., Felton, G.W., Luthe, D.S. 2014. Herbivore cues from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) larvae trigger direct defenses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(5):461–70.

CORBET, S.A. 1971. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella* contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a hymenopteran parasite. *Nature*, 232(5311):481–484.

CORBET, S.A. 1973. Oviposition pheromone in larval mandibular glands of *Ephestia kuehniella*. *Nature*, 243(5409):537–538

Cruz, I. 2007. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Circular Técnica. Embrapa Milho e Sorgo. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Brasil, Governo Federal, 90:12.

De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature*, 410 (6828):577–580.

Deisig, N., Dupuy, F., Anton, S., Renou, M. 2014. Responses to pheromones in a complex odor world: sensory processing and behavior. *Insects*, 5(2):399–422.

Diezel, C., von Dahl, C.C., Gaquerel, E., Baldwin, I.T. 2009. Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiology*, 150(3):1576–1586.

Eberhard, S., Krenn, H.W. 2003. Salivary glands and salivary pumps in adult Nymphalidae (Lepidoptera). *Zoomorphology*, 122(4):161–167.

Enders D., Breuer I., Nühning A., 2005. First asymmetric synthesis of (+)-sordidin and (-)-7-epi-sordidin, aggregation pheromones of the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. *European Journal of Organic Chemistry*, (13):2677–83.

Erb, M., Meldau, S., Howe, G.A. 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Sciences*, 17(5):250–259.

Felton, G.W. 2008. Caterpillar secretions and induced plant responses. *Induced Plant Resistance to Herbivory*, 369–87.

Fitzgerald, T.D., Wolfen M., Rossi F., Carpenter J.E., Pescador-Rubio, A. 2014. Trail marking by larvae of the cactus moth, *Cactoblastis cactorum*. *Journal of Insect Science*, 14(64):64.

Gallo, D., Nakano O., Neto, S.S., Carvalho, P.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D. 1988. Manual de entomologia agrícola. São Paulo. Agronômica Ceres, 649p.

Guiguet, A., Dubreuil, G., Harris, M.O., Appel, H.M., Giron, D. 2016. Shared weapons of blood- and plant-feeding insects: Surprising commonalities for manipulating hosts. *Journal of Insect Physiology*, 84:4-21.

Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., Baldwin, I.T. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiology*, 125(2):711–717.

Hensley, S.D., Hammond, A.M.Jr.1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal Economic Entomology*, 61:1742-1743.

Ho, H.Y., Millar, J.G. 2001. Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zoological Studies*, 40(3):193–198.

Hoddle, M.S., Millar, J.G., Hoddle, C.D., Zou, Y., McElfresh, J.S. 2009. Synthesis and field evaluation of the sex pheromone of *Stenoma catenifer* (Lepidoptera: Elachistidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(4):1460–1467.

Howard, R.W., Baker, J.E. 2004. Stage-specific surface chemicals of *Plodia interpunctella*: 2-acyl-1,3-cyclohexanediones from larval mandibular glands serve as cuticular lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology* 138(2):193-206.

Jiang, X.C., Dong, W.X., Chen, B., Xiao, C., Gui, F-R., Yan, N.S., Qian, L., Li, Z-Y. 2015. Electrophysiological and oviposition responses of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), to compounds rinsed from the surfaces of sugarcane and maize leaves. *European Journal of Entomology*, 112(2):295–301.

Kumar, D., Chirumarry, S., Vijaykumar, B.V.D., Harshavardhan, S.J., Jang, K., Lee, D.H. 2015. Practical synthesis of (9S, 10R)-9, 10-epoxy-(3Z, 6Z)-hencosadiene: the major pheromone of the saltmarsh caterpillar moth *Estigmene acrea*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 36(4):1245–1249.

Lait, C.G., Alborn, H.T., Teal, P.E.A., Tumlinson, J.H. 2003. Rapid biosynthesis of N-linolenoyl-L-glutamine, an elicitor of plant volatiles, by membrane-associated enzyme(s) in *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12):7027–7032.

Lange, B.D., Fering, B., 1988. Asymmetric 1,4-additions to 5-alkoxy-2(5h)-furanones. An efficient synthesis of (r)- and (s)- 3,4-epoxy-1-butanol. *Tetrahedron*, 44(23):7213–7222.

Lewis, W.J., Jones, R.L., Gross, H.R., Nordlund, D.A. 1976. The role of kairomones and other behavioral chemicals in host finding by parasitic insects. *Behavioral Biology*, 16(3):267–289.

Maischak, H., Grigoriev, P.A., Vogel, H., Boland, W., Mithöfer, A. 2007. Oral secretions from herbivorous lepidopteran larvae exhibit ion channel-forming activities. *FEBS Letters*, 581(5):898–904.

Marques, F.A., Wendler, E.P., Sales Maia, B.H.L.N., Ventura, M.U, Arruda-Gatti, I.C. 2007. Identification of defensive compounds in metathoracic glands of adults of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of the Brazilian Chemical Society, 18(6):1242–1246.

Mena, E.F.G. 2010. Toxicidade de inseticidas a *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). Universidade de São Paulo (USP) –Piracicaba, São Paulo. p.61.

Millar, J.G. 2000. Polyene hydrocarbons and epoxides: a second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. Annual Revision of Entomology, 45(1):575–604.

Mori K., 1998. Chirality and insect pheromones. Chirality, 10(7):578–86.

Mudd A., Corbet S.A. 1982. Response of the ichneumonid parasite *Nemeritis canescens* to kairomones from the flour moth, *Ephestia kuehniella*. Journal of Chemical Ecology, 8(5):843–850.

Mudd, A. 1981. Novel 2-acylcyclohexane-1,3-diones in the mandibular glands of lepidopteran larvae. Journal of Chemical Society Transaction, 1. 2357–2362.

Mudd, A., Cobert, S.A. 1973. Mandibular gland secretion of larvae of stored products pests *Anagasta kuehniella*, *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella* and *Ephestia elutella*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 16:291–293.

Mujiono, K., Putra, N.S. 2015. The Sex pheromone content of the *Spodoptera exigua* (Hubner) under artificial and natural diets. International Journal of Science and Engineering (IJSE) 8:146–150.

Murali-Baskaran, R.K., Sharma, K.C., Kaushal, P., Kumar, J., Parthiban, P., Senthil-Nathan, S., Mankin, R.W. 2018. Role of kairomone in biological control of crop pests- A review. Physiological and Molecular Plant Pathology, 101:3–15.

Musser, R.O., Farmer, E., Williams, S., Felton, G.W. 2006. Ablation of caterpillar labial salivary glands: technique for determining the role of saliva in insect–plant interactions. Journal of Chemical Ecology, 32(5):981–992.

Muto, S., Mori, K. 2003. Synthesis of the four components of the female sex pheromone of the painted apple moth, *Teia anartoides*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67(7):1559–1567.

Muto, S., Mori, K. 2005. Pheromone Synthesis. Part. 219. Synthesis of all four stereoisomers of Leucomalure, components of the female sex pheromone of the satin moth, *Leucoma salicis*. ChemInform, 34(31):3–10.

Ohmasa, Y., Wakamura, S., Kozai, S., Sugie, H., Horiike, M., Hirano, C., Mori, S. 1991. Sex pheromone of the fruit-piercing moth, *Oraesia excavata* (Butler)

(Lepidoptera: Noctuidae): isolation and identification. *Applied Entomology and Zoology* 26 (1): 55-62.

Pajares, J.A., Álvarez, G., Hall, D.R., Douglas, P., Centeno, F., Ibarra, N., Schroeder M., Teale, S.A., Yan, S., Millar, J.C., Hanks, L.M. 2013. 2-(Undecyloxy)-Ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentales et Applicata*, 149(2):118–127.

Parthasarathy, R., Gopinathan, K.P. 2005. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expression Patterns*, 5(3):323–339.

Phillips, T.W., Strand, M.R. 1994. Larval secretions and food odors affect orientation in female *Plodia interpunctella*. *Entomologia Experimentalis et applicata*, 71(3):185-192.

Pohnert, G., Jung, V., Haukioja, E., Lempa, K., Boland, W. 1999. New fatty acid amides from regurgitant of Lepidopteran (Noctuidae, Geometridae) caterpillars. *Tetrahedron*, 55(37):11275–11280.

Reddy, G.V.P., Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Science*, 9(5):253–261.

Rivera-Veja, L.J., Acevedo, F.E, Felton, G.W. 2017. Genomics of Lepidoptera saliva reveals function in herbivory. *Current Opinion in Insect Science*, 19:61–69.

Roda, A., Halitschke, R., Steppuhn, A., Baldwin, I.T. 2004. Individual variability in herbivore-specific elicitors from the plant's perspective. *Molecular Ecology*, 13(8):2421–2433.

Schmelz, E. A. 2015. Impacts of insect oral secretions of defoliation-induced plant defense. *Current Opinion in Insect Science*, 9: 7-15.

Severson, R.F., Rogers, C.E., Marti, O.G., Gueldner, R.C., Arrendale, R.F. 1991. Ventral eversible gland volatiles from larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(10):2527–2530.

Spiteller, D., Boland, W. 2003. N-(15, 16-Dihydroxylinoleoyl)-glutamine and N - (15, 16-epoxylinoleoyl) -glutamine isolated from oral secretions of lepidopteran larvae. *Tetrahedron*, 59:135–139.

Strand, M.R., Williams, H.J., Vinson, S.B., Mudd, A. 1989. Kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3 diones produced by *Ephesia kuehniella zeller* in eliciting searching behavior by the parasitoid *Bracon hebetor* (say). *Journal Chemical Ecology*, 15(5):1491–1500.

Takabayashi, J., Noda, T., Takahashi, S. 1985. Effect of kairomones in the searching behavior of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of

the common armyworm, *Pseudaletia separate* Walker (Lepidoptera: Noctuidae): I. Presence of arresting stimulants produced by the host larvae. *Applied Entomology and Zoology*, 20: 484-489.

Téran, F.O., Precetti, A.A.C.M., Dernika, O. 1983. Broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: COPERSUCAR. Pragas da cana-de-açúcar. São Paulo, p.4-15.

Vegliante, F., Hasenfuss, I. 2012. Morphology and diversity of exocrine glands in lepidopteran larvae. *Annual Review of Entomology*, 57:187–204.

Vendramim, J.D. 1992. Utilização de dietas artificiais à base de macerados de colmos de cana-de-açúcar para avaliação da resistência varietal à *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Pyralidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 21:157-167.

Wakamura, S., Yasui, H., Mochizuki, F., Fukumoto, T., Arakaki, N., Nagayama, A., Uesato, T., Miyagi A., Oroku, H., Tanaka, S., Tokuda, M., Fukayama, M., Akino, T., Hirai, Y., Shiga M. 2009. Formulation of highly volatile pheromone of the white grub beetle *Dasylepidaishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae) to develop monitoring traps. *Applied Entomology and Zoology*, 44 (4): 579–586.

Wang, Y., Lin, D.S., Bolewicz, L., Connor, W.E. 2006. The predominance of polyunsaturated fatty acids in the butterfly *Morpho peleides* before and after metamorphosis. *Journal of Lipid Research*, 47(3):530–6.

Wronizewska, A., 1966. Mandibular glands of the wax moth larva, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Insect Physiology*, 12:509–522.

Xu, J., Wang, Q., He, X.Z. 2008. Emergence and reproductive rhythms of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *New Zealand Plant Protection*, 61:277–282.

Zarbin, P.H.G., Villar, J.A.F.P., Corrêa, A.G. 2007. Insect pheromone synthesis in Brazil: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(6):1100–1124.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química dos extratos totais de glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* do 5º instar é variada, como demonstrou as análises tanto de espectrometria de massas e cromatografia gasosa. Das vinte proteínas diferentes identificadas, estão envolvida na desintoxicação e metabolismo celular, dentre elas está a calreticulina proteína multifuncional que pode ter relação na interação inseto-planta, como elicitadora da modulação de respostas de defesa das plantas. Essa primeira identificação de proteínas da glândula mandibular de larvas de *D. saccharalis* nos favorece a outras perspectivas de pesquisas a fim de reconhecer outras proteínas que também podem estar relacionada na interação inseto-planta. A espectrometria de massas com mais sensibilidade de identificação e análises proteômica do extrato total de glândulas mandibulares de larvas de *D. saccharalis* submetida a diferentes dietas nos podem fornecer elementos comparativos que influenciam na síntese de compostos.

As análises na cromatografia gasosa do extrato total das glândulas mandibulares proporcionou a identificação de hidrocarbonetos de diferentes grupos funcionais. Entretanto, o composto mais abundante, é o ácido linolênico encontrado como um dos ácidos graxos que podem estar conjugado com aminoácidos originando o N- [17-hidroxilinoil] -L-glutamina) conhecido como “volicitina” e compostos análogos como (N-linolenil-L-glutâmico, N-linolenil-L-glutamina. A volicitina é um composto já descrito na secreção oral de outros lepidópteros com a função elicitora onde a planta aumenta a produção de fitormônios e a liberação de substâncias voláteis com a função de atrair os inimigos naturais do herbívoro.

Estudos futuros podem ser desenvolvidos a fim de isolar compostos elicitores, e serem testado em diferentes partes da planta para observar a produção de fitormônios e voláteis. Análises também de cromatografia gasosa pode ser realizado no extrato total de glândulas mandibulares de larvas *D. saccharalis* submetido a diferentes dietas para avaliar a influência sobre os tipos de compostos não proteicos que são sintetizados. Diante das análises realizada neste trabalho sugerimos que tanto a proteína calreticulina e o ácido linolênico são potenciais candidatos a compostos elicitores da cana-de-açúcar diante da herbivoria pelas larvas de *D. saccharalis*, informações que contribuem para discussão do papel funcional da glândula mandibular em lepidópteros como multifuncional.