

PERFIL ESTERÁSICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE *Diatraea saccharalis* FABR. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

ESTERASE PATTERN DURING THE ONTOGENETIC DEVELOPMENT OF *Diatraea saccharalis* FABR. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Fernanda Martins-Parra^{1*}, Vera Lucia Castelo Figueiredo², Marcia Regina Cavichio Issa³, Rosana de Almeida⁴

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade de Franca, UNIFRAN; ²Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas, Universidade de São Paulo, FFCLRP; ³Departamento de Genética e Biologia de Abelhas Universidade de São Paulo, FMRP.; ⁴Universidade de Franca, UNIFRAN.

*Endereço para correspondência: Rua Elis Regina Carvalho Costa, 472, jardim Canaã, Sertãozinho, SP, Brasil, CEP: 14169-260, Brasil. Tel/Fax: +55 16 3942 6438, E-mail: fmartinsparra@yahoo.com.br

RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar a variação dos fenótipos das esterases durante o desenvolvimento ontogenético de *D. Saccharalis* (broca da cana de açúcar) criadas em laboratório. As análises foram realizadas por meio da técnica de eletroforese horizontal utilizando-se géis de Penetrose 30 (12%) revelados com os substratos fluorogênicos específicos, acetato e butirato de 4-metil umbeliferona, e revelaram a presença de sete esterases, sendo seis denominadas anteriormente na literatura de Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-7 e Est-8 e a sétima a Est-9, detectada aqui em Penetrose 30. As esterases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que catalisam a reação de hidrólises de ligações éster, de grande relevância fisiológica. Essas esterases apresentaram diferenças tanto quanto à preferência pelos substratos quanto à presença durante o desenvolvimento desses insetos. As Est-4 e Est-9 são específicas do butirato e a Est-3 é específica do acetato; as demais esterases apresentaram afinidade pelos dois substratos. Quanto à presença (%), as esterases Est-1, Est-2 e Est-9 apareceram em apenas algumas das amostras analisadas e as Est-3, Est-4, Est-7 e Est-8, estão presentes durante todo o desenvolvimento da espécie. Foram observadas as variações alélicas das esterase 3 (Est-3^F/Est-3^S), esterase 4 (Est-4^F/Est-4^S) e esterase 8 (Est-8^F/Est-8^S). A Est-7 aparece mais intensa nas fases iniciais e a Est-3 aparece mais intensa nas fases finais do desenvolvimento. Nos adultos, as esterases 3, 4, 7 e 8 apresentaram variabilidade entre os sexos, sendo sempre mais intensas nas zonas esterásicas das fêmeas do que dos machos.

Palavras-Chave: broca da cana de açúcar; desenvolvimento ontogenético; esterases; Penetrose 30; inseto-praga.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the variation of esterase phenotypes during the ontogenetic development of *D. Saccharalis* (sugarcane borer) created in laboratory. The analyzes were conducted by means of horizontal electrophoresis techniques using Penetrose 30 (12%) released with the substrates specificity for 4-methylumbelliferyl esters (acetate and butyrate), and showed the presence of seven esterases. Six of them were previously denominated in the literature Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-7, and Est-8 isozyme, and the seventh, the Est-9 isozyme, was detected here on the Penetrose 30. The esterases are enzymes belonging to the class of hydrolases, which catalyze the hydrolysis reaction of ester bonds of great physiological importance. The analysis showed difference for the substrate preference of esterases as well as for the presence during the development of those insects. The Est-4 and Est-9 showed specificity for 4-methylumbelliferyl butyrate and the Est-3 was specific for 4-methylumbelliferyl acetate. The remaining esterases had shown affinity for both substrates. As for the presence (%), the Est-1, Est-2, and Est-9 appears only in some of the samples analyzed and the Est-3, Est-4, Est-7, and Est-8 are presents during the entire development of the specie. Allelic variations of esterase 3 (Est-3^F/Est-3^S), esterase 4 (Est-4^F/Est-4^S) and esterase 8 (Est-8^F/Est-8^S) were observed. The Est-7 appears with more intensity on the initial phases whereas the Est-3 appears more intensely on the final phases of the development. In adults, esterases 3, 4, 7, and 8 showed differences between the sexes, being always more intense in females esterasic areas than in males.

Key Words: sugarcane borer; ontogenetic development; esterases; Penetrose 30; insect pest.

INTRODUÇÃO

A cana de açúcar (*Saccharum* spp.) tem sido uma das culturas relevantes para a economia do Brasil como matéria-prima na produção de açúcar e álcool; o setor sucroalcooleiro deverá expandir a área cultivada para atender a crescente demanda do mercado interno e externo (1).

A *Diatraea saccharalis* é uma espécie de mariposa originária das Antilhas, América Central e do Sul (2,3), sendo primariamente descrita como *Phalaena saccharalis* por Fabricius em 1794. Com distribuição geográfica variando da latitude 30° Norte à latitude 30° Sul, ocorrendo em toda região canavieira no Brasil (4).

Essa espécie tem um número significativo de hospedeiros por todo o território nacional, tais como: cana de açúcar, arroz, milho, sorgo, trigo, aveia, cevada e várias espécies de capins (5,3). A cana de açúcar apresenta um número significativo de pragas (1), mas *D. saccharalis* parece ser a principal delas, causando danos na planta e prejuízos financeiros ao setor sucroalcooleiro (5,6).

Uma fêmea adulta de *D. saccharalis* é capaz de ovipositar de 5 a 50 ovos nas folhas das plantas hospedeiras. A eclosão das larvas dá-se em 4 a 9 dias. As lagartas recém-nascidas alimentam-se, no início, do parênquima das folhas convergindo, a seguir, para a bainha das mesmas. Depois da primeira muda penetram pela parte mais mole do colmo, que é a gema e, perfurando-a, abrem galerias de baixo para cima que impedem o fluxo da seiva. Essas galerias causam danos diretos como perda de peso, morte da gema ou morte do topo da planta. As galerias também causam danos indiretos relacionados à entrada dos fungos causadores da podridão vermelha, *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que invertem a sacarose, diminuindo a quantidade e pureza do suco extraído, com redução na produção de açúcar e etanol (5,6).

O número de instares larvais de *D. saccharalis* é variável. Há relatos de três a dez, mas cinco a seis são mais comuns (7,3). Quando criadas com dietas artificiais, a maioria das larvas tende a apresentar seis instares (8). O tempo de desenvolvimento larval requer geralmente 25 a 30 dias durante o tempo morno ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e 30 a 35 dias durante o tempo fresco ($\pm 18^{\circ}\text{C}$) exceto,

naturalmente, durante o inverno em que o desenvolvimento é mais lento. Durante os instares um a cinco, as larvas alcançam um comprimento de aproximadamente 2-4, 6-9, 10-15, 15-20, 20-30 milímetros respectivamente.

Como é uma praga de relevância econômica, essa espécie tem sido estudada em nível comercial, principalmente, na formulação de controle biológico (9,6). Uma vez que sua localização no interior do colmo a deixa alimentada e protegida da ação dos inseticidas, o uso de parasitas naturais (10,11), como a vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), um dos seus parasitoides (12,13) e mais recentemente o uso de óleos essenciais são mais recomendados (14). *D. saccharalis* também é usada em teste de susceptibilidade a inseticidas (15), estudos celulares para a caracterização estrutural citológica de indivíduos parasitados por *Cotesia flavipes* (16), caracterização morfológica do tubo excretor em final de desenvolvimento larval (17), fusão dos testículos durante o desenvolvimento pós-embriônico (18), além de estudos eletrofisiológicos e identificação de componentes do feromônio sexual (19), estudo do equilíbrio de populações (20) e Genética de Populações com o uso de PCR-RAPD (21).

Um dos parâmetros mais investigados em estudos de insetos-praga é a análise de esterases, um grupo de enzimas hidrolíticas altamente variáveis e multifuncionais (22). Sanburg et al. (23,24) classificaram as esterases de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), larva do tabaco, por meio de inibidores em dois grupos: esterases gerais e esterases específicas do hormônio juvenil. As esterases gerais são inibidas rapidamente por diisopropilfosforidato (DFP), um inseticida organofosforado, e estão presentes durante todo o desenvolvimento dos insetos e são capazes de hidrolisar o hormônio juvenil livre. As esterases específicas do hormônio juvenil são fracamente inativadas por DFP e têm sido detectadas na hemolinfa dos insetos especialmente durante o último estágio larval.

Estas enzimas têm ação relevante no desenvolvimento dos insetos, principalmente no processo da metamorfose. São produzidas pelo corpo gorduroso e encontradas na hemolinfa de insetos de várias ordens e apresentam pelo menos dois

picos de atividade em larvas de último estágio. Apresentam variações qualitativas e quantitativas durante o desenvolvimento (25), na distribuição tecidual (26) e atuam sobre vários substratos (25,27,28). Em suma, nos insetos, as esterases parecem estar envolvidas em importantes atividades fisiológicas, tais como: regulação dos títulos de hormônios juvenis (29,30), processos digestivos (31), metabolismo de lipídeos (27), degradação de inseticidas (32-34) e, até mesmo, no comportamento reprodutivo (35,36).

São classificadas em acetilesterases, arilesterases, carboxilesterases e colinesterases de acordo com sua sensibilidade aos inibidores de atividade da enzima (37).

O estudo das esterases e dos inseticidas em geral tem se mostrado relevante e necessário, pois parecem estar envolvidas com a resistência adquirida por insetos contra vários inseticidas (34,38,39,40) usados ao longo dos anos na agricultura para obtenção do controle de pragas.

As esterases são altamente polimórficas e suas diferentes formas são denominadas de isoenzimas; e só puderam ser detectadas após o desenvolvimento de meios para separação e caracterização de moléculas de proteínas similares. Além dos estudos dos polimorfismos pelas técnicas de eletroforese, esses métodos também facilitaram os estudos do comportamento de enzimas e suas múltiplas formas. Seu estudo, em *D. saccharalis*, foi feito inicialmente por Ruvolo-Takasusuki et al. (20) em pupas usando gel de amido (colorações com aceto/butirato de 4-metil umbeliferona e α/β -naftil acetato), que tomamos por base para a nomenclatura das esterases neste trabalho. Em adultos, foram usados apenas o aparelho reprodutor e corpo gorduroso (41) e o abdome e cabeça para a análise da expressão tecidual (26), ambos em gel de poliacrilamida e coloração com α/β -naftil acetato. Este trabalho teve como objetivo investigar a variação dos fenótipos das esterases durante o desenvolvimento ontogenético de *D. saccharalis* criadas em laboratório, com observações sobre seu crescimento e idade.

METODOLOGIA

Material Biológico

As populações de *D. saccharalis* utilizadas em nosso trabalho foram produzidas pelo Laboratório Biocontrol (<http://www.biocontrol.com.br>), em Sertãozinho-São Paulo (21°08'S; 47°59'W), e as análises eletroforéticas das esterases foram feitas no Laboratório de Genética e Desenvolvimento de Abelha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-São Paulo (21°10'S; 47°48'W).

Métodos

Cinquenta casais adultos foram confinados em uma câmara de acasalamento construída com tubo de PVC de ± 10 cm de diâmetro por 25 cm de altura, revestido internamente com papel sulfite.

Após três dias de confinamento, os casais de mariposas foram descartados e os ovos, colocados sobre o papel filtro, foram lavados com uma solução de hipoclorito de sódio e sulfato de cobre para evitar contaminação por bactérias, algas ou fungos. As posturas foram colocadas para secar em uma sala climatizada a 25°C.

Depois de secos, os ovos foram inoculados em um tubo de ensaio de vidro com base achatada (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), vedado com rolha de gaze, contendo uma dieta de levedura e farelo de soja rica em vitaminas e antibióticos. Esses vidros foram então transferidos para o Laboratório de Genética da FMRP-USP, os papéis de filtro foram retirados dos tubos de ensaio 6 horas após a eclosão das larvas. Com 15 dias de idade, as lagartas foram transferidas para placas de Petri de vidro (15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) e receberam uma dieta de realimentação à base de germe de trigo e farelo de soja com vitaminas e antibióticos, onde permaneceram até a eclosão das mariposas adultas.

As amostras para análises eletroforéticas (Figura 4) foram coletadas diariamente após a eclosão dos ovos até completar o ciclo de desenvolvimento e guardadas em freezer a -20°C.

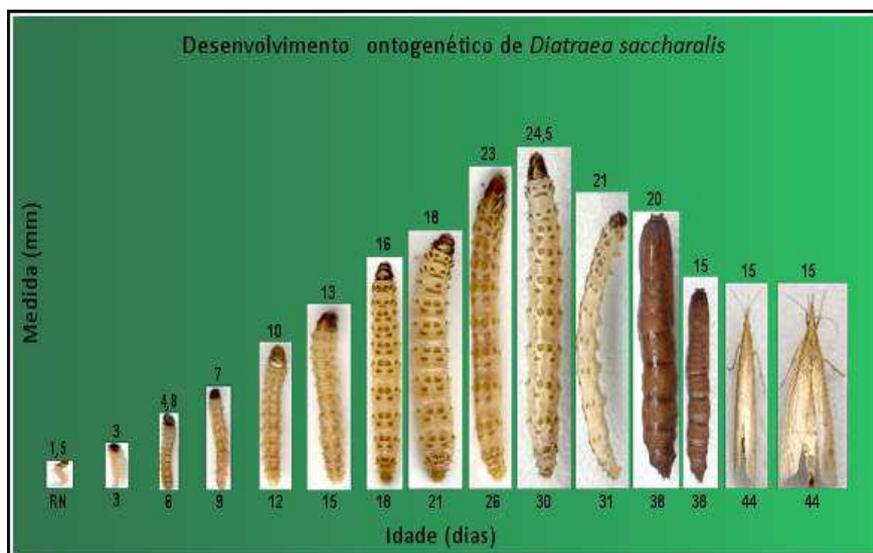


Figura 1. Medida (mm) e idade (dias) de algumas fases larvais (Recém-Nascido a 31 dias), pupais (ambas com 38 dias, fêmea à esquerda e macho à direita) e adulta (ambas com 44 dias, macho à esquerda e fêmea à direita) de *Diatraea saccharalis* digitalizadas no scanner Hewlett Packard Scan Jet 5300C.

Os métodos utilizados no laboratório e detecção da variabilidade genética foram baseados e modificados a partir de Bitondi & Mestriner (25), Figueiredo (42), Figueiredo et al. (43), Ruvolo-Takasusuki et al. (20). As amostras foram homogeneizadas em vortex com bastão de vidro dentro de tubos Eppendorf de 2 mL contendo o tampão das amostras (Tris-HCl 0,02 M pH 7,5 e β -mercaptoetanol a 1%) foram então centrifugadas a 5°C por 10 minutos a 14.000 rpm. As amostras de recém-nascidos (RN) a 13 dias de idades foram maceradas em pool (de 50 e 3 indivíduos) com 50 μ L de tampão das amostras e a partir de 14 dias foram macerados individualmente em 200 μ L de tampão das amostras.

Os géis utilizados foram preparados com Penetrose 30 (cedido por Refinações de Milho Brasil Ltda.), um amiloide de milho de peso molecular de 23.000 e pH entre 4,8 e 5,9 na concentração de 12% diluído em tampão do gel (Tris-HCl 0,02M pH 7,5). Essa mistura foi aquecida sob agitação manual constante, até a ebulição. Em seguida, despejada, sem retirada do ar, em molde de vidro (20 x 30 x 0,6 cm). Os géis foram deixados à temperatura ambiente para esfriar e posteriormente mantidos em geladeira cobertos com plástico para evitar ressecamento, até o momento da aplicação das amostras. Também foram usados géis com múltiplos fronts para agilizar os trabalhos (44).

As amostras foram aplicadas verticalmente no gel embebidas em papel

filtro Whatman 3 (5 x 6 mm) em seguida os géis foram colocados na geladeira apoiados entre duas cubas de eletroforese contendo cada uma 500 mL de tampão Tris-HCl 0,3 M pH 7,5 (tampão dos eletrodos). O contato dos eletrodos com as extremidades anódica e catódica dos géis foi feito através de duas "pontes" feitas com toalhas perfex duplas. A migração eletroforética ocorreu em torno de 5 horas nas seguintes condições: 200 volts e 60 mA medidos na fonte Pharmacia Biotech.

Após migração eletroforética, os géis foram cortados horizontalmente em duas partes e posteriormente revelados, utilizando-se as partes internas, com os seguintes substratos fluorogênicos específicos: acetato e butirato de 4-metil umbeliferona dissolvidos em 0,5 mL de acetona Merck (P. A) e 4,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,4. As análises dos fenótipos foram feitas sob luz ultravioleta (360 nm/MacroVue-UV20-Hoefer), após 10 minutos de contato dos substratos com o gel. Os géis foram fotografados em um aparelho foto documentador Kodak EDAS-290 Vac-70 Ultra-Lum.

Foram utilizados os parâmetros baixa, média e alta intensidades para se determinar a variação da expressão com que as esterases se comportaram durante o desenvolvimento de *D. saccharalis*.

Para a documentação das diferentes fases do desenvolvimento, os insetos foram fixados diariamente em Dietrich por 12 horas e posteriormente mantidos em álcool 70% para serem digitalizados. Os indivíduos de

todas as fases do desenvolvimento das mariposas foram digitalizados no scanner Hewlett Packard Scan Jet 5300C em resoluções que variaram de 3000 a 9000 pixel, sendo também avaliadas a altura em mm e a idade em dias (Figura 4). Essa metodologia foi desenvolvida especialmente para esse trabalho por Figueiredo (45).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em *D. saccharalis* o ciclo embrião-adulto é variável estando em condições naturais (4,5) ou laboratoriais (8,12). Gallo et al. (5) determinaram que em condições naturais a fase larval dura cerca de 44 a 51 dias e a fase pupal cerca de 9 a 14 dias de idade. Roe et al. (8) determinaram que indivíduos criados em condições artificiais as larvas não apresentaram sincronismo no ciclo de desenvolvimento e a metamorfose ocorreu depois de 30 a 35 dias.

As mariposas estudadas nesse trabalho se mantiveram na fase larval por 27 a 42 dias; similar ao de Roe et al. (8) e na fase pupal por 9 a 15; similar ao de Gallo et al. (5). Roe et al. (8) criaram *D. saccharalis* em laboratórios alimentadas com 9 dietas artificiais diferentes, em todos os experimentos o tempo da fase larval variou, sendo sempre mais curto nas larvas machos. Dependendo da dieta machos puparam entre 21 a 39 dias e fêmeas puparam entre 22 a 42 dias. Esses autores observaram também que em todas as dietas com indivíduos da mesma idade ocorreram sobreposições de estágios larvais.

Esses resultados indicam que *D. saccharalis* apresenta um desenvolvimento polimórfico. Vacari et al. (12) testando as características biológicas de *D. saccharalis* em 2 dietas artificiais obtiveram um período larval médio de 26,2 e 26,1, e um período pupal médio de 9,5 e 9,9 dias.

Em nosso experimento, os ciclos larvais adultos de *D. saccharalis* duraram em torno de 60 dias. Em suma, parece que nesses insetos o momento da pupação é aleatório e altamente influenciável por fatores ambientais. Por esse motivo, determinamos o perfil eletroforético das esterases durante os períodos larvais, pupais e adultos levando em consideração só as idades em dias dos insetos analisados.

Durante o desenvolvimento de *D. saccharalis* foram detectadas 7 esterases, seis delas, as esterases Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-7 e Est-8 já descritas anteriormente por Ruvolo-Takasusuki et al. (20) e uma nova esterase que denominamos de Est-9. Essas esterases se diferenciaram quanto à afinidade pelos substratos e grau de intensidade durante o desenvolvimento.

Quanto à afinidade pelos substratos, as esterases Est-1, Est-2, Est-7 e Est-8 foram detectadas tanto com acetato como com butirato de 4-metil umbeliferona, a esterase Est-3 foi detectada só com acetato de 4-metil umbeliferona e as esterases Est-4 e Est-9 foram detectadas só com butirato de 4-metil umbeliferona (Tabela 1).

Tabela 1. Afinidade das esterases de *Diatraea saccharalis* pelos substratos fluorogênicos utilizados, acetato e butirato de 4-metil umbeliferona, em gel de Penetrose 30 (12%). + (presença), - (ausência).

	Est-1	Est-2	Est-3	Est-4	Est-7	Est-8	Est-9
Acetato	+	+	+	-	+	+	-
Butirato	+	+	-	+	+	+	+

As especificidades das esterases de *D. saccharalis* para os substratos fluorogênicos acetato e butirato de 4-metil umbeliferona foram analisadas por Ruvolo-Takasusuki et al. (20) por meio da técnica de eletroforese horizontal utilizando como suporte amido de batata parcialmente hidrolisado e os resultados desses autores revelaram que as esterases Est-2, Est-7 e Est-8 apresentaram afinidades tanto por acetato quanto por butirato de 4-metil

umbeliferona, as esterases Est-1 e Est-3 apresentaram especificidades só por acetato de 4-metil umbeliferona e a Est-4 apenas para butirato de 4-metil umbeliferona. Os resultados obtidos na Penetrose 30 foram similares aos desses autores, diferindo apenas quanto à sensibilidade da esterase 1 também pelo butirato e à presença da esterase 9, o que reforça que o uso desse suporte foi adequado para estudos eletroforéticos em substituição ao amido de

batata, pois aumenta muito a relação custo-benefício. Além disso, o fato de ter sido detectada uma nova esterase, que denominamos de Est-9, mostra que a sensibilidade desse suporte foi maior que a do amido de batata parcialmente hidrolisado (Figura 2).

Ruvolo-Takasusuki et al. (20) analisaram ainda as especificidades das esterases em relação aos substratos cromogênicos α -naftil acetato e β -naftil acetato, esses autores verificaram que as esterases Est-3 e Est-7 apresentaram afinidade por α -naftil acetato e β -naftil acetato e detectaram mais duas esterases que denominaram de Est-5 e Est-6, específicas para esses, e a Est-1 apresentou afinidade por β -naftil acetato. Esses autores detectaram também variações alélicas para o locus da esterase Est-3 e denominaram esses alelos de Est-3^F(fast) e Est-3^S(slow). Em suma, esses autores detectaram 8 loci em pupas de *D. saccharalis*.

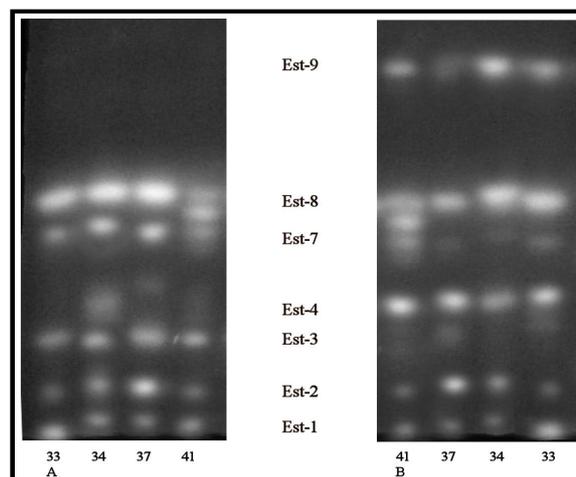


Figura 2. Fenótipos esterásicos detectados em algumas pupas de *Diatraea saccharalis* com 33, 34, 37 e 41 dias de idade em gel de Penetrose 30 (12%) revelados com acetato (A) e butirato (B) de 4-metil umbeliferona.

Neste trabalho, também detectamos a variação alélica para esterase 3, os alelos Est-3^F e Est-3^S, em amostras de larvas, pupas e adultos analisadas, detectamos ainda dois possíveis alelos das esterases 4 e 8, os quais denominamos Est-4^F e Est-4^S, Est-8^F e Est-8^S, respectivamente (Figura 3).

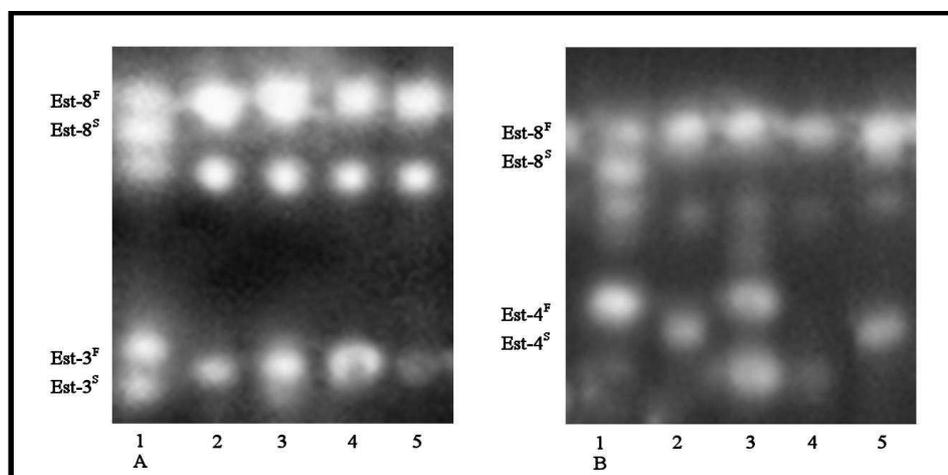


Figura 3. Variações alélicas detectadas em *Diatraea saccharalis* em gel de Penetrose 30 (12%); a pista 1 da figura A mostra a variação alélica dos alelos das esterases 3 (Est-3^F e Est-3^S) e 8 (Est-8^F e Est-8^S) revelados com acetato de 4-metil umbeliferona e as pistas 1 e 3 da figura B mostram a variação dos alelos das esterases 4 (Est-4^F e Est-4^S) e 8 (Est-8^F e Est-8^S) revelados com butirato de 4-metil umbeliferona.

Os resultados das análises eletroforéticas das esterases de *D. saccharalis* revelaram mudanças nas atividades dessas enzimas durante o desenvolvimento. Denominamos de baixa, média e alta intensidade para determinamos essa variação.

Das sete esterases encontradas nas 311 amostras analisadas, caracterizadas e classificadas como Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-7, Est-8 e Est-9, observamos que as esterases 4, 7 e 8 foram encontradas durante todo o desenvolvimento desses insetos (larvas, pupas e adultos), enquanto as demais apresentaram variações, sendo que

a Est-3 foi mais frequente a partir de larvas com 12-19 dias de idade e as Est-1 e Est-2

não foram encontrados em adultos (Tabela 2).

Tabela 2. Presença (em porcentagem) das esterases durante o desenvolvimento ontogenético de *Diatraea saccharalis* em gel de Penetrose 30 (12%).

Idade dias	Amostras analisadas	Est-1 %	Est-2 %	Est-3 %	Est-4 %	Est-7 %	Est-8 %	Est-9 %
RN-11(larvas)	42	12	29	33	100	100	100	28
12-19 (larvas)	74	16	11	84	100	100	100	27
20-27 (larvas)	97	12	20	92	100	100	100	22
28-32 (larvas)	37	8	27	95	100	100	100	41
33-42 (pupas)	49	7	18	98	100	100	100	30
43 (adultos)	12	0	0	94	94	100	100	16
Σ	311							

RN = recém-nascidos

As informações a seguir estão agrupadas na Tabela 2.

A esterase 1 apresentou baixa, média e alta intensidade no decorrer do desenvolvimento, aparecendo em média 12% em estágio larval, 7% em estágio pupal e não sendo encontrada nas amostras de adultos analisadas.

A esterase 2 apresentou o mesmo padrão de intensidade da esterase 1, aparecendo em média 22% em estágio larval e 18% em estágio pupal, não sendo encontrada nas amostras de adultos analisadas.

A esterase 3 foi encontrada em apenas 33% das amostras analisadas no intervalo de larvas RN a larvas com 11 dias de idade, apresentando baixa intensidade, sendo que no decorrer do desenvolvimento tornou-se mais frequente e intensa, aparecendo em 84% em larvas de 12 a 19 dias, 92% em larvas de 20 a 27 dias, 95% em larvas de 28 a 32 dias e 98% em pupas, apresentando para estes períodos média ou alta intensidade. Em indivíduos adultos, a Est-3 aparece em 94% das amostras com baixa intensidade em machos e média intensidade em fêmeas.

A esterase 4 apresentou média ou alta intensidade de expressão, estando presente em 100% das amostras analisadas correspondentes aos estágios larvais e pupais, sendo que em adultos apareceu em 94% das amostras, apresentando baixa

intensidade em indivíduos machos e média ou alta intensidade em fêmeas.

A esterase 7 apresentou o mesmo padrão de intensidade da esterase 4, estando presente em 100% das amostras, inclusive nos adultos onde apresenta baixa intensidade em indivíduos machos e média ou alta intensidade em fêmeas.

A esterase 8 permaneceu estável durante todo o desenvolvimento do inseto, aparecendo em 100% das amostras com média e alta intensidade, apresentando baixa ou média intensidade em indivíduos machos e média ou alta intensidade em fêmeas.

A esterase 9 apresentou baixa, média e alta intensidade no decorrer do desenvolvimento independente da idade analisada, aparecendo em média 29,5% em estágio larval, 30% em estágio pupal e 16% em indivíduos adulto, em relação à Est-9, não foi encontrada nenhuma informação adicional para adultos, sendo que 16% de 12 seriam apenas 2 amostras que apresentaram esta enzima.

Está bem estabelecido na literatura que, tanto em condições naturais como em condições de laboratório, o desenvolvimento de *D. saccharalis* é polimórfico, isto é, não há um ciclo de desenvolvimento padrão e sim períodos mais curtos ou mais longos para a eclosão das larvas, para a metamorfose e para a emergência dos indivíduos adultos.

Neste trabalho, não foi possível estabelecermos fenótipos esterásicos padrões para nenhum estágio.

A sincronia entre fenótipos esterásicos padrões X estágios específicos do desenvolvimento, como observado por Figueiredo (45) e Figueiredo et al. (46) para abelhas do gênero *Apis*, não foi observado para esses insetos e atribuímos esta infidelidade à análise feita, baseada somente nas idades dos indivíduos e não em estágios larvais e pupais bem definidos, o que nos leva a crer que, de acordo com a literatura, indivíduos da mesma idade, aqui analisados, devem estar em estágios diferentes do desenvolvimento e conseqüentemente apresentam fenótipos esterásicos diferentes.

Entretanto, estes resultados estão de acordo com a desorganização do desenvolvimento, que os indivíduos dessa espécie apresentam. Esses resultados sugerem que controles mais rígidos do desenvolvimento ontogenético precisam ser feitos para um melhor esclarecimento do comportamento das esterases nessa espécie. Somente em indivíduos adultos, o fenótipo esterásico das esterases 7 e 8 parecem seguir um padrão quanto ao grau de intensidade, sendo sempre mais intenso nas zonas esterásicas de fêmeas do que de machos (Figura 4).

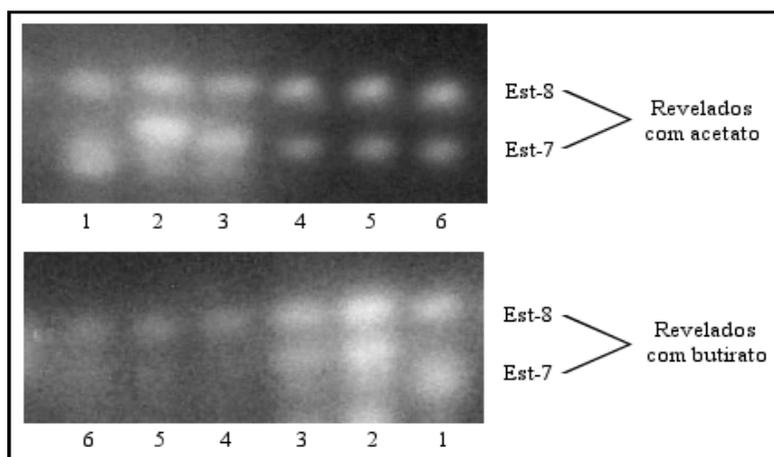


Figura 4. Fenótipos das esterases 7 e 8 detectados em indivíduos adultos de *Diatraea saccharalis* em gel de Penetrose 30 (12%) revelados com acetato e butirato de 4-metil umbeliferona. As amostras 1, 2 e 3, são de insetos adultos-fêmeas e as amostras 4, 5 e 6, são de insetos adultos-machos, podendo-se identificar bandas mais intensas nas fêmeas do que nos machos.

CONCLUSÃO

Os resultados das análises no desenvolvimento ontogenético revelaram que:

O ciclo embrião-adulto em *D. saccharalis* é variável estando em condições laboratoriais. Neste trabalho, em indivíduos criados em laboratório, a fase larval apresentou variação de 27 a 42 dias, a fase pupal de 9 a 15 e os ciclos larvais-adultos em torno de 60 dias, apresentando um desenvolvimento polimórfico.

Com os substratos fluorogênicos acetato e butirato de 4-metil umbeliferona em gel horizontal de Penetrose 30, foram detectadas sete esterases, a Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-7, Est-8 e Est-9. Sendo adequado para estudos eletroforéticos em substituição ao amido de batata, pois aumenta muito a relação custo-benefício.

Foram observadas as variações alélicas das esterase 3 (os alelos Est-3^F e

Est-3^S), esterase 4 (Est-4^F e Est-4^S) e esterase 8 (os alelos Est-8^F e Est-8^S).

Os primeiros estágios de desenvolvimento de *D. saccharalis* são caracterizados pela presença das Est-4, Est-7 e Est-8 e os últimos pela presença das Est-3, Est-4, Est-7 e Est-8, com a Est-3 aumentando sua intensidade de expressão a partir dos últimos estágios larvais.

Por meio do estudo eletroforético de esterases, além de detectar mutações, identificar populações e estágios de desenvolvimento é possível também determinar o sexo em indivíduos adultos, sendo que em *D. saccharalis* o fenótipo esterásico (Est-3, Est-4, Est-7 e Est-8) de adultos-fêmeas apresentou sempre maior intensidade das bandas do que de adultos-machos.

No Brasil, o incremento do uso da bioenergia, o pró-álcool e a mecanização da cana de açúcar, estão levando a um aumento do seu plantio, com a necessidade

de novos conhecimentos e métodos em pesquisas com o manejo das culturas e principalmente o controle (biológico ou não) de suas pragas, como a *D. saccharalis*. Os estudos com esterases, como este, continuam relevantes, uma vez que trabalhos recentes mostram que podem estar envolvidas com a resistência à inseticidas, largamente usados nos últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo do Estado de São Paulo

REFERÊNCIAS

- (1) CENTRO TECNOLÓGICO CANAVIEIRO (CTC) Pragas e doenças da cana-de-açúcar: "Roguing". 2013. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/CadernetaPragas2013.pdf>>. Acesso em: 08.05.2015.
- (2) CHARPENTIER, L.J.; GIFFORD, J.R.; MATHES, R. **Present status of biological control of the sugarcane borer in continental United States**. In: Congress of the ISSCT, 12. Proceedings... San Juan, Porto Rico, Elsevier, 1967. p.1288-1294.
- (3) CAPINERA, J.L. **Sugarcane Borer, Diatraea saccharalis (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)**. Gainesville: University of Florida; Institute of Food and Agricultural Sciences, the Entomology and Nematology Department, 2013. EENY217.
- (4) GUEVARA, L.A.C.; WIENDL, F.M. Aspectos da biologia, em condições de campo, da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). **Revista Agropecuária Técnica**, v.1, n. 1, p. 32-39, 1980.
- (5) GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920p.
- (6) PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; PINTO, A. de S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: CORTEZ, L.A.B. (Coord.). **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**, São Paulo: Edgard Blücher, 2014. p. 441-450.
- (7) HOLLOWAY, T.E.; HALEY, W.E.; LOFTIN, U.C.; HEINRICH, C. **The sugarcane borer in the United States**. USDA Technical Bulletin 41, 1928. 77p.
- (8) ROE, R.M.; HAMMOND, JR, A.M.; SPARKS, T.C. Growth of Larval *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) on an Artificial Diet and Synchronization of the Last Larval Stadium. **Annals of the Entomological Society of America**, v.75, n.4, p.421-429, 1982.
- (9) PARRA, J.R.P. Controle Biológico no Brasil: ficção ou realidade? Simpósio Científico sobre Oceanografia e Defesa Sanitária Animal e Vegetal, FAPESP, São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.fapesp.br/eventos/2011/09/bunge/Jose_Roberto.pdf>. Acesso em: 08.05.2015.
- (10) GALLO, D. Contribuição para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 9, p.135-142, 1965.
- (11) TAMBASCO, F.J.; FERRAZ, J.M.G.; NASCIMENTO, R.S.; SILVA, J.L. **Avaliação de uma formulação comercial do nematoide *Steinernema carpocapsae* no controle de três espécies de lepidópteros**. In: Simpósio de Controle Biológico, 4, 1994, Gramado. Anais... Pelotas: EMBRAPA-CPACT. p. 42.
- (12) VACARI, A.M.; GENOVEZ, G. de S.; LAURENTIS, V.L. de, De BORTOLI, S.A. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e

- no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 355-361, 2012.
- (13) SANTOS, L.A.O.; MIHSFELDT, L.H. Capacidade de Busca e de Parasitismo de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) em Lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v. 7, n. 2, p. 106-109, 2014.
- (14) OLIVEIRA, H.N. de; SANTANA, A.G.; ANTIGO, M.R. Atividade inseticida dos óleos de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) e neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p. 229-232, 2013.
- (15) NAVICKIENE, H.M.DEBONSI.; MIRANDA, J.E.; MURATA, A.T.; de BORTOLI, S.A.; KATO, M.J., BOLZANI, V.S.; FURLAM, M. Isobutyl amides--potent compounds for controlling *Diatraea saccharalis*. **Pest Management Science**, v.65, n.1, p.47-51, 2009.
- (16) PINHEIRO, D. de O.; CONTE, H.; GREGÓRIO, E.A. Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. **Biocell**, v.32, n.1, p.61-67, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669324>>. Acesso em: 08.05.2015.
- (17) RIGONI, G.M.; TOMOTAKE, M.E.M.; CONTE, H. Morphology of Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at Final Larval Development. **Cytologia**, v.69, p.1-6, 2004.
- (18) BILHA, J.K.; BRANCALHÃO, R.M.C.; CONTE, H. Testicles Fusion of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera; Crambidae) During Post-embryonic Development. **Journal of the Entomological Research Society**, v.14, n. 3, p.1-7, 2012.
- (19) BATISTA-PEREIRA, L.G.; SANTANGELO, E.M.; STEIN, K.; UNELIUS, C.R.; EIRAS, A.E.; CORRÊA, A.G. Electrophysiological Studies and Identification of Possible Sex Pheromone Components of Brazilian Populations of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57c, n. 7-8, p. 753-758, 2002.
- (20) RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; MACHADO, M.F.P.S.; CONTE, H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 61-64, 2002.
- (21) LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; STUCHI, A.L.P.B.; MANGOLIN, C.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Population genetics of the sugarcane borer *Diatraea Saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2014.
- (22) MILLER, S.; NOVAK, R.J. A comparative study of esterases in two strains of anopheline mosquitoes by isoelectric focusing. **International Journal Biochemistry**, v. 15, n. 12, p. 1409-1415, 1983.
- (23) SANBURG, L.L.; KRAMER, K.J.; KÉZDY, F.J.; LAW, J.H. Juvenile hormone-specific esterases in the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 4, p. 873-887, 1975a.
- (24) SANBURG, L.L.; KRAMER, K.J.; KÉZDY, F.J.; LAW, J.H.; OBERLANDER, H. Role of juvenile hormone esterases and carrier proteins in insect development. **Nature**, v. 253, p. 266-267, 1975b.
- (25) BITONDI, M.M.G.; MESTRINER, M.A. Esterase Isozymes of *Apis mellifera*: Substrate and Inhibition Characteristics, Developmental Ontogeny, and Electrophoretic Variability. **Biochemical Genetics**, v. 21, n. 9-10, p. 985-1002, 1983.
- (26) PEREIRA, K.M.; MATEUS, R.P.; RIGONI, G.M.; MACHADO, L.P.B. Análise da expressão tecidual de esterases em indivíduos adultos da espécie *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae). In: XIX Seminário de Pesquisa e XIV Semana de Iniciação Científica, Uni Estadual do Centro-Oeste, 2008. Artigo 296. Anais... <http://www.unicentro.br/pesquisa/anais/seminario/.../pdf/artigo_296.doc>.
- (27) SUDDERUDDIN, K.I.; TAN, K.H. Some Hydrolases and Their Involvement in

- Insecticide Resistance. **Pest Articles and News Summaries**, v. 19, p. 24-35, 1973.
- (28) COATES, P.M.; MESTRINER, M.A.; HOPKINSON, D.A. A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. **Annals of Human Genetics**, v. 39 p. 1-20, 1975.
- (29) KORT, C.A.D. de; GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. **Annual Review of Entomology**, v. 26, p. 1-28, 1981.
- (30) YOO, C.M.; BAK, C.B.; LEE, C.H. Substrate and Inhibitor Specificities of Esterase in *Lucilia illustris* Meigen. **The Korean Journal of Zoology**, v. 39, n. 2, p. 190-197, 1996.
- (31) ARGENTINE, J.A.; JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 5, p. 621-630, 1995.
- (32) MOTOYAMA, N.; DAUTERMAN, W.C. The role of non-oxidative metabolism in organophosphorous resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 350-356, 1974.
- (33) SAEZ, C.R. das N.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; VISACRE, P.H.M. Análise da resistência de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) ao organofosforado metafós. In: XI Encontro Maringense de Biologia - XXIV Semana da Biologia, UEM, 2009, Maringá. p. 6. Anais... <http://old.dbi.uem.br/Biologia_Celular_Genetica2009.pdf>.
- (34) GIGLIOLLI, A.A.S.; LUCENA, A.L.M.; LAPENTA, A.S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 25-35, 2011.
- (35) CERON, C.R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. São Paulo, 1988. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- (36) MIKHAILOV, A.T.; TORRADO, M. Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 53-62, July 1, 2000.
- (37) OAKESHOTT, J.G.; van PAPENRECHT, E.A.; BOYCE, T.M.; HEALY, M.J.; RUSSEL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterase. **Genética**, v. 90, n. 2-3, p. 239-268, 1993.
- (38) MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M.; FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- (39) SIQUIEROLI, A.C.S.; PEREIRA, G.B.; VIEIRA, C.U.; GOMES, W.S.; ALMEIDA, L.O.; RODOVALHO, C.M.; AMARAL, I.M.R.; NEPOMUCENO, J.C.; KERR, W.S.; BONETTI, A.M. Efeitos do diazinon sobre o perfil de atividade esterásica em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Meliponini). Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindoia, SP. Disponível em: <<http://www.sbg.org.br>>. Acesso em: 08.05.2015.
- (40) LUCENA, A.L.M.; GIGLIOLLI, A.A.S.; LAPENTA, A.S. Análise das esterases durante as fases do desenvolvimento em *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) e sua relação com a resistência ao inseticida Malathion. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 36-44, 2012.
- (41) BATISTA, A. de O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; CONTE, H. Caracterização das esterases no aparelho reprodutor e corpo gorduroso em adultos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae). In: 58a. Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis. Anais... <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JN1C/RESUMOS/resumo_1529.html>.
- (42) FIGUEIREDO, V.L.C. **Efeitos do composto organofosforado 0,0-Dimetil-0-(2,2-diclorovinil) fosfato (DDVP) sobre o desenvolvimento de operárias africanizadas (*Apis mellifera*)**. 1993. 111 f. Tese (Doutorado em Genética). Departamento de Genética, FMRP, Universidade de São Paulo. 1993.
- (43) FIGUEIREDO, V.L.C.; SIMÕES, Z.L.P.; BITONDI, M.M.G. Developmental pattern

- of esterases in *Apis mellifera* L. honey bees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. **Apidologie**, V.27, p.47-54, 1996.
- (44) FIGUEIREDO, V.L.C.; ISSA, M.R.C.; SIMÕES, Z.L.P.; BITONDI, M.M.G. Análise de isoenzimas em géis de Penetrose 30 com múltiplas origens. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 327, 1998.
- (45) MARTINS, F. **Perfil esterásico durante o desenvolvimento ontogenético de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae)**. 2004. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas-Bacharel). Universidade de Franca. 2004.

Enviado: 24/11/2015

Revisado: 16/08/2016

Aceito: 29/08/2016