



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DO GENE
SINTASE DE QUITINA EM *Atta sexdens*”**

Ariete Cristina Moreira*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Ferreira de Souza

***Bolsista CNPq**

São Carlos – SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DO GENE
SINTASE DE QUITINA EM *Atta sexdens*”**

ARIELE CRISTINA MOREIRA*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador(a): Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CNPq**

**São Carlos – SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ariele Cristina Moreira, realizada em 06/04/2018:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Prof. Dr. François de Moraes Franco Nunes
UFSCar

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
UFSCar

Prof. Dr. Odair Correa Bueno
UNESP

Prof. Dr. Alexandre Santana Vieira
UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais.

“Suba o primeiro degrau com fé. Você não precisa ver a escada inteira, só o primeiro degrau”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem o qual nada disso seria possível, todo meu agradecimento por mais uma etapa concluída, por me guiar e capacitar para todos os desafios.

À Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Ferreira de Souza pela orientação, oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela convivência e amizade construída ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela parceria, convivência, conhecimento compartilhado e por disponibilizar seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Anderson F. Cunha, ao Prof. Dr. Francis M. F. Nunes e ao Prof. Dr. Iran Malavazi pelo conhecimento compartilhado e disponibilidade.

À Prof^a. Dr^a. Regina Celia Mingroni Netto pela disponibilização do seu laboratório para o preparo das agulhas de injeção.

Ao MSc. Rodrigo Salazar da Silva pela disponibilidade e paciência no preparo das agulhas de injeção.

A todos do grupo do Centro de Estudos de Insetos Sociais pela convivência e aprendizado. Em especial à Thais Marchesin pela colaboração e disponibilidade no trabalho *in vivo* com as formigas.

Aos amigos Adriana Miranda, Bruno Amaral, Evandro Prieto, Juliana Rodrigues, João Gabriel, Kelli Micocci e Paulo Adalberto pela convivência diária, por compartilharmos as mais variadas emoções e pela troca de conhecimento ao longo desses anos.

À Mariana Fracola que tive a oportunidade/desafio de ter como aluna de IC...kkk. Pela sua alegria e luz irradiante, pelos momentos compartilhados e pela amizade que desenvolvemos ao longo desses anos. O conhecimento não se transmite pela hierarquia, muito obrigada por tudo.

A todos amigos e colegas que passaram pelo LBFE, onde estou desde a IC, pelo ambiente harmonioso de trabalho, por possibilitar o desenvolvimento profissional e pessoal.

Às amigas Ariane Priscila Alves, Jessica Fernanda A. de Oliveira, Kenia Vanzolini, Priscila Tomie Leme Ike que apesar da distância física são tão importantes em minha vida.

Aos colegas de outros grupos de pesquisa.

Ao meu namorado Carlos Henrique Giampaolo pelo seu amor, paciência, compreensão e apoio, principalmente nos momentos difíceis, e pelos maravilhosos momentos juntos que nos fortaleceram.

Aos meus pais, João e Theresa e pela dedicação, apoio e paciência durante esses anos.

A minha irmã e sua família pelo companheirismo, apoio e pelo incentivo que me fortalece.

A todos os meus familiares pelo carinho, orações e por acreditarem em mim.

A todos que conheci e convivi nesses anos, pela convivência e paciência comigo. Nem sempre entendemos como o acaso nos permitiu conhecer pessoas tão diferentes, mas ao chegar em momentos como esse, ao lembrar de cada um que passou por minha vida, só tenho a agradecer, pelos laços de amizade e cumplicidade ou nem tanto assim... kkkk, sem dúvida TODOS contribuíram para o meu crescimento, amadurecimento e transformação constante, vocês foram grandiosos em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar pela convivência e conhecimento transmitido.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani pelo apoio.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Mecanismo de síntese de quitina em fungos e insetos..	11
FIGURA 3.1: Dois grupos de <i>A. sexdens</i> coletados em ninhos artificiais.	22
FIGURA 3 2: Representação esquemática da conversão de cDNA em triplicata para cada réplica biológica.	24
FIGURA 3.3: Acompanhamento da eficiência do tratamento de RNA total com DNase e da conversão em cDNA por qPCR.	25
FIGURA 3.4: Gráficos obtidos na análise da eficiência de reação do gene <i>AsCHStotal</i> .	39
FIGURA 3.5: Análise da eficiência de reação para avaliação da viabilidade de utilizar o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ na quantificação relativa da expressão gênica.	41
FIGURA 4.1: Análise da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1.2 % (m/v).	49
FIGURA 4.2: Representação esquemática da estratégia de amplificação dos fragmentos codificadores de sintase de quitina em <i>A. sexdens</i> .	51
FIGURA 4.3: Sequência de resíduos de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas amplificadas utilizando o cDNA de larvas e pupas de <i>A. sexdens</i> . O códon	52
FIGURA 4.4: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas amplificada utilizando o cDNA de operária média de <i>A. sexdens</i> .	55
FIGURA 4.5: Alinhamento da ORF dos resíduos de aminoácidos da <i>AsCHSlarvapupa</i> e da <i>AsCHSoperária</i> .	56
FIGURA 4.6: Predição da topologia das CHSs de insetos.	62
FIGURA 4.7: Comparação da estrutura genômica da <i>AsCHS</i> utilizando como base o genoma de <i>T. zeteki</i> .	68
FIGURA 4.8: Árvore filogenética de CHSs de insetos e fungos.	69
FIGURA 4.9: Curva de dissociação do produto amplificado utilizando os <i>primers</i> para o gene <i>tbp</i> em função da temperatura.	74

FIGURA 4.10: Médias da expressão gênica em função do estágio de desenvolvimento (A) e partes do corpo de operária (B) para cada candidato a gene de referência.....	76
FIGURA 4.11: Análise da variação pareada ($V_{n/n+1}$) dos candidatos a gene de referência para determinação do número ótimo de genes controle para uma normalização precisa.	81
FIGURA 4.12: Quantificação relativa da AsCHS em <i>A. sexdens</i>	85
FIGURA 4.13: Análise da expressão gênica de AsCHS durante os estágios de desenvolvimento da <i>A. sexdens</i>	87
FIGURA 4.14: Análise da expressão gênica de AsCHS nas partes do corpo de operária de <i>A.sexdens</i>	89
FIGURA 4.15: Análise fenotípica das pupas de <i>A.sexdens</i> injetadas com 50 ng de siRNA.	93
FIGURA 4.16: Análise fenotípica das pupas de <i>A.sexdens</i> injetadas com 92 ng de siRNA após 168 h (7 dias) da injeção.....	95
FIGURA 4.17: Análise da expressão gênica de AsCHS 168 h (7 dias) após a injeção com 300 ng de siRNA.	96
FIGURA 4.18: Análise fenotípica das pupas de <i>A.sexdens</i> injetadas com 300 ng de siRNA..	97
FIGURA 4.19: Análise da mortalidade nas pupas ao longo de 240 h (10 dias) após a injeção de 300 ng de siRNA.	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 3. 1 Sequências de <i>primers</i> utilizados para identificação da sequência de AsCHS	27
TABELA 3.2: Sequência dos pares de <i>primers</i> para identificar a sequência dos candidatos a gene de referência.	32
TABELA 3.3: Sequências e concentração ótima dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR.....	37
TABELA 3. 4: Parâmetros de eficiência de reação para os <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR.	40
TABELA 3. 5: Sequência do siRNA utilizado em pupas de <i>A. sexdens</i>	43
TABELA 4.1: Parâmetros estatísticos dos valores de Ct dos candidatos a gene de referência nas amostras estágio de desenvolvimento e partes do corpo de operária média.	77
TABELA 4.2: Ranqueamento dos genes de referência em ordem decrescente da estabilidade da expressão de acordo com o BestKeeper, geNorm, NormFinder, método comparativo Δ Ct e RefFinder..	79

RESUMO

ESTUDOS DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DO GENE SINTASE DE QUITINA EM *Atta sexdens*

No Brasil, as formigas-cortadeiras pertencem aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e são consideradas pragas em regiões agrícolas e florestais, levando a grandes perdas econômicas. A proposta deste trabalho foi identificar a sequência de transcritos que codificam para sintase de quitina em *Atta sexdens* (AsCHS), que tem sido descrita como a principal enzima do metabolismo de síntese de quitina. Também foram objetivos avaliar a expressão gênica da AsCHS ao longo do desenvolvimento do inseto (larva, pupa e operária média) e em diferentes partes do corpo de operária média (cabeça, mesossoma e operária sem gáster), validar genes de referência para a PCR quantitativo (qPCR) e avaliar a função da AsCHS por silenciamento gênico. A sequência que codifica para a síntese da AsCHS foi amplificada por PCR com base em regiões conservadas de CHSs de insetos, uma vez que o genoma desta formiga não está disponível. Duas isoformas, advindas de *splicing* alternativo do mesmo gene foram identificadas e sequenciadas. Para análise da expressão gênica por qPCR foram determinados genes de referência para *A. sexdens*, *ef1-alpha* e *rpl18* para estágios de desenvolvimento e *rpl18* e *ef1-beta* para as diferentes partes do corpo de operária média. A AsCHS é diferencialmente expressa ao longo do desenvolvimento da formiga, sendo pupa o estágio de desenvolvimento com maior nível de transcritos. Nas diferentes partes do corpo de operária, houve maior expressão de transcritos de AsCHS no mesossoma e em operária sem gáster. A função do gene AsCHS foi avaliada por silenciamento gênico mediado por RNAi em pupas. Uma redução de 18 % no nível de transcritos de CHS foi verificada 168 h (7 dias) após a injeção de 300 ng de siRNA para AsCHS em relação aos controles, resultando em pupas com alterações morfológicas e uma mortalidade aproximada de 50 %. Este resultado mostra que a AsCHS é uma enzima importante para o desenvolvimento da *A. sexdens*. Do conhecimento atual, este foi o primeiro trabalho a utilizar as técnicas de RNA de interferência e quantificação de transcritos por qPCR em formigas-cortadeiras.

Palavras-Chave: *Atta sexdens*, Sintase de quitina, Análise da expressão gênica, Silenciamento gênico.

ABSTRACT

STUDIES OF EXPRESSION AND FUNCTION OF CHITIN SYNTHASE GENE IN *Atta sexdens*

In Brazil, leaf-cutting ants belonging to the genus *Atta* and *Acromyrmex* and are considered as pests in agricultural and forestry regions that can lead to great economic losses. The aim of this work was to identify the transcripts sequence that codify to chitin synthase in *Atta sexdens* (AsCHS), which has been described as the main enzyme in the metabolism of chitin synthesis. Evaluate the gene expression of AsCHS during insect developmental stage (larva, pupa and medium worker) and different body parts from medium worker (head, mesosome and worker without gaster), validate reference genes for quantitative PCR (qPCR) and evaluate the gene function by gene silencing through RNAi-mediated. The sequence coding to AsCHS was amplified by PCR based on conserved regions for insect CHSs, since the genome of that ant is not available. Two isoforms, from alternative splicing of the same gene were identified and sequenced. For gene expression analysis through qPCR, the reference gene for *A. sexdens* were determined, *efl-alpha* and *rpl18* for developmental stages and *rpl18* and *efl-beta* for different body parts from medium worker. The AsCHS is expressed in a different level during ant development, being pupa the developmental stage with the highest level of transcripts and the mesosome and worker without gaster, among the body parts from medium worker. The gene function was evaluated by gene silencing through RNAi-mediated in pupae. A reduction of 18 % of the CHS transcripts level was verified 168 h (7 days) after the injection of 300 ng of siRNA for AsCHS compared to the controls, resulting in pupae with morphological changes and an almost 50 % of ant's mortality. This result show that AsCHS is an important enzyme for the development of *A. sexdens*. To the best of our knowledge, this is the first work to use the RNA interference techniques and quantification of transcripts by qPCR in leaf-cutting ants.

Key words: *Atta sexdens*, Chitin synthase, Gene expression analysis, Gene silencing.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 AS FORMIGAS-CORTADEIRAS	3
1.2 CONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS.....	5
1.3 DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO	6
1.4 CUTÍCULA DE INSETOS	8
1.5 MECANISMO DE SÍNTESE DE QUITINA.....	9
1.6 SINTASE DE QUITINA (CHS).....	12
OBJETIVOS	18
2. OBJETIVOS	19
METODOLOGIA	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1. COLETA DE EXEMPLARES DE <i>A. sexdens</i>	21
3.2. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA).....	22
3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE <i>AsCHS</i>	25
3.3.1 <i>Determinação da sequência de transcritos de AsCHS</i>	25
3.3.2 <i>Análise e classificação da sequência de AsCHS</i>	28
3.4. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)	29
3.4.1 <i>Validação dos genes de referência</i>	30
3.4.1.1 <i>Seleção e procedimento para obtenção das sequências dos</i> <i>candidatos a gene de referência.</i>	30
3.4.1.2 <i>Análise dos dados e estatística</i>	33
3.4.2 <i>Determinação das condições da RT-qPCR</i>	35
3.4.2.1 <i>Desenho e determinação da concentração ótima de primers</i>	35
3.4.2.2 <i>Eficiência de reação</i>	37
3.4.3 <i>Análise dos dados de RT-qPCR</i>	40
3.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO GENE <i>AsCHS</i>	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46

4.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E INTEGRIDADE DA AMOSTRA	46
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE TRANSCRITOS DE AsCHS	50
4.2.1 <i>Determinação da sequência de AsCHS</i>	50
4.2.2 <i>Análise e classificação das sequências de AsCHS</i>	59
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS AsCHSs POR RT-QPCR... 71	
4.3.1 <i>Validação de genes de referência</i>	72
4.3.1.1 <i>Análise estatística</i>	75
4.3.1.2 <i>BestKeeper</i>	77
4.3.1.3 <i>geNorm</i>	80
4.3.1.4 <i>NormFinder</i>	81
4.3.1.5 <i>Método comparativo ΔCt</i>	82
4.3.1.6 <i>RefFinder</i>	82
4.3.2 <i>Análise da expressão gênica da AsCHS em diferentes estágios de desenvolvimento e de partes do corpo de operária média de A. sexdens</i>	85
4.3.2.1 <i>Análise da expressão de CHS de A. sexdens nas diferentes fases de desenvolvimento da formiga</i>	86
4.3.2.2 <i>Análise da expressão de CHS de A. sexdens em diferentes partes do corpo de operária</i>	88
4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO DA AsCHS POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) EM PUPAS DE A. SEXDENS.....	90
CONCLUSÕES	103
5. CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE.....	118

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As formigas (Hymenoptera:Formicidae) representam um dos grupos de insetos eusociais mais diversos e ecologicamente dominantes no mundo. O seu surgimento data de 115 a 140 milhões de anos atrás e sua presença em quase todos os habitats indica o seu sucesso no ambiente terrestre. Estima-se que existam mais de 46.000 espécies de formigas no mundo, das quais 20 subfamílias, 474 gêneros e mais de 16.000 espécies e subespécies já foram formalmente descritas (ANTWEB, 2018; BRADY et al., 2006).

O advento da agricultura e a capacidade de cultivar o próprio alimento foi um grande passo para a humanidade, possibilitou ao homem se libertar das limitações naturais do meio e iniciar o desenvolvimento das civilizações. Todavia, 50 milhões de anos antes, outros organismos do reino animal já realizavam o cultivo do seu alimento e iniciavam seu sucesso biológico, assim como a espécie humana. De 45 a 65 milhões de anos atrás um grupo de formigas da subfamília Myrmicinae, pertencentes à tribo Attini, realizavam o cultivo de fungo utilizado na sua alimentação. Essa forma característica de agricultura proporcionou uma transição evolucionária para o estilo de vida das formigas, de caçadoras de presas, néctar, sucos de frutas para a vida de agricultoras, sobrevivendo do fungo cultivado (MUELLER et al., 2001).

A importância ecológica das formigas é indiscutível, uma vez que contribuem para o equilíbrio do ambiente, alterando as condições físicas e químicas do solo, a aeração, o acúmulo e a ciclagem de nutrientes, além de contribuir para a polinização e para a dispersão de sementes (BROWN JR., 2000; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Entretanto, as alterações do ambiente resultantes da atividade humana na agricultura, na silvicultura e na construção de cidades, reduzem a complexidade do meio ambiente e a biodiversidade, o que pode favorecer animais oportunistas (KASPARI e MAJER, 2000). Dentre eles, a densidade populacional de formigas pode aumentar drasticamente e elas podem

tornar-se pragas nessas regiões (DELLA-LUCIA, 2011; MONTOYA-LERMA et al., 2012).

Poucas espécies de formigas são consideradas pragas, menos que 1%, porém as perdas econômicas causadas por elas são enormes, especialmente considerando aquelas que ocorrem na silvicultura e na agricultura, tanto na produção, como na estocagem de alimentos (MARICONI, 1970). Dentre as espécies de formigas economicamente importantes no Brasil, as formigas-cortadeiras se destacam, sendo que os efeitos também podem ser indiretos, como os decorrentes da contaminação ambiental causados pela utilização de agrotóxicos para o seu controle (DELLA LUCIA e FOWLER, 1993; DELLA LUCIA e SOUZA, 2011).

No Brasil, a espécie *Atta sexdens*, também conhecida como saúvalimão, apresenta uma ampla distribuição geográfica e é considerada como uma das espécies que mais contribui para os prejuízos econômicos (FORTI e BOARETTO, 1997; MARICONI, 1970). Devido à ausência de uma metodologia eficiente e segura para o seu controle, este inseto continua sendo alvo de novos estudos para ampliar o conhecimento, principalmente com relação a fisiologia e comportamental.

1.1 AS FORMIGAS-CORTADEIRAS

A tribo Attini é composta por 45 gêneros e apresenta distribuição geográfica restrita ao continente americano com a maioria das espécies na região neotropical, dentre esses, 15 gêneros compreendem as formigas cultivadoras de fungos, que são dependentes obrigatórios do cultivo do fungo mutualista utilizado na alimentação da colônia (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; WARD et al., 2015; WEBER, 1972). Uma das diferenciações entre as formigas cultivadoras de fungo é quanto ao substrato que elas fornecem para o fungo simbiote, sendo que os gêneros basais (atíneos inferiores) utilizam matéria orgânica em decomposição,

apresentam colônias quase imperceptíveis e uma organização social simples. Os atíneos superiores apresentam colônias maiores e complexas, fornecem ao fungo material vegetal fresco e até mesmo pedaços de pétalas frescas (NICKELE et al., 2013; SCHNEIDER, 2003; WEBER, 1972).

Dentre os gêneros superiores, é consenso em se tratando da filogenia das Attini que os gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) representam o ápice evolutivo da tribo, sendo conhecidas popularmente como formigas-cortadeiras por realizarem a poda de grande quantidade de material vegetal fresco para o cultivo do fungo simbiote (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Por esse motivo essas formigas são uma das maiores pragas tanto na agricultura como na silvicultura.

Até o momento não se sabe ao certo como a fungicultura se iniciou entre os Attini, se pelo consumo ou pela transmissão do fungo. Os indícios de que diferentes espécies de formigas dessa tribo cultivam diferentes fungos, mostram as várias aquisições de fungos por parte das formigas ao longo da evolução. A maioria dos jardins de fungos cultivados pelas formigas são basidiomicetos pertencentes aos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Leucocoprinae) (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 2001).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* representam as formigas-cortadeiras de folhas que mantém mutualismo com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). O fungo cultivado por esses atíneos superiores apresenta elevado grau de domesticação, sendo incapaz de levar vida livre (MEHDIABADI e SCHULTZ, 2009). A relação simbiote entre fungo e formiga é benéfica para ambos, pois o fungo é utilizado na dieta das formigas, enquanto que recebe substrato para seu desenvolvimento. Além disso, o fungo é protegido de parasitas e competidores, sua reprodução é garantida devido a transição vertical, do ninho de origem para os ninhos descendentes. As novas rainhas são responsáveis por essa transição, uma vez que, antes de saírem para o

voo nupcial carregam um pedaço do fungo em seu aparelho infra bucal e este é utilizado na formação do novo ninho (WEBER, 1972).

A dinâmica microbiana no jardim de fungos vai muito além do fungo simbiote e da formiga, sendo que diversos grupos microbianos, desde o fungo parasita como o *Escovopsis* à bactérias produtoras de antibióticos, foram identificados nesse ambiente (AYLWARD et al., 2012). Além desses, a presença de endossimbiontes, comum em todos os insetos, contribui para o aumento dessa comunidade microbiana. Os endossimbiontes podem diferir entre os tecidos e as castas das formigas, auxiliando na nutrição, defesa imune e antimicrobiana, como descrito para subespécie *A. sexdens rubropilosa* (VIEIRA et al., 2017).

No Brasil há 1550 espécies de formigas (ANTWEB, 2018). Das cinco espécies de saúvas mais importantes no país, a espécie *A. sexdens*, apresenta ampla distribuição nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (BRITTO et al., 2016). Os ninhos subterrâneos das formigas do gênero *Atta* apresentam arquiteturas internas complexas, constituído por centenas de câmaras ou painéis com diferentes funções que são interconectadas por túneis, sendo esse um dos aspectos importante a ser considerado para a aplicação de técnicas no seu controle (FORTI et al., 2011; WEBER, 1972).

1.2 CONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

Atualmente, o controle das formigas-cortadeiras é quase que exclusivamente químico através da utilização de iscas tóxicas, nas quais o ingrediente ativo é incorporado nas iscas peletizadas a base da polpa cítrica. No Brasil, os ingredientes ativos registrados e comercializados para uso em iscas no controle de formigas-cortadeiras são o fipronil (do grupo químico dos fenil pirazóis, atua no sistema nervoso/sistema GABA), o clorpirifós (do grupo dos organofosforados, que inibe a transmissão dos receptores do sistema nervoso), e

a sulfluramida (do grupo das sulfonas fluoroalifáticas, que atua no processo de fosforilação oxidativa, interrompendo a produção de ATP nas mitocôndrias) (BRITTO et al., 2016).

Sulfluramida é o composto mais eficiente no controle das formigas-cortadeiras, contudo o ácido perfluorooctano sulfônico (base para a síntese final da sulfluramida) foi incluído, em 2009, no anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. A produção e o uso somente para o controle de formigas-cortadeiras são restritos nas Américas e em áreas certificadas de reflorestamento em todo o continente americano (CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, 2009).

Nesse contexto, é forte a pressão para que um substituto eficaz desse ingrediente ativo seja encontrado. Para isso o conhecimento da fisiologia desse inseto é de extrema importância, para que se proponha rotas alternativas de controle, já que suas características comportamentais e biológicas proporcionam um grande potencial adaptativo, dificultando o seu controle (BRITTO et al., 2016).

1.3 DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO

As formigas são insetos holometábolos e passam pelos estágios de desenvolvimento de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são muito pequenos ($0,49 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$ de comprimento e $0,31 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$ de largura) e de difícil observação dentro das câmaras de jardim de fungos. O estágio larval apresenta o mesmo tamanho do ovo, quando recém emergida e se desenvolve até a fase de pré-pupa. Nesse estágio não há alterações morfológicas marcantes que possam identificar os instares larvais e mesmo o tamanho delas, não pode ser utilizado nessa identificação, uma vez que quase todos os tamanhos podem entrar em metamorfose. Essa característica de desenvolvimento permite que exista um

elevado grau de polimorfismo entre as operárias de *Atta* (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; SCHNEIDER, 2003).

As pupas de *Attini* são pupas nuas, ou seja, não apresentam casulo. Nesse estágio, as pupas se assemelham cada vez mais com as operárias e o seu desenvolvimento pode ser acompanhado pela pigmentação dos olhos (de branco a completamente escuros) e do corpo (de branco a marrom avermelhado). As operárias adultas têm a sua idade identificada pela coloração da cutícula da cabeça (marrom claro – quase amarelo a marrom escuro avermelhado) devido ao processo de esclerotização das camadas externas de quitina (SCHNEIDER, 2003). As colônias maduras de formigas-cortadeiras apresentam um sistema de polimorfismo de castas complexo dentre as formigas, contendo milhões de operárias variando em tamanho desde pequenas jardineiras (0,8 a 1,0 mm de cápsula encefálica) a grandes soldados (~3 mm de cápsula encefálica) (SUEN et al., 2011; WILSON, 1980).

Nos ambientes sociais a divisão de trabalho é bem estabelecida dentro das colônias, e a casta de operárias adultas apresenta dois padrões de divisão de trabalho, o polietismo etário e o polimorfismo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). O grau de desenvolvimento social na subespécie *A. sexdens* é tão elevado que os estágios imaturos (ovo, larva e pupa) não podem se desenvolver quando retirados do ambiente social, pois são totalmente dependentes das operárias para realizar a sua limpeza, deslocamento e alimentação (SCHNEIDER, 2003).

As operárias adultas dessa subespécie também são responsáveis por auxiliar larvas e pupas a eclodirem de seus ovos e emergirem das ecdises durante o processo de muda. Elas retiram a cutícula velha após a completa diferenciação das pupas sob o tegumento do último instar larval, por exemplo. A cutícula velha é mastigada pelas operárias e elas lambem a cutícula recém exposta transmitindo a esses indivíduos os hidrocarbonetos cuticulares que compõem o odor característico da colônia (SCHNEIDER, 2003).

Os insetos necessitam passar por esse processo de muda ou ecdise periodicamente devido as características da cutícula que compõe seu exoesqueleto. Dependendo do estágio de desenvolvimento e parte do corpo, a composição e função da cutícula muda, porém a arquitetura básica da cutícula de insetos é evolutivamente bem conservada entre os estágios de desenvolvimento e as espécies (MERZENDORFER e ZIMPOCH, 2003; MOUSSIAN, 2010)

1.4 CUTÍCULA DE INSETOS

Em insetos, a cutícula reveste todo o tecido exposto ao exterior incluindo o corpo, o intestino anterior e posterior e o lado luminal da traqueia, sendo que a sua versatilidade quanto a espessura, rigidez, força, elasticidade e cor está relacionada a sua composição, principalmente, quanto a presença de quitina e proteínas esclerotizadas. A cutícula é um dispositivo multifuncional que não apenas sustenta o inseto, mas também lhe protege contra a desidratação, dá forma, constitui uma barreira física para impedir a entrada de patógenos, armazena alimentos temporariamente e serve como um exoesqueleto que permite a locomoção, impermeabilização e uma gama de especializações mecânicas como aderência, resistência ao desgaste e controle de difusão (ANDERSEN, S. O., 2010; MOUSSIAN, 2010; VINCENT e WEGST, 2004).

Embora a cutícula de insetos varie quanto as suas características, causada pela variação da arquitetura molecular, diferença na composição de proteínas e esclerotização, ela apresenta uma estrutura fundamental comum. A cutícula em sua camada mais interna é composta por filamentos de quitina arranjados em uma matriz proteica (procutícula) e é coberta pela epicutícula que consiste de proteínas e lipídios. Ao ser formada, a cutícula é branca e vai se tornando mais escura e rígida durante o desenvolvimento do inseto devido à sua estabilização através da incorporação de compostos fenólicos (esclerotização) (ANDERSEN, S. O. 2010).

Por não ter a capacidade de se estender, o desenvolvimento dos insetos é estritamente dependente da capacidade de biossíntese e remodelamento das estruturas de quitina e, portanto, o mau funcionamento na síntese e/ou na degradação de quitina leva a uma desordem no desenvolvimento que pode ser observada já durante a embriogênese (MERZENDORFER, 2006; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003; ZHU, K. Y. et al., 2016).

1.5 MECANISMO DE SÍNTESE DE QUITINA

A quitina é um componente essencial da cutícula e da matriz peritrófica dos insetos, mas não se restringe apenas a esse organismo. A biossíntese de quitina é um processo encontrado entre os protistas, fungos e invertebrados, principalmente nos fungos (no septo, esporo e parede celular), nos artrópodes (nas cutículas, matriz peritrófica, glândula salivar, traqueia, ovos e pontos de ligação muscular), lulas, conchas de moluscos, casca de ovos de nematoides e paredes de cisto de protozoários. Como os procariotos, as plantas e os vertebrados, incluindo os humanos não sintetizam quitina, esse metabolismo se torna um alvo interessante no controle de fungos, insetos e ácaros (MERZENDORFER, 2013; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003; MUTHUKRISHNAN et al., 2012).

A quitina é um homopolímero linear de N-acetilglicosamina (GlcNAc) cujos monossacarídeos são unidos através de ligações glicosídicas β 1-4. O mecanismo geral de formação de quitina é altamente conservado desde fungos a insetos e envolve diversas reações enzimáticas que convertem diferentes fonte de estoque de açúcares no polímero de GlcNAc, que é secretado para o espaço extracelular, formando as microfibrilas que quitina (MERZENDORFER, 2011).

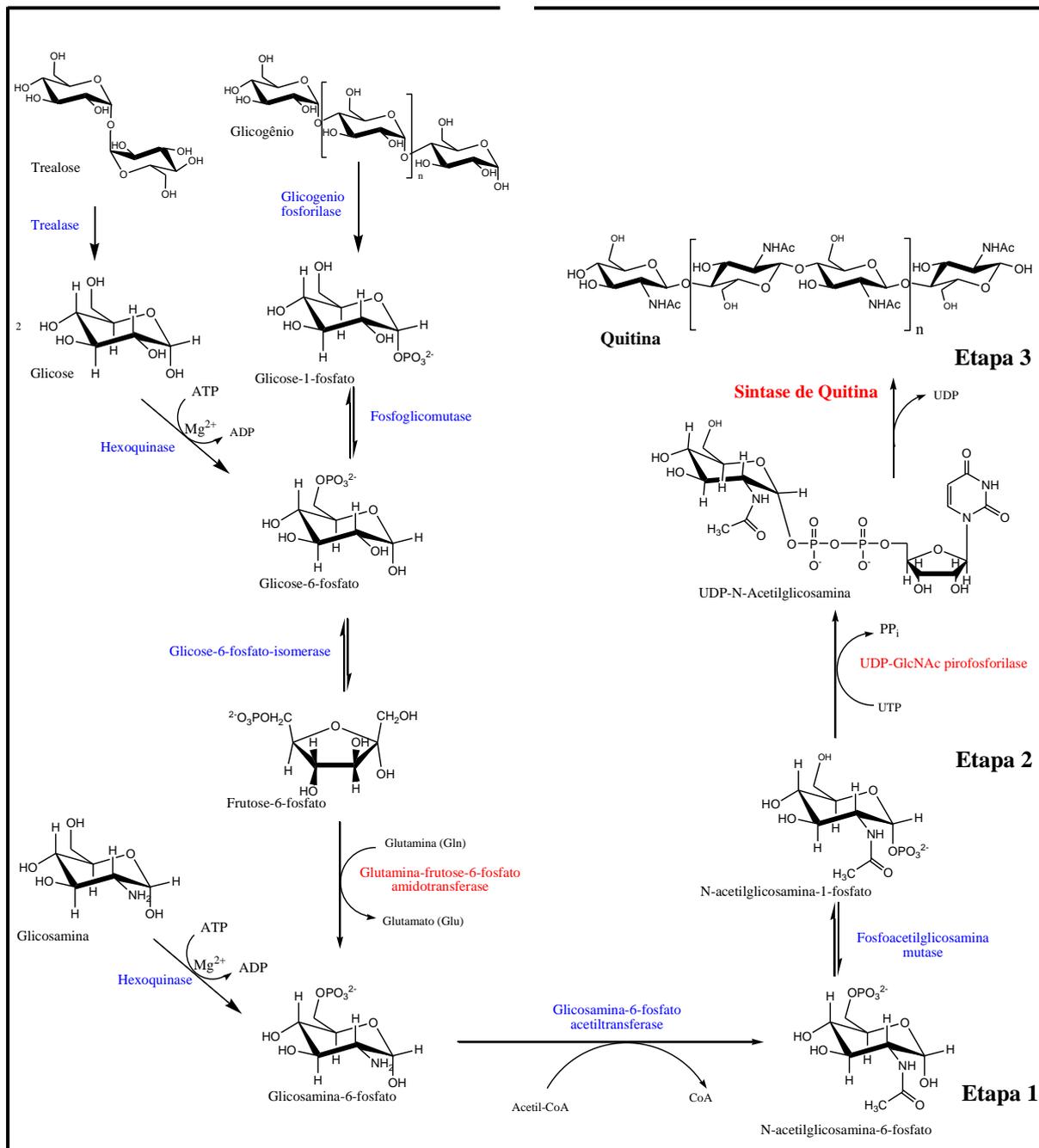
Resumidamente, o processo de síntese de quitina pode ser dividido

em três etapas (FIGURA 1.1). Na etapa 1 o amino açúcar GlcNAc é formado a partir da fonte de açúcar (glicose) ou composto de estoque (trealose ou glicogênio). A enzima limitante da velocidade da reação nesta etapa parece ser a glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT - EC 2.6.1.16) responsável pela conversão da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato. A etapa 2 corresponde a obtenção do açúcar ativado (Uridina difosfato N-acetilglicosamina - UDP-GlcNAc) e é limitada pela enzima UDP-GlcNAc pirofosforilase (UAP - EC 2.7.7.23). A etapa 3, última etapa deste mecanismo corresponde à polimerização da quitina e é catalisada pela sintase de quitina (CHS, do inglês *chitin synthase*, EC 2.4.1.16) que transfere o açúcar ativado UDP-GlcNAc para a extremidade não redutora da cadeia crescente de quitina (MERZENDORFER, 2011).

As enzimas pertencentes a esse mecanismo são altamente reguladas. Em *Aedes aegypti* foi verificado que dentre as enzimas limitante da velocidade da reação para esse metabolismo, a regulação transcricional da GFAT e CHS controlam a biossíntese de quitina em resposta a mudanças ambientais, enquanto que a UAP é constitutivamente expressa em todos os estágios de vida do mosquito (KATO et al., 2005; KATO et al., 2006).

Como algumas destas enzimas também participam em outras reações metabólicas no organismo, a CHS é descrita como a única enzima especificamente associada a biossíntese de quitina e, por isso, vem sendo descrita como a enzima chave desse mecanismo (MERZENDORFER, 2011; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

FIGURA 1.1: Mecanismo de síntese de quitina em fungos e insetos. As três etapas deste mecanismo estão representadas e identificadas como etapa 1 a 3. Em azul, o nome da enzima de cada reação enzimática. Em vermelho, as enzimas determinantes da velocidade da reação de cada uma das três etapas, também demarcadas (extraído e modificado de MERZENDORFER, 2011).



1.6 SINTASE DE QUITINA (CHS)

As CHSs pertencem a família 2 das glicosiltransferases (GT-2), que também agrupa outras enzimas importantes, como a celulose sintase, a hialurano sintase, entre outras. De um modo geral, as enzimas pertencentes à essa família catalisam a transferência de um açúcar doador ativado para um acceptor específico, formando uma ligação glicosídica por um mecanismo que geralmente ocorre por inversão da configuração anomérica do açúcar doador (COUTINHO et al., 2003).

As proteínas dessa família apresentam um enovelamento denominado GT-A, dois domínios $\beta/\alpha/\beta$ fortemente associados, formando uma folha central contínua de pelo menos oito fitas β . As enzimas GT-A também compartilham um motivo comum (motivo DXD, onde D é um aspartato e X é um aminoácido qualquer) de coordenação de íons ribose/metál M^{2+} , bem como outros resíduos carboxilato (Asp -D ou Glu - E) dos locais de ligação dos sacarídeos doadores e aceptores, que em condições fisiológicas devem estar carregados negativamente e atuando como base na reação de substituição nucleofílica, levando a formação da ligação glicosídica (COUTINHO et al., 2003; MERZENDORFER, 2006).

A CHS utiliza UDP-GlcNAc como açúcar doador ativado (substrato) e requer cátions metálicos divalentes (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) para formar o polímero de quitina (GLASER & BROWN, 1957; MERZENDORFER, 2006). É uma enzima processiva que adiciona uma única unidade de GlcNAc à extremidade não redutora do polímero crescente em um mecanismo de inversão de configuração no centro anomérico do açúcar ativado e resíduos de açúcares rotacionados 180° , resultando na formação de ligações β -glicosídicas (IMAI et al., 2003; MERZENDORFER, 2006). Foi proposto de que as CHSs devem apresentar dois sítios ativo próximos, sendo um para cada orientação do açúcar ativado. Essa proposta de dois sítios ativos foi fundamentada com base em ensaios de inibição enzimática, onde foi verificado uma maior inibição ao utilizar compostos

diméricos do que com composto monomérico da mesma classe (YEAGER e FINNEY, 2004).

A CHS localiza-se na membrana plasmática e a sua elevada hidrofobicidade dificulta preparações de CHS solúveis e ativas, o que reflete na escassez do conhecimento bioquímico e cinético dessas enzimas. O único relato de sucesso para a purificação da enzima em insetos é a purificação de um complexo oligomérico (trímero) ativo de CHS isolado do intestino médio de *Manduca sexta* (MAUE et al., 2009). Ainda não há estudos estruturais de CHSs e trabalhos descrevem apenas a expressão heteróloga da região catalítica de CHSs (MAGELLAN et al., 2010).

As CHSs de insetos são grandes proteínas transmembranas com uma massa molecular teórica que vai de 160 a 180 kDa e apresentam ponto isoelétrico (pI) entre 6,1 e 6,7 (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003). Diferentemente dos fungos, que podem apresentar até nove genes que codificam para a síntese de quitina, classificados em sete classes, todos os genomas de insetos conhecidos até o momento contêm de um a dois genes para CHS que são agrupados em duas classes de genes, a classe A (CHS-A ou CHS-1) e a classe B (CHS-B ou CHS-2) (MERZENDORFER, 2006; MUTHUKRISHNAN et al., 2012; ZHU, Y. C. et al., 2002).

Estudos mostram que o gene CHS-A é responsável pela síntese de quitina presente na epiderme, células ectodermal como as células da traqueia, ovos e ovários (ARAKANE et al., 2005; ARAKANE et al., 2004; ARAKANE, SPECHT et al., 2008), enquanto o gene CHS-B está envolvido na síntese de quitina associada a células epiteliais do intestino, como a membrana periotrófica (ARAKANE et al., 2005; ARAKANE et al., 2004; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

Embora apenas dois genes de CHS sejam descritos para insetos,

estudos mostram que diferentes isoformas resultam de *splicing* alternativo das CHS-A e este processo parece ser regulado durante o desenvolvimento do inseto (ARAKANE *et al.*, 2004). Inicialmente, apenas dois transcritos oriundos de *splicing* alternativo foram reportados em várias espécies de insetos, entre eles *Anopheles gambiae* (ZHANG, X. *et al.*, 2012), *Bactrocera dorsalis* (YANG *et al.*, 2013), *Locusta migratoria manilensis* (ZHANG, J. *et al.*, 2010), *Manduca sexta* (HOGENKAMP *et al.*, 2005), *Nilaparvata lugens* e *Laodelphax striatellus* (WANG, Y. *et al.*, 2012), *Plutella xylostella* (ASHFAQ *et al.*, 2007), *Spodoptera exigua* (CHEN *et al.*, 2007) e *Tribolium castaneum* (ARAKANE *et al.*, 2004). Nestas sequências, o *splicing* é exatamente o mesmo, e resulta em cadeia de 59 resíduos de aminoácidos que inclui a primeira e segunda região transmembrana após a região catalítica, na região C-terminal. Além disso, esses estudos mostraram que as CHS-Aa são predominantemente expressas no integumento e as CHS-Ab na traqueia.

Recentemente, em lepidópteros foram descritas outras formas de *splicing* variante para as CHS-A, em *Ostrinia furnacalis* (QU e YANG, 2011) e *Bombyx mori* (XU *et al.*, 2017), podendo apresentar até quatro isoformas de CHSs. As alterações ocorrem na região N-terminal da sequência de CHS, pois diferentes promotores são utilizados para controlar a expressão das enzimas, o que altera os resíduos iniciais das sequências. Também ainda não há um consenso sobre o tecido de atuação delas, uma vez que em *O. furnacalis* as isoformas apresentam regulação diferenciada na expressão da CHS na epiderme, ao longo do desenvolvimento do inseto. Já em *B. mori* uma das enzimas está associada a síntese de quitina na epiderme e na traqueia e a outra ao processo de formação das asas.

Embora classificadas em duas classes distintas, as CHSs de insetos apresentam organização estrutural semelhante. Devido à falta de informação estrutural das CHSs, o conhecimento adquirido sobre elas foi deduzido com base

na sequência de aminoácidos de outras enzimas da mesma classe, as GT-2 (MERZENDORFER, 2006). Estruturalmente, as CHSs podem ser divididas em três domínios A, B e C (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

O domínio A é encontrado na região N-terminal e apresenta baixa similaridade sequencial entre espécies diferentes. O número de hélices transmembranas é variável, comumente de 7 a 10, e dependendo deste número a porção N-terminal pode estar localizada em diferentes lados da membrana tanto para o extracelular como para o citoplasmático (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

O domínio B é encontrado no centro das CHSs (compreende aproximadamente 400 aminoácidos), contém o centro catalítico da enzima e está orientado para o citoplasma. Este domínio contém seis regiões de sequências conservadas em GT-2, sendo as regiões 1 (similar ao motivo *Walker A* e sequência consenso R-(folha β)-GKR) e 2 (similar ao motivo *Walker B* e sequência consenso K-(folha β)-DDGS)) responsáveis pela ligação do motivo UDP. A região 3 (conhecida como motivo DXD) e a região 4 (motivo G(X)₄(Y/F)R) ambos sendo local de ligação do sacarídeo doador. A região 5 (motivo GEDRXX(T/S)) é o local de ligação do sacarídeo acceptor e a região 6 (motivo Q(Q/R)XRW), responsável pela ligação do produto e encontrada apenas nas enzimas processivas da GT-2. As regiões 5 e 6 são descritas como regiões consenso das GT-2, estão presentes em todos os tipos de CHSs e são essenciais para o mecanismo catalítico (MERZENDORFER, 2006; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

O domínio C compreende a porção C-terminal da enzima e contém sete hélices transmembranas na maioria das CHS com exceção das CHSs de fungos que possuem cinco. Para insetos, as duas primeiras hélices podem sofrer *splicing* alternativo, como descrito anteriormente, já o *cluster* de cinco hélices transmembranas pode estar envolvido na extrusão do polímero de quitina através da membrana plasmática, como descrito para as celulose sintases

(MERZENDORFER, 2011; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003; RICHMOND, 2000).

Dois motivos conservados, não envolvidos diretamente na catálise enzimática, podem ser encontrados no domínio C das CHSs. O motivo (S/T)WGT(K/R), localizado após cinco regiões transmembrana, que pode estar relacionado com o papel de translocamento do polímero de quitina e o domínio de super enovelamento (*coiled-coil*), que está presente apenas nas CHS-A. É predito que o domínio *coiled-coil* esteja voltado para o meio extracelular e pode servir como um local de interação proteína-proteína envolvido na oligomerização. Além disso, sua localização próximo ao domínio catalítico, pode auxiliar na regulação da síntese de quitina (ARAKANE et al., 2004; MERZENDORFER, 2006; ZHU, Y. C. et al., 2002).

TELLAM e colaboradores (2000) foram os primeiros a sequenciar completamente o cDNA de uma CHS putativa de um artrópode derivado de *Lucilia*, um tipo de varejeira de ovelha australiana (LcCHS-1) (TELLAM et al., 2000). Atualmente existem diversas sequências de CHS nos bancos de dados (21428, no NCBI depositadas como proteínas, acessado em janeiro 2018), sendo a maioria delas sequências preditas advindas do sequenciamento do genoma desses organismos.

Quando esse trabalho foi idealizado, o único conhecimento sobre as CHS de formiga provinha de uma sequência anotada no banco de dados (GenBank: EGI66236.1) obtida do sequenciamento do genoma de *Acromyrmex echinator* (formiga quenquém). Entretanto, em fevereiro de 2018, existem 60 sequências de CHS para formigas depositadas no banco de dados. Dentre elas, seis de *Trachymyrmex*, quatro de *A. echinator*, quatro de *Solenopsis invicta* e quatro de *Atta*, sendo duas de *Atta colombica* e duas de *Atta cephalotes*, mas esse número aumenta quando consideramos os CDS das sequências de nucleotídeos do sequenciamento do genoma. A espécie *A. sexdens* até o momento não

apresenta o genoma sequenciado e disponível nos bancos de dados.

Por se tratar de uma espécie importante no aspecto econômico e considerando os relatos de que a CHS pode ser um alvo interessante no controle seletivo de insetos, foi realizado o trabalho de identificação da sequência que codifica para a CHS dessa formiga e a avaliação da utilização desse gene como alvo no controle das formigas-cortadeiras.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos contribuir para o conhecimento da sequência que codifica a sintase de quitina de formiga-cortadeira *Atta sexdens* (AsCHS), avaliar a expressão gênica desta enzima ao longo do desenvolvimento do inseto e em diferentes partes do corpo de operária média, validar genes de referência para a PCR quantitativa e avaliar a sua função por silenciamento gênico.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

A metodologia apresentada a seguir foi empregada para atingir os objetivos do trabalho de identificar a sequência que codifica para a sintase de quitina de *Atta sexdens* (AsCHS) nos transcritos do inseto, baseado nas regiões conservadas para essa classe de enzimas. Uma vez obtida a sequência de AsCHS, foram usadas metodologias para classificar a enzima com base na presença de domínios conservados e análise filogenética. Também são descritas metodologias para validar os genes de referência a serem utilizados na avaliação da expressão gênica nos estágios de desenvolvimento (larva, pupa e operária média na fase adulta) e nas partes do corpo de operária média (cabeça, mesossoma e operária média sem gáster). A função da AsCHS no desenvolvimento das formigas-cortadeiras também foi avaliada.

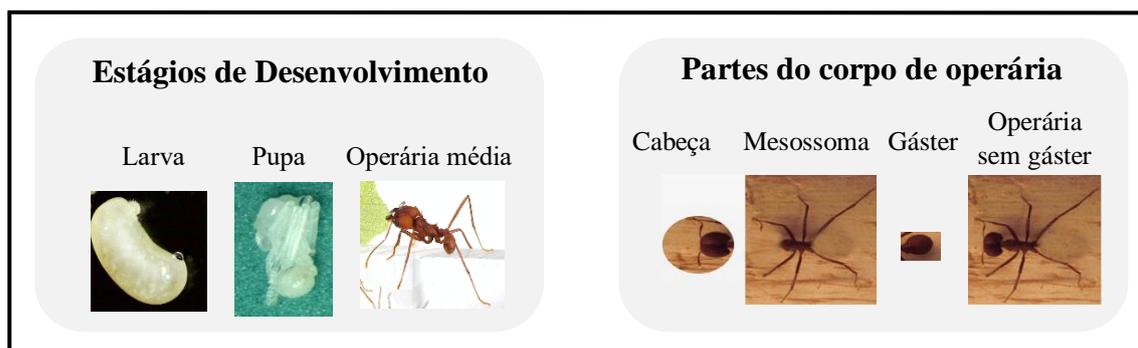
3.1. COLETA DE EXEMPLARES DE *A. sexdens*

Formigas-cortadeiras *A. sexdens* Forel (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes estágios de desenvolvimento foram utilizadas como material de partida. As coletas foram realizadas em ninhos artificiais do laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Campus Rio Claro, os quais são suplementados diariamente com folhas de *Eucalyptus alba*, sementes de aveia e, ocasionalmente, com folhas de outras plantas como *Hibiscus* sp. ou *Ligustrum* sp.

Neste trabalho, dois grupos de amostras foram analisados: formigas em diferentes estágios de desenvolvimento e diferentes partes do corpo de operária média. Os experimentos realizados com exemplares em diferentes estágios de desenvolvimento foram feitos com 10 larvas, 10 pupas e 10 operárias médias (casta de adulto) para cada replicata biológica. Os exemplares foram lavados com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄,

pH 7,4) livre de RNase e estocados a -80°C até sua utilização. Amostras de partes do corpo das operárias médias foram dessecadas: 10 cabeças, 10 mesossomas (consiste do torax + cintura), 10 gásteres e 10 operárias médias sem o gáster, para cada replicata biológica, seguindo o mesmo modo de lavagem e estocagem que as amostras de estágios de desenvolvimento. Os dois grupos de amostras estão ilustrados na FIGURA 3.1.

FIGURA 3.1: Dois grupos de *A. sexdens* coletados em ninhos artificiais. Os diferentes estágios de desenvolvimento analisados foram larva, pupa e operária média. As partes do corpo de operária média analisados foram cabeça, mesossoma, gáster e operária média sem gáster.



3.2. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O RNA total de larvas, pupas e operárias médias sem o gáster foram extraídos utilizando o método de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) combinado com o PureLink® RNA mini Kit (Thermo Fisher Scientific). A extração de RNA das operárias médias e das partes (cabeça, mesossoma e gáster) foi realizada utilizando apenas o kit PureLink® RNA mini Kit. As amostras foram homogeneizadas em 1 ml de TRIzol ou tampão de lise contendo betamercaptoetanol utilizando gral e pistilo mantidos no gelo, dependendo da

metodologia de extração, respectivamente TRIzol e PureLink RNA mini Kit. O protocolo de purificação do fabricante foi seguido para ambas aplicações, sendo que o RNA foi eluído em água livre de RNase.

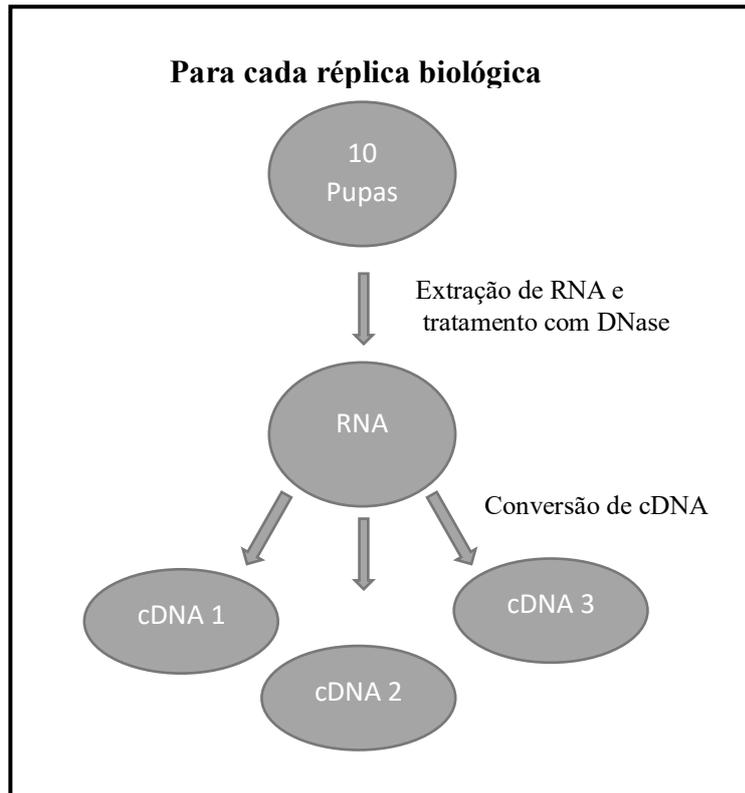
Para a quantificação, o RNA total foi diluído em 10 mM Tris-HCl pH 7,5 e verificado a absorção a 260 nm. A qualidade das amostras foi avaliada através das relações de absorção 260/280 nm e 260/230 nm utilizando o BioSpec-nano (Shimadzu-biotech), com razões entre 1,8 e 2,0.

A integridade do RNA foi analisada por gel desnaturante de agarose 1,2% (m/v) contendo 1,8 M de formaldeído em tampão MOPS para eletroforese (20 mM MOPS, 2 mM acetato de sódio e 1 mM EDTA), o tampão MOPS também foi utilizado na cuba de eletroforese. As amostras de RNA (2,7 µl) foram preparadas em tampão (7,3 µl de tampão contendo 2.0 M formaldeído, 50 % formamida, 5% glicerol, 1 mM EDTA, azul de bromofenol 0,025 % (m/v), e 0,12 mg.ml⁻¹ brometo de etídio pH 8,0) e aplicadas no gel desnaturante.

O RNA total foi tratado com DNase (DNaseI, RNase-free -Thermo Fisher Scientific) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante e utilizando 2 µg de RNA total em 20 µl de reação.

A fita de cDNA foi sintetizada utilizando 1,35 µg de RNA total tratado com DNase e o SuperScript® VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de reação de 20 µl, seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em triplicata para cada réplica biológica e o produto foi estocado a -20°C para uso posterior. Na FIGURA 3.2 pode ser observado o esquema de conversão de cDNA para replica biológica, partindo da extração de RNA de pupas.

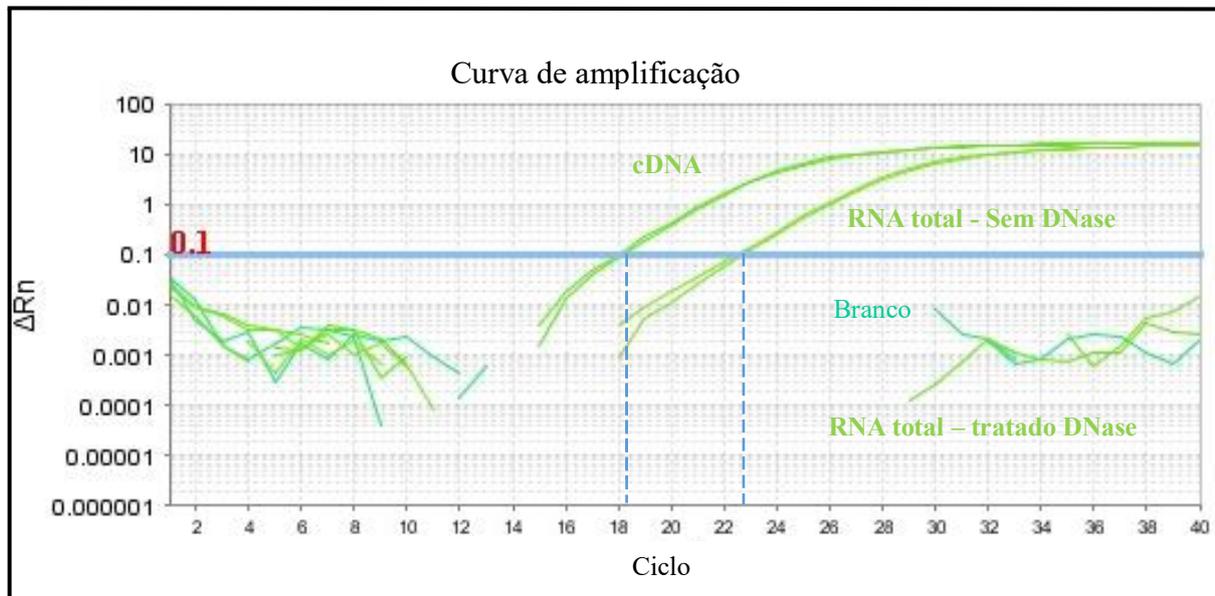
FIGURA 3 2: Representação esquemática da conversão de cDNA em triplicata para cada réplica biológica. Para exemplificar o estágio de desenvolvimento pupa foi utilizado como modelo, onde o RNA total de 10 pupas foi extraído em um *pool*, tratado com DNase e utilizado para conversão de cDNA em triplicata. Esse foi o procedimento adotado para cada réplica biológica das amostras de estágio de desenvolvimento e partes do corpo de operária.



A eficiência de cada etapa (extração de RNA, tratamento com DNase e conversão em cDNA) foi acompanhada por qPCR utilizando *primers* para o gene codificador da proteína ribossomal L18 (*rpl18*) e como molde amostras de cada etapa do processo na mesma concentração (FIGURA 3.3). A amostra de RNA total sem tratamento com DNase (RNA total – sem DNase) apresentou amplificação, provavelmente devido a contaminação de DNA genômico nessa amostra ($C_t = 22.63 \pm 0.11$). Essa contaminação foi eliminada após o tratamento com DNase, confirmado pela ausência de amplificação na amostra RNA total tratado DNase ($C_t =$ não determinado). Esse resultado mostra a importância do tratamento com DNase para a obtenção de dados confiáveis na quantificação da

expressão gênica. A amplificação na amostra de cDNA mostra que a conversão de RNA em cDNA foi eficiente ($C_t = 18.08 \pm 0.19$). Os experimentos de qPCR serão detalhados no subitem 3.4.

FIGURA 3.3: Acompanhamento da eficiência do tratamento de RNA total com DNase e da conversão em cDNA por qPCR. Curva de amplificação utilizando como molde RNA total (sem tratamento com DNase), RNA total tratado com DNase e cDNA de adulto. *Primers* para o gene *rpl18*. As curvas em tons de verde mostram as curvas de amplificação para cada amostra, identificadas na figura. A linha contínua em azul representa o valor de *threshold* para o gene *rpl18* e a linha tracejada em azul indica o C_t para cada amostra.



3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE AsCHS

3.3.1 Determinação da sequência de transcritos de AsCHS

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que permite amplificação específica de uma sequência alvo de DNA através de uma síntese

enzimática. Esse fragmento de DNA é delimitado por um par de *primers*, oligonucleotídeo de DNA, que atuam como iniciadores da replicação, a partir dos quais a fita complementar ao molde são estendidas pela DNA-polimerase termoestável ao longo de ciclos de temperatura.

A PCR foi utilizada para amplificação do fragmento de DNA da sequência de CHS de *A. sexdens*. Para isso, foram utilizados como molécula molde o cDNA dos três estágios de desenvolvimento (larva, pupa e operária média) e foram desenhados *primers* degenerados baseados em regiões conservadas de CHS de insetos (ARAKANE et al., 2004) para iniciar a amplificação. Posteriormente, *primers* específicos ou degenerados foram desenhados até a obtenção da sequência completa. As sequências dos *primers* estão descritas na TABELA 3.1.

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de cDNA, 1 µM de *primer* específico e/ou 2 µM de *primer* degenerado, 0,2 mM de dNTPs e 1,25 U de Pfu DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific). A amplificação foi realizada utilizando o seguinte programa: 3 min a 95 °C seguido de 38 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, a temperatura de anelamento variando de 50 a 62 °C dependendo da combinação de *primer* utilizada por 90 s e a extensão a 72 °C por 6 min. Foi acrescentada uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min.

TABELA 3. 1 Sequências de *primers* utilizados para identificação da sequência de AsCHS

Nome	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Sequência de aa esperada (Obtido)
<i>Primer degenerado</i>		
<i>Primer forward</i>		
Fdeg	ATG DCG AAR AAY CAA CAT CAG	MTKNQHQ (MAKNQHQ)
F1*	TTY GAR TAY GCN ATH GGN CAY TGG	FEYAIGHW
F2*	TGY GCN ACN ATG TGG CAY G	CATMWHE
F3*	GGN TGG TGG GAR AA	GWVEN
F4*	CAR GAR ACN AAR GGN TGG GA	QETKGWE (ETKGW)
F5*	TGG GAY GTN TTY MGN GAY CCN CC	WDVFDDPP (WDVFR)
<i>Primer reverse</i>		
R1*	CCA NCK RTC YTC NCC YTG RTC RTA YTG	QYDQGEDRW
R2*	ACY TCN CKN GTN CCC CA	WGTR
R3*	AAN CKR TGR AAN ARC ATN GC	AMLFHRF
R4*	TTN GCN CCN TRN GTY TGC AT	MQTQ/YGAR (MQTLGA)
Rdeg	TCA CAC GTT GGA GTT CRC CTC	EANSNVStop
Nome	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Sequência de aa esperada
<i>Primer específico</i>		
<i>Primer forward</i>		
SF1	CCC ATC TTG CTC TTC ATG	PILLFM
SF2	TAC AGC TTT TAT GCG CCC AGA TC	QLLCAQI
SF3	GCA ACA GCA TAA TGG CAA TGC	NSIMAM
SF2'	CGT GCA AAT CGA ACA TAC AG	CKSNIQ
F5UTR	GTG AAG TGG ATC CAG GAA ACG G	StopSGSRKR (frame 2)
<i>Primer reverse</i>		
SR2	AGCACGCAGCCGATCATGTGTTTCG	EHMIGCV
SR3	GCA TTG GTC CTC GTC CAG ACG CAG	LRLDEDQC
SR4	CCT CTC TAG ACA TTT CTG GTT TGC C	ANQKCLER
R3UTR	CCT GGG GAG AAG CGC GAT G	IALLPR
* ARAKANE et al., 2004. <i>Primers</i> degenerados: R=A+G; Y=C+T; M=A+C; K=G+T; S=G+C; W=A+T; H=A+T+C; B=G+T+C; D=G+A+T; N=A+C+G+T		

Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE (1 M Tris-Base, 0,5 M ácido acético, 50 mM EDTA). As bandas foram extraídas, purificadas do gel da agarose utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), quantificadas pela absorção a 260 nm e encaminhadas para análise por sequenciamento (ABI 3730 DNA Analyser - Thermo Fisher Scientific) com os mesmos primers utilizados para a amplificação. As sequências foram analisadas com o *software BioEdit* (v7.2.5 <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) para analisar a sequência obtida e a qualidade do sequenciamento. Os diversos fragmentos de DNA sequenciados foram analisados individualmente e posteriormente reunidos até a obtenção da sequência completa de AsCHS. A busca por similaridade com outras sequências de CHS foi realizada utilizando a *web site* de ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local – BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3.2 Análise e classificação da sequência de AsCHS

A predição da estrutura primária da proteína foi realizada a partir da sequência de resíduos de nucleotídeos utilizando os *softwares online Translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>) e o *The Sequence Manipulation Suite* (https://www.bioinformatics.org/sms/show_trans.html). O alinhamento das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foi realizado utilizando o *software online Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), a predição topológica das regiões transmembranas foi realizada utilizando o servidor TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), os *coiled-coils* foram preditos utilizando o Paircoil2 (<http://cb.csail.mit.edu/cb/paircoil2/paircoil2.html>) e as regiões promotoras foram preditas utilizando o programa *Neural Network Promoter Prediction Tool* (NNPP2.2) da Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

A predição da presença e localização de locais de clivagem de peptídeo sinal na sequência de aminoácido foi realizada utilizando o servidor *online* SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011).

A árvore filogenética foi construída utilizando o software MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2016) usando como arquivo de entrada as sequências de aminoácidos da AsCHS e de CHS de insetos e fungos. O método de aproximação utilizado foi o *neighbor-joining*.

3.4. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

A qPCR é uma evolução da técnica de PCR que permite a coleta de sinal fluorescente a cada ciclo da reação em uma ou mais PCR. Esse sinal é convertido em um valor numérico e o aumento na fluorescência é proporcional ao aumento no produto amplificado. A medida da quantidade de produto acumulado é realizada na fase exponencial da PCR, onde a reação deve apresentar em torno de 100% de eficiência. Assim, essa técnica permite quantificar alterações nos níveis de transcritos que pode indicar mudanças nos níveis de proteínas correspondentes, como uma de suas aplicações (ARYA et al., 2005; DORAK, 2006).

A RT-qPCR foi realizada utilizando o sistema StepOne Plus™ (Thermo Fisher Scientific) em placa de 96 poços selada com fita adesiva óptica MicroAmp (Thermo Fisher Scientific). O volume total da reação foi de 12 µl, contendo 6 µl de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 3 µl de *primer forward* e *reverse* na concentração apropriada e 3 µl de cDNA. Cada cDNA da replicata biológica (três cDNAs para cada réplica biológica – FIGURA 3.2) foi analisado em triplicata técnica. As condições de temperatura foram 10 min a 95 °C (ativação da polimerase) seguido por 40 ciclos a 95 °C por

15 s (desnaturação) e 60 °C durante 1 min (anelamento/extensão). Para cada reação, os produtos da PCR foram analisados através da curva de dissociados (curva de *melting*) promovendo o aquecimento as amostras de 60 a 95 °C para verificar a especificidade do produto amplificado...

Para análise dos dados da qPCR é necessário realizar uma normalização. Dentre as diferentes técnicas de normalização, o uso de genes de referência é uma metodologia efetiva, uma vez que esses passam pelas mesmas etapas que os genes a serem avaliados (HUGGETT et al., 2005; KOZERA e RAPACZ, 2013). Devido à ausência de genes de referência validados para *A. sexdens*, foi realizada a validação deles (MOREIRA et al., 2017), antes dos experimentos de avaliação do nível da expressão gênica de AsCHS.

3.4.1 Validação dos genes de referência

3.4.1.1 Seleção e procedimento para obtenção das sequências dos candidatos a gene de referência.

Resumidamente, genes candidatos a gene de referência foram selecionados com base em genes já descritos como referência para outros insetos. Sete genes foram selecionados: actina (*act*), fator de alongação 1-beta (*ef1-beta*), fator de alongação 1-alfa (*ef1-alpha*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), proteína ribossomal L18 (*rpl18*), proteína de ligação do TATA box (*tbp*), e 18S RNA ribossomal (*18S rRNA*). Como ainda não está disponível o genoma da *A. sexdens*, foi necessário identificar as sequências destes genes. Para isso, foi realizado um alinhamento para cada gene com diversas sequências depositadas em banco de dados de formigas. As regiões conservadas foram utilizadas para desenhar primers *forward* e *reverse* específicos ou degenerados

para cada uma das sequências citadas acima (TABELA 3.2), então foi realizada a amplificação de um fragmento de DNA dessas sequências.

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR utilizando como molde o cDNA de operária. A reação foi idêntica a descrita anteriormente (subitem 3.3.1). O programa de amplificação consiste em 3 min a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C por 1 min, 52 ou 62 °C por 90 s dependendo da combinação de *primer* utilizada e a 72 °C por 6 min. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados e submetidos ao sequenciamento, como descrito anteriormente (subitem 3.3.1).

TABELA 3.2: Sequência dos pares de *primers* para identificar a sequência dos candidatos a gene de referência.

Genes	Função	Sequência de <i>primer</i> ^a (5'-3')	Tamanho do amplicom sequenciado (bp)
<i>act</i>	Proteína estrutural do citoesqueleto envolvida na mobilidade celular, estrutura e integridade	F: GYGACGACGAMGTAGC R: TGCCAGATCTTCTCC	259
<i>ef1-alpha</i>	Elongação durante a síntese de polipeptídios no ribossomo	F: GACATTGCCTTGTGGAAG R: CAGTTGGCCTGGTAGGTGGC	498
<i>ef1-beta</i>	Elongação durante a síntese de polipeptídios no ribossomo	F: GTGGCAACCAACTCAGG R: GTGGACGAAGCTGGG	177
<i>GAPDH</i>	Metabolism de Carboidrato Codificar uma	F: CAACTTYGARRTYSTCGAGG R: CCRWAYTCGTTGTCATACC	436
<i>rpl18</i>	proteína ribossomal que é um componente da subunidade 60S	F: GATATTAATCATAAGCATGATCGGA R: CTTATAACCGCAGCTGCGTC	481
<i>tbp</i>	Coordenar no promotor do início da transcrição promovida pela RNA polimerase II	F: ATGGATCAGATGCTTCCG R: AGACCTGGAAATAGCTCTGG	677
<i>18S rRNA</i>	Constituinte estrutural do subunidade 40S do rRNA	F: AGCCATGCATGTCTCAGTGC R: CGCGACGGGATATTAGTTGG	648

^aF e R indicam os *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

3.4.1.2 Análise dos dados e estatística

Após obter a sequência parcial dos sete genes candidatos a gene de referência, novos *primers* foram sintetizados para RT-qPCR e as condições da reação foram padronizadas (subitem 3.4.2). Os níveis da expressão gênica dos candidatos a gene de referência foram analisados nos três diferentes estágios de desenvolvimento (larva, pupa e operária média) e nas partes do corpo da operária média (cabeça, mesossoma e operária sem gáster) sob condições bióticas.

Resumidamente, a análise estatística dos níveis de expressão de cada uma das amostras foi realizada utilizando desvio padrão, coeficiente de variação e teste-t para verificar se as diferenças nas médias dos valores de nível de expressão entre dois estágios de desenvolvimento ou partes do corpo de operária média são diferentes ou não (MOREIRA et al., 2017). Também foi verificada a fonte de desvio padrão, levando em conta a variabilidade dos dados de diferentes replicatas experimentais. O auto escalonamento foi utilizado para a melhor visualização das variáveis mais similares dentro de cada grupo.

Para completar a análise estatística, quatro algoritmos diferentes foram utilizados na análise estatística da estabilidade dos genes e um último programa foi utilizado para propor uma lista consenso do ranqueamento dos genes de referência. A seguir uma breve descrição dos algoritmos:

- 1) BestKeeper[®] version 1 (PFAFFL et al., 2004): é um software baseado na planilha do Excel que utiliza valores de Ct e eficiência de reação para identificar os melhores padrões e combiná-los em uma lista. A estabilidade do candidato a gene de referência é calculado considerando a variação como desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV). Genes candidatos com valores de SD [\pm Ct] maior que 1 podem ser considerados inconsistentes e são recomendados de serem excluídos da planilha de cálculo. Este software também testa as amostras individualmente quanto a sua integridade. O parâmetro utilizado é a variação

intrínseca (InVar), amostras que apresentam uma super ou subexpressão de três vezes ($\text{InVar} \geq 3$) devem ser removidos da análise devido a desvios elevados que podem ser atribuídos ao preparo ineficiente das amostras, transcrição reversa incompleta ou degradação da amostra.

2) geNorm version 3 (VANDESOMPELE et al., 2002a): utiliza a quantificação relativa $2^{-\Delta Ct}$. A estabilidade da expressão é determinada com base na medida do valor M, que é definido como a média da variação pareada para aquele gene contra todos os outros genes. Valores de M que ultrapassam 1,5 não são considerados estáveis. Um ranqueamento da estabilidade da expressão é apresentado com base na exclusão gradual do gene com maior valor de M e o recálculo de M para os genes restantes. O número mínimo de genes de referência a serem utilizados para uma análise confiável de RT-qPCR também é indicado.

3) NormFinder version v0.953 (ANDERSEN, C. et al., 2004): é um modelo de aproximação para estimar a variação da expressão. Os valores de Ct são transformados em escala linear, como no geNorm, e então a variação intra e intergrupo é apresentada. Estas variações são combinadas em um valor de estabilidade, representando uma medida prática do erro sistemático que será introduzido quando utilizado o gene de investigação. A lista de ranqueamento é gerada com base nos valores de estabilidade, baixos valores de estabilidade indicam os genes expressos com maior estabilidade.

4) Método comparative ΔCt (SILVER et al, 2006): compara a expressão relativa de “pares de genes” dentro de cada amostra para identificar os melhores genes de referência. A variação ΔCt para cada gene é obtida pela diferença dos valores de Ct. A média, o SD e a média dos SD relativos aos valores de ΔCt são obtidas e utilizadas para ranquear os genes. Os genes são estávelmente expressos ou co-regulados se um valor constante de ΔCt é observado entre os dois genes. Valores baixos de desvio mostram uma maior estabilidade de expressão devido a baixa variabilidade.

5) RefFinder (XIE et al., 2012): uma ferramenta *online* (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>). Utiliza os valores de Ct para obter o ranqueamento dos quatro algoritmos descrito anteriormente, fornece uma medida para cada gene individualmente baseado nessa lista e então gera uma lista consenso final dos candidatos a gene de referência.

3.4.2 Determinação das condições da RT-qPCR

3.4.2.1 Desenho e determinação da concentração ótima de *primers*

Depois de obter a sequência total que codifica para a AsCHS (e de fragmento dos genes candidatos a gene de referência), novos *primers* foram sintetizados para a RT-qPCR. O Software Primer Express® (Thermo Fischer Scientific) foi utilizado, uma vez que leva em consideração todos os requisitos para o desenho eficiente de *primer* para essa aplicação.

Dentre os pares de *primers* sugeridos pelo software, foram selecionados os pares com menor pontuação de penalidade e menor tamanho de amplicom. As melhores sequências selecionadas foram analisadas utilizando a *web site* de ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local – BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências dos pares de *primers* e o tamanho dos amplicons estão resumidos na TABELA 3.3.

A concentração mínima de *primer* na reação de qPCR foi determinada para minimizar amplificações não específicas e alcançar a máxima eficiência de reação (VANDESOMPELE et al., 2002b). Para isso, combinações dois a dois de *primer forward* e *reverse* nas concentrações de 100, 150 e 300 nM foram testadas. Cada combinação foi analisada em duplicata e foi adicionado um

controle negativo (NTC - utilizando água no ao invés da molécula molde). A melhor concentração para cada gene foi selecionada levando em consideração a reação que apresentou o menor valor de Ct, o maior ΔR_n e que apresentou um único pico na curva de dissociação dos produtos da PCR. Na TABELA 3.3 estão as concentrações de cada par de *primer* (*forward/reverse*) para cada gene analisado.

TABELA 3.3: Sequências e concentração ótima dos *primers* utilizados na RT-qPCR.

Gene	Sequência (5'-3')	Concentração (F/R) ^a	Tamanho do produto
<i>AsCHStotal</i>	F:CAAATTCTATTGATGGGTGGTACGA	150/300	69
	R: GAAGGCACCCACCAACATG		
<i>AsCHSlarvapura</i>	F: GCGTACGCGATGATCATGAT	100/100	61
	R: CGTCCTCGCCAAGCTGTAG		
<i>act</i>	F: TCCTCGCGCCGTCTTTC	300/300	69
	R: TTGACCCATACCGACCATCA		
<i>ef1-alpha</i>	F: AGCCGCTGTTGCATTCGT	100/150	64
	R: TGACGGATACTTCCAACATATTGTC		
<i>ef1-beta</i>	F: GGCAACCAACTCAGGCTGAT	150/300	82
	R: CAACGGAGTACATGAGGATTCCG		
<i>GAPDH</i>	F: ATGACGACTGTACATGCGATTACA	300/150	70
	R: TCACGCCATAGCTTGCTTGA		
<i>rpl18</i>	F: CGAGATCATCACGTTTCGATC	150/300	66
	R: CTGCATCAAGACTGTACGTTTTCC		
<i>tbp</i>	F: CAGCAGTCACAACAATTTCAACAA	300/300	75
	R: TCATTAGCATGCCACTCTGCAT		
<i>18S rRNA</i>	F: CTGATCGCACGGTCTTAGCA	150/150	73
	R: CAGAACCTACCATCGACAGTTGAT		

^a F e R indicam os *primers forward* e *reverse*, respectivamente e a concentração em nM.

3.4.2.2 Eficiência de reação

A eficiência da PCR é dependente dos componentes da reação, sendo altamente dependente dos *primers* utilizados. Por isso, a eficiência de reação para cada gene foi determinada. Para que se tenha uma comparação precisa e confiável entre as amostras, elas devem apresentar uma eficiência de amplificação constante principalmente quando se utiliza modelos de quantificação relativa entre a uma sequência desconhecida/alvo e um gene de referência. É esperado que essa

eficiência seja próximo de 100%, que corresponde a duplicação de produto amplificado a cada ciclo de reação (BUSTIN et al., 2009; DORAK, 2006).

Após a determinação da concentração ótima de *primer*, a eficiência de reação foi analisada através da curva padrão para cada gene. Para isso, uma diluição seriada de duas ou cinco vezes do cDNA foi utilizada como molécula molde na reação. As amostras foram analisadas em triplicata e um controle negativo. A eficiência de reação foi calculada de acordo com a equação 1, na qual o coeficiente angular advém da plotagem gráfica dos valores de Ct contra o logaritmo da concentração de cDNA. Reações que obtiveram eficiências entre 90 % e 110 % foram utilizadas para análises estatística.

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Na FIGURA 3.4 estão apresentadas a curva de amplificação, o gráfico de Ct contra o logaritmo da concentração de cDNA utilizado para obter a regressão linear e obter a eficiência de reação e a curva de dissociação utilizada para verificar a formação de dímeros de *primers* e amplificação inespecífica. Nessa etapa foi determinada a eficiência de reação, a viabilidade de utilizar os *primers* desenhados e o valor da linha de *threshold* para cada gene que foi utilizado nas análises posteriores (TABELA 3.4). O *threshold* corresponde à faixa de fluorescência acima do faixa de detecção do ruído, delimitado na fase exponencial da curva de amplificação e leva à obtenção do Ct (do inglês, *cycle threshold*), ciclo no qual a fluorescência atinge essa faixa de fluorescência.

Determinados esses parâmetros, a RT-qPCR foi realizada utilizando as condições de reação já descritas (subitem 3.4). As reações para cada conversão

de cDNA foram realizadas em triplicata técnica e controle negativo para cada gene.

FIGURA 3.4: Gráficos obtidos na análise da eficiência de reação do gene *AsCHStotal*. A) Gráfico de amplificação da PCR, ΔRn x ciclo. B) Curva padrão, Ct x log[cDNA]. C) Curva de dissociação.

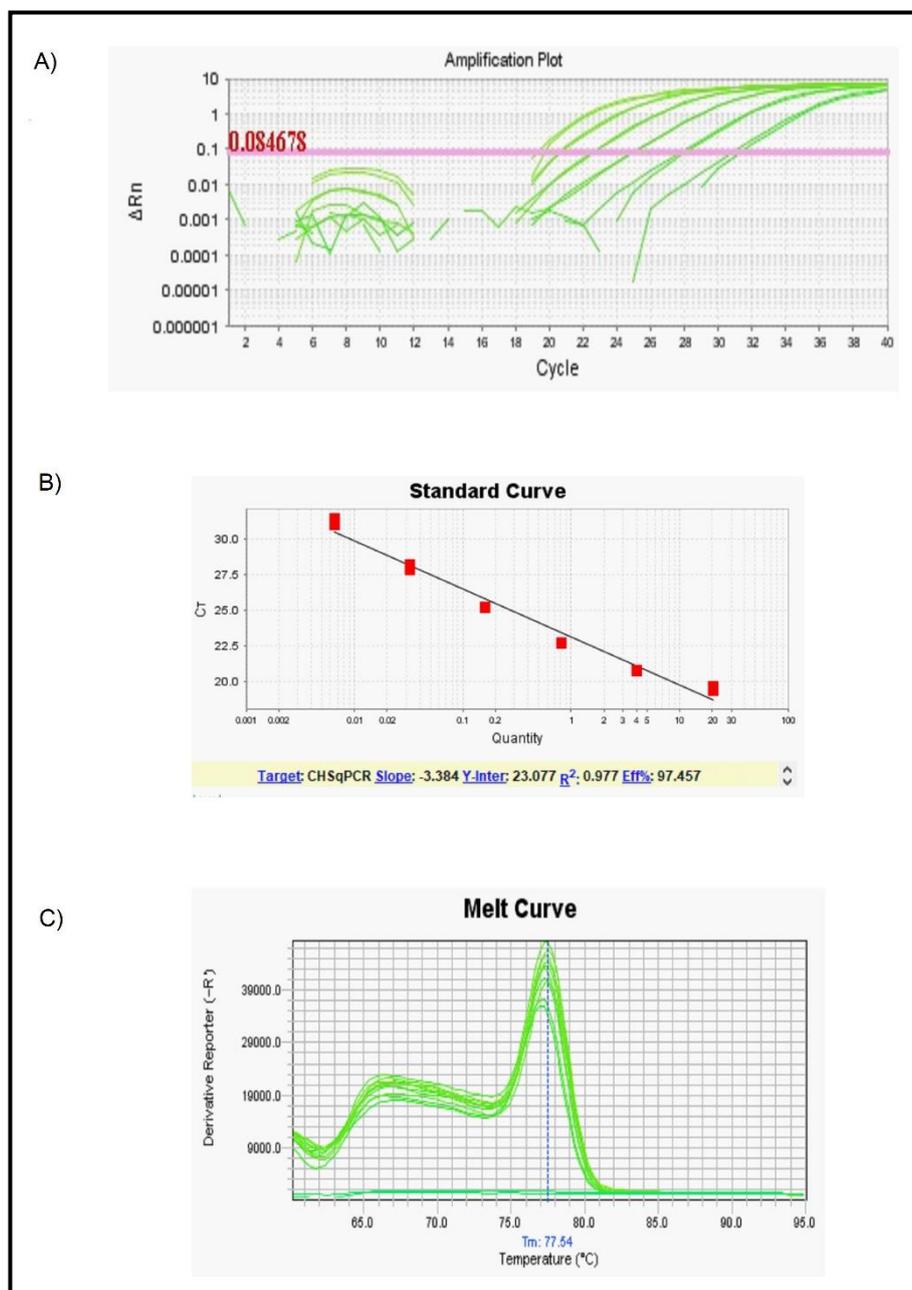


TABELA 3. 4: Parâmetros de eficiência de reação para os *primers* utilizados na RT-qPCR.

Gene	Threshold	Eficiência (%) ^a	Slope	R ² ^b
<i>AsCHStotal</i>	0,084678	97,4	-3,38	0,977
<i>AsCHSlarvapupa</i>	0,600102	101,4	-3,29	0,992
<i>act</i>	0,102028	98,2	-3,37	0,990
<i>ef1-alpha</i>	0,100000	95,1	-3,44	0,993
<i>ef1-beta</i>	0,084678	99,8	-3,33	0,900
<i>GAPDH</i>	0,100000	97,4	-3,38	0,990
<i>rpl18</i>	0,100000	97,9	-3,37	0,988
<i>tbp</i>		---	---	---
<i>18S rRNA</i>		---	---	---

^a Eficiência da RT-qPCR, calculada pelo método da curva padrão

^b Coeficiente de determinação

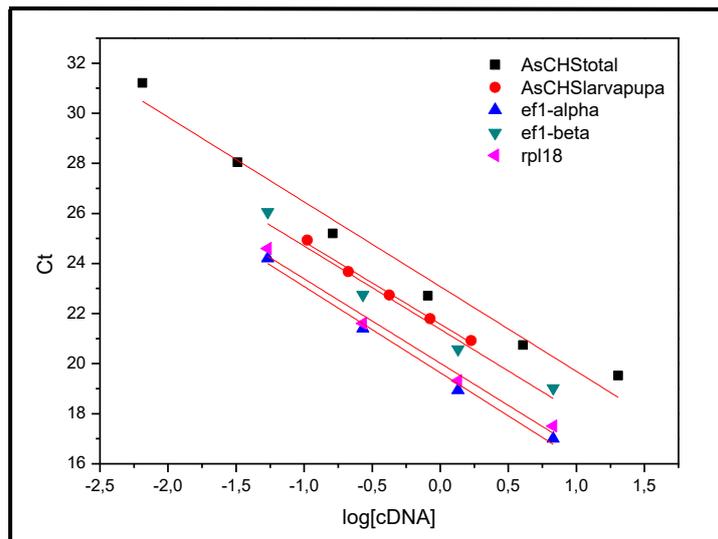
3.4.3 Análise dos dados de RT-qPCR

Os dados de qPCR normalmente são avaliados por um de dois métodos: quantificação absoluta ou quantificação relativa. Na quantificação absoluta o número exato de cópias no início da reação é determinado relacionando o sinal da PCR com uma curva padrão. Na quantificação relativa as mudanças na expressão gênica do gene alvo são descritas em relação a qualquer amostra referência, a escolha do observador.

Os dados de análise da expressão gênica foram avaliados por quantificação relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para que esse método seja válido, a eficiência de amplificação do alvo e do gene de referência devem ser aproximadamente iguais. Os genes de referência para essa aplicação foram *ef1-alpha* e *rpl18* para os estágios de desenvolvimento e *rpl18* e *ef1-beta* para diferentes partes do corpo de operária média. Para verificar se dois amplicons apresentam a mesma eficiência, as curvas de diluição da eficiência de reação devem ser paralelas. Isto corresponde a comparar a variação do ΔC_t do gene alvo

e do gene referência; ao plotar a diferença entre os pontos, o coeficiente angular da reta resultante deve ser próximo de zero (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Na FIGURA 3.5 representamos a curva de eficiência de reação para os genes de referência (*ef1-alpha*, *ef1-beta* e *rpl18*) e para os genes alvo (*AsCHStotal* e *AsCHSlarvapupa*). Como as retas são paralelas, o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ pode ser utilizado com confiabilidade para as análises de expressão gênica.

FIGURA 3.5: Análise da eficiência de reação para avaliação da viabilidade de utilizar o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ na quantificação relativa da expressão gênica. A legenda do gráfico está descrita da figura e as retas em vermelho corresponde a análise por regressão linear para cada gene.



Para análise da expressão gênica da AsCHS durante os estágios de desenvolvimento, o estágio de larva foi utilizado como amostra calibradora e nas partes do corpo de operária média foi utilizado o mesossoma. Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 5 e estão apresentados com a média \pm SEM. Para análise estatística de variância foi utilizado o teste one-way ANOVA e como pós-teste, o teste múltiplo de comparação Tukey com 95 % de confiança.

3.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO GENE *AsCHS*

Para avaliar a função do gene *CHS* em *A. sexdens* foi utilizada a metodologia de interferência por RNA (RNAi) (FIRE et al., 1998). Essa é uma técnica potente e específica de regulação negativa da expressão gênica pós-transcricional. De um modo geral, consiste na injeção de uma fita dupla de RNA (dsRNA) complementar a um gene específico. Essas moléculas indutoras são processadas levando à formação de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de 21 a 25 nucleotídeos. As fitas antissenso do siRNA são responsáveis por ativar um complexo enzimático (RISC – *RNA-induced silencing complex*) responsável por localizar o RNA celular por homologia e degradar especificamente esses transcritos (PEREIRA, 2013).

Neste trabalho foi utilizado siRNA (TABELA 3.5) e como controle negativo foi utilizado o siRNA Universal Negative Control#1 (SIC001), ambos adquiridos na Sigma-Aldrich após análise dos especialistas da empresa. O siRNA *AsCHS*, o siRNA controle e a água foram injetados em pupas de *A. sexdens* utilizando um microscópio e o micro injetor Nanoliter 2010 (World Precision Instruments). As agulhas utilizadas nesse micro injetor foram preparadas a partir de capilar de vidro de borossilicato (diâmetro interno: 0.530 mm ± 25 µm, diâmetro externo: 1,14 mm) utilizando um microeletrodo puxador (Microeletrode Puller PUL-1000 - World Precision Instruments) seguindo as condições do fabricante para o preparo das agulhas. As concentrações e volume injetados foram 50 ng (36,8 nL), 92 ng (69 nL), 300 ng (239,2 nL, quatro injeções de 59,8 nL) e 1000 ng (82,8 nL).

TABELA 3. 5: Sequência do siRNA utilizado em pupas de *A. sexdens*.

Nome	siRNA
Atta sexdens siRNA_s	CCGUGGUAAGGCAUUGAUG[dT][dT]
Atta sexdens siRNA_as	CAUCA AUGCCU UACCACGG[dT][dT]

s: fita senso
as: fita antissenso

Uma metodologia foi desenvolvida para a injeção de solução nas pupas, sendo que toda a manipulação das formigas foi realizada utilizando luvas e pinças. Ninhos artificiais previamente adormecidos a -20°C por 30 min foram desmontados para realizar a coleta de pupas de olho branco a avermelhado, que corresponde aos estágios iniciais do estágio de pupa. Ensaios preliminares foram realizados injetando água com corante alimentício para verificar a introdução da solução na hemolinfa das formigas. Para avaliação da função do gene, 10 pupas foram injetadas, para cada uma das análises (siRNA AsCHS, siRNA controle e água).

Ninhos menores (micro formigueiros) foram montados em placas de Petri contendo jardim de fungos e algumas operárias, a fim de ter o controle das pupas injetadas. Esses micro formigueiros foram adormecidos a -20°C por 30 min, uma solução de sacarose foi aspergida sobre eles e então as pupas injetadas foram introduzidas. Para cada uma das análises experimentais foram preparados cinco micro formigueiros. A mortalidade das pupas foi avaliada diariamente em cada micro formigueiro, enquanto que as coletas para análise da expressão gênica foram realizadas após 24, 48, 72, 168 e 240 h após a injeção. Para cada análise de expressão gênica um micro formigueiro foi retirado do experimento.

Após a remoção do micro formigueiro, este foi adormecido, as pupas coletadas e avaliadas fenotipicamente (imagem fotográfica) e posteriormente

foram estocados a -80°C até extração de RNA para a avaliação quantitativa da alteração dos níveis de transcritos por RT-qPCR, descrito anteriormente. A amostra injetada com água em cada tempo de análise foi utilizada como amostra calibradora. Este experimento foi realizado em duplicata biológica e os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 5, estão apresentados com a média \pm SEM e as análises estatísticas foram realizadas com 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E INTEGRIDADE DA AMOSTRA

A verificação da integridade do RNA total extraído de *A. sexdens* é de extrema importância, uma vez que o cDNA obtido a partir dessa amostra foi utilizado como molécula molde em diversas etapas desse trabalho. O processo de extração de RNA total e a análise de sua integridade foram avaliados por gel de agarose desnaturante 1,2%. Essa metodologia avalia a integridade do rRNA assumindo que esta reflita a integridade de outras frações do RNA, como o mRNA. Embora essa abordagem pode não ser uma medida precisa da qualidade do mRNA, certamente é um modo indicativo rápido do estado geral do RNA purificado (WINNEBECK et al., 2010).

Em amostras de eucariotos, as bandas mais intensas de rRNA são as subunidades 28S e 18S, que geralmente se apresentam como bandas bem definidas e distintas. Para assumir um mRNA com qualidade aceitável, o rRNA deve apresentar a banda 28S duas vezes mais intensa que a banda 18S e não se deve ser verificado nenhum arraste das mesmas (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Entretanto, há diversos trabalhos que relacionam a integridade do mRNA com a presença de apenas uma das bandas de rRNA, a 18S ou a 28S, e até mesmo mostrando que o mRNA pode permanecer intacto em amostras em que houve a degradação total do rRNA (FLEIGE e PFAFFL, 2006; MAYNE et al., 1999; MILLER et al., 2004; SANTIAGO et al., 1986).

Há mais de 50 anos se discute a respeito da termolabilidade variável do 28S rRNA em diferentes espécies de insetos, o que pode levar a interpretação errada do perfil do RNA (APPLEBAUM et al., 1966; GREENBERG, 1969; MACHARIA et al., 2015). Em muitos insetos, a subunidade 28S rRNA é

composta por dois fragmentos unidos por ligações de hidrogênio, que podem se dissociar sob aquecimento ou durante o processo de purificação e migrar juntamente com a subunidade 18S (WINNEBECK et al., 2010).

O perfil das amostras de RNA total extraído de *A. sexdens* pode ser verificado na FIGURA 4.1. A banda intensa acima de 1000 bp (com base no padrão de DNA) corresponde ao 18S e aos dois fragmentos do 28S rRNA que migram junto com essa subunidade. A banda fraca em torno de 3500 bp, presente em algumas amostras, corresponde ao 28S rRNA intacto. Este perfil é comumente visto em RNA de insetos e provavelmente não representa degradação da amostra.

A termolabilidade do 28S rRNA de *A. sexdens* foi avaliada verificando o comportamento do RNA total extraído de pupas, a FIGURA 4.1-A mostra o perfil da mesma amostra submetida ao aquecimento e sem aquecimento antes de aplicar no gel desnaturante. O aquecimento a 65°C por 5 min com o tampão desnaturante levou a uma alteração no padrão de migração do rRNA. E ao aumentar o tempo de aquecimento para 15 min pode ser observado um arraste na amostra ao ser visualizada no UV, contudo, este perfil é diferente do perfil de uma amostra degradada, que consiste na presença de uma banda intensa de baixa massa molecular (50 -100 bp).

Em amostras de RNA total de *Apis mellifera* foram observadas variações semelhantes nas proporções do 28S e 18S. Apenas um sinal analítico (pico) foi observado quando as amostras foram aquecidas (70°C por 2 min) antes da separação através do Agilent 2100 Bioanalyzer, esse sinal analítico correspondente ao 18S e a fragmentação do 28S rRNA. Enquanto que nas amostras não aquecidas antes da análise foram observados dois sinais, um referente ao 18S rRNA e o outro ao 28S rRNA (WINNEBECK et al., 2010). Devido a termolabilidade do rRNA de *A. sexdens*, não foi realizado o aquecimento

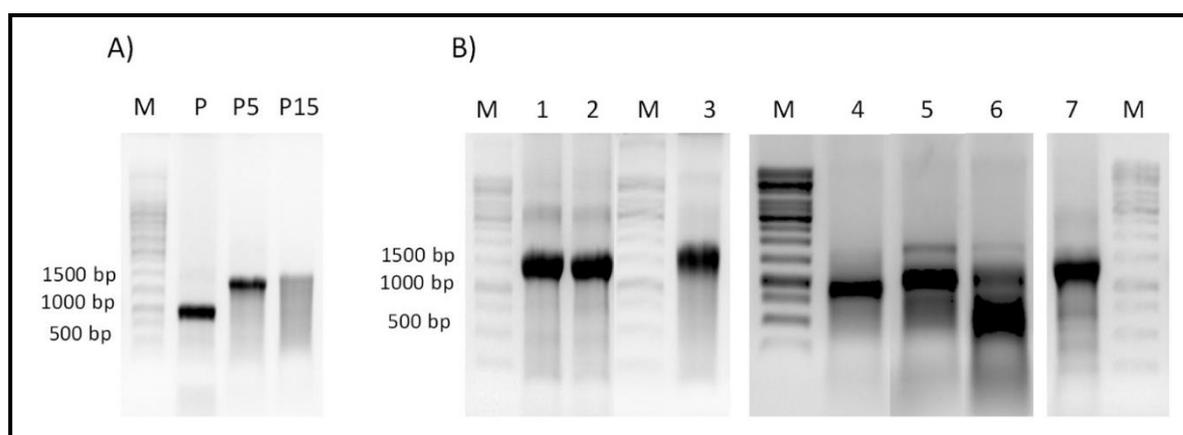
do RNA total antes de aplicar no gel de agarose, como sugerido nos protocolos, para a análise da integridade das amostras.

O gel de agarose desnaturante (FIGURA 4.1-B) confirmou a integridade do RNA extraído para as amostras de larva, pupa e operária média sem o gáster extraídas com Trizol em combinação com o kit (FIGURA. 4.1-B, poços 1, 2 e 7, respectivamente) e para as amostras de cabeça e mesossoma extraídas somente com o kit (FIGURA. 4.1-B, poços 4 e 5) caracterizadas pela ausência de arraste e a presença de uma banda intensa em torno de 1000 bp.

A extração de RNA total de operária média e do gáster com Trizol[®] levou a uma severa degradação do RNA (dados não mostrados). Valles e colaboradores detectaram a presença de componentes endógenos localizados no segmento terminal do abdômen de formigas adultas *Nylanderia pubens* Forel (Hymenoptera: Formicidae) capaz de degradar o RNA, até mesmo em rainha e formigas aladas quando extraídos com Trizol[®]. Além disso, também foi mostrado que a adição de pelo menos 50 mM EDTA levou a obtenção de RNA intacto (VALLES et al., 2012). Neste trabalho não foi utilizado o EDTA, uma vez que este pode inibir a transcrição reversa e a PCR, o que pode incluir mais uma variável, tanto nos experimentos de PCR, mas principalmente nos experimentos de RT-qPCR (FLEIGE e PFAFFL, 2006).

Tanto o RNA intacto de operária média (FIGURA. 4.1-B, poço 3), como um RNA parcialmente intacto do gáster (FIGURA. 4.1-B, poço 6) foram obtidos utilizando o PureLink[®] RNA mini Kit. O diferencial deste kit é a solução de lise, que é acrescida de betamercaptoetanol e pode ter auxiliado na manutenção do RNA total íntegro mesmo na presença destes possíveis componentes endógenos responsáveis pela degradação desta amostra.

FIGURA 4.1: Análise da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1.2 % (m/v). A) Gel de agarose de RNA de pupa com e sem aquecimento antes de aplicar no gel. P) RNA sem aquecimento; P5) RNA aquecido por 5 min; P15) RNA aquecido por 15 min. (B) Gel de agarose de RNA total de 1) Larva; 2) pupa, 3) operária; 4) cabeça; 5) mesossoma; 6) gáster; 7) operária sem gáster e M) Marcador molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder - Thermo Scientific).



Há discussões divergentes sobre a influência da integridade do RNA nos experimentos de RT-qPCR. Alguns autores sugerem que alguma degradação de RNA pode ser tolerada desde que os amplicons apresentem de 70-250 bp (FLEIGE e PFAFFL, 2006), enquanto outros autores indicam que a degradação parcial do RNA pode fornecer um resultado impreciso da expressão gênica (WANG, E. 2005). Devido a isso, optamos por analisar o RNA do gáster que se encontrava parcialmente degradado, com o algoritmo BestKeeper que além de avaliar os candidatos a genes de referência, também avalia a integridade das amostras a partir dos dados de RT-qPCR (PFAFFL et al., 2004). Os dados dessa análise serão discutidos no subitem 4.3.1.2.

As amostras de RNA total foram quantificadas e a concentração foi padronizada para posterior tratamento com DNase e conversão em cDNA. O cDNA obtido dessa maneira foi utilizado tanto na PCR, como na RT-qPCR.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE TRANSCRITOS DE AsCHS

4.2.1 Determinação da sequência de AsCHS

Quando este projeto de doutorado foi proposto, o único relato na literatura relacionado a CHS de formigas era a sequência para *Acromyrmex echinator* (GenBank: EGI66236.1). Deste modo, inicialmente para obter a sequência que codifica para a síntese da CHS em *A. sexdens* foram desenhados *primers* com base nesta sequência disponível e como molde foi utilizado o cDNA de operária média sem gáster na PCR. Contudo, a amplificação com estes *primers* e este molde não foi eficiente (dados não mostrados).

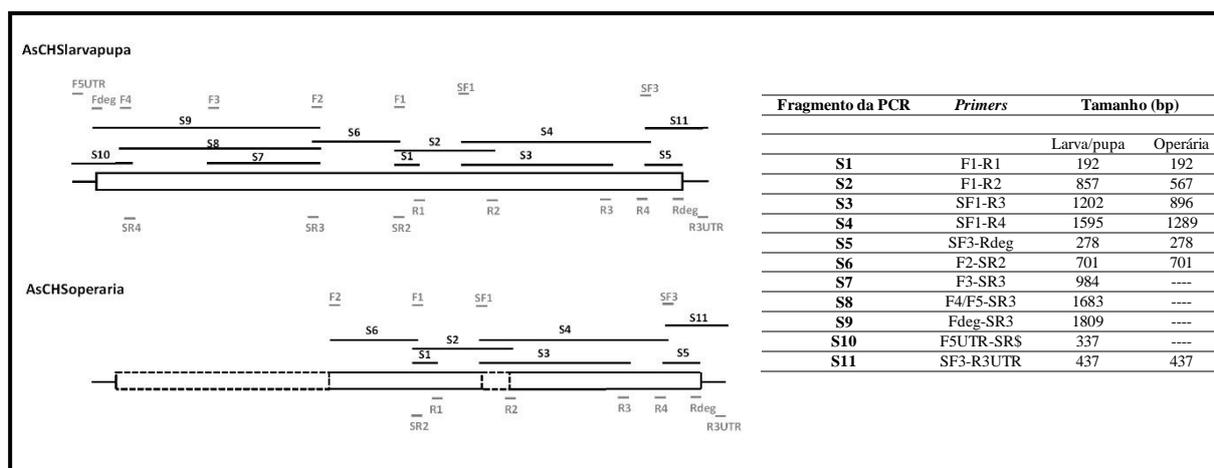
A outra abordagem utilizada para realizar a amplificação foi utilizar diferentes combinações de *primers* degenerados descritos na literatura para regiões conservadas de CHS de insetos e que permitissem a amplificação tanto de enzimas da classe A como da classe B (ARAKANE et al., 2004).

Como molécula molde na PCR foi utilizado o cDNA de três fases de desenvolvimento (larva, pupa e operária média) separadamente. A FIGURA 4.2 mostra a combinações de *primers* usadas na PCR e o tamanho dos 11 fragmentos de DNA amplificados. As identificações dos *primers*, as sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes estão descritas na TABELA 3.1.

A partir da sobreposição dos fragmentos de DNA amplificados por PCR dois transcritos de CHS de *A. sexdens* foram identificados em diferentes fases de desenvolvimento. As sequências identificadas em larva e pupa são idênticas e inicialmente denominada AsCHSlarvapupa, enquanto que em operária média foi identificada uma sequência diferente, AsCHSoperária. Estas sequências foram classificadas como sequências que codificam para a síntese de uma CHS devido a presença dos dois domínios que caracterizam as enzimas pertencentes à família das glicosiltransferases processivas GT-2, o motivo EDR e o motivo

QRRRW que estão presentes no domínio catalítico de todas as CHSs. Esses motivos são considerados como sequências assinatura dessas enzimas (MERZENDORFER, 2006; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

FIGURA 4.2: Representação esquemática da estratégia de amplificação dos fragmentos codificadores de sintase de quitina em *A. sexdens*. As sequências amplificadas por PCR de AsCHS obtidas em larva/pupa e operária média estão representadas pelos fragmentos S1 a S11. A caixa representa a região da ORF e o seguimento contínuo nas extremidades dela, as regiões 5' e 3' UTR. A combinação de *primer* e o tamanho de cada fragmento amplificado estão identificados na tabela ao lado. A região tracejada na sequência de operária média corresponde a região ausente neste estágio, mas presente em larva e pupa.

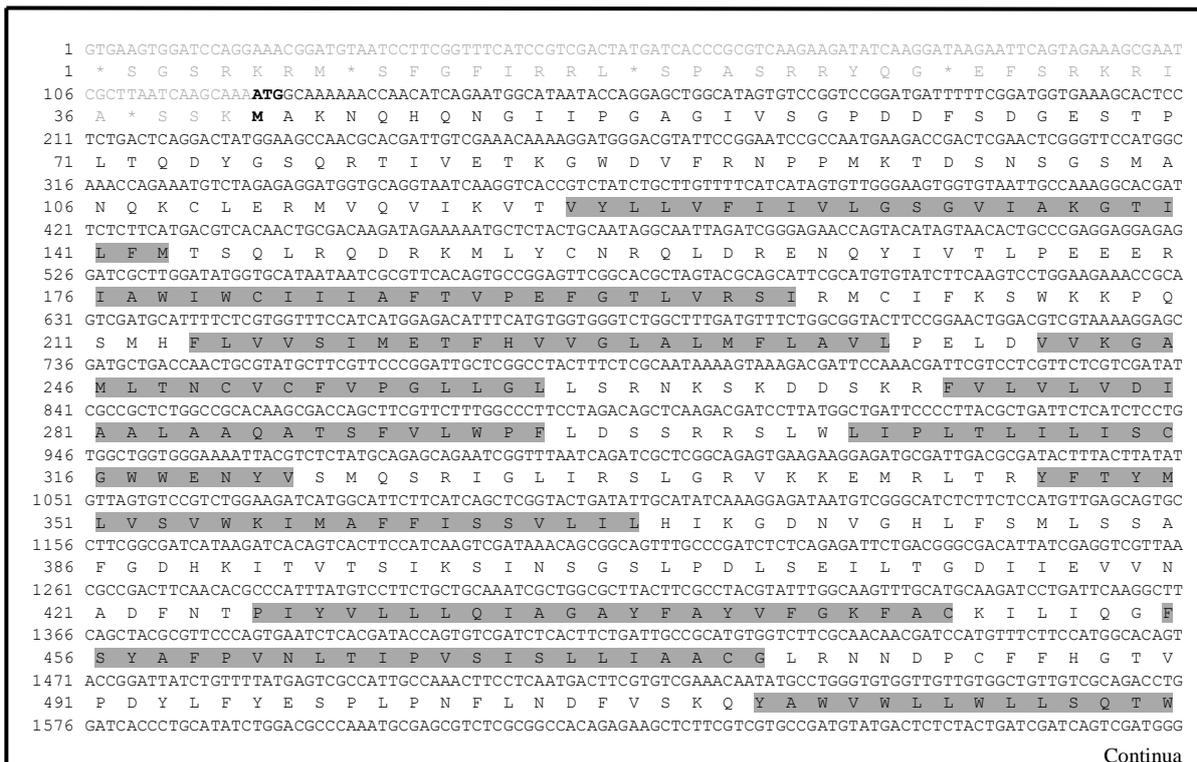


Na FIGURA 4.3 pode ser verificada a sequência completa de resíduos de nucleotídeos e a sequência deduzida de aminoácido da CHS para larva e pupa (AsCHSlarvapupa). A sequência amplificada consiste em 4987 bp com uma fase aberta de leitura (ORF) de 4707 bp, que codifica para síntese de 1569 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 177.475,21 Da, *pI* teórico 6,93 e não há predição para peptídeo sinal.

As seis regiões do domínio catalítico altamente conservadas das GT-2 foram identificadas: 1) GKTKMIAHLKDKSKIRHRKR; 2)

KEVIAENTFLLTLD sendo que essas duas são regiões são responsáveis pela ligação do motivo UDP; 3) DID e 4) GCFSLFR ambos sendo local de ligação do sacarídeo doador; 5) GEDR, local de ligação do sacarídeo acceptor e 6) QRRRW, responsável pela ligação do produto. O domínio consenso SWGTR descrito como envolvido no processo de translocamento do polímero de quitina através da membrana também está presente na sequência de AsCHS_{larvapura}.

FIGURA 4.3: Sequência de resíduos de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas amplificadas utilizando o cDNA de larvas e pupas de *A. sexdens*. O códon iniciador está indicado em negrito e o códon de parada com asterisco (*). A sequência em cinza claro correspondem as regiões 5'- e 3'-UTR, em vermelho as regiões altamente conservadas no domínio catalítico e em azul o domínio (S/T)WGT(K/R). As regiões transmembranas preditas estão sombreadas. A predição da região de superrenovamento está sublinhada com traço simples e a região catalítica com traço duplo. Em verde, a região do *primer* AsCHS_{total} e em roxo a região do *primer* AsCHS_{larvapura}, ambos utilizados na RT-qPCR. Destacado em amarelo a região de desenho do siRNA.



Continua

Continuação

```

526 I T L H I W T P K C E R L A A T E K L F V V P M Y D S L L I D Q S M G
1681 CCTCAACCGAAGAAGATGATCAACCCAGAGTCAAAGTCGAAGATCTGGCAGAAATAGAGAAGGAGAAAGCGACGGCGACTATGAGACAATCTATGAACAGAC
561 L N R R R D D Q P E V K V E D L A E I E K E K G D G D Y E T I Y E Q T
1786 GGACGGTTCAACCACACCTCCATCTGTGGTGAAGAGCAGCGATCATGTAACCTAGGATCTATGCTTGGCGCTACCATGTGGCATGAAAATAAGGAGGAAATGATGGA
596 D G S T T P P S V V K S S D H V T R I Y A C A T M W H E N K E E M M E
1891 GTTTTGAAGAATATTCTGCGTCTGGACGAGGACCAATCGCGCGGCGTGTGCCCCAGAAGTATCTCAAGTGGTTCGATCCCGACTACTATGAATTTGAACTCA
631 F L K S I L R L D E D O C A R R V A O K Y L K V V D P D Y Y E F E T H
1996 CATATTTCTCGACGATCGGTTTCAGTTGTCGACCCAGCAGGAAATGAGTCCGAGGTGAATAGATTTCGTAATTTATGGTCGGCACATTAGACGAGGCGCCGTC
666 I F E D D A F E L S D H D E N E S O V N R F V K L L V G T L D E A A S
2101 GGATGTGCACAAAACGAGAATGCATGTGAGAGCCCTAAGAAGTACCCGACTCCGATGGTGGACGATGGTATGGACTTTCCTGGAAAAACGAAAGATGATTGC
701 D V H K T R M H V R A P K K Y P T P Y G G R L V W T L P G K T K M I A
2206 CCATCTAAAAGATAAGAGCAAGATTCGACATAGGAAACGATGGAGTCAAGTAATGTACATGTATTACTTACTGGGTTCATCGGCTAATGGAATACCGATCAGTGT
736 H L K D K S K I R H R K R W S O V M Y M Y Y L L G H R L M E L P I S V
2311 CGATCGCAAGGAAGTCAATCGCCGAGAATACGTTTCTGTAAACATAGACGGGATATTGACTTTCAACCGCGCGGCGTGAAGCTTCTCGTGGACCTGATAAAAA
771 D R K E V I A E N T F L L T L D G D I D F O P A A V K L L V D L M K K
2416 GAATAAAAACCTTGGTGGCGTTCGCGTTCGATTCATCCGTTGTTGTTCCGTCCTATGGTGGTATCAAATGTTTCGAGTATCGGATCGGTCCTGGCTGGCTCAAAA
806 N K N L G A A C G R I H P V G S G P M V W Y O M F E Y A I G H W L O K
2521 AGCCACCGAACACATGATCGGTCGCTGCTGAGTCCCGGATGCTTTTCGCTATTCCGTTGGTAAGGCATTGATGACGACACCGTGTATGAAAAATACACGAC
841 A T E H M I G C V L C S P G C F S L F R G K A L M D D N V M K K Y T T
2626 CAAGTCTGACGAGCGAGACTACGTGACGATCAAGAGAGGATCGTTGGCTGTGCACGTTGCTATTGCAACGAGGCTACAGGGTGGAGTATTCTGCAGC
876 K S D E A R H Y V O Y D O G E D R W L C T L L L O R G Y R V E Y S A A
2731 GAGTGATGCTTACTACGACCGGAGGATTAACGAGTTTACAAATCAACGAGCTCGTTGGGTACCCCTTACCATTGCAAAATATTGGATCTGCTGATGGA
911 S D A Y T H A P E G F N E F Y N O R R R W V P S T I A N I M D L L M D
2836 TGGCAACCGTACAATCAAAATCAATGATAATATCTCACTGCTTACATTTCCGATCAAAATTCATTTGATGGGTGGTACGATTTTGGGACCGCGGACGATCTCTCT
946 A K R T I K I N D N I S L P Y I S Y Q I L L M G G T I L G P G T I F L
2941 CATGTTGGTGGGTCGCTCGTAGTGCTTTCAAAATCGACAACCTGGACGTTTCTACTACAACATCATTCCCATCTTGCCTTTCATGCTGTTTCACGTCG
981 M L V G A F V A A F K I D N W T S F Y Y N I I P I L L F M I V C F T C
3046 CAAATCGAACATACAGCTTTTATGCGCCAGATCTGTGACGCGGTACCGGATGATGATGGCGGTAATCGTAGGTACTGCCCTACAGCTTGGCGAGGACGG
1016 K S N I Q L L C A Q I L S T A Y A M I M M A V I V G T A L Q L G E D G
3151 TATAGGCTCGCCCTCGCGATCTTCTTAATATCATTATCGAGCTCATTCTTCATAGCAGCTGCCTACATCCACAAGAAATCTGGTGCATCGTCCCGGCATCAT
1051 I G S P S A I F L I S L S S F F I A A C I H P Q E F W C I V P G I I
3256 ATACTGTTGTCATTCAGTCTATGTTTTCCTCCTACTGCTCAATCAATCTTAATGTTGTATCCTGGGGCACACGAGAGGTCACAAACGAAAAAGAC
1086 Y L L S I P S M Y L L L I L Y S I I N L N V V S W G T R E V O T K K T
3361 CAAGAAGAACTCGAAAGAGAACGAGAAGCAGAGGAGGCAAAGCGTAAGGCCAAAACAGAAAGCTTGTGCTTCTTACAGAAGCGCGGGTAAACATGA
1121 K K E L E O E K R E A E A K R K A K O K S L L G F L Q N G A G N N D
3466 CGACGATCAGGGTTCCATTGAGATTTGTTGGCCGCTTGTCAAATGCTTGTACTACACTACGAAAAACCATCCGCGGAGAAACAGCAGCTCGTAGCAATCGC
1156 D D Q G S I E I S L A G L F K C L L C T H G K P S A E K Q Q L V A I A
3571 TGAGTCGCTCGAACCTCGGCAAAAGGCTCGAAACTCGAAGAGCGGTAGATCTCACAGTCAATGTTCCGGACGAAAGGAGGACCTTCCCGTAGGTTCCGG
1191 E S L E Q L G K R L E T I E R A V D P H S H V S G R R A S G V G S R
3676 CACCGCTGATCACTGGGTGCCATTGGCGAAGATCCCGAGGACGAGAGGGTAGCGAAACAGAGACAGTGACCAAGTACAGAAATCCGAAGGTAATCGTGATGGCAG
1226 T A D H L G A I G E D P E D E E G S E T E T V T S Q N T E G N R D G S
3781 CAACTTCTCTCGAGACTGCTAACCAGGAGGCTCTGAAGAAGGGCGAGATGGATGTGCTGTGATGCAGGAGAACAGTCTCTGGAAGGATCTATTGGA
1261 N F L S R P Y W L T D E G L K K G E M D V L S M Q E E Q F W K D L L E
3886 GAAATATCTCTACCGATCGATGAGGACAAGCGGAGAAGCCGATCGCCGCGGATCTAATAGAGTACGCAACAAGAGCGGTGTCGCGTTCTTAATGTTCAA
1296 K Y L Y P I D E D K A E K T R I A A D L I E L R N K S V F A F L M F N
3991 TGCGTTGTTGTTCTGATCGTATTCTTGTACAGCTGAATAAGGATCAGCTGCACGTTGCTTGGCCGCTCGGCGTCAAGACCAATATCCATATGTCGAGGAGAC
1331 A L F V L I V F L L Q L N K D Q L H V V W P L G V K T N I T Y V E E T
4096 CTCGGAGGTACACCTCGAAGGAGTATCTACAACCTCGAGCAATCCGTTCTGCTATTGTTCTTCTTCCGATGATATGGTTATACAGTCTACTCGCATGTT
1366 S E V H I S K E Y L Q L E P I G L V V F F F A L I L V I Q F T A M L
4201 ATTCATCGATTCCGAACATTTGGCCACATTTGCGCCAGCACCAGCTTAGATTGTTACAAGAAGACGAAAGGATCTCTCCGAGGAAGCCTTATTATCGAAACACGC
1401 F H R F G T L A H I L A S T S L D C Y G K K T K D L S E E A L L S K K H A
4306 AGTTGATATAGTGAGATCTCCAAAGGCTGGACGAAATAGAAGTGTATTACGAGGAGGCGAGCGGTAGCGGGCCGGTAGACGAAAAACGATCCGGAATCTGGA
1436 V D I V R D Q R L D G I E G D Y E E G S G S G P R K T I R N L E
4411 GAAGAGTCGTAGAAGACGCGAGGATCAACACGCTCGATGTGGCTTCAGGCAACGTTTCTTCAGCATGAATGAGGCGCAGGCTGTCAAGGAACATGTCGAC
1471 K S R R K T Q A I N T L D V A F R Q R F F S M N E G A G L S R N M S T
4516 GCGACGAGGCGTTCAAGCGTTCAAGGCGGCGCAACAGCAATAATGCAATGCGCCGGAAGTCGAGATGCGAGACCCCTAGGTGCGAAACAAATATATGGCGT
1506 R R E A F K A F E G R R N S I M A M R R K S Q M Q T L G A N N I Y G V
4621 GCGGGTAACCCCTAGGAATTCAGGCGGCGATCCCGCATGCTAGTCAAGTATCCGTTGAAGGATGTTTGGAGACATCCGCGCAGCTGGGAACGCGCATGT
1541 A G N P L G I Q G R P S R S Q I S V K D V F E G H P A F E S G T H V
4726 GAACCGCGGCTACGAAGGTGACGACAGCCCGTCAACAGTCTACGTCTACAGAATCTTGGCGCAACAGGTCACGTGGCGAGAGGCGAACTCCAACGTGTGACC
1576 N A G Y E G D D S P V N S L R L Q N L G G N Q V T W R E A N S N V * P
4831 ACGTTTCACTGCTGTTGCGATAAATTAACGAAAAATTTATTTCCGATCGAATTTATTTATCGAAAAATTCATTGCGCGAGTTCAATACATATTTCTCCGA
1611 R S S A R C D K L T K N L F I R * I Y L S K N S L P S S I H I S S E
4936 GTAGAATTTCTAAATCTATTGACGCAAGGTTTCATCGCGCTTCTCCCGAG
1646 * N F * I L L H E G F I A L L P R

```

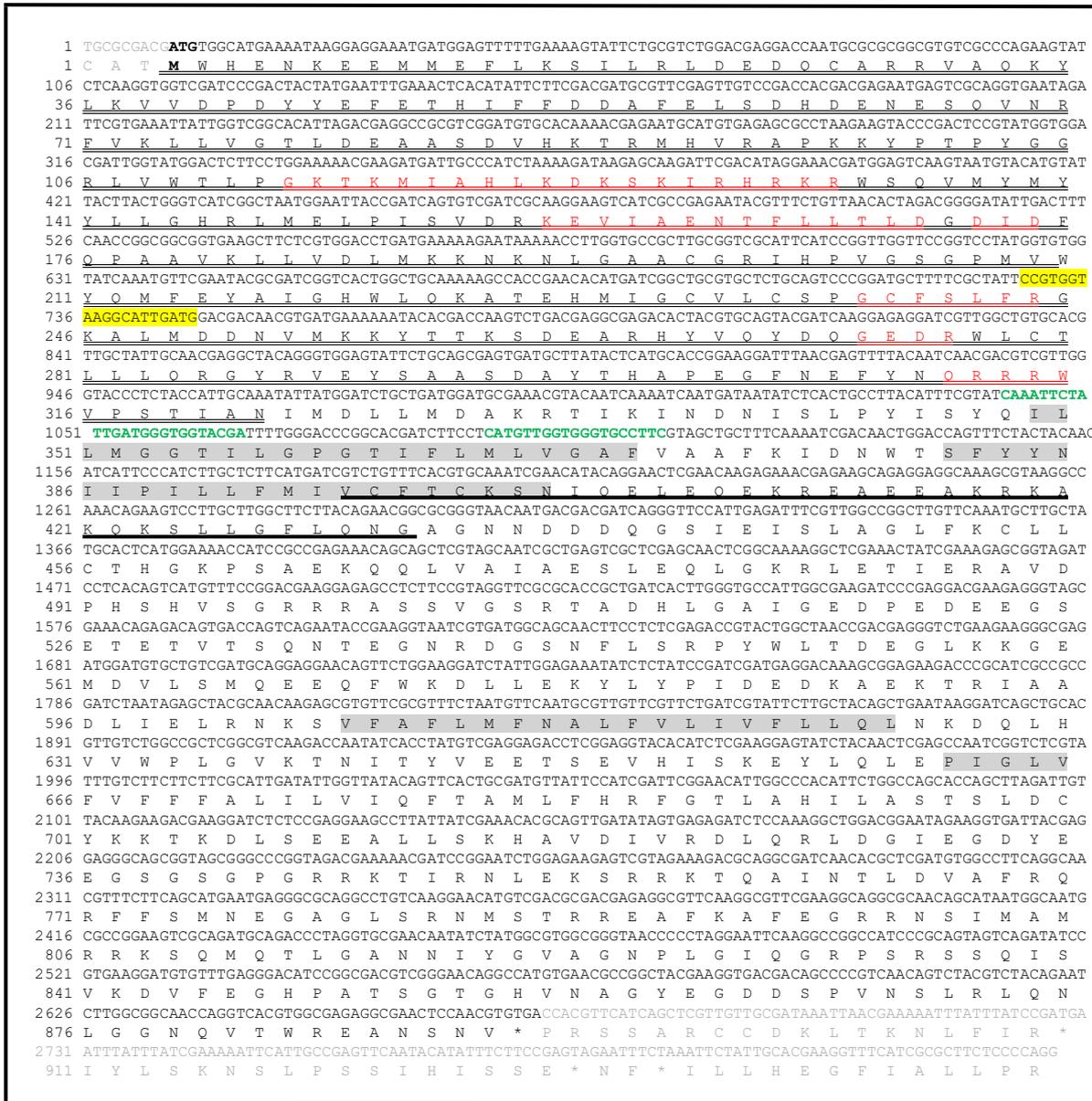
Na FIGURA 4.4 pode ser verificada a sequência completa de resíduos de nucleotídeos com a sequência deduzida de aminoácidos obtida a partir da sobreposição dos fragmentos de DNA amplificados utilizando como molde o cDNA de operária média (AsCHSoperária). A sequência amplificada apresenta 2832 bp com uma ORF de 2664 bp, que codifica para síntese de 887 resíduos de

aminoácidos, massa molecular estimada de 100.977,41 Da, *pI* teórico 6,69 e ausência de peptídeo sinal.

Nesta ORF também foram verificadas as mesmas seis regiões altamente conservadas das GT-2 envolvidas na catálise enzimática e presentes no domínio catalítico (1) GGTKMIAHLKDKSKIRHRKR; 2) KEVIAENTFLLTLD; 3) DID; 4) GCFSLFR; 5) GEDR e 6) QRRRW).

A ORF de *AsCHSoperária* difere em duas regiões da ORF *AsCHS*larvapupa na região N-terminal e na região C-terminal, logo após a região catalítica. A *AsCHSoperária* apresenta N-terminal diferente das sequências obtidas para larva e pupa, sendo que 579 resíduos de aminoácidos não são encontrados no N-terminal da sequência de operária média com relação à sequência de larva e pupa. Não foi possível amplificar regiões conservadas dessa porção, como GWWEN, ETKGW, WDVFR ou WDVFDPP, por exemplo, mesmo utilizando *primers* degenerados e após diversas tentativas de amplificação (alterando as concentrações de reagentes e os ciclos de temperatura da PCR). Essas regiões conservadas normalmente estão presentes em sequências de CHS de outros insetos e não foi verificado até o momento sequências de CHS que iniciem na região catalítica como em *AsCHSoperária*.

FIGURA 4.4: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas amplificada utilizando o cDNA de operária média de *A. sexdens*. O códon iniciador está indicado em negrito e o códon de parada com asterisco (*). A sequência em cinza claro correspondem as regiões 5'- e 3'-UTR e em vermelho as regiões conservadas do domínio catalítico. As regiões transmembranas preditas estão sombreadas. A predição da região de superenovelamento está sublinhada com traço simples e a região catalítica com traço duplo. Em verde, a região do *primer* AsCHStotal utilizado na RT-qPCR. Destacado em amarelo a região de desenho do siRNA.



Por meio do alinhamento de resíduos de aminoácidos das duas sequências identificadas, AsCHSlarvapupa e AsCHSoperária, podem ser verificadas facilmente as diferenças entre essas duas sequências (FIGURA 4.5).

FIGURA 4.5: Alinhamento da ORF dos resíduos de aminoácidos da AsCHSlarvapupa e da AsCHSoperária. As regiões conservadas em CHSs de insetos e utilizadas como *primer* na PCR estão sombreadas. A predição da região de superenovelamento está sublinhada com traço simples. Em vermelho as regiões conservadas do domínio catalítico. Em verde, a região do *primer* AsCHStotal e em roxo a região do *primer* AsCHSlarvapupa, ambos utilizados na RT-qPCR. Destacado em amarelo a região de desenho do siRNA.

AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	MAKNQHONGIIPGAGIVSGPDDFSDGESTPLTQDYGSQRTIVETKGDVFRNPPMKTDSN	60
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	SGSMANQKCLERMVQVIKVTVYLLVFIIVLGSQVIAKGTILFMTSQLRQDRKMLYCNRQL	120
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	DRENQYIVTLPBEERIAWIWCIIIAFTVPEFGTLVRSIRMCI FKSWKKPQSMHFLVVSIM	180
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	ETFHVVLGALMFLAVLPELDDVVKGAMLTNCVCFVPGLLGLLSRNKSKDDSKRFVLVLDI	240
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	AALAAQATSFVLWPFLLDSRRSLWLIPLTLILISCWWENYVSMQSRIGLIRSLGRVKKE	300
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	MRLTRYFTYMLVSVVKIMAFFTSSVLLIHKGDVNGHLFSMLSSAFGDHKITVTSIKSIN	360
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	SGSLPDLSEILTGDII EVVNADFNTPIYVLLLQIAGAYFAYVFGKFAKILIQGFSYAFP	420
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	VNLTIPVSI SLLIAACGLRNDPCFFHGTVPDYLFYESPLPNFLNDFVSKQYAWVWLLWL	480
AsCHSoperaria	-----	0
AsCHSlarvapupa	LSQTWITLHIWTPKCELAATEKLFVVPYDLSLLIDQSMGLNRRRDDQPEVKVEDLAEIE	540
AsCHSoperaria	-----	21
AsCHSlarvapupa	KEKGDGDYETIYEQTDGSTPPSVVKSSDHVTRIYACATMWHENKEEMMEFLKSILRLDE *****	600
AsCHSoperaria	DQCARRVAQKYLKVVDPDYEFETHIFFDDAFELSDHDENESQVNRVFKLLVGTLDAAAS	81
AsCHSlarvapupa	DQCARRVAQKYLKVVDPDYEFETHIFFDDAFELSDHDENESQVNRVFKLLVGTLDAAAS *****	660
AsCHSoperaria	DVHKTRMHVRAPKYPPTYGGRLVWTLPGTKMIAHLKDKSKIRHRKRSQVMYMYLLG	141
AsCHSlarvapupa	DVHKTRMHVRAPKYPPTYGGRLVWTLPGTKMIAHLKDKSKIRHRKRSQVMYMYLLG *****	720

Continua

		Continuação
AsCHSoperaria	HRLMELPISVDRKEVIAENTFLLTLGDIDFQPAAVKLLVDLMKKNKNLGAACGRHPVG	201
AsCHSlarvapupa	HRLMELPISVDRKEVIAENTFLLTLGDIDFQPAAVKLLVDLMKKNKNLGAACGRHPVG *****	780
AsCHSoperaria	SGPMVWYQMF EY AIGHW LQKATEH M IGC V L C S P G C F S L F R G K A L M D D N V M K K Y T T K S D E A	261
AsCHSlarvapupa	SGPMVWYQMF EY AIGHW LQKATEH M IGC V L C S P G C F S L F R G K A L M D D N V M K K Y T T K S D E A *****	840
AsCHSoperaria	RHYVQYDQGEDRWLCTLLLRQGYRVEYSAASDAYTHAPEGFNEFYNQRRRWVPSTIANIM	321
AsCHSlarvapupa	RHYVQYDQGEDRWLCTLLLRQGYRVEYSAASDAYTHAPEGFNEFYNQRRRWVPSTIANIM *****	900
AsCHSoperaria	DLMDAKRTIKINDNISLPYISYQILLMGGTILGPGTIFLMLVGAFVAAFKIDNWT SFYY	381
AsCHSlarvapupa	DLMDAKRTIKINDNISLPYISYQILLMGGTILGPGTIFLMLVGAFVAAFKIDNWT SFYY *****	960
AsCHSoperaria	NIIPILLFMIVCFTCKSNIQ-----	401
AsCHSlarvapupa	NIIPILLFMIVCFTCKSNIQLLCAQILSTAYAMIMMAVIVGTALQLGEDGIGSPSAIFLI *****	1020
AsCHSoperaria	-----	401
AsCHSlarvapupa	SLSSSFIAACLHPQEFWCIVPGIYLLSIPSMYLLILYSIINLNWVSWGTRVOTKKT	1080
AsCHSoperaria	--FLEQEKREAEFAKRKAOKSLLGFLONGAGNNDDDQGSIEISLAGLFPKCLLCTHGKPS	459
AsCHSlarvapupa	KKLEQEKREAEFAKRKAOKSLLGFLONGAGNNDDDQGSIEISLAGLFPKCLLCTHGKPS *****	1140
AsCHSoperaria	AEKQQLVAIAESLEQLGKRLETIERAVDPHSHVSGRRRASSVGSRTADHLGAIGEDPEDE	519
AsCHSlarvapupa	AEKQQLVAIAESLEQLGKRLETIERAVDPHSHVSGRRRASSVGSRTADHLGAIGEDPEDE *****	1200
AsCHSoperaria	EGSETETVTSQNTGEGNRDGSNFLSRPYWLTDEGLKKGEMDVL SMQEEQFWKDLLEKYL YP	579
AsCHSlarvapupa	EGSETETVTSQNTGEGNRDGSNFLSRPYWLTDEGLKKGEMDVL SMQEEQFWKDLLEKYL YP *****	1260
AsCHSoperaria	IDEDKAEKTRIAADLIELRNKSVFAFLMFNALFVLI VFLQLNKDQLHVWVPLGVKTNIT	639
AsCHSlarvapupa	IDEDKAEKTRIAADLIELRNKSVFAFLMFNALFVLI VFLQLNKDQLHVWVPLGVKTNIT *****	1320
AsCHSoperaria	YVEETSEVHISKEYLQLEPIGLVVFVFFALILVIQFTAMLFHRFGTLAHLASTSLDCYK	699
AsCHSlarvapupa	YVEETSEVHISKEYLQLEPIGLVVFVFFALILVIQFTAMLFHRFGTLAHLASTSLDCYK *****	1380
AsCHSoperaria	KTKDLSEEALLSKHAVDIVRDLQRLDGEI G D Y E E G S G S G P G R R K T I R N L E K S R R K T Q A I N	759
AsCHSlarvapupa	KTKDLSEEALLSKHAVDIVRDLQRLDGEI G D Y E E G S G S G P G R R K T I R N L E K S R R K T Q A I N *****	1440
AsCHSoperaria	TLDVAFRQRF F S M N E G A G L S R N M S T R E A F K A F E G R R N S I M A M R R K S Q M Q T L G A N N I Y G V	819
AsCHSlarvapupa	TLDVAFRQRF F S M N E G A G L S R N M S T R E A F K A F E G R R N S I M A M R R K S Q M Q T L G A N N I Y G V *****	1500
AsCHSoperaria	AGNPLGIQGRPSRSSQISVKDVFEGHPATSGTGHVNAGYEGDDSPVNSLRLQNLGGNQVT	879
AsCHSlarvapupa	AGNPLGIQGRPSRSSQISVKDVFEGHPATSGTGHVNAGYEGDDSPVNSLRLQNLGGNQVT *****	1560
AsCHSoperaria	WREANSNV 887	
AsCHSlarvapupa	WREANSNV 1568 *****	

A PCR realizada utilizando o *primer* F5UTR, desenhado com base na sequência não traduzida de outras formigas, disponíveis em banco de dados, também não foi eficiente na amplificação utilizando o cDNA de operária média, diferente de quando utilizado o cDNA de larva e de pupa. A região 5'UTR está situada na extremidade 5' de todos os genes codificadores de proteínas, é

transcrito em mRNA, mas não é traduzido em proteína. Essa região tem papel principal no controle do início da tradução por conter vários elementos regulatórios. Sabe-se que em eucariotos o uso de um promotor alternativo em um determinado gene pode levar a regiões 5'UTR distintas e o seu papel principal está relacionado com o controle espacial e temporal da expressão gênica (BARRETT et al., 2012).

A diferença nas regiões 5'UTR para as sequências de CHS de operária média em relação à sequência de larva e de pupa pode mostrar que essas enzimas estão sendo reguladas por diferentes promotores, o que justificaria a expressão diferencial da AsCHS ao longo do desenvolvimento da formiga. Em insetos da ordem Lepidoptera (*Ostrinia furnacalis* e *Bombyx mori*) foi identificado um novo tipo de *splicing* alternativo. Nesses insetos foram verificados dois promotores, um localizado a montante do 5'UTR e outro localizado entre o éxon 2a e o éxon 2b, além disso, nas isoformas CHSA-2b desses insetos não há transcrição do éxon 1 e transcrição do éxon 2b é parcial para iniciar na metionina iniciadora (QU e YANG, 2011; XU et al., 2017). Para confirmar a presença desse outro promotor nos transcritos de operária de *A. sexdens* poderia ser utilizado o sistema 5' RACE (*Rapid amplification of cDNA Ends*).

A outra alteração na sequência de CHS em operária média em relação à larva e pupa ocorre na região C-terminal, após a região catalítica. Para CHSs da classe A é predito e pode ser usado como base para a classificação preliminar das enzimas identificadas em *A. sexdens*. A ausência de transcrição dos 306 nucleotídeos (102 aminoácidos) é decorrente ao *splicing* alternativo nessa porção. Na sequência de CHS de operária média, a ausência do motivo (S/T)WGT(K/R)) descrito como envolvido no processo de translocamento do polímero de quitina através da membrana não coloca em dúvidas quanto a funcionalidade da enzima, pois esse domínio não deve estar diretamente envolvido na catálise.

A presença do *splicing* alternativo no C-terminal foi verificado inicialmente no produto da PCR utilizando o cDNA de operária média e a combinação de *primers* SF1(PILLFM) - R3(AMLFHRF) e SF1(PILLFM) - R4(MQTLGA), fragmentos S3 e S4 respectivamente (FIGURA 4.2). Dois *primers forward* específicos foram desenhados para a confirmação e utilizados na amplificação por PCR. O *primer* SF2(QLLCAQI) - região ausente em operária - foi utilizado com o *primer* R3 e levou à amplificação de um fragmento em torno de 150 bp, que o sequenciamento mostrou ser um fragmento inespecífico e sem identificação para qualquer sequência de nucleotídeos de formiga. E o *primer* SF2'(CKSNIQ), também utilizado com o *primer* R3 que levou à amplificação de um único fragmento correspondendo ao fragmento com a ausência do motivo SWGTR e contendo 865 bp confirmado por sequenciamento, diferentemente da amplificação utilizando cDNA de larva e pupa como molde que amplificou um fragmento de 1171 bp.

A não expressão do motivo (S/T)WGT(K/R) também já foi descrita em sequências de CHSs de outros insetos já estudados como *Bombyx mori* (ZHUO, FANG, et al., 2014) e sequências preditas de insetos da ordem Hymenoptera como *Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Cephus cinctus*, *Trachymyrmex zeteki*, *Vollenhovia emeryi*.

Deste modo, pode ser considerado que as duas sequências de CHSs identificadas em *A. sexdens* são transcritos resultantes de *splicing* alternativo do mesmo gene.

4.2.2 Análise e classificação das sequências de AsCHS

As sintases de quitina (CHS) são enzimas processivas constituídas de três domínios distintos. O domínio N-terminal (domínio A) é a porção com menor conservação de similaridade entre diferentes espécies, variável no comprimento e

frequentemente apresenta diversos segmentos transmembrana (TMHs). A porção central constitui o domínio catalítico (domínio B) que é altamente conservado mesmo em CHS de reinos diferentes e apresenta as sequências consenso para as CHSs. O domínio C-terminal (domínio C) é constituído de regiões TMHs e acredita-se que o padrão conservado de três a cinco segmentos TMHs é responsável pelo translocamento do polímero de quitina recém-sintetizado para o meio extracelular (MERZENDORFER, 2006). Além disso, essas enzimas podem ser classificadas em duas classes, CHS-A ou CHS-B dependendo dos elementos conservados na sua sequência e essa classificação está diretamente relacionada com a função delas.

A análise dos domínios mostra que a *AsCHS*larvapupa apresenta os três domínios preditos para CHS de insetos, como pode ser verificado na FIGURA 4.6-A. O domínio A, localizado na região N-terminal apresenta 10 hélices TMHs, o domínio B, domínio catalítico na região central altamente conservado e voltado para o meio intracelular, contendo os seis motivos conservados para a atividade catalítica e o domínio C, na porção C-terminal com 7 hélices TMHs e uma região de superenovelamento (*coiled-coil*). Essa região é caracterizada como um domínio de oligomerização em proteínas e uma região que não é verificada em CHS-B. A localização do *coiled-coil* é condizente com o predito na literatura e se encontra após 5 hélices TMHs logo após a região catalítica, voltado para o meio extracelular. O motivo (S/T)WGT(K/R) também está presente e se encontra em lado oposto ao domínio catalítico. Esse motivo pode estar associado com o papel de translocamento do polímero de quitina ao invés da catálise (MERZENDORFER, 2006). Assim, essa análise sugere que a CHS de larva e pupa pode ser pertencente à classe CHS-A.

A *AsCHS*operária apresenta apenas dois dos três domínios preditos para CHS de insetos: o domínio B, catalítico que é altamente conservado e voltado para o meio intracelular e o domínio C, localizado na porção C-terminal com 4

hélices transmembranas, uma região de superenovelamento (*coiled-coil*) voltada para o meio intracelular e ausência do motivo (S/T)WGT(K/R) (FIGURA 4.6-B).

O domínio A, predito para CHSs de insetos está ausente na AsCHSoperária, tem sido descrito como o domínio com um número variado de regiões transmembrana e apresentando a menor similaridade de sequência entre as espécies. No entanto, ainda não foi descrita sequência de insetos com a ausência completa deste domínio, porém para algumas classes de CHSs de fungos já foi observado o domínio A sem regiões transmembranas e com menor tamanho quando comparada com a sequência de insetos, como discutido por MERZENDORFER, 2011. Além disso, a deleção do domínio A para fungo da classe I e II, (389 e 221 resíduos de aminoácidos respectivamente), não levou a perda de atividade ou função da enzima, enquanto que a remoção de 75 resíduos da porção C-terminal da enzima da classe II levou a perda da atividade (CABIB et al., 1996). Esses resultados mostram que essa sequência identificada em operárias deve corresponde a uma enzima funcional, mesmo com a ausência do domínio A.

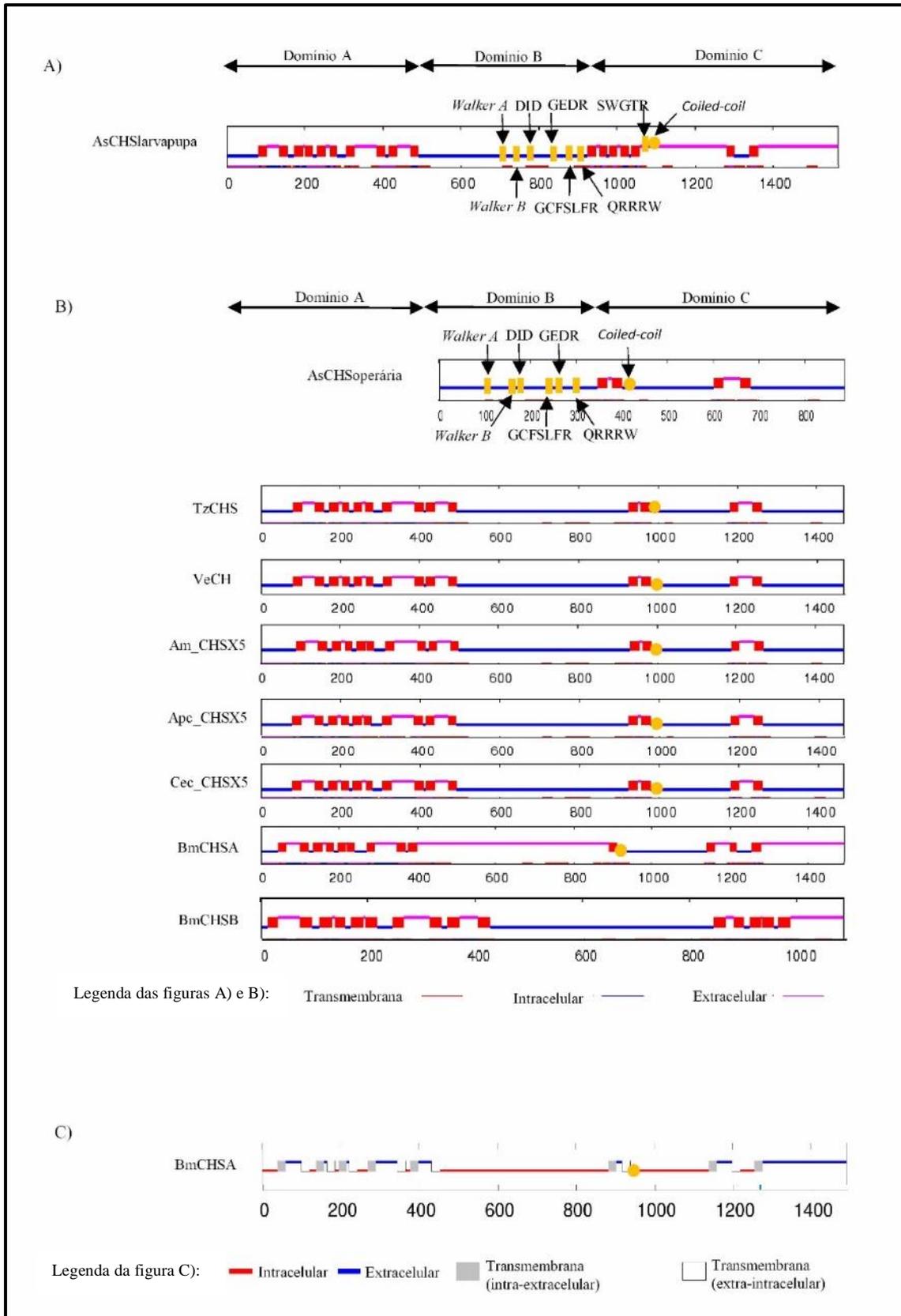
Há sequências de CHSs de insetos que apresentam a predição do domínio B, região catalítica, voltada para o meio extracelular e o motivo (S/T)WGT(K/R) se encontra em posição contrária a região catalítica, contudo ainda não se sabe a significância desse arranjo (MOHAMMED et al., 2017). Esse novo arranjo identificado vai contra a predição de que o domínio catalítico esteja voltado para o meio intracelular da membrana plasmática, onde se encontra o substrato e as enzimas envolvidas na biossíntese de quitina (ZHU, Y. C. et al., 2002). No entanto, isso também pode ser reflexo das deficiências em relação à previsão teórica de hélices transmembranas como discutido para a posição da extremidade N-terminal das CHSs (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003). Essa última afirmação parece ser mais condizente, por exemplo, para a sequência de CHS-A de *Bombyx mori* (FIGURA 4.6-B E 4.6-C), que quando se utiliza

diferentes programas para predição da estrutura topológica, o domínio B catalítico ora se encontra para o meio extracelular, ora para o intracelular.

FIGURA 4.6: Predição da topologia das CHSs de insetos. (A) Topologia da AsCHS_{larvapupa} utilizando TMHMM-2.0. B) Topologia da AsCHS_{operária} e de outras CHSs de insetos utilizando TMHMM-2.0. Os três domínios estão identificados como A, B e C na parte superior. As barras verticais (vermelho) representam as regiões transmembranas, as linhas horizontais representam os domínios intracelular (em azul – inferior) e extracelular (rosa – superior). As regiões conservadas estão representadas por caixas (amarelo), a região de superenovelamento (*coiled-coil*) por um círculo amarelo. Predição de CHS de insetos já estudados como *Bombyx mori* (BmCHSA (AFB83705.1) e BmCHSB (AFC69002.1) e outras sequências preditas *Trachymyrmex zeteki* (TzCHS (KYQ52765.1)), *Vollenhovia emeryi* (VeCHS (011866715.1)), *Apis mellifera* isoforma X5 (Am_CHSX5 (XP_016770740.1), *Apis cerana* isoforma X5 (Apc_CHSX5 (XP_016906999.1)), *Cephus cinctus* isoforma X5 Cec_CHSX5 (XP_015608867.1). C) Topologia da BmCHSA (AFB83705.1) utilizando o TOPCONS. As barras verticais (cinza e branco) representam as regiões transmembranas, as linhas horizontais representam os domínios intracelular (vermelho – inferior) e extracelular (azul – superior).

Continua

Continuação



A busca no banco de dados por similaridade com outras sequências (BLAST) mostrou que a AsCHSlarvapupa e a AsCHSoperária apresentam elevada identidade com sequências de CHSs de formigas e outros insetos. O alinhamento mostrou que as AsCHSlarvapupa e AsCHSoperária apresentam maior identidade com enzimas classificadas como CHS-A (*Apis mellifera* (85,7 e 84,7 % Am_CHS1 - XP_395677.4); *Bombyx mori* (68,2 e 73,8 % Bm_CHSA - AFB83705.1); *Manduca sexta* (69,4 e 73,4 % Ms_CHS1 - AAL38051.2);) e *Tribolium castaneum* (71,6 e 76,0 % Tc_CHS1 - AAQ55059.1), dados de porcentagem de identidade para AsCHSlarvapupa e AsCHSoperária, respectivamente) do que com enzimas da classe B (44,1 e 50,9 % Am_CHS2 - XP_001121152.2; 57,0 e 71,10 % Bm_CHSB - AFC69002.1; 51,9 e 57,0 % Ms_CHS2 - AAX20092.1 e 50,0 e 54,2 % Tc_CHS2 - AAQ55061.1). A AsCHSlarvapupa e AsCHSoperária também apresentaram elevada identidade com sequências preditas de CHSs de formiga como *A. cephalotes* (98,2 e 97,6 % Ace_CHS1 - XP_012058612.1; 48,4 e 61,4% Ace_CHS2 - XP_012058785.1), *Trachymyrmex zeteki* (98,2 e 99,1 % Tz_CHS8 - KYQ52765.1) e *Vollenhovia emeryi* (95,0 e 96,0 % Ve_CHSX3 - XP_011866715.1).

Os relatos de *splicing* alternativo na CHS-A de diferentes espécies de insetos mostram que a sua posição do *splicing* pode variar, entretanto, todos estão presentes no domínio C das sequências das CHSs da classe A. A não expressão de 102 resíduos de aminoácidos na região C-terminal de AsCHSoperária em relação a AsCHSlarvapupa inclui o motivo SWGTR, o que leva a uma alteração na predição das regiões transmembrana, sendo que o domínio C passa a apresentar quatro regiões transmembrana ao invés de sete, como usualmente descrito para essas enzimas. O *coiled-coil* permanece voltado para o meio intracelular após 2 hélices transmembranas, posterior a região catalítica (FIGURA 4.6-B).

A busca por sequências similares (BLAST) com a sequência AsCHSoperária levou à identificação de outras seis sequências com o mesmo padrão de *splicing* alternativo na região C-terminal. Estas sequências possuem de três a quatro regiões transmembranas no domínio C e o *coiled-coil* voltado para o meio intracelular. Dessas sequências, cinco sequências são de insetos da ordem Hymenoptera, duas pertencentes a família Formicidae, *T. zeteki* (KYQ52765.1) e *V. emeryi* (XP_011866715.1) com 99 % e 96 % de identidade, respectivamente. Duas da família Apidae, *A. mellifera* (XP_016770740.1) e *Apis cerana* (XP_016906999.1) ambas com 89 % de identidade e uma da família Cephidae, *Cephus cinctus* (XP_015608867.1) com 89 % de identidade. A outra pertence a ordem Lepidoptera, família Bombycidae, *Bombyx mori* (AFB83705.1) e apresenta 73 % de identidade com a AsCHSoperária. As predições da estrutura topológica dessas enzimas estão na FIGURA 4.6-B.

Dentre estas sequências de CHSs, apenas a de *B. mori* apresenta estudos quanto a organização do gene, presença de *splicing* variante e análise da expressão gênica (XU et al., 2017; ZHUO, CHU, et al., 2014; ZHUO, FANG, et al., 2014). Deste modo, a alteração na predição das hélices transmembrana da região C-terminal não altera a função da enzima.

Para verificar a estrutura do gene e a hipótese de a AsCHS apresentar dois promotores foi comparada as sequências de AsCHS com o genoma de *T. zeteki* que também pertence à tribo Attini. Na FIGURA 4.7-A mostra a representação gráfica da estrutura do gene CHS disponível no NCBI sob o número de acesso KQ982655.1. O gDNA que codifica para a síntese da Tz_CHS8 apresenta 20808 bp, o mRNA e a sequência codificadora possuem 4407 bp e é constituída por 18 éxons e 17 íntrons.

No alinhamento entre o genoma da *T. zeteki*, a sequência codificadora da Tz_CHS8 (KYQ52765.1) e as duas sequências de AsCHS

(APÊNDICE) foi verificado que a AsCHSlarvapupa e a AsCHSoperária apresentam padrão semelhante de íntrons e éxons como representado na FIGURA 4.7-B e 4.7-C, respectivamente.

A análise baseado no gDNA de *T. zeteki* mostrou que a AsCHSlarvapupa deve apresentar a região 5' UTR interrompida por um íntron de 9,2 kb, estrutura semelhante foi verificada em OfCHSA-2a (QU e YANG, 2011). AsCHSlarvapupa também apresenta um éxon a mais em relação à sequência codificadora de Tz_CHS8, o éxon 12b com 306 bp (FIGURA 4.7- B). Contudo, essa sequência está presente na sequência do genoma da *T. zeteki*, o que confirma a hipótese de um *splicing* alternativo na porção C-terminal (APÊNDICE). Em *A. sexdens* esse *splicing* alternativo se encontra em uma região transmembrana como predito para CHS de insetos e a presença dele é uma característica das CHS-A, uma vez que não tem sido identificado em CHS-B (ARAKANE et al., 2004).

Em AsCHSoperária o éxon 12b está ausente, assim como em Tz_CHS8. Por PCR também foi verificada a ausência do éxon 2 (*primer* F3, tabela 1) e do éxon 4 (*primer* F4, tabela 1), assim como da região 5' UTR. Esse resultado sugere que, embora as duas sequências de AsCHS sejam codificadas pelo mesmo gene, elas devem ser expressas sob regulação de diferentes promotores como foi recentemente encontrado para *O. furnacalis* (QU e YANG, 2011) e *B. mori* (XU et al., 2017).

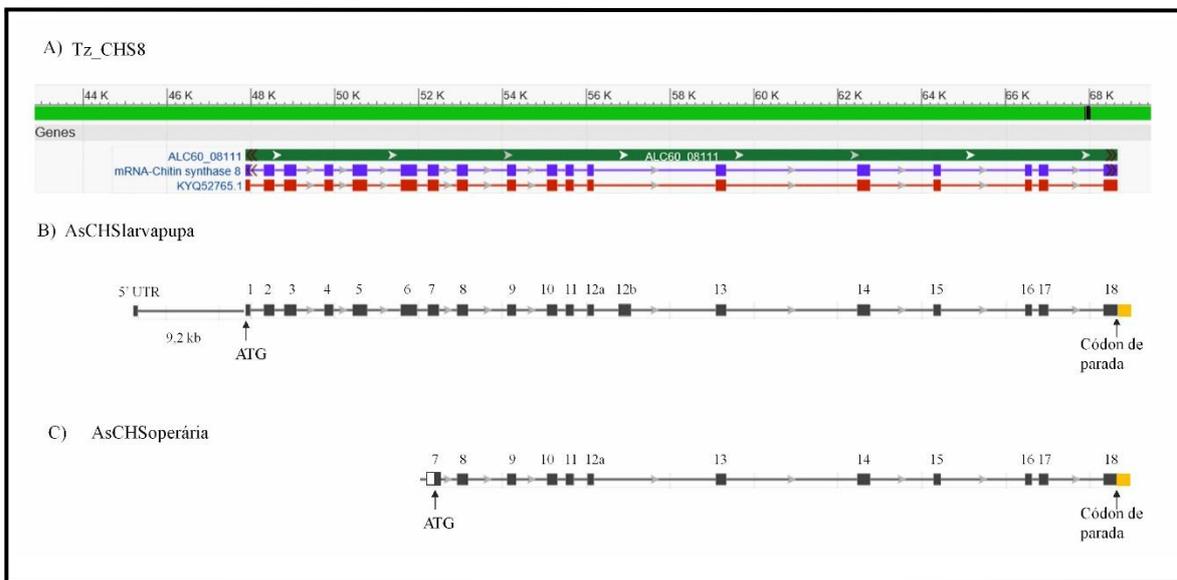
Tanto para *O. furnacalis*, como para *B. mori* foi descrita uma estratégia ainda não descoberta de *splicing* variante para produzir isoformas. A construção das sequências codificadores consiste em dois éxons diferentes no éxon 2 (éxon 2a e 2b) e dois promotores preditos (um localizado a montante do 5' UTR e outro entre o éxon 2a e 2b), sendo que os transcritos do variante CHSA-2a na porção N-terminal é constituído pelos éxons 1, 2a e 3 e do variante CHSA-

2b, pelos éxons 2b e 3, com ausência do éxon 1 (QU e YANG, 2011; XU et al., 2017)

A predição de promotores, tendo como base o genoma de *T. zeteki*, mostrou um promotor a montante do 5' UTR que pode estar sendo utilizado para a expressão da AsCHS nos estágios de larva e pupa (AsCHS_{larvapupa}). Uma outra região promotora foi predita na região do éxon 5 (APÊNDICE) e pode estar sendo como promotor para os transcritos no estágio de operária, uma vez que foi confirmada a ausência até o éxon 4 em AsCHS_{operária}. Deste modo, diferentes promotores podem estar sendo utilizados para a expressão da AsCHSs. Para confirmar a região de início da tradução da AsCHS_{operária}, se o éxon 6 está ou não presente no mRNA ou se inicia no éxon 7, como obtido até o momento, poderia ser utilizada a técnica de 5' RACE.

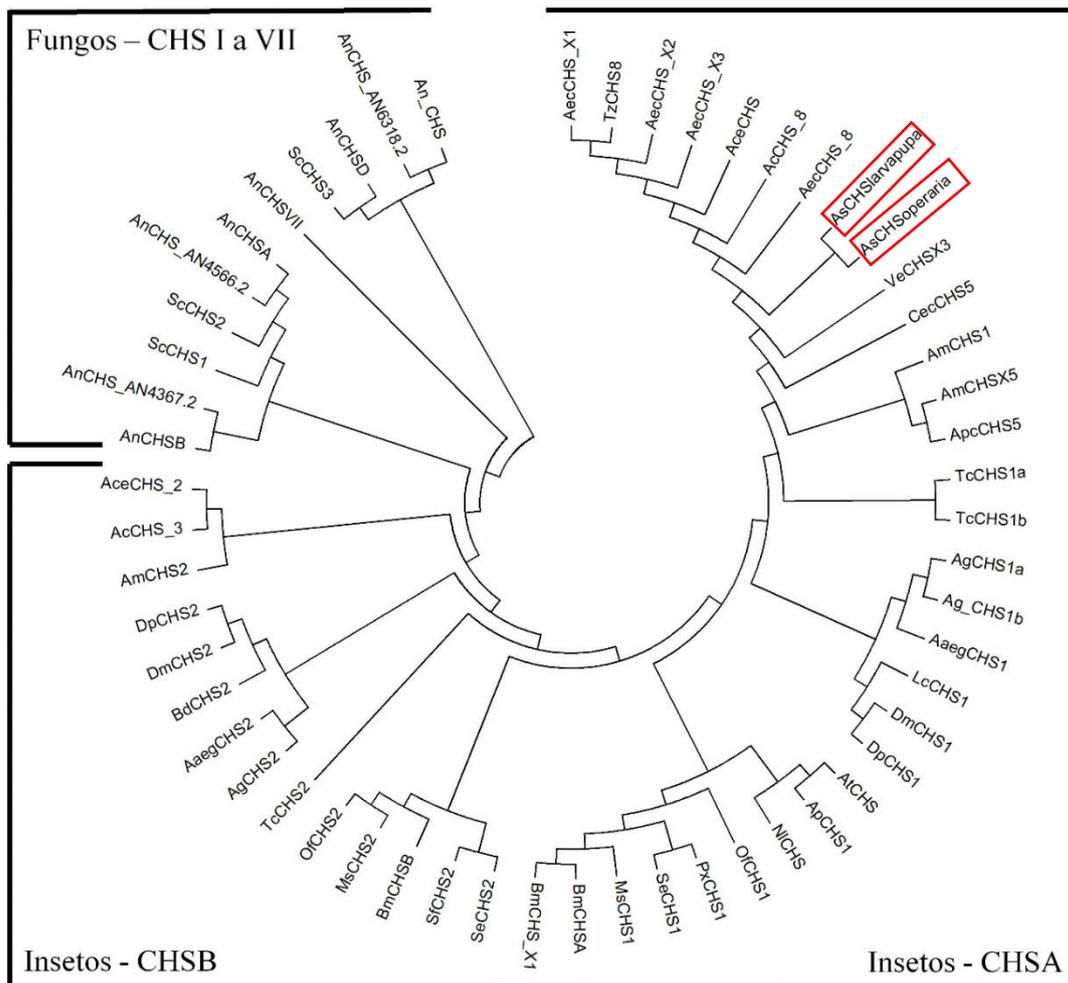
O que pode ser afirmado com esses resultados é que a CHS de operária apresenta um perfil diferente de enzima descrita para insetos, com ausência do domínio A e que os dois transcritos de CHS identificados em *A. sexdens* (encontrados em larva/pupa e operária) correspondem a duas isoformas.

FIGURA 4.7: Comparação da estrutura genômica da AsCHS utilizando como base o genoma de *T. zeteki*. A) Representação da estrutura do gene de Tz_CHS8. Em verde escuro o gDNA; em roxo a sequência codificadora e em vermelho o mRNA, disponíveis online no NCBI sob o número de acesso KQ982655.1. B) Estrutura predita do mRNA de AsCHSlarvapupa. C) Estrutura predita do mRNA de AsCHSoperária. As caixas sólidas indicam os éxons da ORF e o 5'UTR, as caixas amarelas a região 3'UTR, a linha contínua indica os íntrons, o códon de início e de parada obtidos estão identificados.



A fim de confirmar a classificação das AsCHSs estudadas neste trabalho, mostrar a relação evolutiva dessa enzima e verificar se as sequências obtidas são realmente da formiga ou de algum endossimbionte, foi construída uma árvore filogenética de CHSs contendo sequências de CHSs de insetos e de fungos já descritas na literatura e classificadas como CHS-A e CHS-B. A análise filogenética (FIGURA 4.8) mostra que as AsCHSs foram agrupadas na família das CHS-A de insetos, confirmando a classificação baseada na presença de *coiled-coil* e *splicing* alternativo. Assim, essas enzimas devem estar relacionadas com a síntese de quitina no exoesqueleto.

FIGURA 4.8: Árvore filogenética de CHSs de insetos e fungos. A árvore foi construída no MEGA 7.0 utilizando o método Neighbor-Joining. Dos insetos, *Acyrtosiphon pisum* (Ap) ApCHS1 (XP_003247517.1). *Aedes aegypti* (Aaeg) AaegCHS1(XP_001662200.1); AaegCHS2 (AAF34699.2). *Acromyrmex echinator* (Aec) AecCHS_8 (EGI66236.1); AecCHS_X1 (XP_011053053.1); AecCHS_X2 (XP_011053054.1); AecCHS_X3 (XP_011053055.1). *Anasa tristis* (At) AtCHS (AFM38193.1). *Anopheles gambiae* (Ag) AgCHS1a (XP_321336.5); Ag_CHS1b (XP_321336.5); AgCHS2 (AAL23627.1). *Apis cerana* (Apc) ApcCHS5 (XP_016906999.1). *Apis mellifera* (Am) AmCHS1 (XP_395677.4); AmCHS2 (XP_001121152.2); AmCHSX5 (XP_016770740.1). *Atta cephalotes* (Ace) AceCHS (XP_012058612.1); AceCHS2 (XP_012058785.1). *Atta colombica* (Ac) AcCHS_8 (KYM79361.1); AcCHS_3 (KYM77515.1). *Atta sexdens* (As) AsCHSlarvapura; AsCHSoperária. *Bactrocera dorsalis* (Bd) BdCHS2 (AGC38392.1). *Bombyx mori* (Bm) BmCHSA (NP_001245291.1); BmCHS_X1 (XP_021206755.1); BmCHSB (AFC69002.1). *Cephus cinctus* (Cec) CecCHS5 (XP_015608867.1). *Drosophila melanogaster* (Dm) DmCHS1 (NP_524233.1); DmCHS2 (NP_001137997.2). *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura* (Dp) DpCHS1 (XP_001359390.3); DpCHS2 (XP_001352881.3). *Lucilia cuprina* (Lc) LcCHS1 (AAG09712.1). *Manduca sexta* (Ms) MsCHS1 (AAL38051.2); MsCHS2 (AAX20092.1). *Nilaparvata lugens* (NI) NICHS (AEL88648.1). *Ostrinia furnacalis* (Of) OfCHS1 (ACB13821.1); OfCHS2 (ABX46067.1). *Plutella xylostella* (Px) PxCHS1 (BAF47974.1). *Spodoptera exigua* (Se) SeCHS1 (AAZ03545.1); SeCHS2 (ABI96087.1). *Spodoptera frugiperda* (Sf) SfCHS2 (AAS12599.1). *Trachymyrmex zeteki* (Tz) TzCHS8 (KYQ52765.1). *Tribolium castaneum* (Tc) TcCHS1a (AAQ55059.1); TcCHS1b (AAQ55060.1); TcCHS2 (AAQ55061.1). *Vollenhovia emeryi* (Ve) VeCHSX3 (XP_011866715.1). Dos fungos *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ScCHS1 (NP_014207.2); ScCHS2 (NP_009594.1); ScCHS3 (NP_009579.1) e *Aspergillus nidulans* (An) An_CHS (BAE78841.1); AnCHSA (P30584.2); AnCHSB (XP_660127.1); AnCHSD (XP_659159.1); AnCHSVII (CBF88263.1); AnCHS_AN4367.2 (XP_661971.1); AnCHS_AN4566.2 (XP_662170.1); AnCHS_AN6318.2 (XP_663922.1).



Os insetos pertencentes à ordem Hemiptera (*Anasa tristis*; *Acyrtosiphon pisum*, e *Nilaparvata lugens*, *Rhodnius prolixus*) são os únicos descritos como possuindo um único gene de CHS (e não dois genes como os demais insetos), por não apresentarem matriz peritrófica verdadeira, podendo ter perdido um dos genes de CHS durante a evolução (MANSUR et al., 2014; RICHARDS et al., 2010; WANG Y. et al., 2012).

Dentre as sequências analisadas da ordem Hymenoptera, *A. mellifera* (AmCHS2) e as sequências preditas de CHS para formigas, apenas *Atta cephalotes* e *Atta colombica* apresentam sequências de CHSs tanto na classe A como na classe B. A análise do genoma dessas formigas confirma a presença de dois genes responsáveis pela síntese das CHSs (*A. cephalotes*: LOC105621766 e LOC105621961 e *A. colombica*: LOC108690240 e LOC108691753), mas não há estudos sobre o transcriptoma delas.

Neste trabalho não foi identificado CHS-B no transcriptoma de *A. sexdens* nos estágios de larva, pupa e adulto do inseto. A matriz peritrófica é constituída basicamente de quitina e proteínas e apresenta variável taxa de formação, sendo estimulada nos estágios onde há alimentação do inseto (LEHANE, 1997). Assim, seria esperado identificar transcritos de CHS-B ao menos nos estágios larval e adulto. Contudo, há evidências de que alguns insetos não possuem matriz peritrófica, como é o caso de algumas espécies de formigas adultas (Hymenoptera). Por se alimentarem exclusivamente de substâncias de baixa massa molecular, como açúcar, a digestão luminal não é necessária, o que explica a ausência da membrana peritrófica nesse grupo (TERRA, 2001).

Nos formigueiros de *A. sexdens* foi verificado que a alimentação das larvas é quase que exclusivamente de estáfilas do fungo simbionte (97,5%), que são um conjunto de gongilídeos do fungo, repletas de líquido com as maiores concentrações de lipídeos e carboidratos do que o resto do fungo. As operárias

adultas só ingerem alimentos líquidos, sendo que parte provém do preparo das estáfilas para as larvas (ao mastigar provavelmente ingerem o líquido dos gongilídeos) e das ocorrências de trofalaxia proctodeal com as larvas (líquidos secretados pelo ânus das larvas, constituído por uma mistura de açúcares, aminoácidos, ácido fosfórico, glicerol e enzimas) (SCHNEIDER, 2003). Esse comportamento das formigas-cortadeiras justifica o fato de serem encontrados dois genes que codificam para a síntese de CHSs em algumas espécies de formigas, mas não ter sido encontrado nos transcritos, enzimas da classe B.

Para o melhor entendimento da expressão gênica das AsCHSs foi realizada a análise quantitativa em tempo real por RT-qPCR utilizando como molde os transcritos de diferentes fases de desenvolvimento e partes do corpo de operárias média que será apresentada nos próximos tópicos.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS AsCHSs POR RT-qPCR

A alta precisão da RT-qPCR faz com que essa técnica seja muito utilizada na análise da expressão gênica, contudo a confiabilidade dos resultados está estritamente correlacionada com os genes de referências utilizados (GUÉNIN et al., 2009). Diversos trabalhos demonstram a importância de escolher um gene de referência apropriado para cada organismo, para a condição experimental e os impactos da escolha não apropriada, que afetam principalmente em transcritos de baixa abundância (RADONIC' et al., 2004; TENG et al., 2012).

De acordo com os dados da literatura, não há um gene de referência universal, que possa ser utilizado em todos os organismos e condições experimentais. Isso pode ser observado em organismos da mesma ordem, como no caso dos insetos, por exemplo, onde há diferença de estabilidade dos genes de

referência (CHENG et al., 2013; HORŇÁKOVÁ et al., 2010; LOURENÇO et al., 2008; TENG et al., 2012), em organismos da mesma família (SHAKEEL et al., 2015; ZHU, X. et al., 2014) e até mesmo do mesmo gênero (HORŇÁKOVÁ et al., 2010; LU, Y. et al., 2013; ZHU, X. et al., 2014). Esses dados evidenciam a necessidade de validar genes de referência para uma quantificação precisa dos níveis de transcritos. Por esse motivo, antes de realizar a análise da expressão gênica da AsCHS, os genes de referência para *A. sexdens* foram validados.

4.3.1 Validação de genes de referência

Para que um gene atue como um gene de referência confiável, o seu nível de expressão não pode ser afetado por fatores experimentais, deve apresentar variabilidade mínima entre os tecidos e estados fisiológicos e é desejável que o valor de Ct seja similar ao do gene de análise (KOZERA e RAPACZ, 2013). A escolha dos genes de referência não é trivial e inicia-se com a seleção dos candidatos a gene de referência, sendo que os genes *housekeeping* (HKG) são primeiramente selecionados a serem investigados, uma vez que estão envolvidos em processos essenciais de sobrevivência celular e espera-se que sejam expressos em um nível estável e não regulados (ANDERSEN, C. et al., 2004; THELLIN e ZORZI, 1999). Uma boa estratégia para selecionar potenciais candidatos é se basear em dados de espécies relacionadas, devido à similaridade entre os genomas e a expectativa de um nível de expressão similar (KOZERA e RAPACZ, 2013).

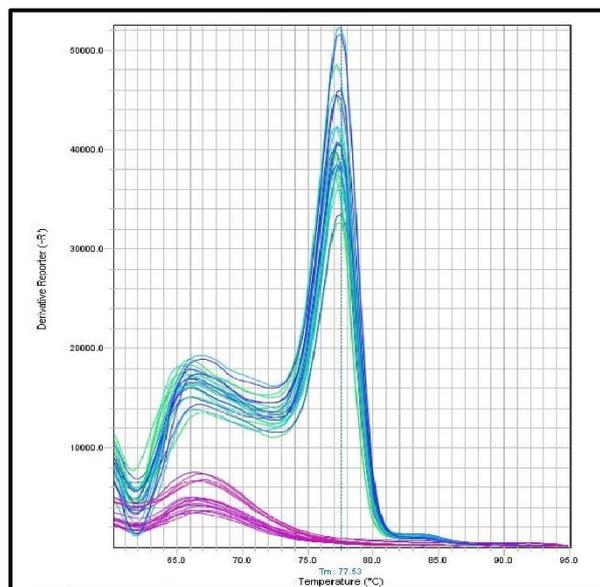
A falta de informações genômicas para *A. sexdens* não foi um obstáculo para a validação do gene, uma vez que o alinhamento de nucleotídeos dos genes selecionado a candidatos a gene de referência de outras formigas e a análise de regiões conservadas permitiu o desenho de *primers* nessas regiões. A seleção dos candidatos a gene de referência foi realizada com base nos genes de referência para *Solenopsis invicta*, uma formiga também pertencente à subfamília

Myrmicinae, com genes de referência descritos (CHENG et al., 2013) e outros insetos (BARROS RODRIGUES et al., 2014; FU et al., 2013; KOZERA e RAPACZ, 2013; LOURENÇO et al., 2008; PAIM et al., 2012; ZHANG, S. et al., 2015; ZHU, X. et al., 2014).

Neste sentido, foram realizadas PCRs usando os *primers* desenhados para os sete candidatos a gene de referência (*act*, *ef1-beta*, *ef1-alpha*, *GAPDH*, *rpl18*, *tbp* e *18S rRNA*) e como molécula molde o cDNA de operária média na fase adulto (TABELA 3.2). Os amplicons foram sequenciados e as sequências foram analisadas para busca por similaridade. A comparação com sequências de proteínas de formigas levou a uma identidade acima de 90%, confirmando a identidade dos genes. Utilizando as sequências identificadas, novos *primers* foram desenhados para a RT-qPCR.

Durante a padronização das condições da RT-qPCR, todos os candidatos a gene de referência apresentaram um único pico na curva de dissociação das amostras e nenhum pico no branco reacional, exceto para o gene *tbp* que apresentou um pico no branco reacional (FIGURA 4.9), sugerindo a formação de dímero de *primer*. Por esse motivo este gene foi excluído do estudo de validação do gene de referência, contudo a análise seria possível se novos *primers* fossem desenhados para esse gene.

FIGURA 4.9: Curva de dissociação do produto amplificado utilizando os *primers* para o gene *tbp* em função da temperatura. Em azul a curva de dissociação para as amostras da diluição de *primer*; em lilás, a curva de dissociação para o branco reacional.



A melhor concentração de *primer* foi determinada para os seis genes restantes e foi utilizada na determinação da eficiência de reação de cada um (TABELA 3.4). O gene 18S rRNA apresentou elevada abundância de transcritos devido ao baixo valor de Ct (dados não mostrados) e, mesmo após diluição para verificar a eficiência de reação, os resultados não foram satisfatórios. A discrepância entre o rRNA e o mRNA tem sido discutido como um ponto negativo no uso de rRNA como gene de referência (VANDESOMPELE et al., 2002a), além disso, a necessidade de elevada diluição antes da qPCR pode levar a erros de diluição (TAKLE et al., 2007). Por esses motivos, alguns estudos que analisaram este gene como referência em insetos, também sugerem a eliminação do 18S rRNA da lista consenso de genes de referência (PONTON et al., 2011; ZHU, X. et al., 2014). Deste modo, o gene 18S rRNA foi excluído desse estudo.

A eficiência de reação da RT-qPCR para os cinco genes restantes (*act*, *ef1-alpha*, *ef1-beta*, *GAPDH*, *rpl18*) foi determinada entre 95,1 e 99,8 % mostrando que esses *primers* podem ser utilizados nessa análise.

Para a validação dos genes de referência foi realizada a análise estatística dos dados, e além disso, diferentes algoritmos como BestKeeper, geNorm, NormFinder, o método comparativo ΔC_t e o RefFinder foram utilizados para verificar a estabilidade dos genes selecionados.

4.3.1.1 Análise estatística

O processo de autoescalamento foi utilizado para obter uma melhor visão das correlações entre as variáveis. Na FIGURA 4.10-A o autoescalamento para estágio de desenvolvimento mostra que os genes mais correlacionados são *ef1-alpha* e *ef1-beta*, seguido por *rpl18*. Além disso, apresentam menor variabilidade, fazendo deles genes bons candidatos a gene de referência. Os genes *act* e *GAPDH* são correlacionados entre si, mas apresentam maior variabilidade (TABELA 4.1).

O auto escalamento para as amostras de partes do corpo de operária (FIGURA 4.10-B) mostra que os genes mais correlacionados são *rpl18* e *ef1-beta*, seguido por *GAPDH* e *ef1-alpha*. Neste caso, embora os genes *GAPDH* e *act* apresentem os menores valores de desvio padrão (TABELA 4.1), eles não apresentam boa correlação comparada com os outros genes. Isso reflete a alternância no ranqueamento dos candidatos a gene de referência entre os diferentes programas, pois a escolha do melhor gene de referência irá depender se o algoritmo utiliza menores valores de SD e CV ou se utiliza correlação entre as variáveis, por exemplo.

O teste t não mostrou diferença significativa para os genes com um nível de confiança de 95%, tanto nas amostras de estágios de desenvolvimento como nas partes do corpo de operária média. A única diferença significativa foi observada quando larva e pupa foram comparadas às operárias. A comparação entre os desvios padrão para as réplicas técnicas do experimento de RT-qPCR e as réplicas de conversão de RNA em cDNA mostrou que o desvio desse último é 1,6, que é 3,6 vezes maior que o primeiro. Este resultado confirma que a conversão de RNA em cDNA é uma das principais fontes de variabilidade nos dados e por isso a necessidade de realizar a conversão de cDNA em triplicata para análise por RT-qPCR.

FIGURA 4.10: Médias da expressão gênica em função do estágio de desenvolvimento (A) e partes do corpo de operária (B) para cada candidato a gene de referência. Os dados foram autoescalados antes da representação gráfica. Os dados de parte do corpo de operária estão sem a amostra de gáster.

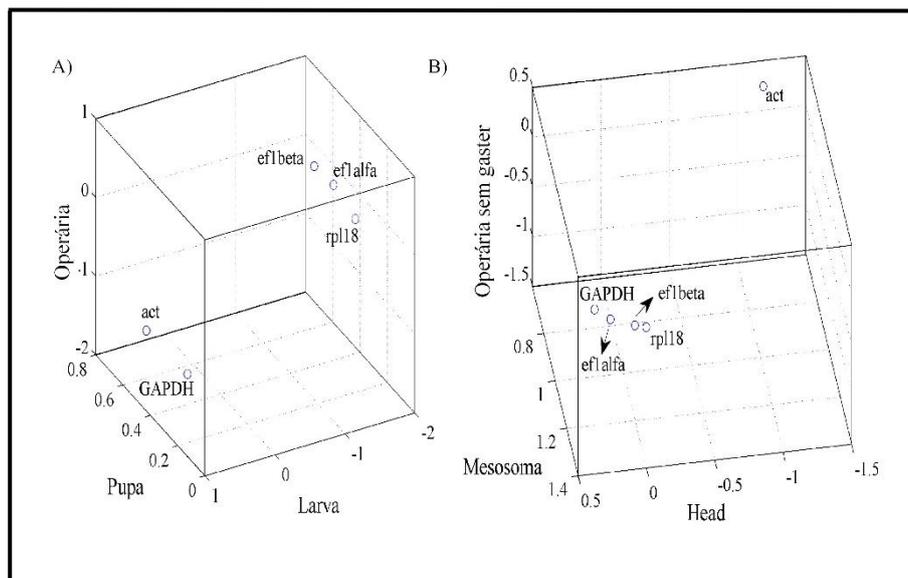


TABELA 4.1: Parâmetros estatísticos dos valores de Ct dos candidatos a gene de referência nas amostras estágio de desenvolvimento e partes do corpo de operária média.

Estágio de desenvolvimento (n = 27)*					
	<i>GAPDH</i>	<i>act</i>	<i>ef1-alfa</i>	<i>ef1-beta</i>	<i>rpl18</i>
Mean	18.02	18.77	17.36	18.97	18.10
SD	0.66	0.84	0.58	0.57	0.50
CV (%)	3.67	4.48	3.34	3.03	2.77
Partes do corpo de operária média** (n = 27*)					
	<i>GAPDH</i>	<i>act</i>	<i>ef1-alfa</i>	<i>ef1-beta</i>	<i>rpl18</i>
Mean	17.42	17.54	18.21	19.74	18.57
SD	0.69	0.58	0.96	0.91	0.90
CV (%)	3.97	3.33	5.27	4.60	4.87

*n=27 corresponde as médias dos valores de RT-qPCR da triplicata biológica dos estágios de desenvolvimento ou partes do corpo de operária.

Para a triplicata biológica (larva, por exemplo): três *pools* de RNA de larva foram extraídos e convertidos em cDNA em triplicata (9 cDNA), cada cDNA foi analisado em triplicata técnica por RT-qPCR (27 análises), foi calculada a média da triplicata técnica (9 pontos de média). Como são três estágios de desenvolvimento com 9 pontos de média de RT-qPCR para cada um, temos n=27. De modo semelhante para partes do corpo de operária.

**Na análise de partes do corpo de operária média não foi incluída a amostra gáster, discutido no item a seguir. Assim as partes são: Cabeça, mesossoma e operária média sem o gáster.

4.3.1.2 BestKeeper

A ordem de estabilidade da expressão gênica dos alvos analisados foi construído utilizando as variações dos valores de Ct (SD \pm Ct) (PFAFFL et al., 2004). Para os estágios de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) todos os valores de SD \pm Ct obtidos foram abaixo de um para todos os cinco candidatos a gene de referência analisados, mostrando que eles podem ser considerados com sendo estavelmente expressos. Na TABELA 4.2 os genes estão apresentados em ordem decrescente de estabilidade. A integridade do RNA total extraído de todas as amostras foi confirmada pelos valores de InVar, que foram todos abaixo de 3.

Nas amostras de partes do corpo da operária (cabeça, mesossoma, gáster e operária média sem gáster) foi verificado que os valores de estabilidade estavam acima do estabelecido, de modo que nenhum dos genes candidatos a gene de referência poderiam ser utilizados. Adicionalmente, os resultados de InVar foram maiores que 3 para as amostras de gasteres, confirmando a degradação do RNA que já havia sido observada no gel de agarose (FIGURA 4.1) e justificando a remoção da amostra gáster das análises de partes do corpo de operária média. Além dos fatores já discutidos para justificar essa degradação, este tecido apresenta uma microbiota rica (VIEIRA et al., 2017), que pode estar auxiliando na degradação do RNA.

Após a remoção das amostras de gáster, o grupo de partes do corpo de operária permaneceu com as amostras de cabeça, mesossoma e operária sem gáster. Os dados foram analisados novamente e valores aceitáveis de SD [\pm Ct], SD [\pm x-fold] e InVar [\pm x-fold] foram observados para todos os candidatos a gene de referência, na TABELA 4.2 estão os valores obtido e os genes estão ranqueados em ordem decrescente de estabilidade.

TABELA 4.2: Ranqueamento dos genes de referência em ordem decrescente da estabilidade da expressão de acordo com o BestKeeper, geNorm, NormFinder, método comparativo ΔCt e RefFinder. Os valores foram obtidos após análise individual de cada software.

Estágio de desenvolvimento					Partes do corpo de operária				
BestKeeper	geNorm	NormFinder	Método ΔCt	RefFinder	BestKeeper	geNorm	NormFinder	Método ΔCt	RefFinder
<i>GAPDH</i> (0.50)	<i>ef1-alpha/ef1-beta</i> (0.21)	<i>rpl18</i> (0.135)	<i>rpl18</i> (0.73)	<i>rpl18</i> (1.57)	<i>GAPDH</i> (0.33)	<i>ef1-beta/rpl18</i> (0.16)	<i>rpl18</i> (0.028)	<i>rpl18</i> (0.30)	<i>rpl18</i> (1.32)
<i>rpl18</i> (0.58)	<i>rpl18</i> (0.26)	<i>ef1-alpha</i> (0.143)	<i>ef1-alpha</i> (0.74)	<i>ef1-alpha</i> (1.86)	<i>act</i> (0.38)	<i>ef1-alpha</i> (0.20)	<i>ef1-beta/GAPDH</i> (0.050)	<i>ef1-beta</i> (0.31)	<i>ef1-beta</i> (2.00)
<i>ef1-alpha</i> (0.59)	<i>GAPDH</i> (0.71)	<i>ef1-beta</i> (0.176)	<i>ef1-beta</i> (0.79)	<i>ef1-beta</i> (2.45)	<i>rpl18</i> (0.41)	<i>GAPDH</i> (0.27)	<i>ef1-alpha</i> (0.060)	<i>ef1-alpha</i> (0.34)	<i>GAPDH</i> (2.83)
<i>ef1-beta</i> (0.71)	<i>act</i> (0.89)	<i>GAPDH</i> (0.218)	<i>GAPDH</i> (1.02)	<i>GAPDH</i> (2.83)	<i>ef1-beta</i> (0.44)	<i>act</i> (0.37)	<i>act</i> (0.140)	<i>GAPDH</i> (0.39)	<i>ef1-alpha</i> (3.41)
<i>act</i> (0.74)		<i>act</i> (0.254)	<i>act</i> (1.16)	<i>act</i> (5.00)	<i>ef1-alpha</i> (0.49)			<i>act</i> (0.51)	<i>act</i> (3.98)

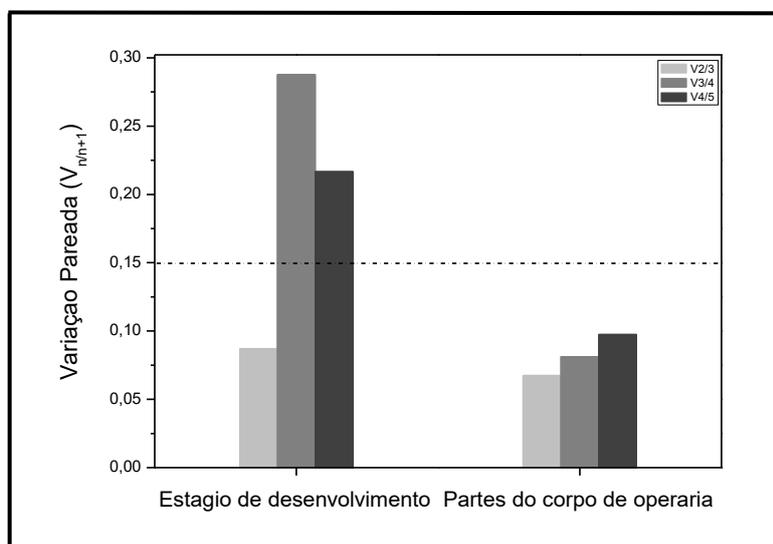
Os parâmetros para cada software foi desvio padrão dos valores de Ct (SD $\pm Ct$) para BestKeeper, os valores de estabilidade do NormFinder, os valores de M após a exclusão sucessiva para os valores do geNorm, a média do desvio padrão de ΔCt para o método comparativo ΔCt e a média geométrica dos valores de ranqueamento do RefFinder.

4.3.1.3 geNorm

O geNorm é um software capaz de identificar os genes controle que apresentam maior estabilidade de expressão em um determinado tecido ou amostra com base na medida de estabilidade do gene (M). Também determina o número mínimo de genes necessários requeridos para calcular um fator de normalização confiável (VANDESOMPELE et al., 2002a). Neste trabalho, os cinco genes candidatos a gene de referência, tanto para o estágio de desenvolvimento como partes do corpo de operária, podem ser considerados para o uso como genes de referência, pois apresentaram valores de M menor que 1,5. Para o ranqueamento deles, os genes mais estáveis apresentam os menores valores de M. (TABELA 4.2). Os genes foram ranqueados após a exclusão um a um do gene com maior valor de M, resultando em uma combinação de dois genes constitutivamente expressos e com maior estabilidade.

Os genes mais estáveis são *ef1-alpha* e *ef1-beta* para estágio de desenvolvimento e *ef1-beta* e *rpl18* para as partes do corpo de operária. Esses resultados estão de acordo com os obtidos pela análise estatística por autoescalamento. Para obter resultados confiáveis para análise da expressão gênica, geNorm determina o número mínimo de genes a ser utilizado como gene de referência em um experimento. Para isso, a variação pareada foi determinada individualmente para cada gene iniciando com os dois mais estáveis ($n=2$) seguido da adição sequencial dos genes menos estáveis ($V_{n/n+1}$). Na FIGURA 4.11 pode ser verificado que o valor de $V_{2/3}$ está abaixo do limite de corte de 0,15, corresponde que o geNorm indica que o uso de apenas dois genes, os mais estáveis, é suficiente para normalizar os experimentos de RT-qPCR em *A. sexdens* para obter resultados precisos, tanto na análise das amostras de fase de desenvolvimento como partes do corpo de operária.

FIGURA 4. 11: Análise da variação pareada ($V_{n/n+1}$) dos candidatos a gene de referência para determinação do número ótimo de genes controle para uma normalização precisa.



4.3.1.4 NormFinder

O modelo matemático do NormFinder considera a variação inter e intra grupo para estimar a estabilidade e o ranqueamento dos genes, eliminando problemas associado a seleção de genes corregulados (ANDERSEN, C. et al., 2004). A ordem decrescente de estabilidade está representada na TABELA 4.2, sendo que *rpl18* foi o gene mais estável para ambas amostras.

Andersen e colaboradores elucidaram algumas diferenças causada pela diferente abordagem dos programas. Evidencia o problema de se utilizar genes co-regulados entre os candidatos, devido à tendência da comparação pareada em selecionar genes com elevado grau de similaridade no seu perfil de expressão, esses genes tendem a mostrar perfil de expressão muito similares e serem ranqueados como os melhores, independente da estabilidade da sua expressão (ANDERSEN, C. et al., 2004). Esta pode ser a razão que o geNorm classificou os genes *efl-alpha* e *efl-beta* como os melhores para a amostra de estágio de desenvolvimento, diferentemente do NormFinder.

4.3.1.5 Método comparativo Δ Ct

O método comparativo Δ Ct compara pares de genes, similarmente ao geNorm, e utiliza os valores de Δ Ct para estimar a variabilidade do gene (SILVER et al., 2006). A média do desvio padrão dos valores de Δ Ct entre todas as combinações possíveis de genes analisados foi utilizada para analisar o gene mais estável, sendo que os menores valores se referem aos genes mais estáveis. Na TABELA 4.2, além da ordem de estabilidade, pode ser verificado que, para estágio de desenvolvimento, *rpl18*, *ef1-alfa*, e *ef1-beta* mostraram desvios menores e similares.

4.3.1.6 RefFinder

A estabilidade dos candidatos a gene de referência foi avaliada com 4 diferentes algoritmos, descritos anteriormente. Na TABELA 4.2 pode ser verificada diferenças no ranqueamento dos genes. Isso reflete as diferenças matemáticas de cada modelo de análise, contudo esses métodos são igualmente importantes (KOZERA e RAPACZ, 2013; PONTON et al., 2011). Assim, o RefFinder foi utilizado para propor a lista consenso de estabilidade dos candidatos a gene de referência, como mostrado na TABELA 4.2, a ordem decrescente de estabilidade é *rpl18*, *ef1-alpha*, *ef1-beta*, *GAPDH* e *act* para os estágios de desenvolvimento e *rpl18*, *ef1-beta*, *GAPDH*, *ef1-alpha* e *act* para as partes do corpo de operária.

Após a análise individual de cada programa, os dados de validação do gene de referência mostraram que a melhor combinação de genes a serem utilizados como gene de referência são *ef1-alpha* e *rpl18* para estágio de desenvolvimento e *rpl18* e *ef1-beta* para as partes do corpo de operária. Resultados similares foram obtidos para *S. invicta*, onde *rpl18* e o fator de

elongação (beta) foram considerados os genes mais estáveis em diferentes estágios de desenvolvimento, castas e tecidos (CHENG et al., 2013).

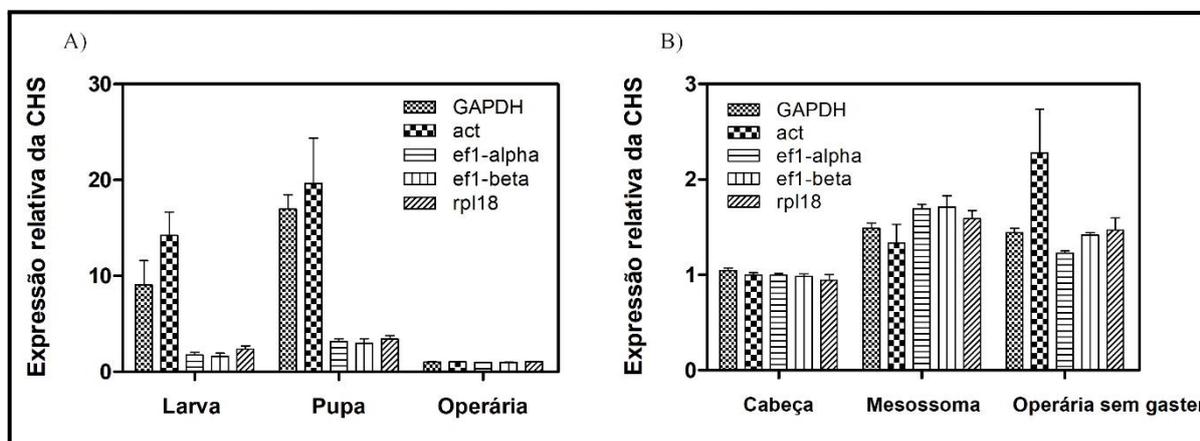
Os valores de estabilidade da expressão para candidatos a gene de referência foram maiores para as amostras de estágio de desenvolvimento do que para as partes do corpo de operária para todos os algoritmos (TABELA 4.2), o que mostra que as amostras dos estágios de desenvolvimento apresentam menor estabilidade que as partes do corpo de operária. Isto pode estar associado a maior complexidade das amostras nos diferentes estágios de desenvolvimento, resultado similar foi observado em *S. invicta*, onde o aumento da complexidade dos transcritos na fase adulto pode alterar durante o processo de eclosão de pupa para adulto (OMETTO et al., 2011; ZHU, X. et al., 2014). Adicionalmente, a casta de operárias das formigas-cortadeiras apresenta um dos polimorfismos mais complexos, o que contribuir para esse uma expressão diferencial dos genes nas diferentes castas (SUEN et al., 2011; WILSON, 1980).

Após a análise de cada algoritmo individualmente, foi confirmado que em abordagens que utilizam desvio padrão, como na análise estatística, assim como no algoritmo BestKeeper, o *GAPDH* é listado como um dos genes mais estáveis. Todos os outros algoritmos classificaram *rpl18/ef1-alpha* (estágio de desenvolvimento) e *rpl18/ef1-beta* (partes do corpo de operária) como um dos mais estáveis. Por outro lado, *act* foi classificado como um dos genes com menor estabilidade, esse gene também não foi bem ranqueado entre os melhores para outros insetos da ordem Hymenoptera (CHENG et al., 2013; HORŇÁKOVÁ et al., 2010) e apresentou resultados controversos para insetos da ordem Lepidoptera (TENG et al., 2012). Esse resultado pode ser justificado devido ao grande número de genes envolvidos na organização do citoesqueleto de actina, como descrito para *A. cephalotes* comparado a outros genes de himenópteros que estão associados a extensiva mudança no citoesqueleto que ocorre durante a diferenciação das castas em adultos de *Atta* (SUEN et al., 2011).

Para mostrar a importância da validação dos genes de referência na obtenção de resultados confiáveis e precisos, foi realizada a normalização da expressão da AsCHS total utilizando os diferentes candidatos a genes de referência, FIGURA 4.12. Como predito, os resultados apresentam diferenças na quantificação dependendo do gene utilizado para normalizar.

Nas amostras de estágio de desenvolvimento, é evidente em larva e pupa que a expressão quando calibrada com os genes menos estáveis como *GAPDH* ou *act*, a diferença no nível da expressão gênica pode variar de 10 a 20 vezes, se comparada com a calibração utilizando os genes mais estáveis como *rpl18* e *ef1-alpha* (FIGURA 4.12-A). Para avaliação da expressão da AsCHS nas partes do corpo de operária, a variação não foi tão expressiva, sendo que a maior diferença foi para a operária sem gáster utilizando *act* como gene de referência (FIGURA 4.12-B). A análise estatística para os dois genes melhor ranqueados *rpl18* e *ef1-alpha*, para estágio de desenvolvimento e *rpl18* e *ef1-beta* para partes do corpo de operária, não apresentou diferença estatística significativa. Esses resultados evidenciam a importância da normalização com genes de referência para que os resultados da RT-qPCR sejam precisos e confiáveis.

FIGURA 4.12: Quantificação relativa da AsCHS em *A. sexdens*. Perfil da expressão do gene alvo normalizado com diferentes candidatos a gene de referência nos três estágios de desenvolvimento (A) e partes do corpo de operária (B). Os dados estão apresentados como média \pm SEM das réplicas biológicas.



4.3.2 Análise da expressão gênica da AsCHS em diferentes estágios de desenvolvimento e de partes do corpo de operária média de *A. sexdens*

A expressão do gene de AsCHS em diferentes estágios de desenvolvimento e diferentes parte do corpo de operária média de *A. sexdens* foi avaliada com a técnica de RT-qPCR. Para isso, dois *primers* foram desenhados (TABELA 3.3):

- *Primer AsCHStotal*: correspondente a sequência de nucleotídeos comum às duas isoformas de AsCHSs encontradas em larva/pupa e em operária (FIGURA 4.5);

- *Primer AsCHSlarvapupa*: correspondente a sequência de nucleotídeos encontrada somente nas sequências de larva e pupa (FIGURA 4.5).

Esses *primers* foram avaliados quanto a eficiência de reação e apresentaram eficiência semelhante aos genes de referência (*rpl18* e *ef1-alpha*,

para estágio de desenvolvimento e *rpl18* e *ef1-beta*, para partes do corpo de operária). Assim, os dados foram analisados pelo método de quantificação relativa.

4.3.2.1 Análise da expressão de CHS de *A. sexdens* nas diferentes fases de desenvolvimento da formiga

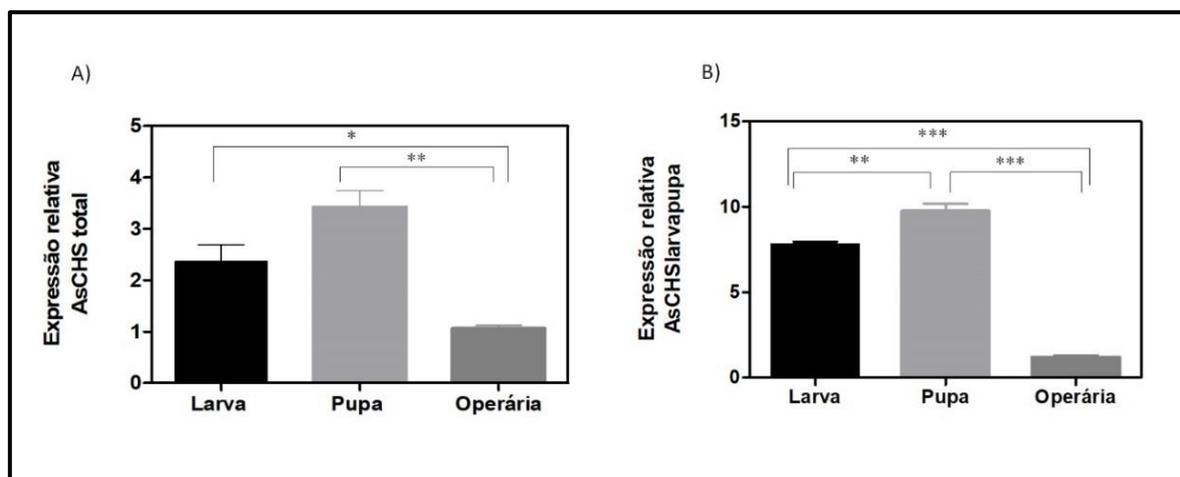
Os resultados da expressão gênica de CHS nos diferentes estágios de desenvolvimento de *A. sexdens* avaliados por RT-qPCR estão apresentados na FIGURA 4.13. Na FIGURA 4.13-A, quando utilizado o *primer AsCHStotal*, pode ser verificado que os estágios de larva e pupa apresentam uma maior expressão relativa da CHS em relação a operária. Nos estágios de larva e pupa ocorre o remodelamento de cutícula, assim as enzimas devem estar associadas com a síntese de quitina na epiderme, confirmando sua classificação como CHS-A. A menor expressão de CHS na fase adulta é condizente, uma vez que neste estágio, não há troca de exoesqueleto e a formiga já atingiu seu tamanho máximo, de modo que não há necessidade de sintetizar quitina, resultados semelhantes foram obtidos para outros insetos, dentre eles *Tribolium castaneum* (ARAKANE et al., 2004), *L. migratoria manilensis* (ZHANG, J. et al., 2010), *Rhodnius prolixus* (MANSUR et al., 2014) e *O. furnacalis* (QU e YANG, 2011).

Ao utilizar o *primer AsCHSlarvapupa* foi observada amplificação de CHS em operária (FIGURA 4.13-B), diferentemente da PCR convencional (menos sensível) e por isso não foi possível detectar esse transcrito.

A análise da expressão da *AsCHSlarvapupa* (FIGURA 4.13-B) apresenta exatamente o mesmo perfil da *AsCHStotal*, mostrando que a *AsCHSlarvapupa* deve corresponder ao transcrito majoritariamente expresso nos estágios de larva e pupa. Esse resultado é confirmado, devido a maior diferença no nível da expressão gênica entre operária e os outros estágios de

desenvolvimento utilizando esse *primer*, quando comparada com a expressão utilizando o *primer AsCHStotal*.

FIGURA 4.13: Análise da expressão gênica de AsCHS durante os estágios de desenvolvimento da *A. sexdens*. A) *AsCHStotal*; B) *AsCHSlarvapupa*. Dados: média \pm SEM e análise estatística one-way ANOVA, como pós-teste, teste múltiplo de comparação Tukey ($p < 0,05$).



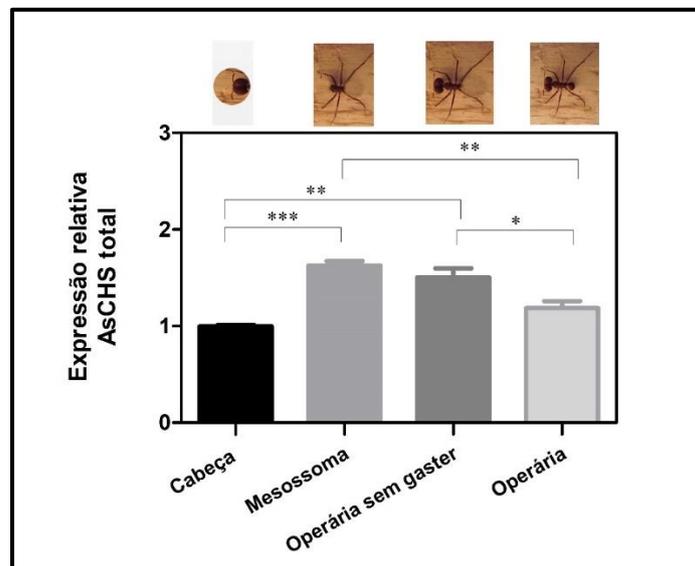
O fato de operárias adultas de *A. sexdens* ser o estágio de desenvolvimento a apresentar o menor nível da expressão de CHS, certamente justifica quantitativamente os resultados de NAGAMOTO e colaboradores (2007), que não observaram nenhuma atividade inseticida sobre operárias adultas quando utilizado o diflubenzuron, que é considerado um inibidor dessa enzima, embora até o momento não seja conhecido o modo de ação do diflubenzuron em formigas (BRITTO et al., 2016). Dentre as diversas características necessárias para que a isca tóxica seja considerada ideal para formigas-cortadeiras, espera-se que a casta das operárias seja inicialmente contaminada, o que leva à desorganização geral da colônia e o jardim de fungo deixa de ser cuidado, facilitando a contaminação por microrganismos (FORTI e BOARETTO, 1997).

4.3.2.2 Análise da expressão de CHS de *A. sexdens* em diferentes partes do corpo de operária

O nível da transcrição nas partes do corpo de operária foi avaliado utilizando o *primer* AsCHStotal. A FIGURA 4.14 mostra a expressão relativa da CHS nas diferentes partes do corpo de operária: cabeça, mesossoma, operária média sem o gáster e operária média. Há diferença significativa nos níveis de transcritos entre a cabeça e o mesossoma e entre a cabeça e a operária sem gáster, contudo não há diferença significativa entre o mesossoma e a operária sem gáster. Esse resultado mostra que o mesossoma é a parte do inseto com maior quantidade de transcritos de AsCHS e que a cabeça contribui muito pouco nos níveis de transcritos.

Surpreendentemente, há diferença significativa entre operária e operária sem gáster. A operária sem gáster apresenta maior nível de transcrição que a operária. O mesossoma apresenta maior contribuição para os níveis de transcritos de AsCHS. Uma alternativa para essa diminuição dos níveis de transcritos ao adicionar o gáster (operária) em relação a operária sem gáster pode estar relacionada com a grande abundância e diversidade da comunidade microbiana do intestino das formigas-cortadeiras, como identificado por VIEIRA e colaboradores (2017).

FIGURA 4.14: Análise da expressão gênica de AsCHS nas partes do corpo de operária de *A.sexdens*. Dados média \pm SEM e análise estatística one-way ANOVA, como pós-teste, teste múltiplo de comparação Tukey ($p < 0,05$).



Os resultados obtidos de análise da expressão gênica mostram que há uma maior diferença de expressão gênica entre os estágios de desenvolvimento do que entre as partes do corpo de operárias. As operárias médias na fase adulta, representam o estágio de desenvolvimento com menor nível de expressão para CHS, o que é condizente com o desenvolvimento do inseto. As formigas de um mesmo formigueiro apresentam genótipos equivalentes, contudo se desenvolvem em fenótipos divergentes, por isso o padrão de expressão gênica pode ser substancialmente diferente, como também foi observado para *Solenopsis*. OMETTO e colaboradores avaliaram a expressão gênica de duas espécies de *Solenopsis* (*S. invicta* e *S. richteri*) por *microarray*, foi verificado que a variação no perfil da expressão gênica foi mais influenciada pelo estágio de desenvolvimento do que pela associação de castas, sexo ou identidade das espécies. Além disso, foi verificado que a casta das operárias de *Solenopsis* apresenta expressão gênica diferenciada, que pode ser explicada por uma combinação de fatores, incluindo que as operárias são amplamente ou

completamente estéreis, vivenciam os ambientes mais diversos e exibem os repertórios comportamentais mais amplos (OMETTO et al., 2011).

4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO DA AsCHS POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) EM PUPAS DE *A. sexdens*

Com o intuito de analisar a influência da AsCHS no desenvolvimento das formigas-cortadeiras foi utilizada a técnica de RNA de interferência nos estágios de desenvolvimento onde há maior expressão das enzimas. O primeiro trabalho a descrever a utilização dessa técnica em espécies de formiga foi em *S. invicta* realizando a injeção intra abdominal de 0,5 µl contendo 1 µg de dsRNA para o receptor de vitelogenina ou controles (dsRNA-EGFP e tampão) em pupas de rainhas (LU, H. L. et al., 2009). Outro trabalho para análise do hormônio neuropeptídico (família PBAN), também em *S. invicta* descreve a injeção de 50 nl contendo 20 ng de dsRNA Soi-PBAN ou controles (dsRNA-GFP e água) em formiga adulta e pupas. Além disso, também foi realizada a alimentação de operárias através de um capilar contendo o dsRNA (1µg/µl) dissolvido em uma solução 10% sacarose (m/v) e essa solução foi utilizada pelas operárias para a alimentação das larvas (CHOI et al., 2012). Neste trabalho foi utilizado siRNA AsCHS e como controle siRNA Universal Negative Control#1 (Sigma-Aldrich) e água.

A maior expressão de AsCHS foi em larva e pupa, assim, os experimentos iniciaram com a tentativa de injeção de uma solução aquosa em larvas e pupas. Contudo, as larvas apresentam uma grande concentração de corpo gorduroso sob sua cutícula, o que inviabilizou a aplicação dessa metodologia devido ao extravasamento do corpo gorduroso e da solução injetada ao retirar a agulha da larva. A tentativa de manutenção de apenas operárias e larvas em uma placa de Petri realizando a alimentação das operárias apenas com uma solução de

sacarose, que deveria ser utilizada na alimentação das larvas, não foi eficiente devido à elevada mortalidade ao longo do tempo de análise. Desse modo, pupa foi o estágio de desenvolvimento que apresentou viabilidade de injeção de solução contendo siRNA e acompanhamento dos exemplares injetados.

Inicialmente foi desenvolvida a metodologia para a injeção em pupas e retorno dos exemplares injetados para o micro formigueiro, uma vez que formas imaturas de *A. sexdens* dependem obrigatoriamente de operárias e não podem se desenvolver quando retiradas do ambiente social (WHEELER e WHEELER, 1979). As pupas foram injetadas no início desse estágio de desenvolvimento, ou seja, pupas de olho branco ou levemente avermelhado foram selecionadas dos formigueiros previamente anestesiados por resfriamento e a injeção foi realizada na região do gáster.

As operárias presentes no micro formigueiro precisaram ser anestesiadas para a introdução das pupas injetadas devido ao comportamento agressivo delas, uma vez que quando as pupas são introduzidas diretamente, as operárias podem identificar alterações no odor das pupas manipuladas e as reconhecem como invasoras, atacando-as. A aspersão de solução de sacarose sobre as placas faz com que as operárias realizem a limpeza das pupas lambendo-as, e isso faz com que as pupas retiradas do ninho adquiriam novamente os hidrocarbonetos cuticulares (odor) característico daquele formigueiro e não sejam atacadas pelas operárias.

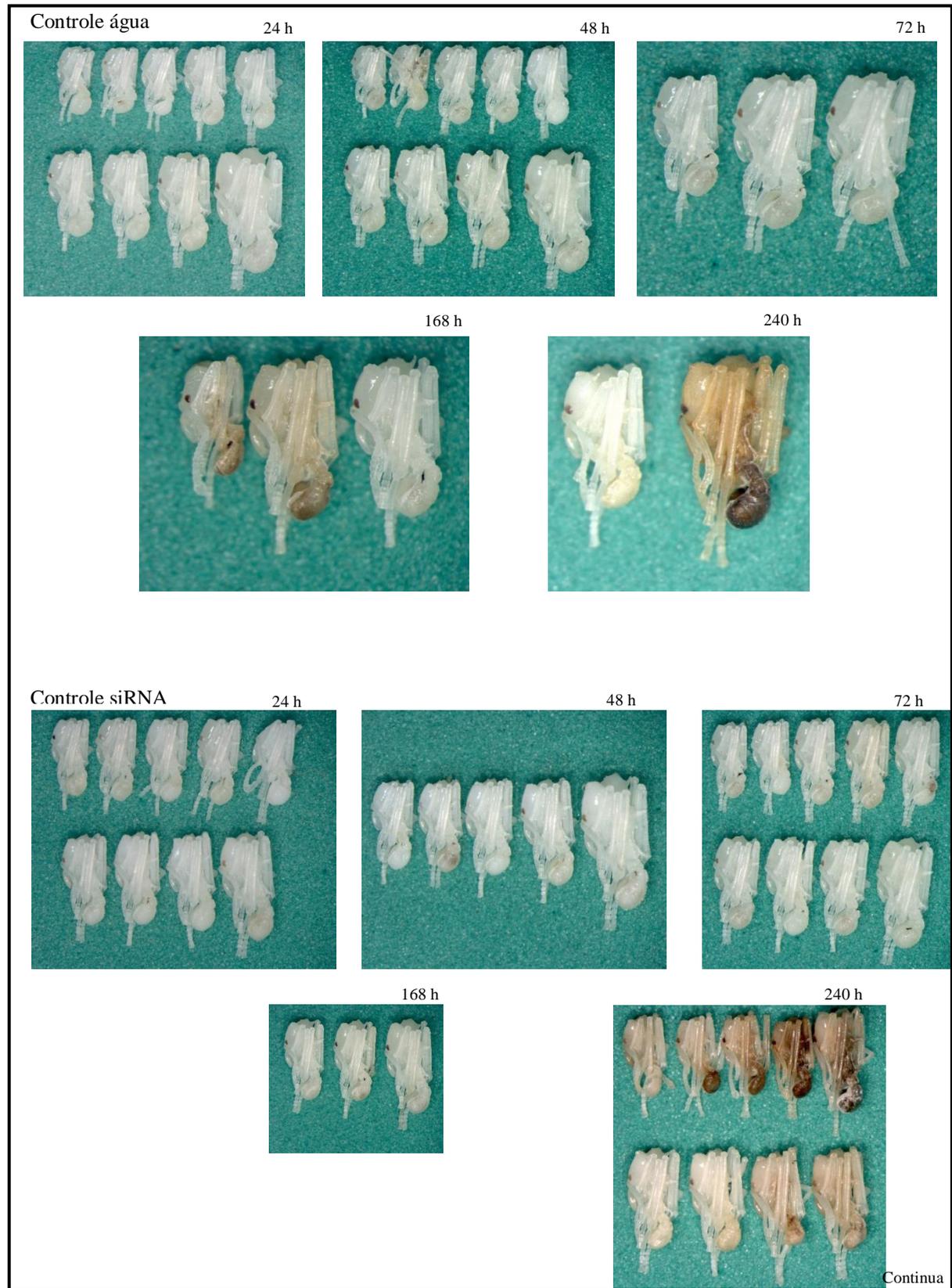
Nos ensaios iniciais os micro formigueiros foram preparados contendo jardim de fungo, algumas operárias e larvas, uma vez que é descrito que os formigueiros mantidos em laboratórios contendo larvas são mais ativos e saudáveis que os formigueiros composto apenas por operárias (WHEELER e WHEELER, 1979). Após 240 h (10 dias) de análise foi verificado que algumas dessas larvas poderiam ter passado para o estágio de pupa, ficando difícil diferenciá-las das pupas injetadas. Assim, o experimento foi repetido sem a adição

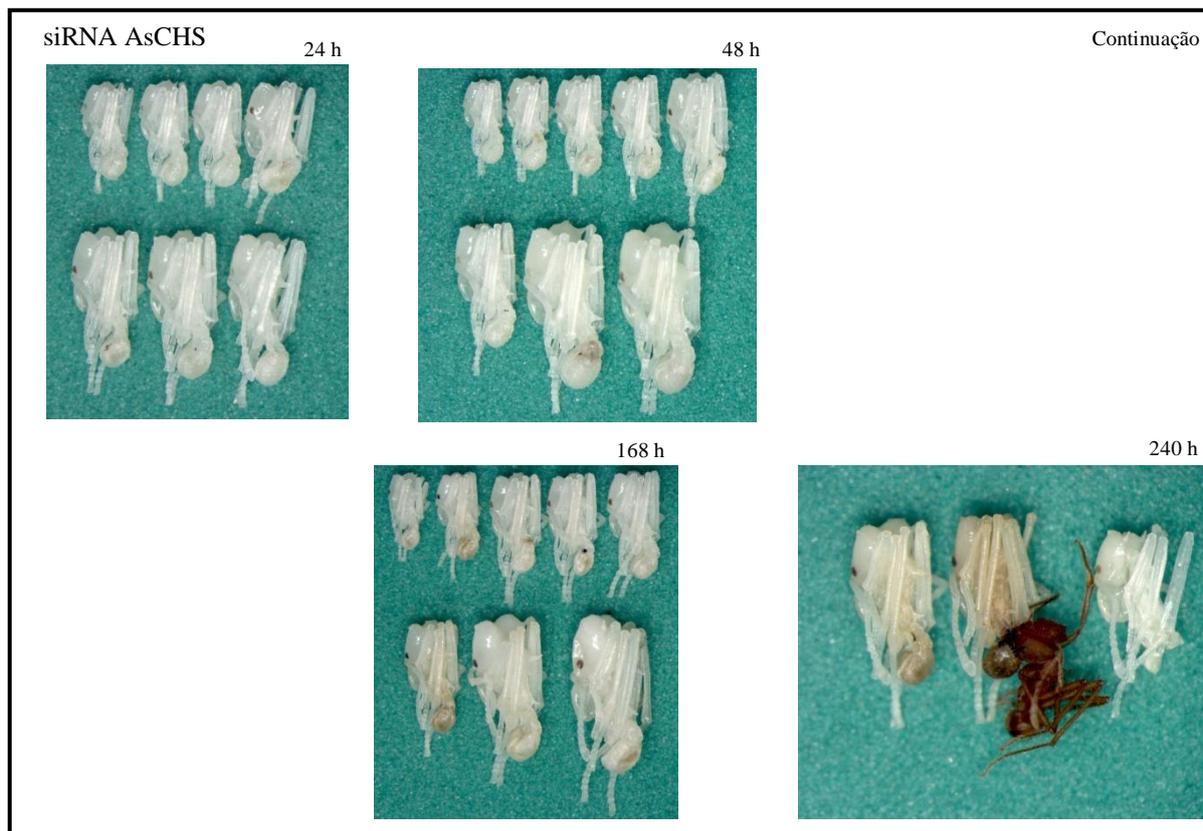
de larvas aos micro formigueiros e foi verificado que não houve prejuízo na manutenção deste durante o período de análise.

A mortalidade no micro formigueiro (com pupas injetadas com água) foi no máximo de 10 a 20 %. Essa mortalidade foi considerada satisfatória para iniciar os experimentos de RNAi. Como foi encontrada na literatura uma concentração variada de RNAi, experimentos testando diferentes concentrações de siRNA AsCHS foram realizados injetando 50, 92, 1000 e 300 ng de amostra. Além disso, dois controles negativos foram utilizados neste experimento: a injeção de água e a injeção de um siRNA controle que foi desenhado e sintetizado pela empresa Sigma Aldrich, que não deveria apresentar complementariedade com nenhum RNA mensageiro de formigas-cortadeiras.

O experimento com a injeção de 50 ng de siRNA-AsCHS foi acompanhado apenas pela análise fenotípica, pois os exemplares de pupas injetadas com água (controle água) apresentaram elevada mortalidade, mostrando algum problema experimental durante a execução das injeções. Contudo, nas pupas injetadas com controle siRNA, a mortalidade não foi tão elevada e o desenvolvimento das pupas foi normal. As pupas injetadas com siRNA AsCHS apresentaram elevada mortalidade, sendo que na placa coletada após 72 h (dia 3) não havia pupas vivas. Além disso, foi possível verificar (durante 240 h - 10 dias) que as operárias estavam atacando as pupas e removendo a região do gáster delas (FIGURA 4.15), provavelmente por verificar algum desenvolvimento anormal delas.

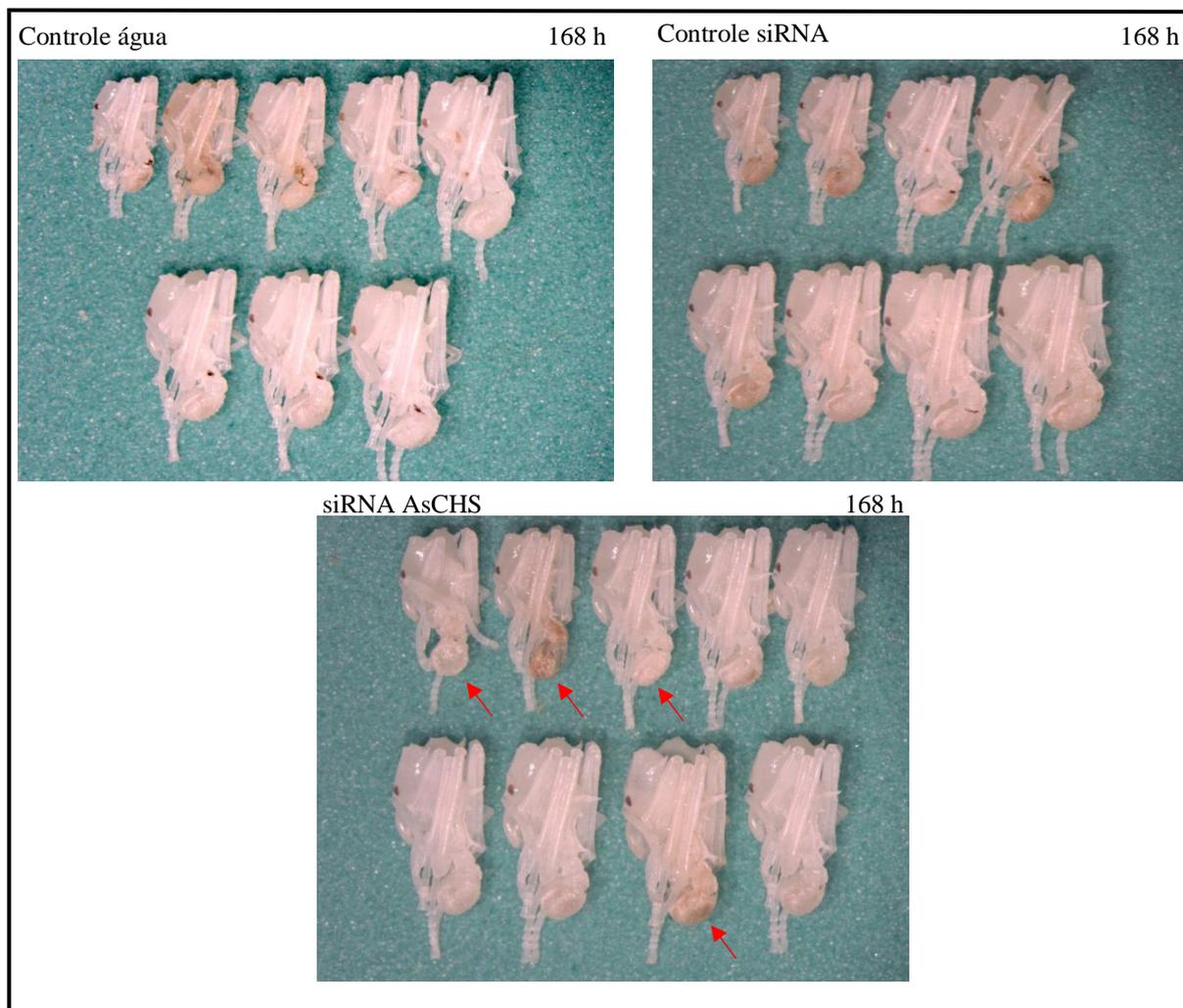
FIGURA 4.15: Análise fenotípica das pupas de *A. sexdens* injetadas com 50 ng de siRNA. Amostras injetadas com siRNA AsCHS, siRNA controle e controle água. O acompanhamento foi realizado por 240 h (10 dias) após a injeção, o tempo de coleta está identificado na figura.





O experimento com a injeção de 92 ng de siRNA-AsCHS foi acompanhado pela análise fenotípica e pela expressão gênica. A quantificação da expressão gênica mostrou não haver diferença significativa na expressão de CHS nas formigas injetadas com siRNA AsCHS (dados não mostrados). Contudo, a análise fenotípica mostrou que 168h (7 dias) após a injeção as pupas apresentaram alterações na cutícula na região do gáster, em relação as pupas dos grupos controle (FIGURA 4.16).

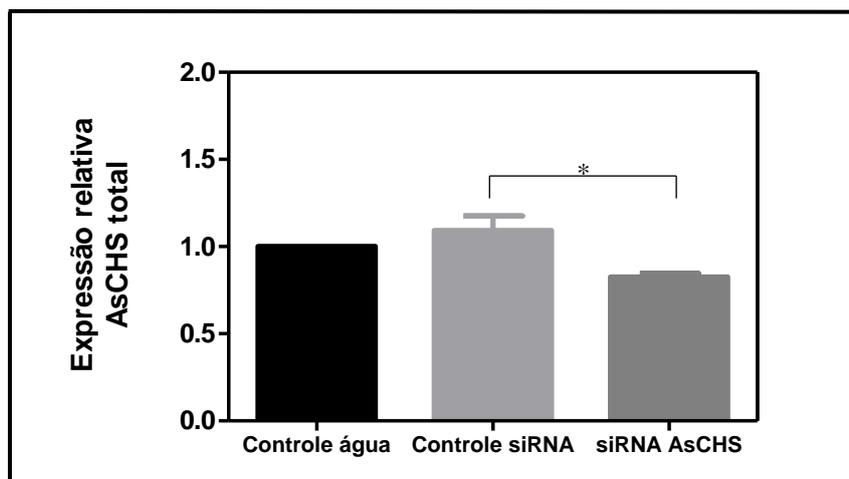
FIGURA 4.16: Análise fenotípica das pupas de *A. sexdens* injetadas com 92 ng de siRNA após 168 h (7 dias) da injeção. Amostras injetados com siRNA AsCHS, siRNA controle e controle água. As setas em vermelho apontam para a região dos exemplares com maior alteração no exoesqueleto.



O experimento com a injeção de 1000 ng não foi eficiente, pois não apresentou variação significativa, da expressão gênica da AsCHS dos tratados com siRNA AsCHS em relação aos controles, nem na mortalidade e nem na análise fenotípica (dados não mostrados). Nesse experimento, os siRNAs precisaram ser concentrados a partir da solução estoque e esse processo pode ter interferido na eficiência das moléculas de siRNA.

Baseado nos resultados obtidos sugerimos que uma concentração intermediária entre 92 e 1000 ng poderia ser interessante de ser analisada e 300 ng de siRNA foram injetados em cada pupa. Após 168 h (7 dias) do tratamento com siRNA foi verificado que as pupas do grupo tratado com siRNA AsCHS apresentaram uma redução de aproximadamente 18 % nos níveis de transcritos de AsCHS em relação aos controles (FIGURA 4.17), retornando aos níveis normais de expressão 240 h (10 dias) após o tratamento.

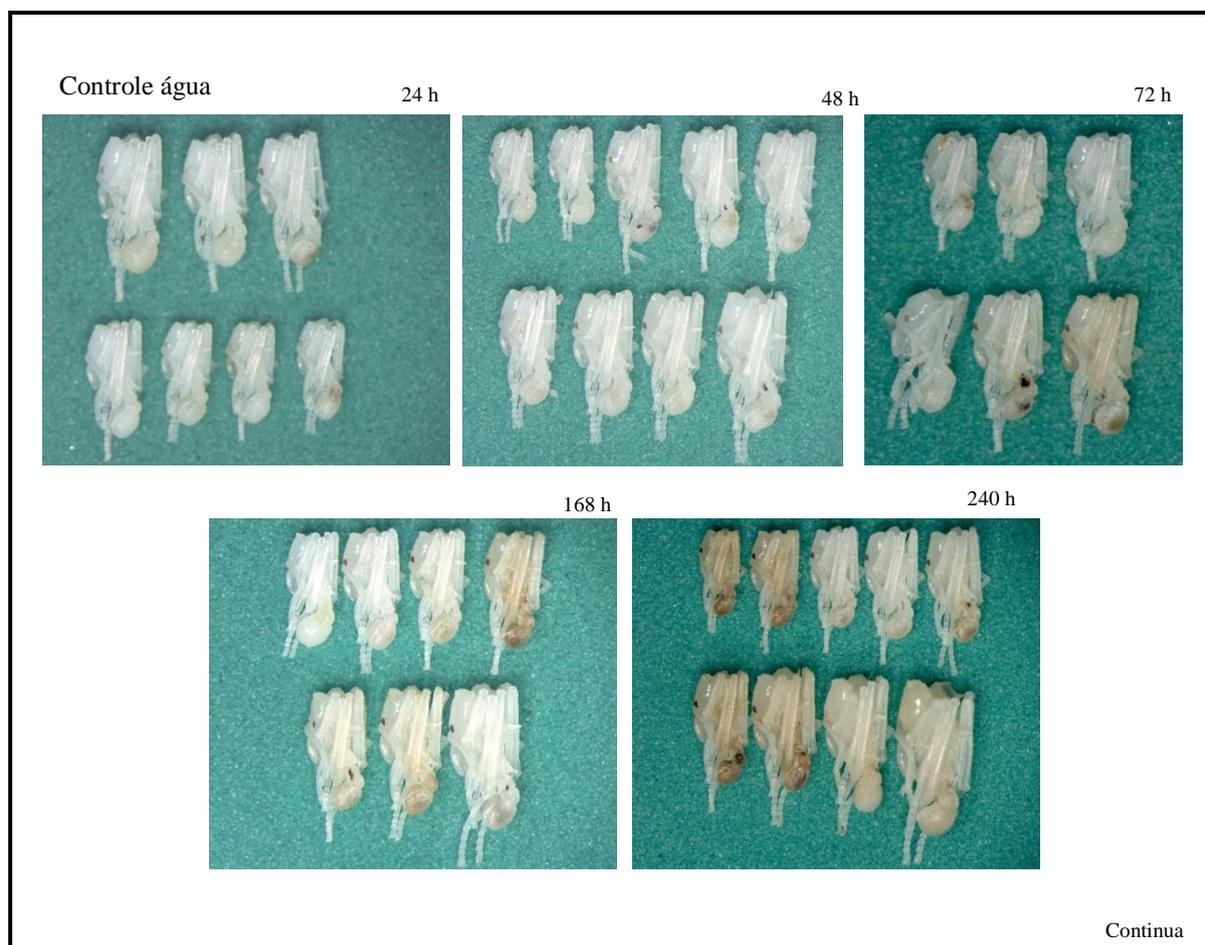
FIGURA 4.17: Análise da expressão gênica de AsCHS 168 h (7 dias) após a injeção com 300 ng de siRNA. As pupas foram injetadas com siRNA AsCHS e os controles são siRNA controle e controle água. Dados média \pm SEM e análise estatística one-way ANOVA, como pós-teste, teste múltiplo de comparação Tukey ($p < 0,05$).

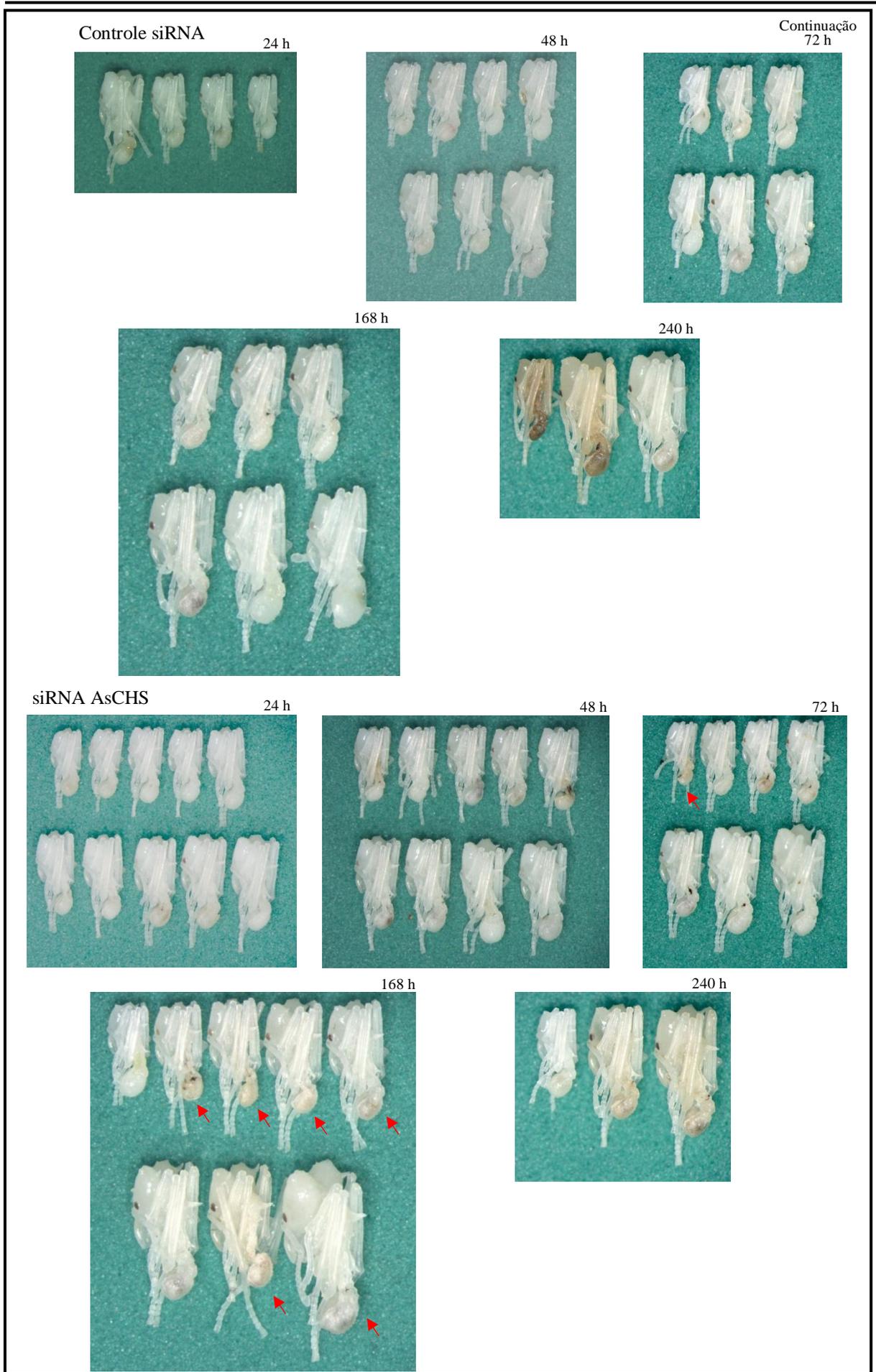


A análise fenotípica desse experimento (FIGURA 4.18) mostra que essa variação nos níveis de transcritos levou a alterações no exoesqueleto na região do gáster das pupas injetadas com siRNA AsCHS 168 h (7 dias) após a injeção, que não são observadas nos grupos controle. As alterações foram encolhimento, má formação na região do gáster e a presença de regiões mais esbranquiçadas na cutícula, diferentemente das amostras dos dois controles que apresentam uma cutícula mais homogênea. A presença de um ponto mais escuro

na região do gáster, presente em algumas pupas tratadas, corresponde à região onde foi realizada a injeção da solução contendo siRNA ou água.

FIGURA 4.18: Análise fenotípica das pupas de *A.sexdens* injetadas com 300 ng de siRNA. Amostras injetados com siRNA AsCHS, siRNA controle e controle água. O acompanhamento foi realizado por 240 h (10 dias) após a injeção. As setas em vermelho apontam para a região dos exemplares com maior alteração no exoesqueleto.





Observações semelhantes de má formação de exoesqueleto, afetando a ecdise e levando a fenótipos letais foram observados em ninfas de *R. prolixus* após a injeção de dsRNA RpCHS-1, com redução de 50 % nos níveis de transcritos de CHS-1 em ninfas após 15 dias do tratamento (MANSUR et al., 2014). Em *L. migratoria manilensis* o tratamento com dsRNA LmCHS1 em ninfas levou a fenótipos anormais com ecdise incompleta e redução de aproximadamente 80 % nos níveis de transcritos de LmCHS1 em comparação ao controle injetado com água (ZHANG, J. et al., 2010).

Em larvas de *Phthorimaea operculella*, uma traça do tubérculo da batata, três diferentes dsRNA foram utilizados para cada região da CHS-A (PhoCHSA) – região 5', central e região 3' e em três concentrações diferentes (50, 100 e 200 ng). Esses dsRNAs apresentaram eficácia diferente, sendo que o dsRNA da região 5' e a concentração de 200 ng foi a condição mais eficiente e após 48 h da injeção levou a uma redução de 16 vezes dos transcritos de mRNA da PhoCHSA. Após 96 h de injeção os níveis de transcritos retornaram aos níveis normais. As larvas tratadas com dsRNA PhoCHSA apresentaram maior mortalidade comparada com o controle, morfologia deformada, encolhimento dos corpos e o desenvolvimento mais lento (MOHAMMED et al., 2017)

Outros insetos como *T. castaneum* (ARAKANE et al., 2005) e *S. exigua* (TIAN et al., 2009) e *B. dorsalis* (YANG et al., 2013) quando tratados com dsRNA CHS-A também apresentaram alterações fenotípicas e na ecdise.

Uma outra observação é que, aparentemente, a coloração da cutícula do grupo siRNA AsCHS está levando mais tempo para iniciar a esclerotização da cutícula, levando a um desenvolvimento mais lento das pupas (FIGURA 4.18). Este resultado mostra uma menor estabilização da cutícula, que pode estar associada à dificuldade de incorporação dos compostos fenólicos necessários para a esclerotização da mesma. A incorporação desses compostos ocorre tanto entre

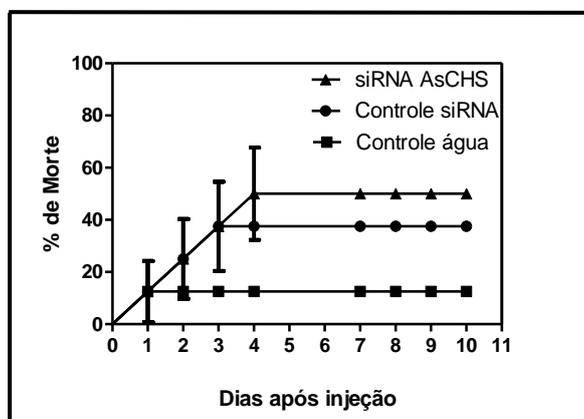
as proteínas cuticulares, como pode ligar covalentemente às estruturas de quitina (OMETTO et al., 2011).

A mortalidade das pupas tratadas foi acompanhada ao longo de 240 h (10 dias) após a injeção (FIGURA 4.19). No controle água foi observado em torno de 10 % de mortalidade, sendo que no primeiro dia após a injeção houve maior mortalidade. Esse fato mostra que a metodologia de injeção nas pupas foi eficiente e a mortalidade observada no controle pode estar relacionada tanto com a perfuração das pupas como com a identificação pelas operárias ao reintroduzi-las no micro formigueiro.

A injeção do controle siRNA mostrou mortalidade de 40 % (FIGURA 4.19), e era esperado que este grupo apresentasse mortalidade semelhante ao grupo controle água. Contudo, sabe-se que os controle dupla fita de RNA podem apresentar efeitos não específicos, causados pelo pareamento dos siRNAs à genes não-alvo (JACKSON et al., 2003). Este efeito é denominado como *off-target* e já foi observado em *A. mellifera*, o organismo modelo para estudos genéticos de insetos eusociais (JAROSCH e MORITZ, 2012; NUNES et al., 2013). Deste modo, ao injetar o controle siRNA (SIC001 – Sigma Aldrich) em *A. sexdens* pode ser observada uma elevada mortalidade, que pode estar relacionada ao efeito *off-target*, de modo que genes essenciais para a sobrevivência da formiga-cortadeira possam estar sofrendo alteração na expressão no devido ao siRNA controle utilizado. Entretanto, não há alteração na expressão do gene AsCHS no grupo controle siRNA quando comparado o outro grupo controle água (FIGURA 4.17).

A injeção de siRNA AsCHS levou à 50 % de mortalidade das pupas (FIGURA 4.19), mostrando a importância desse gene no desenvolvimento de formigas-cortadeiras.

FIGURA 4.19: Análise da mortalidade nas pupas ao longo de 240 h (10 dias) após a injeção de 300 ng de siRNA.



De um modo geral, pode-se concluir que as isoformas de AsCHSs identificadas estão relacionadas com a síntese de quitina na epiderme e que a redução no nível dos transcritos desse gene interfere na formação do exoesqueleto de *A. sexdens*. Assim, esse estudo contribuiu para ampliar o conhecimento biológico sobre essa formiga-cortadeira e mostrar a viabilidade de utilizar a técnica de RNAi neste inseto, o que é interessante nos estudos genômicos e validação de novos alvos para o controle de insetos.

As formigas-cortadeiras se destacam pela importância econômica em setores cruciais no Brasil, como na agricultura e silvicultura, causando perdas anuais significativas, o que é agravado pela falta de um sistema de manejo de qualidade e pelo número reduzido de compostos químicos eficazes no controle deste inseto. Adicionalmente, a indústria química mundial não prevê novos ativos químicos de uso genérico como pesticidas para os próximos dez anos, portanto, muito menos os específicos para as formigas-cortadeiras. Deste modo, a tendência mundial está voltada para novas tecnologias, o que pode ser o fim dos inseticidas químicos (BOREL, 2017).

Dentre essas novas tecnologias, a utilização de RNAi no controle de insetos vem se destacando, sendo que os primeiros trabalhos relatados datam de 2007 e parece ser um ramo promissor (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007). Contudo, as limitações com relação à aplicação dessa tecnologia em escala comercial ainda são a forma de entrega do dsRNA aos insetos e a grande variabilidade com relação à eficiência dos RNAi entre insetos de diferentes ordens (JOGA et al., 2016; KATOCH et al., 2013).

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Duas isoformas de CHSs de *A. sexdens* foram identificadas, desde a sequência que codifica para a síntese dessas enzimas à função delas ao longo do desenvolvimento das formigas. Ambas foram classificadas como CHS-A. A análise da função desse gene também confirmou essa classificação, uma vez que estão relacionadas com a síntese de quitina da epiderme. Além disso, foram descritos genes de referência confiáveis para a utilização da técnica de PCR em tempo real para essa espécie de formiga sob condições bióticas. Do nosso conhecimento, esse trabalho foi o primeiro a utilizar e mostrar a viabilidade de utilizar técnica de RNA de interferência em formigas-cortadeiras. Essa metodologia foi utilizada para análise genômica da função da CHS, mas também se mostra promissora para avaliação de outros potenciais alvos no controle das formigas-cortadeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C.; JENSEN, J. & ORNTOFT, T. "Normalization of real-time quantitative reverse transcription - PCR data : a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets". *Cancer Research*, **64**: 5245, 2004.

ANDERSEN, S. O. "Insect cuticular sclerotization: A review". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**(3): 166–178, 2010.

ANTWEB, Versão 7.3.1. 2018. Disponível em: <http://www.antweb.org> (Acessado em 25/01/2018).

APPLEBAUM, S. W.; EBSTEIN, R. P. & WYATT, G. R. "Dissociation of ribosomal ribonucleic acid from silkworm pupae by heat and dimethylsulfoxide : evidence for specific cleavage points". *Journal of Molecular Biology*, **21**(1), 29–41, 1966.

ARAKANE, Y.; HOGENKAMP, D. G.; ZHU, Y. C.; KRAMER, K. J.; SPECHT, C. A.; BEEMAN, R. W.; KANOST, M. R. & MUTHUKRISHNAN, S. "Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(3): 291–304, 2004.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; SPECHT, C. A.; TOMOYASU, Y.; LORENZEN, M. D.; KANOST, M. & BEEMAN, R. W. "The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix". *Insect Molecular Biology*, **14**(5): 453–463, 2005.

ARAKANE, Y.; SPECHT, C. A.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. & BEEMAN, R. W. "Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(10): 959–962, 2008.

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N. & PATEL, H. R. "Basic principles of real-time quantitative PCR". *Expert Rev. Mol. Diagn*, **5**(2): 209–219, 2005.

ASHFAQ, M.; SONODA, S. & TSUMUKI, H. "Developmental and tissue-specific expression of CHS1 from *Plutella xylostella* and its response to chlorfluazuron". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **89**(1): 20–30, 2007.

AYLWARD, F. O.; CURRIE, C. R. & SUEN, G. "The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutter ants". *Insects*, **3**(1): 41–61, 2012.

BARRETT, L. W.; FLETCHER, S. & WILTON, S. D. "Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements". Cellular and Molecular Life Sciences, **69**(21): 3613–3634, 2012.

BARROS RODRIGUES, T.; KHAJURIA, C.; WANG, H.; MATZ, N.; CUNHA CARDOSO, D.; VALICENTE, F. H.; ZHOU, X & SIEGFRIED, B. "Validation of reference housekeeping genes for gene expression studies in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). PloS One, **9**(10), 2014.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T. & ROBERTS, J. "Control of coleopteran insect pests through RNA interference". Nature Biotechnology, **25**(11): 1322–1326, 2007.

BOREL, B. "When the pesticides run out". Nature, **543**: 302–304, 2017.

BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R.; FISHER, B. L. & WARD, P. S. "Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants". Proc Natl Acad Sci U S A, **103**(48): 18172–18177, 2006.

BRITTO, J. S. DE; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. DE; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. COLA et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. International Journal of Reserch in Environmental Studies, **3**: 11–92, 2016.

BROWN JR., W. L. "Diversity of ants". IN: AGOSTI, D. et al. (Eds.). Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity (Smithsonia). Washington, 2000.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments". Clinical Chemistry, **55**(4), 2009.

CABIB, E.; SHAW, J. A.; MOL, P. C.; BOWERS, B. & CHOI, W. Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. IN: BRAMBL R. & MARZLUF G.A. (eds) Biochemistry and molecular biology. The mycota (A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research), vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg, 1996.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. & MUELLER, U. G. "Evolutionary history of th symbiosis between fungus-growing ants and their fungi". Science, **266**: 1691–1693, 1994.

CHEN, X.; YANG, X.; SENTHIL KUMAR, N.; TANG, B.; SUN, X.; QIU, X.; HU, J & ZHANG, W. "The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*:

molecular cloning and expression patterns". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**(5): 409–417, 2007.

CHENG, D.; ZHANG, Z.; HE, X. & LIANG, G. "Validation of reference genes in *Solenopsis invicta* in different developmental stages, castes and tissues". *PLoS ONE*, **8**(2): 1–6, 2013.

CHOI, M. Y.; VANDER MEER, R. K.; COY, M. & SCHARF, M. E. "Phenotypic impacts of PBAN RNA interference in an ant, *Solenopsis invicta*, and a moth, *Helicoverpa zea*". *Journal of Insect Physiology*, **58**(8): 1159–1165, 2012.

COUTINHO, P. M.; DELEURY, E.; DAVIES, G. J. & HENRISSAT, B. "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases". *Journal of Molecular Biology*, **328**(2): 307–317, 2003.

CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, 2009. United Nations Environment Programme (UNEP). The news POPs under the Stockholm Convention. Disponível em <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/%20Default.aspx> (Acessado em 15/01/2018).

DELLA-LUCIA, T. M. C. "Formigas-cortadeiras: da Biologia ao Manejo". Viçosa: Ed. UFV, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C. & FOWLER, H. G. "As formigas cortadeiras". In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). *As formigas cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C., & SOUZA, D. J. "Importância e história de vida das formigas- cortadeiras". In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). *Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo*. Ed. UFV, Viçosa, 2011.

DORAK, M. T. "Real-Time PCR". Taylor & Francis Group, 2006.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*, **391**(6669): 806–811, 1998.

FLEIGE, S. & PFAFFL, M. W. "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance". *Molecular Aspects of Medicine*, **27**(2–3): 126–139, 2006.

FORTI, L. C. & BOARETTO, M. A. *Formigas Cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle*. (UNESP), Botucatu, 1997.

FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; ANDRADE, A. P.; CASTELLANI, M. A. &

CALDATO, N. "Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas- cortadeiras". In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo. Ed. UFV, Viçosa, 2011.

FU, W.; XIE, W.; ZHANG, Z.; WANG, S.; WU, Q.; LIU, Y.; ZHOU, X.; ZHOU, X. & ZHANG, Y. "Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)". International Journal of Biological Sciences, **9**(8): 792–802, 2013.

GLASER, L. & BROWN, D. "The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*". J. Biol. Chem., **228**(9): 729–742, 1957.

GREENBERG, J. R. "Synthesis and properties of ribosomal RNA in *Drosophila*". Journal of Molecular Biology, **46**(1): 85–98, 1969.

GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C. & GUTIERREZ, L. "Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references". Journal of Experimental Botany, **60**(2): 487–493, 2009.

HOGENKAMP, D. G., ARAKANE, Y., ZIMOCH, L., MERZENDORFER, H., KRAMER, K. J., BEEMAN, R. W., KANOSTA, M. R.; SPECHTD, C. A. & MUTHUKRISHNAN, S. "Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **35**(6): 529–540, 2005.

HÖLLDOBLER, E. & WILSON, E. O. The ants. Harvard University, Cambridge, 1990.

HORŇÁKOVÁ, D.; MATOUŠKOVÁ, P.; KINDL, J.; VALTEROVÁ, I. & PICHOVÁ, I. "Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages". Analytical Biochemistry, **397**(1): 118–120, 2010.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S. & ZUMLA, A. "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations". Genes and Immunity, **6**(4), 279–284, 2005.

IMAI, T.; WATANABE, T.; YUI, T. & SUGIYAMA, J. "The directionality of chitin biosynthesis: a revisit". Biochemical Journal, **374**(3): 755–760, 2003.

JACKSON, A. L.; BARTZ, S. R.; SCHELTER, J.; KOBAYASHI, S. V.; BURCHARD, J.; MAO, M.; ... & LINSLEY, P. S. "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi". Nature Biotechnology, **21**(6): 635–638, 2003.

- JAROSCH, A. & MORITZ, R. F. A. "RNA interference in honeybees: Off-target effects caused by dsRNA". *Apidologie*, **43**(2): 128–138, 2012.
- JOGA, M. R.; ZOTTI, M. J.; SMAGGHE, G. & CHRISTIAENS, O. "RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far". *Frontiers in Physiology*, **7**: 1–14, 2016.
- KASPARI, M. & MAJER, J. D. "Using ants to monitor environmental change". In: AGOSTI, D., MAJER, J.D., ALONSO, L.E., SCHULTZ, R., *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, 2000.
- KATO, N.; MUELLER, C. R.; FUCHS, J. F.; WESSELY, V.; LAN, Q. & CHRISTENSEN, B. M. "Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **36**(1): 1–9, 2006.
- KATO, N.; MUELLER, C. R.; WESSELY, V.; LAN, Q. & CHRISTENSEN, B. M. "*Aedes aegypti* phosphohexomutases and uridine diphosphate-hexose pyrophosphorylases: comparison of primary sequences, substrate specificities and temporal transcription". *Insect Molecular Biology*, **14**(6): 615–624, 2005.
- KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N. & MURDOCK, L. L. "RNAi for insect control: current perspective and future challenges". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **171**(4): 847–873, 2013.
- KOZERA, B. & RAPACZ, M. "Reference genes in real-time PCR". *Journal of Applied Genetics*, **54**(4): 391–406, 2013.
- KUMAR, S., STECHER, G., & TAMURA, K. "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets". *Molecular Biology and Evolution*, **33**(7): 1870–1874, 2016.
- LEHANE, M. J. "Peritrophic matrix structure and function". *Annu. Rev. Entomol.*, **42**(100): 525–550, 1997.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method". *Methods*, **25**(4): 402–408, 2001.
- LOURENÇO, A. P.; ALINE, M.; CRISTINO, A. DOS S. & SIMÕES, Z. L. P. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee , *Apis mellifera* , by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, **39**: 372–385, 2008.
- LU, H. L.; VINSON, S. B. & PIETRANTONIO, P. V. "Oocyte membrane localization of vitellogenin receptor coincides with queen flying age, and receptor

silencing by RNAi disrupts egg formation in fire ant virgin queens". *FEBS Journal*, **276**(11): 3110–3123, 2009.

LU, Y.; YUAN, M.; GAO, X.; KANG, T.; ZHAN, S.; WAN, H. & LI, J. "Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)". *PLoS ONE*, **8**(7): 1–9, 2013.

MACHARIA, R. W.; OMBURA, F. L. & AROKO, E. O. "Insects' RNA profiling reveals absence of "hidden break" in 28S ribosomal RNA molecule of onion thrips, thrips tabaci". *Journal of Nucleic Acids*, **2015**: 1–8, 2015.

MAGELLAN, H.; DRUJON, T.; THELLEND, A. PIFFETEAU, A. & BECKER, H. F. "Expression in *E. coli* and characterization of the catalytic domain of *Botrytis cinerea* chitin synthase". *BMC Research Notes*, **3**(1): 299, 2010

MANSUR, J. F.; ALVARENGA, E. S. L.; FIGUEIRA-MANSUR, J.; FRANCO, T. A.; RAMOS, I. B.; MASUDA, H.; MELO, A. C. A & MOREIRA, M. F. "Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **51**(1): 110–121, 2014.

MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P. & CHEN, X. Y. "Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol". *Nature Biotechnology*, **25**(11): 1307–1313, 2007.

MARICONI, F. A. *As Saúvas*. Agronomica Ceres, Viçosa, 1970.

MAUE, L.; MEISSNER, D. & MERZENDORFER, H. "Purification of an active, oligomeric chitin synthase complex from the midgut of the tobacco hornworm". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**(9): 654–659, 2009.

MAYNE, M.; SHEPEL, P. N. & GEIGER, J. D. "Recovery of high-integrity mRNA from brains of rats killed by high-energy focused microwave irradiation". *Brain Research Protocols*, **4**(3): 295–302, 1999.

MEHDIABADI, N. J. & SCHULTZ, T. R. "Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae)". *Myrmecological News*, **13**, 37–55, 2009.

MERZENDORFER, H. "Insect chitin synthases : a review". *J Comp Physiol B*, **176**: 1–15, 2006.

MERZENDORFER, H. "The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences". *European Journal of Cell Biology*,

90(9): 759–769, 2011.

MERZENDORFER, H. "Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments". *Insect Science*, **20**: 121–138, 2013

MERZENDORFER, H. & ZIMOCH, L. "Review chitin metabolism in insects : structure , function and regulation of chitin synthases and chitinases". *The Journal of Experimental Biology*, **206**: 4393–4412, 2003.

MILLER, C. L.; DIGLISIC, S.; LEISTER, F.; WEBSTER, M. & YOLKEN, R. H. "Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue". *BioTechniques*, **36**(4): 628–633, 2004.

MOHAMMED, A. M. A.; DIAB, M. R.; ABDELSATTAR, M. & KHALIL, S. M. S. "Characterization and RNAi-mediated knockdown of Chitin Synthase A in the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*". *Scientific Reports*, **7**(1): 1–12, 2017.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A. & CALLE, Z. "Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control". *International Journal of Pest Management*, **58**(3): 225–247, 2012.

MOREIRA, A. C.; SANTOS, A. M.; CARNEIRO, R. L.; BUENO, O. C. & SOUZA, D. H. F. "Validation of reference genes in leaf-cutting ant *Atta sexdens* in different developmental stages and tissues". *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, **2**(2): 743–755, 2017.

MOUSSIAN, B. "Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**(5): 363–375, 2010.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M. & MALLOCH, D. "The origin of the Attine ant-fungus mutualism". *The Quarterly Review of Biology*, **76**(2): 169–197, 2001.

MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H.; ARAKANE, Y. & KRAMER, K. J. "Chitin Metabolism in Insects". *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, London, 2012.

NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C. & RAETANO, C. G. "Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity". *Journal of Pest Science*, **80**(1): 9–13, 2007.

NICKELE, M. A.; PIE, M. R.; REIS FILHO, W. & PENTEADO, S. DO R. C.

"Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras". Pesquisa Florestal Brasileira, **33**(73): 53–72, 2013.

NUNES, F. M. F.; ALEIXO, A. C.; BARCHUK, A. R.; BOMTORIN, A. D.; GROZINGER, C. M. & SIMÕES, Z. L. P. "Non-target effects of green fluorescent protein (GFP)-derived double-stranded RNA (dsRNA-GFP) used in honey bee RNA interference (RNAi) assays". Insects, **4**(1): 90–103, 2013.

OMETTO, L.; SHOEMAKER, D.; ROSS, K. G. & KELLER, L. "Evolution of gene expression in fire ants: the effects of developmental stage, caste, and species". Molecular Biology and Evolution, **28**(4): 1381–1392, 2011.

PAIM, R. M.; PEREIRA, M. H.; DI PONZIO, R.; RODRIGUES, J. O.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, N. F. & ARAÚJO, R. N. "Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR". BMC Research Notes, **5**(1): 128, 2012.

PEREIRA, T. C. (coord.). "Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2013.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. & NIELSEN, H. "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions". Nature Methods, **8**: 785, 2011.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations". Biotechnology Letters, **26**(6): 509–515, 2004.

PONTON, F.; CHAPUIS, M. P.; PERNICE, M.; SWORD, G. A. & SIMPSON, S. J. "Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*". Journal of Insect Physiology, **57**(6): 840–850, 2011.

QU, M. & YANG, Q. "A novel alternative splicing site of class A chitin synthase from the insect *Ostrinia furnacalis* gene organization, expression pattern and physiological significance". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **41**(12): 923–931, 2011.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W. & NITSCHKE, A. "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR". Biochemical and Biophysical Research Communications, **313**(4): 856–862, 2004.

RICHARDS, S., GIBBS, R. A., GERARDO, N. M., MORAN, N.,

NAKABACHI, A., STERN, D. et al. "Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*". PLoS Biology, **8**(2), 2010.

RICHMOND, T. "Higher plant cellulose synthases". Genome Biology, **1**(4), 2000.

SAMBROOK, J., & RUSSELL, D. W. "Molecular cloning: a laboratory manual. Molecular Cloning A Laboratory Manual" (3^a). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTIAGO, T. C.; PURVIS, I. J.; BETTANY, A. J. E. & BROWN, A. J. P. "The relationship between mRNA stability and length in *Saccharomyces cerevisiae*". Nucleic Acids Research, **14**(21): 8347–8360, 1986.

SCHNEIDER, M. O. "Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens* FOREL, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)". Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro, 2003.

SHAKEEL, M.; ZHU, X.; KANG, T.; WAN, H. & LI, J. "Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)". Journal of Asia-Pacific Entomology, **18**(2): 123–130, 2015.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. & THEIN, S. L. "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR". BMC Molecular Biology, **7**: 1–9, 2006.

SUEN, G.; TEILING, C.; LI, L.; HOLT, C.; ABOUHEIF, E.; BORNBERG-BAUER, E. et al. "The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle". PLoS Genetics, **7**(2), 2011.

TAKLE, G. W.; TOTH, I. K. & BRURBERG, M. B. "Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*". BMC Plant Biology, **7**: 1–9, 2007.

TELLAM, R. L.; VUOCOLO, T.; JOHNSON, S. E.; JARMEY, J. & PEARSON, R. D. "Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression". European Journal of Biochemistry, **267**: 6025–6043, 2000.

TENG, X.; ZHANG, Z.; HE, G.; YANG, L. & LI, F. "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects". J Insect Sci, **12**(60), 2012.

TERRA, W. R. "The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **47**(2): 47–61, 2001.

THELLIN, O. & ZORZI, W. "Housekeeping genes as internal standars: use and limits". *Journal of Biotechnology*, **75**: 291–295, 1999.

TIAN, H.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.; XIE, Q.; TANG, B. & ZHANG, W. "Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene". *PLoS ONE*, **4**(7): 1–13, 2009.

VALLES, S. M.; STRONG, C. A; BUSS, E. A & OI, D. H. "Non-enzymatic hydrolysis of RNA in workers of the ant *Nylanderia pubens*". *Journal of Insect Science*, **12**(146):1–8, 2012.

VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. "Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR". *Analytical Biochemistry*, **303**(1): 95–98, 2002b.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, I.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes". *Genome Biology*, **3**(7): 1–12, 2002a.

VIEIRA, A. S.; RAMALHO, M. O.; MARTINS, C.; MARTINS, V. G. & BUENO, O. C. "Microbial communities in different tissues of *Atta sexdens* leaf-cutting ants". *Current Microbiology*, **74**(10): 1216–1225, 2017.

VINCENT, J. F. V. & WEGST, U. G. K. "Design and mechanical properties of insect cuticle". *Arthropod Structure and Development*, **33**(3): 187–199, 2004.

WANG, E. "RNA amplification for successful gene profiling analysis". *Journal of Translational Medicine*, **3**(28): 1–11, 2005.

WANG, Y.; FAN, H. W.; HUANG, H. J.; XUE, J.; WU, W. J.; BAO, Y. Y.; XU, H. J.; ZHU, Z. R.; CHENG, J. A. & ZHANG, C. X. "Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **42**(9): 637–646, 2012.

WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L. & SCHULTZ, T. R. "The Evolution of Myrmicine Ants: Phylogeny and Biogeography of a Hyperdiverse Ant Clade (Hymenoptera: Formicidae)." *Systematic Entomology*, **40**(1): 61–81, 2015.

WEBER, N. A. "Gardening Ants: the attines". Philadelphia: American Philosophical Society, 1972.

WHEELER, G. C. & WHEELER, J. "Larvae of the social Hymenoptera". IN: HERMANN, H. R. (Ed.) *Social Insects*. v. 1. (Academic Press). New York, 1979.

WILSON, E. O. *Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (Hymenoptera:*

Formicidae: *Atta*). I. The Overall Pattern in *A. sexdens*. Behavioral Ecology and Sociobiology, **7**(2): 143–156, 1980.

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D. & WARMAN, G. R. "Why does insect RNA look degraded?". Journal of Insect Science (Online), **10**(159): 1–7, 2010.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L. & ZHANG, B. "miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs". Plant Molecular Biology, **80**(1): 75–84, 2012.

XU, G.; ZHANG, J.; LIU, J.; DING, Y.; FENG, Q.; SONG, Q. & ZHENG, S. "BmCHSA-2b , a Lepidoptera specific alternative splicing variant of epidermal chitin synthase, is required for pupal wing development in *Bombyx mori*". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **87**: 117–126, 2017.

YANG, W. J.; XU, K. K.; CONG, L. & WANG, J.J. "Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*". International Journal of Biological Sciences, **9**(4): 331–342, 2013.

YEAGER, A. R. & FINNEY, N. S. "The first direct evaluation of the two-active site mechanism for chitin synthase". Journal of Organic Chemistry, **69**(3): 613–618, 2004.

ZHANG, J.; LIU, X.; ZHANG, J.; LI, D.; SUN, Y.; GUO, Y.; MA, E. & ZHU, K. Y. "Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen)". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **40**(11): 824–833, 2010.

ZHANG, S.; AN, S.; LI, Z.; WU, F.; YANG, Q.; LIU, Y.; CAO, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Q. & LIU, X. "Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)". Gene, **555**(2): 393–402, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; PARK, Y. & ZHU, K. Y. "Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*". Insect Biochem Mol Biol., **42**(9): 674–682, 2012.

ZHU, K. Y.; MERZENDORFER, H.; ZHANG, W.; ZHANG, J. & MUTHUKRISHNAN, S. "Biosynthesis, turnover and functions of chitin in insects". Annual Review of Entomology, **61**: 177–196, 2016.

ZHU, X.; YUAN, M.; SHAKEEL, M.; ZHANG, Y.; WANG, S.; WANG, X.; ZHAN, S.; KANG, T. & LI, J. "Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua*

(Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)". PLoS ONE, **9**(1), 2014.

ZHU, Y. C.; SPECHT, C. A.; DITTMER, N. T.; MUTHUKRISHNAN, S.; KANOST, M. R. & KRAMER, K. J. "Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **32**: 1497–1506, 2002.

ZHUO, W.; CHU, F.; KONG, L.; TAO, H.; SIMA, Y. & XU, S. "Chitin synthase B: A midgut-specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *Bombyx mori* larvae". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **85**(1): 36–47, 2014.

ZHUO, W.; FANG, Y.; KONG, L.; LI, X.; SIMA, Y. & XU, S. "Chitin synthase A: A novel epidermal development regulation gene in the larvae of *Bombyx mori*". Molecular Biology Reports, **41**(7), 4177–4186, 2014.

Apêndice



APÊNDICE: Alinhamento de sequências parcial do genoma de *T. zeteki* (KQ982655.1), o CDS da Tz_CHS8 (KYQ52765.1) e AsCHSlarvapupa e AsCHSoperaria utilizando o Clustal Omega. As sequências estão numeradas e os éxons 1 a 18 estão identificados. Em branco sombreado, os códons de início e de parada. Em vermelho a região 5'UTR. Em verde a região 3'UTR. Em azul a região predita como promotora da transcrição para a CHS de *T. zeteki* e AsCHSlarvapupa e também para AsCHSoperária (éxon 5). A marcação tracejada mostra a região de corte na sequência do genoma, como pode ser identificado pela numeração do mesmo.

KQ982655.1	CTGTCTCTAGAAAAGGTT TTCTAACAGATAAAAAAGCGAAGAAAACGCTGATTTTCCATC	37860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATTTAAT GACTTCAAAATCGCGACTCCGCGCTGTAGGATCCTAAGAAATACACCAAGTCA	37920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAAGAAAGTTAAATGACTTTTATTCTGACGTTATGAAAGTCAAATGATAATTTTGGTT	37980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ACAAAATTTAAGTGTATTGACTTTAAGAATCAAATTAAGTAATTTTGATTTTTGTT	38040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GATTCTTGTTGTTTCTTGGGATGGAGAACGATGGTGGCCCGCGCGACTCCGCGTCTCTC	38100
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GCGCGTTCAAATCTCCGACTTTTGCTTCGCCTCGGCTCTCGCTCTCTACCTAC	38160
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TCTCTCGTGAAAGTACTCCACTGATCGGCAGGCAGGGGAGGCCCTCCTCGGAACTCGC	38220
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CTTCGGTACCTTGGTAGACGATGCCACGGCAGTCGTCGTTTCGGCCGACGTTACCTCGAC	38280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TCCGCTTTACCTGACCAATCTCGGCATCTTGC GCGATTTCGTCGCCGTCGTCGTCGTC	38340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTCGCGAAAATTTTCTCGCCGTCGGGAATACCAGGTGACATTTACGGCACCCACGTTGTT	38400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	CGCGATCGACGTAAACGGATATTGCACAAGAGAGAAGAAAAAAGGAGAGAGAGAGAGAG	38460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGTGCAGAAAGTACAGAACTCAGGCCAAGTCT	38520
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CATCGATCGACTTGAGCATCCCAGTGAAGTGGATCCAGGAAACGGATACGACCCCTTCGGT	38580
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----GTGAAGTGGATCCAGGAAACGGATGTAATCCTTCGGT	37
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTCATCCGTCGACTATGATCACCCGCGTCGAGAAGATATCGAGGATAAGGATTCAGTAGA	38640
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	TTCATCCGTCGACTATGATCACCCGCGTCAAGAAGATATCAAGGATAAGAATTCAGTAGA	97
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAGCGAGTCGCCAATCAAGCAAGTATGAACTACTTATTGTCCCTTCTGTCTTTTCA	38700
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	AAGCGAATCGCTTAATCAAGCAA----- 120	0
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GCAATTACCGCATCAGTGCCAGCTTCATGTTTACTAACACTTGAGCGTCATTGAGACTCA	38760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	120
AsCHSoperaria	-----	0
Continua -----		
KQ982655.1	AAAACTTTTCATTTTTTACACATTCTTAACACTCCCCGTTATAACAATTCGATTCGTTA	47820
Tz_CHS8 (CDS)	-----	0
AsCHSlarvapupa	-----	120
AsCHSoperaria	-----	0
Éxon 1		
KQ982655.1	AAAATAAGAGAGCTGGAAATAAGATTGAGATAAATTGCCAATTTATAGAATGGCGAAGAA	47880
Tz_CHS8 (CDS)	-----ATCGCGAAGAA	11
AsCHSlarvapupa	-----ATCGCAAAAAA	132
AsCHSoperaria	-----	0
Éxon 1		
KQ982655.1	CCAACATCAGAATGGCATAATACCGGGAGGTGGCATGGTGTCCGGCCCGGATGATTTTTC	47940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	71
AsCHSlarvapupa	CCAACATCAGAATGGCATAATACCGAGAGCTGGCATAGTGTCCGGTCCGGATGATTTTTC	192
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GGACGGTGAAGCACTCCTCTGACTCAGGACTATGGTGAAGGTATGACGTATCATCATC	48000
Tz_CHS8 (CDS)	GGACGGTGAAGCACTCCTCTGACTCAGGACTATGGTGAAGGTATGACGTATCATCATC	111
AsCHSlarvapupa	GGATGGTGAAGCACTCCTCTGACTCAGGACTATG---GA-----	229
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATTAGTAATTTCTTCTCTCTCCAAAATTTCCAAAATTTCAAGGATGAAATAAAATTAAT	48060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	111
AsCHSlarvapupa	-----	229
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAAATAGAAAACCGAAACAAAAAGATAAAAAGATATTTCTTCTAATTTGCAATTTTCTG	48120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	111
AsCHSlarvapupa	-----	229
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AATCGTTACTTATTGAAATAATTTATTTTAGATTACATTCGATTATTCAAATTA AAAAGC	48180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	111
AsCHSlarvapupa	-----	229
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATGAAATCTCTTCTTTTTCCCTCGAGAAGGTTTAAAGAAATAAGAACTTACATAATGT	48240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	111
AsCHSlarvapupa	-----	229
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	TGATTATAAATGTTTATTTGTTAATTAATGATATTTTCGATAAACGACGATCAATTTGAAC	48300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	111
AsCHSlarvapura	-----	229
AsCHSoperaria	-----	0
Exon 2		
KQ982655.1	GTAGCCAACGCACGATTGTTCGAGACAAAAGGATGGGACGTGTTCCGGAATCCGCCAATGA	48360
Tz_CHS8 (CDS)	--AGCCAACGCACGATTGTTCGAGACAAAAGGATGGGACGTGTTCCGGAATCCGCCAATGA	169
AsCHSlarvapura	--AGCCAACGCACGATTGTTCGAAACAAAAGGATGGGACGTATTCGGAATCCGCCAATGA	287
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AGACCGACTCGAACTCGGGTTCATGGCAAACAGAAATGCCCTAGAGAGGATGGTACAAG	48420
Tz_CHS8 (CDS)	AGACCGACTCGAACTCGGGTTCATGGCAAACAGAAATGCCCTAGAGAGGATGGTACAAG	229
AsCHSlarvapura	AGACCGACTCGAACTCGGGTTCATGGCAAACAGAAATGTCCTAGAGAGGATGGTGCAGG	347
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TAATCAAGGTCATCGTCTACCTGCTTGTGTTTGTTCATAGTGTGGGAAGCGGTGTAATTG	48480
Tz_CHS8 (CDS)	TAATCAAGGTCATCGTCTACCTGCTTGTGTTTGTTCATAGTGTGGGAAGCGGTGTAATTG	289
AsCHSlarvapura	TAATCAAGGTCACCGTCTATCTGCTTGTGTTTTCATCATAAGTGTGGGAAGTGGTGAATTG	407
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CCAAGGCACGATTCTTTCATGACGTCGCAGCTACGACAAGACAGAAAAATGCTCTACT	48540
Tz_CHS8 (CDS)	CCAAGGCACGATTCTTTCATGACGTCGCAGCTACGACAAGACAGAAAAATGCTCTACT	349
AsCHSlarvapura	CCAAGGCACGATTCTTTCATGACGTCACAACCTGCGACAAGATAGAAAAATGCTCTACT	467
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GCAACAGGCAATTAGGTGAGACTTAAATATAAGTGTATCCTGGCGTAAAACTTAATTT	48600
Tz_CHS8 (CDS)	GCAACAGGCAATT-----	362
AsCHSlarvapura	GCAATAGGCAATT-----	480
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GTATGATTCAAATCAATAAAGTAAATAATCCAGTTCTGACCAATTCAAATTAACATAAAGA	48660
Tz_CHS8 (CDS)	-----	362
AsCHSlarvapura	-----	480
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTGTGTATTACAAACTATAAATTTTACTTTTAAATTACAAAAGAGCAGAAGAAAAAGAGAA	48720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	362
AsCHSlarvapura	-----	480
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAAGAGATATTTGTAATATCCCAATAATTTAATCTTAATAATTATTATCGCAACTTT	48780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	362
AsCHSlarvapura	-----	480
AsCHSoperaria	-----	0
Exon 3		
KQ982655.1	TCCTTGCAGATCGAGAGAACCAGTACATAGTAACACTGCCCGAGGAGGAGGATCGCTT	48840
Tz_CHS8 (CDS)	-----AGATCGAGAGAACCAGTACATAGTAACACTGCCCGAGGAGGAGGATCGCTT	415
AsCHSlarvapura	-----AGATCGGGAGAACCAGTACATAGTAACACTGCCCGAGGAGGAGGATCGCTT	533
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GGATATGGTGCATAATAAATTCGTTTCACAGTGCCGGAATTCGGCACGCTGGTACGCAGCA	48900
Tz_CHS8 (CDS)	GGATATGGTGCATAATAAATTCGTTTCACAGTGCCGGAATTCGGCACGCTGGTACGCAGCA	475
AsCHSlarvapura	GGATATGGTGCATAATAATTCGCGTTTCACAGTGCCGGAATTCGGCACGCTAGTACGCAGCA	593
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTTCGATGTGTATCTTCAAGTCTGGAAGAAGCCGCAATTGATGCACCTTCTCGTGGTTT	48960
Tz_CHS8 (CDS)	TTTCGATGTGTATCTTCAAGTCTGGAAGAAGCCGCAATTGATGCACCTTCTCGTGGTTT	535
AsCHSlarvapura	TTTCGATGTGTATCTTCAAGTCTGGAAGAAGCCGCAATTCGATGCACCTTCTCGTGGTTT	653
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CCATCATGGAGACATTTACGCTGGTGGGCTGGCTTTGATGTTCCCTGCGGTGCTTCCGG	49020
Tz_CHS8 (CDS)	CCATCATGGAGACATTTACGCTGGTGGGCTGGCTTTGATGTTCCCTGCGGTGCTTCCGG	595
AsCHSlarvapura	CCATCATGGAGACATTTTCATGTTGGTGGGCTGGCTTTGATGTTCCCTGCGGTGCTTCCGG	713
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AACTGGACGTCGTAAAAGGAGCGATGCTGACCAACTGCGTGTGCTTCGTTCCCGGATTGC	49080
Tz_CHS8 (CDS)	AACTGGACGTCGTAAAAGGAGCGATGCTGACCAACTGCGTGTGCTTCGTTCCCGGATTGC	655
AsCHSlarvapura	AACTGGACGTCGTAAAAGGAGCGATGCTGACCAACTGCGTATGCTTCGTTCCCGGATTGC	773
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TCGGTAATTTCAATCCAATTCATCAATTTTCATTCGATTTACCTCGTTCAACTCGAAC	49140
Tz_CHS8 (CDS)	TC-----	657
AsCHSlarvapura	TC-----	775
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	GCACAGAAAGAACGATTTTGCTGAAGTATCTAAAAATTTAGCTCACAAATCTGAAAAATA	49200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTTGATTAGACAATCCAAATATTGCGTTGGAATCTCAAGCATAATGATCAATGTTGCAAA	49260
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAGTTTGAATTTAGCAAAATAGTTGAGCATCCTATGTATTTATCTCTTTGTGTGGTC	49320
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CAAACAAAATTTATTTTCAGAACCACTAAATTTTTCAGATATTTTAGCAAAACCATGAAT	49380
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ACATAAGAATTACATAAGAACTATAATATATAAAAAGTAAGAGAAATAAAGAAAATG	49440
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TCAATAAGCAAGAGAGGGAGTGAATATTTAAACAAAATAAAAATAAATTTTAAATCTAAT	49500
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CTATTACATTATTTGCATATTAATATATAATAATGCGTTAATAATAATGCCAACAGTGTA	49560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTACATGTTATCTAGTTCTGAATACTTGATATTTAAATTCGAAAAATGGGGACACTTGATC	49620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTGTTTTCAATCGCGATTGCTCGACTTTCGCGTTCGATTTTCCACGGTTCCGTATTGCC	49680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GAGCGAATAATCATGAAAGTAGTGATTACACGAGAAATAGGTGAAGTGAACACGCTACAT	49740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	657
AsCHSlarvapupa	-----	775
AsCHSoperaria	-----	0
Éxon 4		
KQ982655.1	GCATTCGCAGGCCTACTTTCCCGCAATAAAAAGTAAAGACGATTCCAAACGATTTCGTCTC	49800
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGCCTACTTTCCCGCAATAAAAAGTAAAGACGATTCCAAACGATTTCGTCTC	708
AsCHSlarvapupa	-----GGCCTACTTTCTCGCAATAAAAAGTAAAGACGATTCCAAACGATTTCGTCTC	826
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GTTCTCGTCGATATCGCCGCTCTGGCAGCACAAAGCGACCAGCTTCGTCTTTGGCCCTTC	49860
Tz_CHS8 (CDS)	-----GTTCTCGTCGATATCGCCGCTCTGGCAGCACAAAGCGACCAGCTTCGTCTTTGGCCCTTC	768
AsCHSlarvapupa	-----GTTCTCGTCGATATCGCCGCTCTGGCCGACAAAGCGACCAGCTTCGTCTTTGGCCCTTC	886
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CTGGACAGTTCAAGACGATCCTTATGGCTGATTCGCCCTTACGCTGATTCTCGTCTCCTGC	49920
Tz_CHS8 (CDS)	-----CTGGACAGTTCAAGACGATCCTTATGGCTGATTCGCCCTTACGCTGATTCTCGTCTCCTGC	828
AsCHSlarvapupa	-----CTAGACAGCTCAAGACGATCCTTATGGCTGATTCGCCCTTACGCTGATTCTCATCTCCTGT	946
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GGTTGGTGGGAAAATTACGTCTCCATGCAGAGCAGAATCGGTGAGTTCCTAATCCTTTA	49980
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGTTGGTGGGAAAATTACGTCTCCATGCAGAGCAGAATC-----	867
AsCHSlarvapupa	-----GGCTGGTGGGAAAATTACGTCTCTATGCAGAGCAGAATC-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CGGTCCAAATCTTTTATTTCAAATTTAAATAAAAATATAAAAAGAAAGTTTTAAATCT	50040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapupa	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	TTTGTAGAGAATACTGAGCTTCTATAATGACTTAAATAATTACCCTGGAAAAACATTTTTT	50100
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GTATAATTTGTTAGAATTTTATATAAAATTCAGAATGTTTGAATAATTTATAATTTTTTA	50160
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GAACATTTTATCAGGTTTTTATACAAATTGAAACACTTTTTAGAAAGTTCAGAGAAAGTCTA	50220
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	CATCTTTTCTCAAATTTTTCATGTATATGAATTTTCAAATATAATAATATCTAAAAATTT	50280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTCAGATTTTTATTCCATAATTTTAAATAAAATGTTATAAAATTAATTTATCAAATTCAA	50340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATAATATCATGGTTGGCTCACAACAACCTTTTTAAACATCTTTTAAACATCTTTCTTTTA	50400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	867
AsCHSlarvapura	-----	985
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TATTTCTGTCGATTTCTTTTCGTAGGTTTAAATAGATCGCTCGGCAGAGTGAAGAAGGAG	50460
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGTTTAAATAGATCGCTCGGCAGAGTGAAGAAGGAG	903
AsCHSlarvapura	-----GGTTTAAATCAGATCGCTCGGCAGAGTGAAGAAGGAG	1021
AsCHSoperaria	-----	0
	Éxon 5	
KQ982655.1	ATGCAATTAACGCGTTACTTACCTACATGTTGGTGTCGGTCTGGAAGATCGTGGCATTTC	50520
Tz_CHS8 (CDS)	ATGCAATTAACGCGTTACTTACCTACATGTTGGTGTCGGTCTGGAAGATCGTGGCATTTC	963
AsCHSlarvapura	ATGCGATTGACGCGATACTTACTTATATGTTAGTGTCCGCTGGAAGATCATGGCATTTC	1081
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTCATCAGCTCGATTCTGATACTACATATCAAAGGGGAGACTATCGGGCATCTCTTCTCC	50580
Tz_CHS8 (CDS)	TTCATCAGCTCGATTCTGATACTACATATCAAAGGGGAGACTATCGGGCATCTCTTCTCC	1023
AsCHSlarvapura	TTCATCAGCTCGGTACTGATATTGCATATCAAAGGAGATAATGTGCGGCATCTCTTCTCC	1141
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATGTTGAGCAGTGCCTTCGGTGACCATAAGATCACGGTTACTTCCATCAAGTCGATAAAC	50640
Tz_CHS8 (CDS)	ATGTTGAGCAGTGCCTTCGGTGACCATAAGATCACGGTTACTTCCATCAAGTCGATAAAC	1083
AsCHSlarvapura	ATGTTGAGCAGTGCCTTCGGCGATCATAAGATCACAGTCACTTCCATCAAGTCGATAAAC	1201
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AGCGGCAATTTGCCGATCTCTCGGAGATTTTAA ACGGGCGACATCACCGAGGTCGTTAAC	50700
Tz_CHS8 (CDS)	AGCGGCAATTTGCCGATCTCTCGGAGATTTTAAACGGGCGACATCACCGAGGTCGTTAAC	1143
AsCHSlarvapura	AGCGGCAGTTTGCCCGATCTCTCAGAGATTCTGACGGGCGACATTATCGAGGTCGTTAAC	1261
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GCCGACTTCAACACGCCCATTTATGTCCTCTGCTACAAATCACTGGCGTTACTTCGCC	50760
Tz_CHS8 (CDS)	GCCGACTTCAACACGCCCATTTATGTCCTCTGCTACAAATCACTGGCGTTACTTCGCC	1203
AsCHSlarvapura	GCCGACTTCAACACGCCCATTTATGTCCTCTGCTGCAAAATCGTGGCGTTACTTCGCC	1321
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TACGTATTTGGTGAGCGAATCATGAGATTGAAACTAACCTGGAGAAAGATAAGAATAATA	50820
Tz_CHS8 (CDS)	TACGTATTT-----	1212
AsCHSlarvapura	TACGTATTT-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TAATCATAAAAATAACAATAAAATTTGCGATTTATATAATCATAGCTCTTGTCAAATAA	50880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	GTACATAAGCTATACAGTTGAAAAATTCATGTTAAATGTAAAAATTAATACAAAAACACT	50940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GACACAATTTGTAAGCAATCGTGAAAGCATAATTTCTCGATAAAAATGACACGTACAATT	51000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AACACGTTTTAATAAAAATAAAATTTATATATTAATTAACATATTATGCATTTATTTTT	51060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AAATTTACATTTTAAAATACATTATTTTATGTTAATGTTATTTACTTATAAATGTGTT	51120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATTTTTAAACTAAGTGTTCACCTTAGCGCTCACAACGTTAGCGAGTATTATTTATCCAAA	51180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TGAAATGCAGCTTAAAAATGTTGAATATCAATTAATCAATTTAATACAAAATATTCAA	51240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATAACAAAATCATATTACATTAATTAACATTCTAATATGTTAAAAATGTAAAAAAATG	51300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTAGCGCTGCGAGGATCGTTTTAACACGAATACAAAATTAATGTGCGCTGAAAATGTT	51360
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTTACTGTATATAATATTTTGATCATCTTAAGAGGACACTATTTAATTAATAATTCGAATT	51420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATACATGTAGTAAAATTCATAGTTGAAATAACACGGAAAAATATGGGTTAACCGGGTT	51480
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AACTGTTTGATTAACAAGAGATTCTCTATTGAACTCGTTGAAGATATTTTTTAATTAAT	51540
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1212
AsCHSlarvapura	-----	1330
AsCHSoperaria	-----	0
Éxon 6		
KQ982655.1	TAATGTTTAAACATCGTTTCATCATCCAGGCAAGTTTGCCTGTAAGATCCTGATCCAAGGC	51600
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGCAAGTTTGCCTGTAAGATCCTGATCCAAGGC	1245
AsCHSlarvapura	-----GGCAAGTTTGCATGCAAGATCCTGATCCAAGGC	1363
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TTCAGTTACGCGTTCCCGGTGAATCTCACGATACCGGTGTCGATCTCGCTTCTGATCGCC	51660
Tz_CHS8 (CDS)	TTCAGTTACGCGTTCCCGGTGAATCTCACGATACCGGTGTCGATCTCGCTTCTGATCGCC	1305
AsCHSlarvapura	TTCAGTTACGCGTTCCCGGTGAATCTCACGATACCGGTGTCGATCTCGCTTCTGATCGCC	1423
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GCGTGTGGTCTGCGCAACAACGATCCATGTTTTTCCACGGCACGGTACCGGATTATCTG	51720
Tz_CHS8 (CDS)	GCGTGTGGTCTGCGCAACAACGATCCATGTTTTTCCACGGCACGGTACCGGATTATCTG	1365
AsCHSlarvapura	GCATGTGGTCTTCCGCAACAACGATCCATGTTTTTCCATGGCACAGTACCGGATTATCTG	1483
AsCHSoperaria	-----	0

KQ982655.1	TTTTACGAGTCGCCACTGCCAACTTCCTCAATGACTTCGTGTCGAAGCAGTATGCCTGG	51780
Tz_CHS8 (CDS)	TTTTACGAGTCGCCACTGCCAACTTCCTCAATGACTTCGTGTCGAAGCAGTATGCCTGG	1425
AsCHSlarvapura	TTTTATGAGTCGCCATTGCCAACTTCCTCAATGACTTCGTGTCGAACAATATGCCTGG	1543
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	GTGTGGTTGCTGTGGCTGTGTGCGAGACCTGGATCACCTACACATCTGGACGCCAAA	51840
Tz_CHS8 (CDS)	GTGTGGTTGCTGTGGCTGTGTGCGAGACCTGGATCACCTACACATCTGGACGCCAAA	1485
AsCHSlarvapura	GTGTGGTTGTTGTGGCTGTGTGCGAGACCTGGATCACCTGCATATCTGGACGCCAAA	1603
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TGCGAGCGTCTCGCTTCCACGGAGAAGCTCTTCGTGTCGACCGATGTACGACTCTCTACTG	51900
Tz_CHS8 (CDS)	TGCGAGCGTCTCGCTTCCACGGAGAAGCTCTTCGTGTCGACCGATGTACGACTCTCTACTG	1545
AsCHSlarvapura	TGCGAGCGTCTCGCGCCACAGAGAAGCTCTTCGTGTCGCGGATGTATGACTCTCTACTG	1663
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	ATCGACCAGTCGATGGGCCTCAATCGGAGAAGGGACGATCAACCGGAAGTCAAAGTCGAA	51960
Tz_CHS8 (CDS)	ATCGACCAGTCGATGGGCCTCAATCGGAGAAGGGACGATCAACCGGAAGTCAAAGTCGAA	1605
AsCHSlarvapura	ATCGATCAGTCGATGGGCCTCAACCGAAGAAGAGATGATCAACCGAAGTCAAAGTCGAA	1723
AsCHSoperaria	-----	0
Íntron 6		
KQ982655.1	GTAAGTATCTTCAGTTAGAAATGGCTTTGAATAAAATTTGCGAAATAAAATAAATTTATGCA	52020
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1605
AsCHSlarvapura	-----	1723
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TGTTAATTCTTTAATTTCTCAGTTAAAATATCTTTTATTAAATATCTTAAATGAAGATC	52080
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1605
AsCHSlarvapura	-----	1723
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TGAAGAATTTTAAATAAGGATATCTTAAATTTTTTTAATATCTTAAATAAGGATTTTTT	52140
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1605
AsCHSlarvapura	-----	1723
AsCHSoperaria	-----	0
Íntron 6		
KQ982655.1	AAATAAAAAATATAAAAAATATTAACCTTGAAAATATGTTAGTTCTTAAATTAATCTATTCTG	52200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1605
AsCHSlarvapura	-----	1723
AsCHSoperaria	-----	0
Éxon 7		
KQ982655.1	GGTTGATCGACAGGATCTGGCAGAAATAGAGAAGGAGAAAGGCGACGGTGACTACGAGAC	52260
Tz_CHS8 (CDS)	-----GATCTGGCAGAAATAGAGAAGGAGAAAGGCGACGGTGACTACGAGAC	1652
AsCHSlarvapura	-----GATCTGGCAGAAATAGAGAAGGAGAAAGGCGACGGTGACTACGAGAC	1770
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	AATCTATGAGCAGACGGATGGTTCAACCACCTCCATCCGCGGTGAAGAGCAGTGATCA	52320
Tz_CHS8 (CDS)	AATCTATGAGCAGACGGATGGTTCAACCACCTCCATCCGCGGTGAAGAGCAGTGATCA	1712
AsCHSlarvapura	AATCTATGAACAGACGGATGGTTCAACCACCTCCATCTGTGGTGAAGAGCAGCGATCA	1830
AsCHSoperaria	-----	0
KQ982655.1	TGTAAC TAGGATCTACGCTTGCCTACCATGTGGCATGAGAAATAAGGAAGAGATGATGGA	52380
Tz_CHS8 (CDS)	TGTAAC TAGGATCTACGCTTGCCTACCATGTGGCATGAGAAATAAGGAAGAGATGATGGA	1772
AsCHSlarvapura	TGTAAC TAGGATCTATGCTTGCCTACCATGTGGCATGAAAAATAAGGAGGAAATGATGGA	1890
AsCHSoperaria	-----TGCCTGAGCATGAAAAATAAGGAGGAAATGATGGA	41

KQ982655.1	ATTCTTGAAGATATCCTACGCTGGACGAGGACAGTGCCTGCGCGGCGGTCGCCAGAA	52440
Tz_CHS8 (CDS)	ATTCTTGAAGATATCCTACGCTGGACGAGGACAGTGCCTGCGCGGCGGTCGCCAGAA	1832
AsCHSlarvapura	GTTTTTGAAGATATCTGCTGCTGGACGAGGACCAATGCGCGGCGGTCGCCAGAA	1950
AsCHSoperaria	GTTTTTGAAGATATCTGCTGCTGGACGAGGACCAATGCGCGGCGGTCGCCAGAA	101
** ***** ** ***** ** *****		
KQ982655.1	GTACCTCAAAGTTGTCGATCCCAGTACTACGAATTCGAAAGTGAATATGATGATGG	52500
Tz_CHS8 (CDS)	GTACCTCAAAGTTGTCGATCCCAGTACTACGAATTCGAAA-----	1873
AsCHSlarvapura	GTATCTCAAGTGGTTCGATCCCAGTACTATGAATTTGAAA-----	1991
AsCHSoperaria	GTATCTCAAGTGGTTCGATCCCAGTACTATGAATTTGAAA-----	142
** ***** ** ***** ** *****		
KQ982655.1	CAATTTAGTAAATGTCGGCGCTTGATAAAAAAACCGTCACTAAAAAATCGGTATTAGA	52560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHSlarvapura	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142
KQ982655.1	GTTGCAGCGTTGGAATTTTTAAAATTTATGATATAGTTCTAAAAATAGAATACATATGT	52620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHSlarvapura	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142

KQ982655.1	ATAATTAAAAGTGAACATGGAAGAAAGTGAAGTTATGCATATTCGCTATCCTAATCAA	52680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHS1arvapupa	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142
KQ982655.1	AACATTCCAAC TAGCAGACGCTTTAAAAATTTAAATAATTACTTAATATTAATTTT	52740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHS1arvapupa	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142
KQ982655.1	TAATATTAATTAATAATTAAGAATATATTTGAAAAATATTATCTGTTGATTCGGTTGTC	52800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHS1arvapupa	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142
KQ982655.1	CAATTCGAAATTTTAAAAATGTTCTCCTGAAAGTTATACATTTGGAGATGTGTGTATCA	52860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	1873
AsCHS1arvapupa	-----	1991
AsCHSoperaria	-----	142
KQ982655.1	TTTTTCTATTAAAAATGTTTCATTGCTTCACATATGGAATGTGTTCTCTAGCTCACATA	52920
Tz_CHS8 (CDS)	-----CTCACATA	1881
AsCHS1arvapupa	-----CTCACATA	1999
AsCHSoperaria	-----CTCACATA	150

	Exon 8	
KQ982655.1	TTCTTCGACGACGCGTTCGAGTTGTCCGACCACGACGAAAACGAGTCGCAGGTGAACAGG	52980
Tz_CHS8 (CDS)	TTCTTCGACGACGCGTTCGAGTTGTCCGACCACGACGAAAACGAGTCGCAGGTGAACAGG	1941
AsCHS1arvapupa	TTCTTCGACGATGCGTTCGAGTTGTCCGACCACGACGAGAATGAGTCGCAGGTGAATAGA	2059
AsCHSoperaria	TTCTTCGACGATGCGTTCGAGTTGTCCGACCACGACGAGAATGAGTCGCAGGTGAATAGA	210

KQ982655.1	TTCTGTAATTTGCTGGTCGGCACGTTGGACGAGGCCGCGTCGGATGTTCAAAAACGAGG	53040
Tz_CHS8 (CDS)	TTCTGTAATTTGCTGGTCGGCACGTTGGACGAGGCCGCGTCGGATGTTCAAAAACGAGG	2001
AsCHS1arvapupa	TTCTGTAATTTGCTGGTCGGCACATTAGACGAGGCCGCGTCGGATGTTCAAAAACGAGA	2119
AsCHSoperaria	TTCTGTAATTTGCTGGTCGGCACATTAGACGAGGCCGCGTCGGATGTTCAAAAACGAGA	270

KQ982655.1	ATGCACGTGAGAGCGCCTAAAAAGTATCCGACTCCGTATGGTGGACGATTGGTATGGACT	53100
Tz_CHS8 (CDS)	ATGCACGTGAGAGCGCCTAAAAAGTATCCGACTCCGTATGGTGGACGATTGGTATGGACT	2061
AsCHS1arvapupa	ATGCATGTGAGAGCGCCTAAGAAGTACCCGACTCCGTATGGTGGACGATTGGTATGGACT	2179
AsCHSoperaria	ATGCATGTGAGAGCGCCTAAGAAGTACCCGACTCCGTATGGTGGACGATTGGTATGGACT	330

KQ982655.1	CTTCCCAGAAAGACGAAAATGATTGCTCATCTGAAGGATAAGAGCAAGATTCGACACAGG	53160
Tz_CHS8 (CDS)	CTTCCCAGAAAGACGAAAATGATTGCTCATCTGAAGGATAAGAGCAAGATTCGACACAGG	2121
AsCHS1arvapupa	CTTCTTGGAAAACGAAGATGATTGCCCATCTAAAAGATAAGAGCAAGATTCGACATAGG	2239
AsCHSoperaria	CTTCTTGGAAAACGAAGATGATTGCCCATCTAAAAGATAAGAGCAAGATTCGACATAGG	390

KQ982655.1	AAGCGATGGAGTCAAGTATGCATATTAATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATA	53220
Tz_CHS8 (CDS)	AAGCGATGGAGTCAA-----	2136
AsCHS1arvapupa	AAACGATGGAGTCAA-----	2254
AsCHSoperaria	AAACGATGGAGTCAA-----	405

KQ982655.1	TTTTAGAGTATCCTGAGCACTCCATCTACCTACTTAAGGGGGCACCTCATGTAATGGGT	53280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHS1arvapupa	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	CAAAAAATCGAAAACATTTTTGATAATTTAATAATTTAACCCGTCAGAGAAATATGT	53340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHS1arvapupa	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	CCCTTGAGTTTTAAAAACAAAATTCGAAGAATTGACATAATTACAAATAATTTATTGCGG	53400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHS1arvapupa	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	ACTGTCAAGTAAGTAAATTTACGCAATAAAATCATCTGTAATTATGTCAATTCTCAAAT	53460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHS1arvapupa	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	TTTGTACTAAAACCAAGGGACATATTACGTATACTTAAAACTTAAATGCGTTTTTCTC	53520
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHS1arvapupa	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405

KQ982655.1	GACACTACTTTTTTAAAAATTACCGTGCAAGATAACTCAAAAATATCCATCCGATTGAGC	53580
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	CCTTCTTGTGCACACATCTAGATAAATACTTTCCCTCATAAATTGAACCTTTATTTTATAAT	53640
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	TGTATTGTTTAAATAAATACTTTTATTACATAAATTAACACGAAAATTTTCGTAAAAAT	53700
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	CGATATTTTTTCTATGTGTGCGCCATTTTATAAATTGATATTATCTCTTTAAAAATAG	53760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	GTTCAATTAATAACGTAACCCTACAAAAAGAAATCGTTTTTGTTTTTTGTTCGGAT	53820
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	GAATACAAGCAGTGTACATTGCACGCCGCTCAACGCCGACGCACTAAAATTAATTTATTA	53880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	TAAATATAAAATTCACATTGTTTTCTATCGAAAAATATTTTTTTAGTAGCTGAATATT	53940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	ACAATAACATATCCTGAAAATTTCAAAGAATTTGTGATAGTCTCCAATTAATAAATTT	54000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	CCGAAAAATATATCCGATAGATCATTTTCAGCACGATACATAAGGTGCCCCCTTAAAG	54060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2136
AsCHSlarvapura	-----	2254
AsCHSoperaria	-----	405
KQ982655.1	TTACAAAATATAGAGATTGTCTCCTAAGAAATTTCAATTCCTGATTTAGGTAATGTAC	54120
Tz_CHS8 (CDS)	-----GTAATGTAC	2145
AsCHSlarvapura	-----GTAATGTAC	2263
AsCHSoperaria	-----GTAATGTAC	414

	Exon 9	
KQ982655.1	ATGTATTACTTACTGGGTACCGGCTAATGGAATTACCGATCAGTGTGATCGCAAAGAA	54180
Tz_CHS8 (CDS)	ATGTATTACTTACTGGGTACCGGCTAATGGAATTACCGATCAGTGTGATCGCAAAGAA	2205
AsCHSlarvapura	ATGTATTACTTACTGGGTACCGGCTAATGGAATTACCGATCAGTGTGATCGCAAAGAA	2323
AsCHSoperaria	ATGTATTACTTACTGGGTACCGGCTAATGGAATTACCGATCAGTGTGATCGCAAAGAA	474

KQ982655.1	GTCATCGCCGAGAATACGTTTCTGTTAACTCGACGGGGATATCGACTTCAACCGGCG	54240
Tz_CHS8 (CDS)	GTCATCGCCGAGAATACGTTTCTGTTAACTCGACGGGGATATCGACTTCAACCGGCG	2265
AsCHSlarvapura	GTCATCGCCGAGAATACGTTTCTGTTAACTCGACGGGGATATCGACTTCAACCGGCG	2383
AsCHSoperaria	GTCATCGCCGAGAATACGTTTCTGTTAACTCGACGGGGATATCGACTTCAACCGGCG	534

KQ982655.1	GCAGTGAAGCTTCTAGTCGACTTGATGAAGAAGAATAAAAACCTGGGCGCCGCTTGC	54300
Tz_CHS8 (CDS)	GCAGTGAAGCTTCTAGTCGACTTGATGAAGAAGAATAAAAACCTGGGCGCCGCTTGC	2325
AsCHSlarvapura	GCGGTGAAGCTTCTCGTGGACCTGATGAAAAAGAATAAAAACCTGGGCGCCGCTTGC	2443
AsCHSoperaria	GCGGTGAAGCTTCTCGTGGACCTGATGAAAAAGAATAAAAACCTGGGCGCCGCTTGC	594

KQ982655.1	CGTATTCAATCCAGTTGGTTCCGGTAAAGTCGTTCTAGCACAAAAAATACATGAACATGAA	54360
Tz_CHS8 (CDS)	CGTATTCAATCCAGTTGGTTCC-----	2346
AsCHSlarvapura	CGCATTCATCCGGTTGGTTCC-----	2464
AsCHSoperaria	CGCATTCATCCGGTTGGTTCC-----	615

KQ982655.1	TATATATTTAAACAAGTAAAAATAATTACGATAAGTATATTTAATCAAATAATAATTA	54420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	ATGCAAAAGATTGTCATTATTAATAATGAAATAATAACAGAAATAAAGGCTGAGAGTA	54480
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	GGTACGGGTACAGTAATTGTGGCTTAAAAGTCTTCGTATAAAATATATTACTTAAAAAT	54540
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	ACATCAGCCTCATTAGATGTTTACAGCATTCCCTAATCTTAGCAGCTATGCTCGTTTAGAA	54600
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	ATGAATAAAAGTCATGTTTGGACACGTATTATGGAATTGTTTGAATGGATTTTGAATT	54660
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	AGGTATTTCAATTTCCCTAAAAATACAATAGAAATTTAGGATATAATTAAGCGATCGAA	54720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	ATCTATTTCGAATAATTTTATAATTTAATAGTTCATTAATTCAATAATTTCAATATTC	54780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	CATTAATTTGAATAATTAATTAATTTCAATAATTTCAATATTTTATTAATTTAAAAAAT	54840
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	AATTTCAATTTTCTTCTTCAATTCGATACTTTAGAAAAAGAGAGCGGTATGATCAA	54900
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	ACTACCTCACTCTTCTTAAACCAATATAGTGACAACCTCAGGATTGAGCAGTTTATTCCT	54960
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	CTTACGCCCATGATTGGTCCAATAAAAAAAGATAAATTTATTTAAATATGCAATCATA	55020
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2346
AsCHSlarvapupa	-----	2464
AsCHSoperaria	-----	615
KQ982655.1	AACGATCACAACAATAAAATGTTTCGCAATGTCCAGGGCCTATGGTGTGGTATCAAA	55080
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGGCCTATGGTGTGGTATCAAA	2368
AsCHSlarvapupa	-----GGTCCTATGGTGTGGTATCAAA	2486
AsCHSoperaria	-----GGTCCTATGGTGTGGTATCAAA	637
	** *****	
	Exon 10	
KQ982655.1	TGTTTCGAGTACGCGATCGGTCCTGCTGCAGAAGGCCACCGAACACATGATCGGCTGCG	55140
Tz_CHS8 (CDS)	TGTTTCGAGTACGCGATCGGTCCTGCTGCAGAAGGCCACCGAACACATGATCGGCTGCG	2428
AsCHSlarvapupa	TGTTTCGAGTACGCGATCGGTCCTGCTGCAGAAGGCCACCGAACACATGATCGGCTGCG	2546
AsCHSoperaria	TGTTTCGAAATACGCGATCGGTCCTGCTGCAGAAGGCCACCGAACACATGATCGGCTGCG	697
	***** ** *****	
KQ982655.1	TGCTCTGCAGTCCCGGATGCTTCTCGTTGTTCCGTGGTAAGGCATTGATGGACGACAACG	55200
Tz_CHS8 (CDS)	TGCTCTGCAGTCCCGGATGCTTCTCGTTGTTCCGTGGTAAGGCATTGATGGACGACAACG	2488
AsCHSlarvapupa	TGCTCTGCAGTCCCGGATGCTTCTCGTTGTTCCGTGGTAAGGCATTGATGGACGACAACG	2606
AsCHSoperaria	TGCTCTGCAGTCCCGGATGCTTCTCGTTGTTCCGTGGTAAGGCATTGATGGACGACAACG	757
	***** ** *****	

KQ982655.1	TGATGAAAAATACACTACCAAGTCTGACGAGGCGAGACACTACGTGCAATATGATCAGG	55260
Tz_CHS8 (CDS)	TGATGAAAAATACACTACCAAGTCTGACGAGGCGAGACACTACGTGCAATATGATCAGG	2548
AsCHSlarvapura	TGATGAAAAATACACGACCAAGTCTGACGAGGCGAGACACTACGTGCAATATGATCAGG	2666
AsCHSoperaria	TGATGAAAAATACACGACCAAGTCTGACGAGGCGAGACACTACGTGCAATATGATCAGG	817

KQ982655.1	GAGAGGATCGTTGGCTGTGCACGTTGTTGTGCAACGAGGCTACAGGTTATGCATTAATC	55320
Tz_CHS8 (CDS)	GAGAGGATCGTTGGCTGTGCACGTTGTTGTGCAACGAGGCTACAG-----	2594
AsCHSlarvapura	GAGAGGATCGTTGGCTGTGCACGTTGTTGTGCAACGAGGCTACAG-----	2712
AsCHSoperaria	GAGAGGATCGTTGGCTGTGCACGTTGTTGTGCAACGAGGCTACAG-----	863

KQ982655.1	TCATTGTCACACTACATAACGATTTTCATCCTGGCATGATGTACAACATTATTATATTTAAAA	55380
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2594
AsCHSlarvapura	-----	2712
AsCHSoperaria	-----	863
KQ982655.1	AATTCAATTGCGTTATAATGATTTATTATTATTATTATATTTTGTCTTTATAACAGTTTT	55440
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2594
AsCHSlarvapura	-----	2712
AsCHSoperaria	-----	863
KQ982655.1	ATTATATTAATGTAATTATTCATGTTTTTAAAAATTCCTTATTTTTTACATTGCAC	55500
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2594
AsCHSlarvapura	-----	2712
AsCHSoperaria	-----	863
	Exon 11	
KQ982655.1	TCCAGGTCGAGTATTCCGACGAGTGATGCTTATAACCCACGCACCGGAAGGTTTAAACG	55560
Tz_CHS8 (CDS)	---GGTCGAGTATTCCGACGAGTGATGCTTATAACCCACGCACCGGAAGGTTTAAACG	2650
AsCHSlarvapura	---GGTCGAGTATTCCGACGAGTGATGCTTATAACTCATGCACCGGAAGGTTTAAACG	2768
AsCHSoperaria	---GGTCGAGTATTCCGACGAGTGATGCTTATAACTCATGCACCGGAAGGTTTAAACG	919

KQ982655.1	AGTTTACAAATCAACGACGTCGTTGGGTGCCCTCCACCATTGCAAATATTATGGATCTGC	55620
Tz_CHS8 (CDS)	AGTTTACAAATCAACGACGTCGTTGGGTGCCCTCCACCATTGCAAATATTATGGATCTGC	2710
AsCHSlarvapura	AGTTTACAAATCAACGACGTCGTTGGGTGCCCTCCACCATTGCAAATATTATGGATCTGC	2828
AsCHSoperaria	AGTTTACAAATCAACGACGTCGTTGGGTGCCCTCCACCATTGCAAATATTATGGATCTGC	979

KQ982655.1	TAATGGACGCGAAACGCACAATCAAATCAACGATAAATCTCACTGCCTTACATTTTCAT	55680
Tz_CHS8 (CDS)	TAATGGACGCGAAACGCACAATCAAATCAACGATAAATCTCACTGCCTTACATTTTCAT	2770
AsCHSlarvapura	TGATGGATGCGAAACGTAACAATCAAATCAATGATAAATCTCACTGCCTTACATTTTCAT	2888
AsCHSoperaria	TGATGGATGCGAAACGTAACAATCAAATCAATGATAAATCTCACTGCCTTACATTTTCAT	1039

KQ982655.1	ATCAAATTTTACTGATGGGCAAGTGCCTTCTCTCATTCCCTGAATTATAACATCACG	55740
Tz_CHS8 (CDS)	ATCAAATTTTACTGATG-----	2787
AsCHSlarvapura	ATCAAATTTTACTGATG-----	2905
AsCHSoperaria	ATCAAATTTTACTGATG-----	1056

KQ982655.1	TTCTTTTCTATTGAATATTAGATTTGATTCGATTAATCAGATCAAATTAATTATTAATTA	55800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2787
AsCHSlarvapura	-----	2905
AsCHSoperaria	-----	1056
KQ982655.1	ATTATTAGTATAAAATTAATTTTATATTTTATATGTTTTTTATTAATTTAAAAATA	55860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2787
AsCHSlarvapura	-----	2905
AsCHSoperaria	-----	1056
KQ982655.1	TTTAAAAATATTAGAAATTTTAAATTTTACGTTATAAAATGAATATAATATCTGTATA	55920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2787
AsCHSlarvapura	-----	2905
AsCHSoperaria	-----	1056
KQ982655.1	TTTAAATATATTATAATTTTAAACATTGGAATATAAAAAACTTCGGATTTTGTAAATTG	55980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2787
AsCHSlarvapura	-----	2905
AsCHSoperaria	-----	1056
KQ982655.1	AAAAGTATATCGATTGAAATATCTTTGTGCTTAAATAAAACAGGTTGACGATCCTGGG	56040
Tz_CHS8 (CDS)	-----GGTGGTACGATCCTGGG	2804
AsCHSlarvapura	-----GGTGGTACGATTTTGGG	2922
AsCHSoperaria	-----GGTGGTACGATTTTGGG	1073

Éxon 12a		
KQ982655.1	ACCCGGCACGATCTTCCTCATGTTGGTGGGTGCCTTCGTGGCTGCCTTCAAATCGACAA	56100
Tz_CHS8 (CDS)	ACCCGGCACGATCTTCCTCATGTTGGTGGGTGCCTTCGTGGCTGCCTTCAAATCGACAA	2864
AsCHSlarvapupa	ACCCGGCACGATCTTCCTCATGTTGGTGGGTGCCTTCGTAGCTGCTTCAAATCGACAA	2982
AsCHSoperaria	ACCCGGCACGATCTTCCTCATGTTGGTGGGTGCCTTCGTAGCTGCTTCAAATCGACAA	1133

KQ982655.1	CTGGACCAGCTTCTACTACAACATCATCCCATCTTACTCTTCATGATCATCTGCTTCAC	56160
Tz_CHS8 (CDS)	CTGGACCAGCTTCTACTACAACATCATCCCATCTTACTCTTCATGATCATCTGCTTCAC	2924
AsCHSlarvapupa	CTGGACCAGTTTCTACTACAACATCATCCCATCTTGTCTTCATGATCGTCTGTTTCAC	3042
AsCHSoperaria	CTGGACCAGTTTCTACTACAACATCATCCCATCTTGTCTTCATGATCGTCTGTTTCAC	1193

KQ982655.1	GTGCAAATCGAACGTACAGGTACATAAGTATCTCTCTTTTGATCTATTTGAGCGTTTGTG	56220
Tz_CHS8 (CDS)	GTGCAAATCGAACGTA-----	2940
AsCHSlarvapupa	GTGCAAATCGAACATA-----	3058
AsCHSoperaria	GTGCAAATCGAACATA-----	1209

KQ982655.1	TACAAGTATCCGTGCATATATCCGCTTTATGTGCGCATTTTGTGATCGTCCCTCGCTCG	56280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
KQ982655.1	CGGAATTCACTTTCATTAGAACAGAAATCTTAATTTATAATATCGCACAAATAATCAT	56340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
KQ982655.1	AATAATAATATATTCTCTCACGCAGTGTGATTCATTTTCCGTACAACATTTGCGACTTT	56400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
KQ982655.1	TGACGTATTATTTCTCCAAGGAATATACCAAGAAAAAGTCGAAATGATGACTTTTGGTTAG	56460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
KQ982655.1	AAAATTCACTGTTTATTGACATTAATAAATAAAAGTAATTTTGATTTTTCGTTGA	56520
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
KQ982655.1	CTTTTGTGTGTTCCCTTGAGACTGTTCCAAAAATGCCTTCAAACGTGGGATGGGAAGGAAT	56580
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2940
AsCHSlarvapupa	-----	3058
AsCHSoperaria	-----	1209
Éxon 12b		
KQ982655.1	TAAATGTGAGTGGTTTTCAGCTTTTATGCGCCAGATCCTGTGCGACGGCGTACGCGATGA	56640
Tz_CHS8 (CDS)	-----CAGGA-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----CAGCTTTTATGCGCCAGATCCTGTGCGACGGCGTACGCGATGA	3101
AsCHSoperaria	-----CAG-----	1212

KQ982655.1	TCATGATGGCGGTGATCGTAGGTACTGCCCTACAGCTCGGCGAGGACGGCATAGGCTCGC	56700
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	TCATGATGGCGGTAATCGTAGGTACTGCCCTACAGCTTGGCGAGGACGGTATAGGCTCGC	3161
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CCTCGGCGATCTTCCTAATATCATTTGTCGAGCTCATTCTTCATAGCAGCCTGCCTACACC	56760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	CCTCGGCGATCTTCCTAATATCATTTGTCGAGCTCATTCTTCATAGCAGCCTGCCTACATC	3221
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CGCAAGAAATCTGGTGCATCGTACCTGGCATCATATACTTGTGTCCATTCCGCTATGT	56820
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	CACAAGAAATCTGGTGCATCGTACCTGGCATCATATACTTGTGTCCATTCCGCTATGT	3281
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATTTGCTCCTCATACTGTACTCCATCATCAATCTTAATGTTGTCTGGGGACCAGGG	56880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	ATTTGCTCCTCATACTGTACTCCATCATCAATCTTAATGTTGTATCCTGGGGACCAGAG	3341
AsCHSoperaria	-----	1212

KQ982655.1	AGGTCCAAACGAAAAAGACCAAGAAGGTTTCGTTCAGTGTTCGATCCTTTTTTTCCATTCT	56940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	AGGTCCAAACGAAAAAGACCAAGA-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TAGACTTTTTTTTTATTTGGCACTGAGTCGTAACCTGATAGCAAAGCCTGCGGAGA	57000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CAAAATTCGAGCAGGGCCTGTTACCAATTTCTGATGCAGAAAGACAATTCTTGTTCGAGA	57060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AAGGCAACAAATTGTATCCAGAGTTTGTATTATTTAACATTGTCAGTAAATTGCTGTCAG	57120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AAATATGACAAAGCTTCCTGGACATGCTTTGCCAGTAGATTGTTAGCAGAAACCGAAAAA	57180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AACCCTGCATAACCTTATGGCAAATCGAGAGCAAAACCTAATTCGAGCAAACCTCTGCTCG	57240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATTTCTGCCACCAATCTGCTGACATAGCCTATCAACAGGCTTTGTCGACAAATCCATAGC	57300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CAAATGCGGACACAGATGGCTATATGGTTTTGTAGTAAAAATCTGATCGAGTTGCTGCC	57360
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AATTTGGCCCCAAATGTTAACATTTTGCTATCAGGGTATATAAAATAGGGGTGTAACCTCT	57420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	GGTGAATGGGGCTTTGAAATGGTGAAGGTTTCAGGTTTTTGGATCCTCACTTTGTTGATA	57480
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TTTCATCCAGATATAAATACAATAACATCAACGCTGTACGAGAAATATTAATATAA	57540
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AACACCTCATATTTGCAATTCATTTTCATCATGAAAACCTATGAGTTGCTGTGCTAAATAA	57600
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	GAATAATGTAATAAACCTAGATTTTAAATTGGTATCAACTGGGAAGTTGATATCAATTAA	57660
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATACTTTTAAACACAAATAAGCGAGAAGGCCATGTTCTGTAAAAGAGAGTCAGTGTCTAA	57720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TAATATTTTACTTAAATCTTACAATTTCCAGTTAATATTGTTTATCAAATAAATTGGAT	57780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212

KQ982655.1	CTACTATCTCAGTTTAATTTTACTATTAAATCATTAAAAACAGCTATAATAATCTTCAA	57840
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TGCACGAATCGGATGAGGCTCCGGAGATAAGGAGATGATCTCGTCGAGATTCCTTGTTA	57900
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	GATGAACTCCCAATCATTGCTTCGTCGTAAGAACGTCACGCTTCAGCTTCAGCTTTGCT	57960
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TAACTCAGAAGTAAAAGCAACTAACGCACACGAAGTTGGCGGTCTTGATGATCGTAG	58020
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CCGCCGTAATCAGCACCATGTACGCGATCGTGATGACCGCGGTGATCGTTGCATTCGCGA	58080
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CAAACATCGTGCAGGAAAGCGTGATGTCGCCAAGTGCCTGTTCTGTTCCCTCATGGTGG	58140
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ACGAATTTGTGATCGCGGGCCTCCTGCACCCGTACGAAATCAATTGCCTGCTGCACGGTC	58200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TGATCTATTACCTGGCGGTGCCCTCGATGTACGTGTTATTAATCATATATTCACCTTACA	58260
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATCTCAACAACATCTCATGGGGCACGGGAAATTGTAACGAAGAAGAGCAACGTGGTAA	58320
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TTAATCTCGCTCCCTTTACTAATTCCAATTGATCTATACTAATTCGAGTGTTCCTGACTT	58380
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	TCACGCAGCTTTGTATATACATATGCTAGAATATTATTATGCTTTTTAATTAACCTCTT	58440
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AGAAAAATTATGATTGAGGCGCGTCGAAAATTTAATTTATTACTGTTTTAGTCTTTTGGGA	58500
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATGGGATCTCACCTAAAGAGTGAAAACCTGAGCCAATCTTGAAAATAGTGACTCAATTTT	58560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CAATCTTTAAGATTTCACTTTTCAAAGTCCGATTCACCTTAAGTTTTAAGGAATAAAATT	58620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AAGATTTCTACAGAAAATAAAAAATATAAGAAATTTAAAGTTTTTAGAATTTTATTAAT	58680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHS1arvapupa	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212

KQ982655.1	TTGATTCAATTAATTTTAAATGACCTGCAATTCGTTTCAGTTAGAATTAATGATAAAAATTAT	58740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AGGATATTTAAACATATTTATACAGATTAAATTTAGAGAGAAATAAAGTTTGACCCTTTTATT	58800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AATTTAATTACTAAATAATTTAAATTTTGAATATAATTAATGTATAAATATAAAGCTA	58860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	AATGTATGATATGAATTTAGAAAAAGATTATTTTACTAAAACCTCATTCCTACTCGTA	58920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	ATGAAATATTTTCTTAAAGCAAACCGTTAATGGATGGTTGCTTTGGTTTATTAATATT	58980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CTATTGTATTATATGATCTATTTAACTAATTTAATCTTTCACAACCTAACGAGAAACACA	59040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	2945
AsCHSlarvapura	-----	3365
AsCHSoperaria	-----	1212
KQ982655.1	CGGCGATTAAGTTTCCGTGCGTTTATCATGATCGTTTGTGCGATTTCAGGAACTCGAGCAA	59100
Tz_CHS8 (CDS)	-----ACTCGAGCAA	2955
AsCHSlarvapura	-----AGGAACTCGAACAA	3379
AsCHSoperaria	-----GAACTCGAACAA	1224
	***** **	
	Exon 13	
KQ982655.1	GAGAAGCGAGAAGCAGAGGAAGCGAAACGTAAGGCCAAGCAGAAGTCCCTTGC TTGGCTTC	59160
Tz_CHS8 (CDS)	GAGAAGCGAGAAGCAGAGGAAGCGAAACGTAAGGCCAAGCAGAAGTCCCTTGC TTGGCTTC	3015
AsCHSlarvapura	GAGAAACGAGAAGCAGAGGAGGCAAAGCGTAAGGCCAAGCAGAAGTCCCTTGC TTGGCTTC	3439
AsCHSoperaria	GAGAAACGAGAAGCAGAGGAGGCAAAGCGTAAGGCCAAGCAGAAGTCCCTTGC TTGGCTTC	1284
	***** **	
KQ982655.1	TTGCAGAACGGCGCGGGTAACAACGACGACGATCAGGGTTCCATCGAGATATCGCTGGCC	59220
Tz_CHS8 (CDS)	TTGCAGAACGGCGCGGGTAACAACGACGACGATCAGGGTTCCATCGAGATATCGCTGGCC	3075
AsCHSlarvapura	TTACAGAACGGCGCGGGTAACAATGACGACGATCAGGGTTCCATTGAGATTTTCGTTGGCC	3499
AsCHSoperaria	TTACAGAACGGCGCGGGTAACAATGACGACGATCAGGGTTCCATTGAGATTTTCGTTGGCC	1344
	** ***** **	
KQ982655.1	GGCTTATTCAAGTGTCTTGCTATGCACCCATGGAAAACCATCCGCCGAGAAACAACAGCTC	59280
Tz_CHS8 (CDS)	GGCTTATTCAAGTGTCTTGCTATGCACCCATGGAAAACCATCCGCCGAGAAACAACAGCTC	3135
AsCHSlarvapura	GGCTTGTCAAATGTCTTGCTATGCATCTATGGAAAACCATCCGCCGAGAAACAACAGCTC	3559
AsCHSoperaria	GGCTTGTCAAATGTCTTGCTATGCATCTATGGAAAACCATCCGCCGAGAAACAACAGCTC	1404
	***** **	
KQ982655.1	GTAGCAATCGCTGAGTCGCTCGAGCAGCTCGGCAAGAGGCTCGAGACTATCGAGAGGTAA	59340
Tz_CHS8 (CDS)	GTAGCAATCGCTGAGTCGCTCGAGCAGCTCGGCAAGAGGCTCGAGACTATCGAG-----	3189
AsCHSlarvapura	GTAGCAATCGCTGAGTCGCTCGAGCAACTCGGCAAAAGGCTCGAAACTATCGAA-----	3613
AsCHSoperaria	GTAGCAATCGCTGAGTCGCTCGAGCAACTCGGCAAAAGGCTCGAAACTATCGAA-----	1458
	***** **	
KQ982655.1	GAAAAAACTGCATACGAAGACATTTGAATTGAGGAAAGATTATCGAAAAATTAGAGT	59400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CAGGCGTAAAAATGATGTTT TAGAGAGATCTCGCAAAAGTGAAAGTACTTCAGGTTACG	59460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AAGCGAGAAAGTTT CAGAATTGTGCGATTAACGTTT GAAAACATTTAACGCTAGAAAACA	59520
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458

KQ982655.1	TCAGTTTTCTGTGAAAGTAGATTA AAAATATCTTTTTTATTCACATGAAAAAAAAATGTA	59580
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTAAATCTTAATACTTATTTTTTTAATAGTGCTAAATATTCATTTACAGTAAATATTTA	59640
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CTTATAATTCAAACAAATATTTATTA AAAATTTAGTGTTTTTTTCAGTGTATATGAAGCAT	59700
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TCCTTAGGAAAAAGTACACCCAACTAGACGTTGGCGCTCCGAAATAACACTCAAATAGT	59760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GTTAATCCTCAAATTGGAGGTTTATTTGGAAGTTAACACTCAATGAAGTATCATTTCCGG	59820
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ACCACTAACGCCTAGTTGGGTGTATTTTTTCATAGGGCAGTGTATTACGTTAATTAT	59880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTTTGTTTTTGTACAATAAACCATTTACCTAAAATTTAAGTCTCAAGCCATAAGAAATGAC	59940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CAATCATAGTCAATTGTTCTAATATCACCGTATTCTTATTAAGGAGGTTCCGCTGTAGT	60000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TGGAAACGTTAGAAATAAACTTAGTCTTAATTTTTTTATATGATGTAGATAAACTGTA	60060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CACAAATAATCCCACAATTTGAGCAATATTGACCGTATAAATTCCTTGTAATATTCTGAA	60120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GTTGACCATTTTAAGAATATCGTTCGGAAGAAGATAATCGCCGATTTAATACACACTCAC	60180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTAAGACTTTGAAATAATGTGTCGGTGAATACACCTAATATTCGAGTAAATGAATAAAA	60240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AATGATGAAAATACTCATTGCAATACACTTCTTTTTTTATTCGCCAAGAAACGAATAAA	60300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TACTTTTTTCATCCATTTGAATGAATATTTTTTGAATATGATTATGAATATTTTCGTTTC	60360
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GTATTCACTTTTACTCTGTATTATTTGTATAGTCTGTAAGCCTACAAGAGAAAACAGAAA	60420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapura	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458

KQ982655.1	TCTATAAAAAACAATGCGGCTACAATTACGCCGTGCTCTTAGTTCGCGACCTATACAATAG	60480
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GCGTTCCTGTTTAACTATAGGTAAACAAAAATATTTTATGGGAATAAATAATATAT	60540
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CTCGGAACTTTATATCCTCGAACTCTCAGACCATACTGAACGACGCGCCCAAGATATCTT	60600
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ATAAAGTGTTTATTCAACCGGAATTATATCGGAATATGTATGGCGCTCTCTCAAATAAAT	60660
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ATTTATAAATAAAAAATGTATTGCTTCTAAACATTTTCAAATTTCTAAGTTTCTT	60720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CATAAAATCTGAATACTTCAATGACAAAAATAAATAAATTCATTCTTTTACTTAAAGT	60780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GCCGGTTATAATTAAGGGATAACGATTGCGCGCTTATTGCAGTTCCTTTTTCAGTTT	60840
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ATATTTTGTTTGAATGAACACTCATTAAATATTCATAGTTTTTTTGTGAATAAATATTTT	60900
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTGAAAACCAAAATTTTGAATGAATACATGATTACATCTTTTATGTGAAAATTTGAA	60960
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TAAATACAATTTGGAGCTCAATTACAAATTTTGTATTTCATCGGGCACACTACTTTGAAA	61020
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AACTAGCATTGACAGATGAGAATCAACAATTTGTGCATAAAAAAGAAAAACCAGATTTTA	61080
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTGTATGGATTTAAAATTAATTTTATTGTCATAAAGTTTACCTCTACCTCACAGATCATA	61140
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTAATAGTAACAGACTTGGCAACGTCGTAGTGTACAACCTGATACGAAACCAACTTCATAT	61200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AATCTAGAATCCATCTCGGCGTAAAAAACAGATACCTATGAAAATAAAGGTGAACGCAC	61260
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458

KQ982655.1	TTAGAAGTAAGCAGTAAGCAGTAAGAAGTAAGACGTAAGACCGCCATCTTTCATATGTAT	61320
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AGATTACTGGCAATGTTAATGTCTACTACGTACGTCTAAGGCGTTGTCTATGTCACAAT	61380
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ATGCGAAGTAAGCTTGGTTTAAAGAAGTAAGAGTAAGAAATTGACTCACAGTCGAATGTGA	61440
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GAAGAATAATCGACTGTGATTGGTCAATTTCTTACTCTTACTCTTAAACCTAGCTTACT	61500
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ACGTGTATTGTAGACGGGCCATTACTGCTTACTGTTTACTGCTTACTGCTTACTTTTACT	61560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TCTATGTGCGTTCACCTTAATACAAAATCGGTCTTTACATCGATTCTGAATTTCTCTCTC	61620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ATTATACGCCATAGCCGGTCAGTGCCTGTCACATCGCGAAGTGCAACGTAATGCAATGTT	61680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ACCAAAATATACACTCGACTTTTCAAGTCGTTGACAATCTCATACATTTGTTAATATTC	61740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TACATTAATAATTTACTAAAAATATAGCACGTAATAGTAACCACAATTCATTACTACTAA	61800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TATTGCATGTGATACGGAATCGCTGTAATAACAATTTATTTTCAGTCGCATTTTTTTACTC	61860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	CAAAGTAATAGCGAACCCTCCTTTAACAATACTACGTAAAAAATGGTCAAGACATGATA	61920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	GATATTTTATTTAATGATTGAAGCAATTTTCTCGTAAAAATATGTGCAATTTGCGTAGAT	61980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	ACTTGCTCACACTGAGAAAAAGTTGTTAACTTGACCAAATGCAGATAGTTCGTAGTGAT	62040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TATTTAATTCAAATATTTATATATATATTTAGAACCTTAATTTTAAAGTTAACAAAAATCT	62100
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TGTAATTTAAAACATGTTATTTGTTTGAATTAACGAATATTTGCTTGATCGTTGATTGATCAG	62160
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458

KQ982655.1	TTAAATCAACTAATATTTTTTTGAAATGGCAACTTTTTTCTCAGTGCAGTTATTGTTTAA	62220
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TATCAATAGATTATTATTAATAAAAATTATTACAGTCCATTC AATGATCCGTTTTTGTTC	62280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	AGTAAATAGATTCAAATTTTGTGTGCGCATCTTTTGTCCGTAGTAACTGCAAGCAAGGCA	62340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TTCCTTGATTGGAATCCGAAGTAGTTTTAATTAATTACTGTAGACAGAGTTAATACAAC	62400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
KQ982655.1	TATCCAATAATTTGTTCAAAAATGCATATTTTCTACCAGAGTCAATTTTATGATTTTTTTTA	62460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3189
AsCHSlarvapupa	-----	3613
AsCHSoperaria	-----	1458
Éxon 14		
KQ982655.1	CAGAGCGGTGGATCCTCACAGTCACGCTTCCGGACGAAGGAGAGCCTCATCAGTGGGTTC	62520
Tz_CHS8 (CDS)	-AGAGCGGTGGATCCTCACAGTCACGCTTCCGGACGAAGGAGAGCCTCATCAGTGGGTTC	3248
AsCHSlarvapupa	-AGAGCGGTAGATCCTCACAGTCATGTTTCCGGACGAAGGAGAGCCTCTTCCGTAGGTTC	3672
AsCHSoperaria	-AGAGCGGTAGATCCTCACAGTCATGTTTCCGGACGAAGGAGAGCCTCTTCCGTAGGTTC	1517

KQ982655.1	GCGCACCGCTGATCACCCTGGTGCCATCGCGCAGGATCCCGAGGATGAGGAGGGCAGCGA	62580
Tz_CHS8 (CDS)	GCGCACCGCTGATCACCCTGGTGCCATCGCGCAGGATCCCGAGGATGAGGAGGGCAGCGA	3308
AsCHSlarvapupa	GCGCACCGCTGATCACCCTGGTGCCATTGGCGAAGATCCCGAGGACGAAGAGGGTAGCGA	3732
AsCHSoperaria	GCGCACCGCTGATCACCCTGGTGCCATTGGCGAAGATCCCGAGGACGAAGAGGGTAGCGA	1577

KQ982655.1	AACGGAGACGGTGACCAGTCAGAATACCGAGGGTAATCGTGATGGCAGCAACTTCCTCTC	62640
Tz_CHS8 (CDS)	AACGGAGACGGTGACCAGTCAGAATACCGAGGGTAATCGTGATGGCAGCAACTTCCTCTC	3368
AsCHSlarvapupa	AACAGAGACAGTGACCAGTCAGAATACCGAAGGTAATCGTGATGGCAGCAACTTCCTCTC	3792
AsCHSoperaria	AACAGAGACAGTGACCAGTCAGAATACCGAAGGTAATCGTGATGGCAGCAACTTCCTCTC	1637

KQ982655.1	GAGACCGTACTGGCTAACCGACGAGGGCCTGAAGAAGGGCGAGGTGGACGTGTTGTCGAT	62700
Tz_CHS8 (CDS)	GAGACCGTACTGGCTAACCGACGAGGGCCTGAAGAAGGGCGAGGTGGACGTGTTGTCGAT	3428
AsCHSlarvapupa	GAGACCGTACTGGCTAACCGACGAGGGTCTGAAGAAGGGCGAGATGGATGTGCTGTCGAT	3852
AsCHSoperaria	GAGACCGTACTGGCTAACCGACGAGGGTCTGAAGAAGGGCGAGATGGATGTGCTGTCGAT	1697

KQ982655.1	GCAGGAGGAGCAATCTGGAAGGATCTGTTGGAGAAGTATCTCTACCCGATCGATGAGGA	62760
Tz_CHS8 (CDS)	GCAGGAGGAGCAATCTGGAAGGATCTGTTGGAGAAGTATCTCTACCCGATCGATGAGGA	3488
AsCHSlarvapupa	GCAGGAGGAAACAGTCTGGAAGGATCTATTGGAGAATATCTCTATCCGATCGATGAGGA	3912
AsCHSoperaria	GCAGGAGGAAACAGTCTGGAAGGATCTATTGGAGAATATCTCTATCCGATCGATGAGGA	1757

KQ982655.1	CAAAGCGGAGAAGGTAACACGATGACACCCCGGACTTTATTCAATTTTTTCTTGAAGTT	62820
Tz_CHS8 (CDS)	CAAAGCGGAGA-----	3499
AsCHSlarvapupa	CAAAGCGGAGA-----	3923
AsCHSoperaria	CAAAGCGGAGA-----	1768

KQ982655.1	GTATTTAAAAAAAATACGCGAAAAAATTTATTAGAATTTATTTTCTAAAAATCATTTTT	62880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	AACTTTTAATTTTAGGATTCAGTCAATTTTACTATTTTAAGTTTTTTTTTTGCTTGTA	62940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	GCAGTCAAAAAGGTTTTTATTTTACACTTCAACTTGAACTTCATAAGTTTTTATAGAAC	63000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	AGTTTAATTAATGTAATTACTGTGAATTAATTTTGTGATATAATAGAATACAATTTTTTT	63060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768

KQ982655.1	TGGGACCAGGATGACTTTTCTCGTAATAAAATCCGCGATACGTCTTTGTTACTGCAAGCT	63120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	GTTGATCAAGGATGAAAATGTAAATTTACGAAATTCGTCTTTATGAAGCCAAATAAACAA	63180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTAAATTAAGTAATTTGATCAAAATAGAAATTAAGAAAAATAATTAATTGATTTGCAA	63240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	CAAATTGAAAGCTTGCTCCTGAAGTAAATTTTTATGTTTCGCAGAGAGTATTTATTTA	63300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTACGCATTTTTTCATCTATTTGAATTAATATACGACATGCTGCTCCGATCAGGCAAGAAT	63360
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	CGCCAAAGATCTAAAGGACCTACGCGACCAGAGTGTCTTTGCGTTTTTTATGATGAACGC	63420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	CCTCTCGTCTGATCGTCTTTCTGCTGCAATTGAACAAAGACTTGTTCACATCAAGTG	63480
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	GCCATTCGGCATCAAGACGAACGTACATATGACCATACTACTATGGAGGTAAAACCAGC	63540
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TCCGTCGGCGCCTCGTATCCTCGATCATGGCTTTATCTCAAGCAGAACATTAACGATATA	63600
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	AACTTGAACCTCCAATTTAAATCTATGTGTTAACTCTCAAATGCCTCATTACGAAAAGAAC	63660
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	ACATTGGTGTACGGCTCTACCCAATTCGATCATAAAAATAGAAACATATCATAAAAAGAT	63720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTTTTTTTTATCGAAATACTGGTACTAGCAATCGTATATACTATATATATATATTTATTA	63780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	ATAAAAAATAGCCCACTTGTGAAATATTTTCATGCAAGATTTAAAAATATTTAGAT	63840
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTTTATAAAATTTTTTTAATGTAATATGAACAGGAAATCAGAATTTTGAAGTATTCA	63900
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TCTTTTTACAATATTTGTACAGTATTTCTAAAAATATTTTCGGGAAATATTTTCAAACGTT	63960
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapupa	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768

KQ982655.1	TTACAAATGTTGTTTACAAAATATTTTCAGAAATATATCAAACAATGATTTATATAAATA	64020
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapura	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTTCATACCGTGTAGGAAATAATGGAAAAAGCATTAATAAAAAACATTGAGGAACAAAGGG	64080
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapura	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	CTGGATATGTCGTCCCTCAAAGGCGTTTATGAGTTAGATTTACGAGACAAATGATATATC	64140
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapura	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	AAACGGATCGTTAACTGAGATAACGAAGGATCGACGGATCGGTGGACTGATCGACGGAGT	64200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapura	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
KQ982655.1	TTTTTATACTTACTATTCCTAATCTTGTGCGGCTCTTTTTTTCTGTTTCTCTCGCATTTCT	64260
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3499
AsCHSlarvapura	-----	3923
AsCHSoperaria	-----	1768
	Exon 15	
KQ982655.1	TCTCCACGCACACGCAACAGGCCCGCATCGCCCGCATCTGATAGAGCTACGCAACAAGA	64320
Tz_CHS8 (CDS)	-----AGGCCCGCATCGCCCGCATCTGATAGAGCTACGCAACAAGA	3541
AsCHSlarvapura	-----AGGCCCGCATCGCCCGCATCTAATAGAGCTACGCAACAAGA	3965
AsCHSoperaria	-----AGGCCCGCATCGCCCGCATCTAATAGAGCTACGCAACAAGA	1810

KQ982655.1	CGGTGTCGCATTTCTAATGTTCAATGCGTTGTTGTTCTGATCGTATTCTTGCTACAGC	64380
Tz_CHS8 (CDS)	CGGTGTCGCATTTCTAATGTTCAATGCGTTGTTGTTCTGATCGTATTCTTGCTACAGC	3601
AsCHSlarvapura	CGGTGTCGCATTTCTAATGTTCAATGCGTTGTTGTTCTGATCGTATTCTTGCTACAGC	4025
AsCHSoperaria	CGGTGTCGCATTTCTAATGTTCAATGCGTTGTTGTTCTGATCGTATTCTTGCTACAGC	1870

KQ982655.1	TGAATAAGGATCAGCTGCACGTTGTCTGGCCGCTCGGCGTCAAGACTAACATCACCTACG	64440
Tz_CHS8 (CDS)	TGAATAAGGATCAGCTGCACGTTGTCTGGCCGCTCGGCGTCAAGACTAACATCACCTACG	3661
AsCHSlarvapura	TGAATAAGGATCAGCTGCACGTTGTCTGGCCGCTCGGCGTCAAGACCAATATCACCTATG	4085
AsCHSoperaria	TGAATAAGGATCAGCTGCACGTTGTCTGGCCGCTCGGCGTCAAGACCAATATCACCTATG	1930

KQ982655.1	TCGAGGAGACCTCGGAGGTATCCGATGATCAAGCATCAGGGGAAAGGATTAAGTCGGTGC	64500
Tz_CHS8 (CDS)	TCGAGGAGACCTCGG-----	3676
AsCHSlarvapura	TCGAGGAGACCTCGG-----	4100
AsCHSoperaria	TCGAGGAGACCTCGG-----	1945

KQ982655.1	CATGGTGGTGTCCGTACACGGTGTCTCGTTAAAACCGCCCTCGATACGCCCGGATGATC	64560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapura	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	ATTTCTGACGTTTCTCTTTATTAAGATTAACCTTTGCAAATAAACTTATCAAATTACC	64620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapura	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	AAATACTTAAGAGATTAATTAATATCTTCGTTATATATAATAATATTATTATTTT	64680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapura	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	GAATTATAATTGCTAATAATAATTACCAACAAATAATGAGAATTAATTAGAAATTAATGAAT	64740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapura	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TAATTAGTAATTAATTAATTAATAAGATAATTAATAAAAAATCATAATAATAATAAAAAAT	64800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapura	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945

KQ982655.1	TGCTAAAAATTATGTTGCTCAAGTTTCTAAAAATATTTTGTGATTCFTTATTTTGGAT	64860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TTTTAATTTAAAAAATTTGAATTTCTAGAGGCTTTTGAATCTTTAAGAATATTTTCGAGT	64920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	GTCTCGAAGTTATCAGTTTATTGGATTACCTGAGCATCCCGACGCGTCGGGGGCGAGCAC	64980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TGTACCTCGGTGATGACGTTGCACCTGATTCAATATATACATACATTTTATGTCATTAA	65040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	CCCAACTGGCTCGTTTGACAGCACGTTGAAATTTCTCCAATTAATATTTCTACGCACAGGT	65100
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	ACCTCACCTGGGTCGAATGGAATGGAATGGCGTGGGAGATGATTTCTAGTGATCCCGACT	65160
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	AGAAATAACCAGAGATTAATGTCACAATAACATCCTTCCGTTTACCCCTTCTCACCAAAA	65220
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TGATACGAAATTGATTCATGGAATTAATTAATCCTCATTAATTTAATTACATATTGATG	65280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TAAAAGTAGAGACGGACATCGAGAGACCTGTTTATCTCGAAAGAATTAAAC TAATAATT	65340
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TTTTAGCAGAATTAATCTTCAATTTCTCGATTTTGTGAGAAAATAATAATTTTACGTTTT	65400
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TATTCTATGTGATATCTAAAAGTTATTAATTTGATTTTATCATCTAAATTGAATAATGCC	65460
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TAAAAATTATTAGTATTAATTTATTATTAGGTGAAAAC TATTACTATTATTAATAATTAAT	65520
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	ACTTTTCTAGTATAAATTTAAGGTCATTTATTAATAAACTAATATTAACCCACAATTAAA	65580
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	ATTATTCTTAAAAATTTAACTGAGTAGTACTGAAGAAAATGGATTTGTCTCTCTATGTAA	65640
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	GAGTCTTAGGATCACATTTGTCTCTCTATGTAAGACTCTTAGAGCCGAGACTCTACGAAG	65700
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945

KQ982655.1	CCTTCTGGATCTGTAGAGCCTCGAATCTGCATCTTTTCTCTCGTTTGTGTGCTAACTT	65760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TGACCATGCACCATACTGCCGGTTGTGGTAGCGGACGAGCACCCTAACGTACGCGTAAC	65820
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	GCGATGGTTGCTTTCAGTGTCTTCTCATCGGGGTTCAACCGAGCCCGTCTTACGTCGTT	65880
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	CATAAGTCTTGTACATATTTTGTACATGTATGTACATAAGTGTGTTAATCTTAACACGCA	65940
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	CGAAAACCATTTGATGATTACGGAATCTTAACTGCTAAGTGTCTTATATTTAATGTTTT	66000
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TAATCGATGCACGCACTCATCAAGAAACAATTTCTGATGGCGATCGATCGATTATTATCG	66060
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TTTTCTGTGCAATATAATTTTAAATAAAGTTTCTTACAAATCGCGAAAAATAATTGTAA	66120
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	AATTTAAATTTAGAGAGAGAGAGTTTATTCTAATAATTTTAAATCAATTTAATTTAAT	66180
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TAAATTAATTTAAACAATTAGAATTTAATTAATAATTTTAAATTTGTCAAAATCAA	66240
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	CTGATTTAATTATTATTTGAAGTTTAAAGTTGTTATTAAGTTACTATCATATCACATTAAT	66300
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	AAGCTAAATTTTAAAGTTTCTTGGAAATAAAATAAAATAAACTTTTATTTTAAAGAA	66360
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	TTAAATTAATGGATAGACGCTACTTGATTTGATTTGCCACGGGTATTGTTTCTCAAAA	66420
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3676
AsCHSlarvapupa	-----	4100
AsCHSoperaria	-----	1945
KQ982655.1	ATAATGCTTGATCGCGTATCGCAACGTATTCTACACACGTGATTTTTCAGGTGCACATCT	66480
Tz_CHS8 (CDS)	-----AGGTGCACATCT	3688
AsCHSlarvapupa	-----AGGTACACATCT	4112
AsCHSoperaria	-----AGGTACACATCT	1957
	**** *****	
	Exon 16	
KQ982655.1	CGAAGGAGTACCTACAACCTTGAGCCGATCGGTCTCGTGTGTTGCTTCTTCTTCGCGTTGA	66540
Tz_CHS8 (CDS)	CGAAGGAGTACCTACAACCTTGAGCCGATCGGTCTCGTGTGTTGCTTCTTCTTCGCGTTGA	3748
AsCHSlarvapupa	CGAAGGAGTATCTACAACCTCGAGCCAATCGGTCTCGTATTGCTTCTTCTTCGCATTGA	4172
AsCHSoperaria	CGAAGGAGTATCTACAACCTCGAGCCAATCGGTCTCGTATTGCTTCTTCTTCGCATTGA	2017

KQ982655.1	TATTGGTCATACAGTTCACCGCGATGTTGTTCCATCGATTTCGGAACACTGGCCACATTC	66600
Tz_CHS8 (CDS)	TATTGGTCATACAGTTCACCGCGATGTTGTTCCATCGATTTCGGAACACTGGCCACATTC	3808
AsCHSlarvapupa	TATTGGTTATACAGTTCCTGCGATGTTATCCATCGATTTCGGAACACTGGCCACATTC	4232
AsCHSoperaria	TATTGGTTATACAGTTCCTGCGATGTTATCCATCGATTTCGGAACACTGGCCACATTC	2077

KQ982655.1	TGCCAGCACCAGCTTAGACTGTTACAAGAAAGTGCGTATACGTCCTTATAAAATATA	66660
Tz_CHS8 (CDS)	TGCCAGCACCAGCTTAGACTGTTACAAGA-----	3838
AsCHSlarvapupa	TGCCAGCACCAGCTTAGATTGTTACAAGA-----	4262
AsCHSoperaria	TGCCAGCACCAGCTTAGATTGTTACAAGA-----	2107

KQ982655.1	CGCGTCTGTCTGGTCAAATTTGTTGCAAAAAGGTTGATCGTTCAATTTACAATTAGTAA	66720
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3838
AsCHSlarvapupa	-----	4262
AsCHSoperaria	-----	2107
KQ982655.1	AAACGACGAACTTCTTGTGTAACAACCTTGATACTCTTTGAGCTGCTCACGTGAATACT	66780
Tz_CHS8 (CDS)	-----	3838
AsCHSlarvapupa	-----	4262
AsCHSoperaria	-----	2107
	Exon 17	
KQ982655.1	TAAATAATCTCCACAGACGAAAGATCTCTCCGAGGAAGCCTTGTGTCGAAACACGCTGTC	66840
Tz_CHS8 (CDS)	-----AAACGAAAGATCTCTCCGAGGAAGCCTTGTGTCGAAACACGCTGTC	3885
AsCHSlarvapupa	-----AGACGAAGGATCTCTCCGAGGAAGCCTTATTATCGAAACACGCGATT	4309
AsCHSoperaria	-----AGACGAAGGATCTCTCCGAGGAAGCCTTATTATCGAAACACGCGATT	2154

KQ982655.1	GACATAGTGAGAGACCTCCAGAGGCTGGACGGAATAGAAGGCATTACGAGGAGGGCAGC	66900
Tz_CHS8 (CDS)	GACATAGTGAGAGACCTCCAGAGGCTGGACGGAATAGAAGGCATTACGAGGAGGGCAGC	3945
AsCHSlarvapupa	GATATAGTGAGAGATCTCCAAAGGCTGGACGGAATAGAAGGTGATTACGAGGAGGGCAGC	4369
AsCHSoperaria	GATATAGTGAGAGATCTCCAAAGGCTGGACGGAATAGAAGGTGATTACGAGGAGGGCAGC	2214

KQ982655.1	GGTAGTGGGCCCGGTAGACGAAAAACAATTCGGAACCTGGAGAAGAGTCGTAGAAAAACG	66960
Tz_CHS8 (CDS)	GGTAGTGGGCCCGGTAGACGAAAAACAATTCGGAACCTGGAGAAGAGTCGTAGAAAAACG	4005
AsCHSlarvapupa	GGTAGCGGGCCCGGTAGACGAAAAACGATCCGGAATCTGGAGAAGAGTCGTAGAAAAGACG	4429
AsCHSoperaria	GGTAGCGGGCCCGGTAGACGAAAAACGATCCGGAATCTGGAGAAGAGTCGTAGAAAAGACG	2274

KQ982655.1	CAGGCGATCAACACGCTCGACGTGGCCTTCAGGCAACGTTTCTTCAGTATGAATGAGAGC	67020
Tz_CHS8 (CDS)	CAGGCGATCAACACGCTCGACGTGGCCTTCAGGCAACGTTTCTTCAGTATGAATGAGAGC	4065
AsCHSlarvapupa	CAGGCGATCAACACGCTCGATGTGGCCTTCAGGCAACGTTTCTTCAGCATGAATGAGGGC	4489
AsCHSoperaria	CAGGCGATCAACACGCTCGATGTGGCCTTCAGGCAACGTTTCTTCAGCATGAATGAGGGC	2334

KQ982655.1	GCAGGTAAGCAAGACGAAAGTATGATCCCCAAAACAAGATAAAAATAAAAATAAAAGA	67080
Tz_CHS8 (CDS)	G-----	4066
AsCHSlarvapupa	G-----	4490
AsCHSoperaria	G-----	2335
	*	
KQ982655.1	ACATTTCAAACGTATATTAATATATCCTTACTCCTTTAAAGACAGAAGCTTTCTAACAAA	67140
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AAATCTCGAAGAAGAAATTTGTTTCTAAGGAAGTTTTCAGAGTTGCTGAATTCGATTCTG	67200
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	GTCTCAGAGAAATCTAAAATTCAAATGTCAAAAAATAATCTAATTATCCCATAGGCCAA	67260
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	GTTTCATGAAAATCGAGGAAATATATAATTTATAATGGTTCAATAATAATAAATAAACA	67320
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	TAAAATAATAAAGGGTTACGAGCCAAGTTATGATATATTTGAATATTAACAACCGTT	67380
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	TCGACCTTTTATCAGGACATCCTCAATCTTTACAATGGCAATGTTTAAAAAGCAAAAAT	67440
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335

KQ982655.1	TAAGTTTTAGTAACAGTTACAATTTTAAATTCATAGTTACGTTGATATAAAAAATAAAAA	67500
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AAATTTTAAGTTCGAAGATTCTTCATGTATTACCGCAAAAATGTGATTCCATTCTTCTC	67560
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	TCTTTTGTGATTGTGAACATTCGTTAACTTTCGCATATATCATTATGTCTATCAGTCGC	67620
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AAATCCAGTGTTAATAAAATCGGTTGAAATTTATAAAGTCATTGAAAGTATAAGAACACAT	67680
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	ACTCAAACGAGAAGGCATAGAACAATATAGAGCCGATAATTAATAAGTGTGAGTCAAAAT	67740
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AATTAAGAAGCAAAATGCGATCATATAGTCCAAAAATTTTAAAAACTTGTTCAAGTCAGA	67800
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AACTGAAAATATATAGTTCACATAAAAGGAGGTGACTTTAAATGGAATGTTAATCCACA	67860
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	ACCCAGACAGCACAGAATATTTATGATAAATATTTAATAATATTCATTTTTGAAATGTT	67920
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	ATATAGATNN	67980
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	NN	68040
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	NNNNNNNNATTTAAATAAATCTTATAAATATTTATAAATATTTGTAAATATTTTATAA	68100
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	ATGTCTGGGAAAGGCATTTTATAAATGTCTTAATATTTTGAACACTAACAGCGTTTCG	68160
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AGTGTAGTGAGTTGAACCAACCAAGTTGGTTAAGCCAAAAGTACCATGATCTCATCC	68220
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	AATTAGAGACCAAAGTAGAAACATGTAACGTCATTAATCGATCTGGATTAGGTTCAAACC	68280
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4066
AsCHSlarvapupa	-----	4490
AsCHSoperaria	-----	2335
KQ982655.1	CACTGCACTTAACAACCCATATAAGCTTTTCGTAATATTAATGAAAATCCTCATTCAGG	68340
Tz_CHS8 (CDS)	-----CAGG	4070
AsCHSlarvapupa	-----CAGG	4494
AsCHSoperaria	-----CAGG	2339

Exon 18		
KQ982655.1	CCTGTCGAGGAACATGTCGACGCGACGGGAGGCGTTCAAGGCCTCGAAGGCAGACGCAA	68400
Tz_CHS8 (CDS)	CCTGTCGAGGAACATGTCGACGCGACGGGAGGCGTTCAAGGCCTCGAAGGCAGACGCAA	4130
AsCHSlarvapura	CCTGTCGAGGAACATGTCGACGCGACGGGAGGCGTTCAAGGCCTCGAAGGCAGGCGCAA	4554
AsCHSoperaria	CCTGTCGAGGAACATGTCGACGCGACGGGAGGCGTTCAAGGCCTCGAAGGCAGGCGCAA	2399

KQ982655.1	TAGCATAATGGCGATGCGCCGGAAGTCGAGATGCAGACCCTGGGCGCAACACATCTA	68460
Tz_CHS8 (CDS)	TAGCATAATGGCGATGCGCCGGAAGTCGAGATGCAGACCCTGGGCGCAACACATCTA	4190
AsCHSlarvapura	CAGCATAATGGCAATGCGCCGGAAGTCGAGATGCAGACCCTAGGTGCGAACAAATATCTA	4614
AsCHSoperaria	CAGCATAATGGCAATGCGCCGGAAGTCGAGATGCAGACCCTAGGTGCGAACAAATATCTA	2459

KQ982655.1	CGGCGTGGCGGGCAACCCCTAGGAATTCAGGGCCGGCCATCCCGCAGTAGTCAGATATC	68520
Tz_CHS8 (CDS)	CGGCGTGGCGGGCAACCCCTAGGAATTCAGGGCCGGCCATCCCGCAGTAGTCAGATATC	4250
AsCHSlarvapura	TGGCGTGGCGGGTAACCCCTAGGAATTCAGGGCCGGCCATCCCGCAGTAGTCAGATATC	4674
AsCHSoperaria	TGGCGTGGCGGGTAACCCCTAGGAATTCAGGGCCGGCCATCCCGCAGTAGTCAGATATC	2519

KQ982655.1	CGTGAAGGATGTGTTTCGAGGGACACCCGGCTGCGACGTGGGGGCGGGCCACGTGAACGC	68580
Tz_CHS8 (CDS)	CGTGAAGGATGTGTTTCGAGGGACACCCGGCTGCGACGTGGGGGCGGGCCACGTGAACGC	4310
AsCHSlarvapura	CGTGAAGGATGTGTTTCGAGGGACATCCGGC---GACGTCGGGAACAGGCCATGTGAACGC	4731
AsCHSoperaria	CGTGAAGGATGTGTTTCGAGGGACATCCGGC---GACGTCGGGAACAGGCCATGTGAACGC	2576

KQ982655.1	CGGCTACGAGGGCGACGACAGCCCGTCAACAGCCTGCGGCTACAGAATCTTGGCGGCAG	68640
Tz_CHS8 (CDS)	CGGCTACGAGGGCGACGACAGCCCGTCAACAGCCTGCGGCTACAGAATCTTGGCGGCAG	4370
AsCHSlarvapura	CGGCTACGAAGGTGACGACAGCCCGTCAACAGCTTACGTCTACAGAATCTTGGCGGCAG	4791
AsCHSoperaria	CGGCTACGAAGGTGACGACAGCCCGTCAACAGCTTACGTCTACAGAATCTTGGCGGCAG	2636

KQ982655.1	CCAAGTCACGTGGCGAGAGGCGAAGTCCAACGTGTGATCGCGTCCATTCCAGCTCGTTGT	68700
Tz_CHS8 (CDS)	CCAAGTCACGTGGCGAGAGGCGAAGTCCAACGTGTGATCGCGTCCATTCCAGCTCGTTGT	4407
AsCHSlarvapura	CCAGGTCACGTGGCGAGAGGCGAAGTCCAACGTGTGATCCACGTTCCAT--CAGCTCGTTGT	4849
AsCHSoperaria	CCAGGTCACGTGGCGAGAGGCGAAGTCCAACGTGTGATCCACGTTCCAT--CAGCTCGTTGT	2694

KQ982655.1	TGCGATAAATTAACGAAGAATTTATTTATCCGACGAATTTATTTATCGAAGAGCTCGTTG	68760
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4407
AsCHSlarvapura	TGCGATAAATTAACGAAAAATTTATTTATCCGATGAATTTATTTATCGAAAAATTCATTG	4909
AsCHSoperaria	TGCGATAAATTAACGAAAAATTTATTTATCCGATGAATTTATTTATCGAAAAATTCATTG	2754

KQ982655.1	CCGAGTCCAGTATATATCTCTTCTGAGTAGAATTTCTAAA--ATATGCACGAAGGTTTC	68818
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4407
AsCHSlarvapura	CCGAGTCCAAATACATATTTCTTCCGAGTAGAATTTCTAAAATTCATATGCACGAAGGTTTC	4969
AsCHSoperaria	CCGAGTCCAAATACATATTTCTTCCGAGTAGAATTTCTAAAATTCATATGCACGAAGGTTTC	2814

KQ982655.1	ATCGCGCTTCTCCCCAGGAACACGCAAGTTAAGAGAAAATGAAATGACTTTATTTTG	68878
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4407
AsCHSlarvapura	ATCGCGCTTCTCCCCAGG-----	4987
AsCHSoperaria	ATCGCGCTTCTCCCCAGG-----	2832

KQ982655.1	ATGTCGGAATAGTCAAAATGATGATTTTTTTGTTATGAAATTTGACTGTTTATTGACGTT	68938
Tz_CHS8 (CDS)	-----	4407
AsCHSlarvapura	-----	4987
AsCHSoperaria	-----	2832