

CARACTERIZACIÓN Y DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE UNA QUITINA SINTASA MEDIADA POR ARNi EN *Hypothenemus hampei* (CURCULIONIDAE)

Characterization and RNAi-mediated knockdown of a chitin synthase in *Hypothenemus hampei* (Curculionidae)

Gustavo A. OSSA-OSSA¹ , Bernardo VILLEGAS-ESTRADA² , Arnubio VALENCIA-JIMÉNEZ^{2*} 

1. Maestría en Ciencias biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10, Manizales. Colombia.
2. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10, Manizales. Colombia.

* **For correspondence:** arnubio.valencia@ucaldas.edu.co

Received: 17th August 2020. **Returned for revision:** 17th December 2020. **Accepted:** 19th June 2021.

Associate Editor: Lorena Novoa Aponte

Citation/ citar este artículo como: Ossa-Ossa, G. A., Villegas-Estrada, B., y Valencia-Jiménez, A. (2022). Caracterización y disminución en la expresión de una quitina sintasa mediada por ARNi en *Hypothenemus hampei* (Curculionidae). *Acta Biológica Colombiana*, 27(2), 186 - 198 <https://doi.org/10.15446/abc.v27n2.89981>

RESUMEN

La broca del café, *Hypothenemus hampei*, es un insecto plaga que causa daños significativos al grano de café y grandes pérdidas económicas a los productores en todo el mundo. Al igual que otros insectos, la broca de café requiere de quitina sintasas (CHS) para la biosíntesis de la quitina, componente principal del exoesqueleto del insecto, y de vital importancia para su crecimiento y desarrollo. En este estudio, el gen *CHS1* de la broca del café (*HhCHS1*) fue identificado, caracterizado y posteriormente silenciado mediante el uso de ARNi, mecanismo que permite degradar el ARNm e interrumpir la expresión de proteínas de interés en un organismo. Los perfiles de expresión del gen *HhCHS1*, medidos por RT-qPCR, mostraron niveles de expresión diferencial en las diferentes etapas del desarrollo del insecto. Los niveles más altos de expresión se encontraron en larvas de segundo estadio (L2) y machos adultos. El ARNcd administrado por vía oral, a concentraciones de 2 µg/100 µL, generó un silenciamiento efectivo del gen *HhCHS1* (84 %) después de 7 días de tratamiento. Estos resultados sugieren que el gen *HhCHS1* desempeña un papel importante en el desarrollo del insecto, y que, por ende, podría usarse como objetivo para desarrollar nuevas estrategias de manejo de este insecto plaga, mediante el uso de ARNi.

Palabras Clave: ARNcd, café, insecto plaga, RT-qPCR

ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is an insect pest that causes significant damage to the grain and profound economic losses to coffee crops and producers worldwide. Like other insects, the coffee berry borer requires chitin synthases (CHS) for the biosynthesis of chitin, which is the main component of the insect exoskeleton, as well as a component of vital importance for their growth and development. In this study, the coffee berry borer *CHS1* gene (*HhCHS1*) was identified, characterized, and subsequently silenced by using RNAi, a mechanism that allows mRNA to be degraded, interrupting the expression of the proteins of interest in an organism. The expression profiles of the *HhCHS1* gene, measured by RT-qPCR, showed levels of differential expression in the different stages of insect development. The highest levels of expression were found in second instar (L2) larvae and adult males. Orally administered dsRNA, at concentrations of 2 µg/100 µL, was able to generate effective *HhCHS1* silencing (84 %) after 7 days of treatment. These results suggest that the *HhCHS1* gene plays an important role in the development of the coffee berry borer that could be used as target to develop new management strategies of this insect pest by using RNAi.

Keywords: Coffee, dsRNA, insect pest, RT-qPCR

INTRODUCCIÓN

Entre los factores que más limitan la producción de café a nivel mundial se encuentra la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), que ha sido considerado el principal insecto plaga, y cuyo ataque causa pérdidas económicas superiores a US\$ 500 millones de dólares anuales en los países productores del grano (Infante, 2018). Aunque originaria del continente africano, la broca del café fue introducida al continente americano, específicamente a Brasil, en 1913, y solo hasta 1988 llegó a Colombia, año en el que fue detectada por primera vez en el sur del departamento de Nariño (Bustillo, 2006). El control de este insecto plaga es poco efectivo por dos factores principales: la naturaleza críptica del insecto (es decir protegido dentro de la cereza de café), y la disponibilidad permanente de granos de café en el campo, que facilita la persistencia del insecto plaga de una generación a la siguiente (Infante, 2018).

La quitina, el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa, es un homopolímero lineal de unidades de N-acetilglucosaminas (GlcNAc) unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 (Merzendorfer y Zimoch, 2003). Este polisacárido, que está distribuido ampliamente en la naturaleza, es sintetizado principalmente por artrópodos, nematodos, y hongos (Merzendorfer, 2006). La cutícula presente en el exoesqueleto de los artrópodos está constituida principalmente por quitina, y contribuye significativamente a su éxito en el medio ambiente dado que esta molécula proporciona fuerza, soporte, protección contra patógenos, y evita la pérdida de agua (Chapman, 1998). Sin embargo, la rigidez de su estructura hace que los insectos recurran a mecanismos fisiológicos como la ecdisis para reemplazarla; facilitando su crecimiento y desarrollo (Merzendorfer, 2006). Durante este proceso biológico, el metabolismo de síntesis de la quitina se activa para producir en el insecto un nuevo exoesqueleto. La nueva cutícula es esclerotizada, por lo que adquiere dureza y se torna de color oscuro en los insectos (Kramer y Muthukrishnan, 2005). Actualmente se sabe que la quitina es un componente central de la epidermis, la tráquea y la matriz peritrófica (MP) de los insectos; esta última está estrechamente relacionada con el proceso digestivo (Zhuo et al., 2014), y representa una línea de defensa del insecto contra patógenos ingeridos (Tellam y Eisemann, 2000; Kelkenberg et al., 2015). Estudios recientes han mostrado que la MP puede considerarse un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos métodos que permitan controlar insectos plaga (Wang y Granados, 2000; Wu et al., 2016).

El paso final en la ruta de síntesis de quitina es catalizado por la enzima quitina sintasa (CHS; EC 2.4.1.16), una proteína que pertenece a la familia de las glicosiltransferasas, que transfieren restos de azúcares desde los donantes activados hacia los aceptores específicos, dando como resultado la formación de un enlace glucosídico (Merzendorfer, 2006).

En los insectos se han reportado dos genes de quitina sintasa (*CHS1* y *CHS2*) que participan en la síntesis de quitina en la cutícula y otras estructuras presentes en ellas, y que se expresan a lo largo de su ciclo de desarrollo (Zhu et al., 2002; Arakane et al., 2004). Así mismo, en otros estudios Moreira et al. (2007), Arakane et al. (2008), Mansur et al. (2014) reportaron que los genes relacionados con la síntesis de quitina se expresan en estructuras reproductivas como los ovarios y huevos de diferentes insectos como *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum* y *Rhodnius prolixus*.

Hasta la fecha, las enzimas CHS se han clonado y secuenciado en varias especies de insectos de diferentes órdenes, como Lepidópteros (Bolognesi et al., 2005; Ampasala et al., 2011; Zhuo et al., 2014), Dípteros (Zhang et al., 2012; Yang et al., 2013), Hemípteros (Bansal et al., 2012; Alvaranga et al., 2016) y Coleópteros (Shi et al., 2016; Macedo et al., 2017). Estudios recientes se enfocan en las funciones de los genes *CHS*, ayudados por el mecanismo del ARN de interferencia (RNAi). Esta estrategia molecular hace uso de secuencias de ARN de doble cadena (ARNcd) para activar el mecanismo de silenciamiento génico, conduciendo a la degradación del ARN mensajero endógeno (ARNm) del insecto (Siomi et al., 2011). Estos estudios de expresión de las CHSs se han efectuado en insectos holometábolos y hemimetábolos como: *T. castaneum* (Arakane et al., 2005; Arakane et al., 2008), *Spodoptera exigua* (Tian et al., 2009), *Locusta migratoria* (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2012), *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens* (Wang et al., 2012), *Anthonomus grandis* (Firmino et al., 2013), *Bactrocera dorsalis* (Yang et al., 2013) y *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 2015).

Una de las estrategias potenciales para el control de insectos plaga es el uso del mecanismo natural de RNAi para lograr una reducción significativa en la expresión relativa de un gen vital, y cuyo resultado fenotípico depende de la supresión eficiente del transcripto asociado al gen y la consecuente reducción en la expresión de la proteína codificada (Scott et al., 2013). Los resultados de Wang et al. (2019), llevados a cabo en *Sogatella furcifera*, un insecto plaga que afecta los cultivos de arroz en algunos países de Asia y el Pacífico, demostraron que el silenciamiento génico basado en ARNi inhibe los niveles de expresión de transcriptos (ARNm) de CHS en ninfas del insecto que se inyectaron con ARN de cadena doble específicos para *SfCHS1*, *SfCHS1a* y *SfCHS1b*. Dichos insectos desarrollaron malformaciones fenotípicas y la consecuente muerte de la mayoría de las ninfas tratadas. De la misma manera, otros estudios demostraron que la disminución del gen *AgraCHS2* mediada por ARNi, la CHS más importante del gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*), afecta el desarrollo de este insecto, resultando en una reducción de la oviposición del 93 % y una mortalidad del 100 % de los adultos (Macedo et al., 2017).

Actualmente se sabe que el silenciamiento génico de transcriptos involucrados en la vía de síntesis de quitina en

la MP tiene un gran potencial como estrategia insecticida. Estudios realizados por Arakane et al. (2008) y Alves et al. (2010), indicaron que el silenciamiento del gen *CHS2* en los insectos del orden coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera* y *T. castaneum* generan trastornos graves en la asimilación de nutrientes por parte del insecto como consecuencia de la malformación de la MP; lo que causa la posterior muerte de los insectos tratados. En el presente estudio se demuestra la presencia del gen de la quitina sintasa (*CHS1*) en *H. hampei* (*HhCHS1*) y se determinan los perfiles de expresión del gen *CHS1* en diferentes etapas de desarrollo del insecto, así como la disminución de su expresión en hembras, mediada por el ARNi. Los resultados obtenidos contribuyen significativamente a un mejor entendimiento de su función biológica en el metabolismo del insecto, lo que permitirá plantear futuras estrategias para el manejo de este insecto plaga, a través del empleo del mecanismo de ARNi.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE INSECTOS

Insectos adultos de la broca de café fueron removidos de grano cereza proveniente de plantas infestadas en el campo en Palestina, Caldas (5 0'28.735" N, 75 36'44.153" W), y posteriormente criados en granos de café pergamino tratado con el fungicida Carbendazim (0,3 % v/v), para evitar una posible contaminación. Las muestras de larvas (L1 y L2) y adultos (machos y hembras) de la broca del café empleadas en los diferentes ensayos se obtuvieron de las colonias que fueron establecidas y mantenidas en laboratorio de cría (2200 m. s. n. m. a 25 °C y 75 % HR), adscrito a la Universidad de Caldas en Manizales, Caldas, Colombia (5 3'22" N, 75 29'34.08" W).

Los insectos se colectaron entre los meses de abril y junio de 2019 y se mantuvieron en tubos de micro-centrifuga de 1,5 mL, libres de ARNasas, con 1 mL de solución de estabilizadora de ARN (RNAlater® solution, EE. UU.), y posteriormente fueron almacenados a -80 °C hasta su procesamiento. Para la extracción de ARN total se utilizaron muestras de 20 mg del cuerpo completo de cada etapa de desarrollo del insecto.

EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

El ARN total se extrajo de cada etapa de desarrollo de *H. hampei* usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), y su concentración se determinó en NanoDrop-1000 (Thermo-Fisher-Scientific, EE. UU.). La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 1 µg de ARN total de cada muestra y el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores para RT-qPCR y RT-PCR semicuantitativa se diseñaron con el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (Tabla 1). Para el diseño de los primers T7 se partió de la secuencia completa del gen, obtenida del transcriptoma ensamblado de la broca (Noriega et al., 2019), y con ayuda del programa Standalone usando Blast local; donde se seleccionó un fragmento nucleotídico (amplicón) de 438 bp, al que se le adicionó la secuencia T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) al inicio de la región 5' de cada cebador (sentido y anti sentido) (Tabla 1). Para los análisis de RT-qPCR se usó el gen de la *actina* como referencia (Barros Rodrigues et al., 2014; Basu et al., 2019).

Tabla 1. Secuencia de cebadores empleados en los análisis de RT-qPCR y PCR-semicuantitativa (RT-PCR). La secuencia T7 para el gen *CHS1* aparece en negrilla. F: forward; R: reverse.

Genes	Secuencias (5'-3')	Amplificación (pb)	Experimento
Actina (Act)	F: GGGATGACATGGAAAA-GATCTG R: GGGTGTGAAGGTTT-CAACA	153	RT-qPCR y RT-PCR
Quitina sintasa (CHS1)	F: TTAGGAGCAGCTTGT-GGACG R: ACCGGGACTACAAAG-TACGC	138	RT-qPCR y RT-PCR
T7 Quitina sintasa (CHS1)	F: AATACGACT-CACTATAGGGAG TGGACCACCCAAGAAAA R: AATACGACT-CACTATAGGGCC GGGACTACAAAGTACGCA	438	Síntesis de ARNcd

PCR SEMI-CUANTITATIVA

El ADNc de los diferentes estados biológicos del insecto se sintetizó a partir de 1000 ng de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc (RNeasy MiniKit (Qiagen, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. El ADNc sintetizado se empleó como plantilla para la amplificación y detección del transcripto de quitina sintasa (*HhCHS1*) en cuatro diferentes etapas del desarrollo de *H. hampei*. El nivel de expresión del transcripto se evaluó en una mezcla de reacción que contenía 0,25 µL de cada cebador (10 µM), 2 µL de ADNc (1:50), 5 µL de SYBR Green y agua libre de nucleasas (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 min, 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, seguido de 25 ciclos y extensión de 1 min a 72 °C. Todos los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v).

PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Los experimentos de qPCR se realizaron usando el kit SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla para PCR contenía 2 µL de ADNc sintetizado (1:50), 0,2 µL de cada cebador (10 µM), 5 µL de SYBR Green, y 2,6 µL de agua libre de nucleasas. Todas las reacciones se llevaron a cabo con cuatro repeticiones técnicas y dos repeticiones biológicas, en un volumen final de 10 µL. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, EE. UU.). El programa para la qPCR incluyó una etapa de sostenimiento de 95 °C durante 20 s seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 3 s y un anillamiento / extensión a 60 °C durante 30 s. Al final de cada reacción de qPCR se generó una curva de fusión para confirmar la producción de un único pico y descartar la posibilidad de formación de dímeros con los cebadores, y la generación de productos o amplicones inespecíficos. El gen de la *actina* se utilizó como control endógeno para todas las etapas del desarrollo (Barros Rodrigues et al., 2014). Las larvas del primer estadio se seleccionaron como etapa de referencia para las comparaciones entre experimentos. El método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen 2001) se usó para calcular el nivel de expresión relativa de los genes.

DISEÑO Y SÍNTESIS DEL ARNcd

Se diseñó un fragmento de 438 pb del ARNcd *in silico* y se sintetizó en el laboratorio de la Universidad de Caldas en Manizales, Caldas. Brevemente, se utilizó ADNc como plantilla para la primera reacción de PCR, junto con los cebadores con el promotor T7 del gen *CHS1* (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTGGCGACCACCAAGAAA-3') y (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCGGGACTACAAAGTACGCA-3'), con condiciones de corrida que fueron descritas anteriormente. Seguidamente, se empleó el amplicón de esta reacción como molde para la síntesis del ARNcd con la ayuda del HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (Cat. E2040S, New England Biolabs, EE. UU.), y según las instrucciones del fabricante. La reacción de síntesis de ARNcd se incubó a 37 °C en un termociclador durante un periodo de 16 h, y al cabo de este tiempo se elevó la temperatura de este a 80 °C durante 5 minutos con el fin de desactivar la enzima T7. Después de la transcripción *in vitro* se determinó la concentración de ARNcd sintético resultante usando un NanoDrop-1000 (Thermo-Fisher-Scientific, EE. UU.). La integridad de la molécula de ARNcd se determinó usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v.

SILENCIAMIENTO MEDIADO POR INGESTIÓN DE ARNcd

El silenciamiento del gen de la quitina sintasa de la broca (*HhCHS1*) se hizo mediante administración vía oral de la

molécula de ARNcd sintético específico para la secuencia del gen *HhCHS1*. Se realizó un lavado del café pergamino verde para retirar el mucílago, después se agregó una solución del fungicida Carbendazim al 0,3 % v/v por un periodo de 8 h y se dejó secar en zarandas al aire libre durante dos días. Luego se almacenó a 4 °C hasta su uso. En los bioensayos se incluyó como control negativo, agua libre de nucleasas. El ARNcd se suministró vía oral a hembras adultas del insecto, y no a estados inmaduros (Aguilera et al., 2011), alimentadas con granos de café así: noventa y seis por repetición y seis hembras por cada pozo, que contenía 0,3 g de café molido mezclado con 2 µg/100 µL de ARNcd*CHS1* en una placa tipo ELISA). Los bioensayos se mantuvieron a 25 °C y 75 ± 5 % de humedad relativa. A los siete días, las hembras vivas fueron retiradas de la dieta para efectuar la extracción del ARN total, y finalmente se procedió a realizar el análisis por RT-qPCR.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *HhCHS1*

La secuencia de aminoácidos de la proteína HhCHS1 se predijo por traducción de la secuencia nucleotídica correspondiente, para lo cual se usó el buscador de marco abierto de lectura (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Esta secuencia proteica de la broca del café se depositó en el Gen Bank (ID: QIB02551). Las hélices transmembranales de la proteína se predijeron con el software TMHMM v.2.0 (Krogh et al., 2001). En este estudio se emplearon otras herramientas de análisis bioinformático de secuencia de proteínas disponibles en sitio web de ExpASY Proteomics (<http://us.expasy.org/>), con el fin de determinar el peso molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI) más probable de la proteína HhCHS1. La predicción de los puntos de N-glicosilación de la proteína se realizó a través de la herramienta web <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.

El árbol filogenético y los alineamientos múltiples de las secuencias de proteínas se generaron mediante el software ClustalW (Corpet, 1988), y los análisis genéticos moleculares con el software MEGA X (Kumar et al., 2018). La historia evolutiva se infirió con el método de máxima verosimilitud y el modelo de Le y Gascuel, con la distribución discreta de gamma y los sitios invariables (Le y Gascuel, 2008). Un análisis de bootstrap no paramétrico se realizó con 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985), con el objetivo de calcular los porcentajes de árboles replicados en los que las secuencias se agruparon.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se usó un análisis de varianza a una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para la expresión relativa. La prueba *t* de Welch, que no implica homogeneidad en la varianza, se utilizó para determinar las

diferencias en el bioensayo de silenciamiento (ARNcd*CHS1*) mediante el programa estadístico R para Windows versión 3.6.3. Los datos se expresaron como la media \pm SE.

RESULTADOS

PERFILES DE TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *HhCHS1*.

Los patrones de expresión de *HhCHS1* en estados de desarrollo inmaduros y adultos de la broca de café (*H. hampei*) fueron analizados por RT-qPCR. Los resultados mostraron que el transcrito *HhCHS1* se expresa en todas las etapas del desarrollo del insecto (Fig. 1a). El transcrito *HhCHS1* mostró un alto nivel de expresión en larvas de segundo estadio (L2), y una expresión más baja en larvas de primer estadio (L1). Igualmente, el nivel de expresión de *HhCHS1* fue mayor en machos adultos que en hembras de *H. hampei*. Se observó igualmente una reducción drástica en el nivel de expresión de transcritos de *HhCHS1* durante la etapa pupal, en comparación con los niveles de expresión encontrados en larvas de segundo estadio (datos no mostrados). Es importante mencionar que el nivel de expresión de *HhCHS1* en varias etapas biológicas de la broca del café también se analizó por RT-PCR semicuantitativa (Fig. 1b). Los resultados indicaron que *HhCHS1* se expresa principalmente en larvas del segundo instar (L2) y machos, y un poco menos en las larvas de primer instar (L1) y en hembras, lo que concuerda con los resultados que se obtuvieron por RT-qPCR.

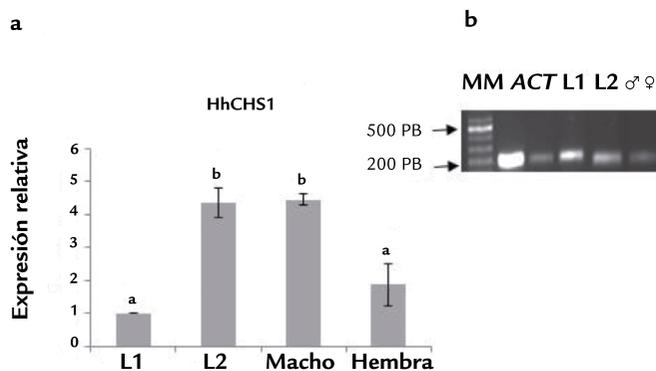


Figura 1. Patrones de expresión del gen *HhCHS1* en la broca del café (*Hypothenemus hampei*). a. qPCR utilizando ADNc de insectos en cada etapa del desarrollo. El perfil de expresión se presenta de manera relativa a la etapa L1, que se definió como 1. b. El inserto se obtuvo mediante PCR semicuantitativa de la expresión diferencial del gen *HhCHS1* de varias etapas del desarrollo del insecto. MM: marcador molecular 1Kb. El gen *Actina* (Act) se utilizó como patrón de referencia interno. L1 (larvas de primer instar), L2 (larvas de segundo instar). El nivel de expresión (media \pm SE) se basó en cuatro réplicas técnicas y dos biológicas. Las letras minúsculas encima de cada barra indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos mediante un análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), (R versión 3.6.3).

SILENCIAMIENTO DE *HhCHS1* MEDIADO POR ARNi

Con el objetivo de evaluar la efectividad del silenciamiento génico mediado por ARNcd específico para gen *HhCHS1*, se realizó la cuantificación del transcrito a través de RT-qPCR del ARN total extraído de hembras adultas del insecto después de siete días de cría en dietas a base de café, que contenían la secuencia de silenciamiento (ARNcd). Los resultados muestran que el gen *HhCHS1* fue silenciado de manera efectiva en las hembras adultas del insecto por la maquinaria asociada al ARNi. Los niveles del transcrito de *HhCHS1* se redujeron considerablemente en un 84 % ($p < 0,005$) en comparación con el nivel de transcripción de *HhCHS1* en el control (agua libre de nucleasas) (Fig. 2). En ningún bioensayo realizado con la molécula de ARNcd*CHS1* se observaron resultados de mortalidades con datos significativos (datos no mostrados).

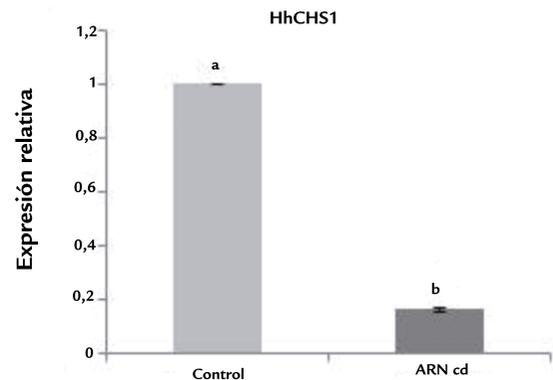


Figura 2. Expresión relativa del gen *HhCHS1* en hembras de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), tratadas con ARNcd. En el control se usó agua libre de nucleasas. El perfil de expresión se presenta relativo a las larvas de primer estadio, que se definió como 1. El nivel de expresión (media \pm SE) se basó en cuatro réplicas técnicas y dos biológicas. Las letras minúsculas sobre cada barra indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos mediante el análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba *t* de Welch (R, versión 3.6.3). Valor $p < 0.001$.

CARACTERIZACIÓN DEL GEN *HhCHS1*

Los resultados muestran que la secuencia del gen *HhCHS1* tiene un marco abierto de lectura de 4695 pb, que codifica una proteína de 1564 residuos de aminoácidos (Anexo 1), denominada quitina sintasa. La secuencia nucleotídica del gen *HhCHS1* se presenta con el codón de inicio ATG en las posiciones 1-3, y el codón de parada TAA en las posiciones 4693-4695. El análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos de la región del ORF del gen mostró un 93 % de identidad

con la secuencia de *Dendroctonus ponderosae* (*DpCHS*, XP_019756066.1), 92 % de identidad con la de *Sitophilus oryzae* (*SoCHS2*, XP_030746406.1), y 91 % de identidad en la secuencia con la de *A. grandis* (*AgCHS1*, AHY28559.1). El peso molecular predicho *in silico* para la proteína *HhCHS1* fue de 178,65 kDa, con un punto isoeléctrico de 6,52. Se predijeron 16 α -hélices transmembrana, lo que sugiere que *HhCHS1* es una proteína integral de la membrana, similar a la proteína *CHS1* de otros insectos, lo que concuerda con lo reportado por Kramer y Muthukrishnan, (2005) y Merzendorfer (2006). La *CHS1* de *H. hampei* tiene una estructura modular con un dominio N-terminal (dominio A) compuesto por nueve estructuras secundarias tipo α -hélices que probablemente atraviesan la membrana, y un dominio catalítico altamente conservado (dominio B) que contiene los motivos (QRRRW y GEDRW), característicos de quitina sintasas. Así mismo, se encontraron siete regiones transmembrana en el dominio C-terminal (dominio C) de la proteína *CHS1* de *H. hampei*, características de las glicosiltransferasas. El motivo distintivo SWGTRE (1057-1062), que se supone juega un papel en la translocación de quitina (Merzendorfer, 2006), también se identificó en el dominio C de la proteína. El análisis de alineamiento de secuencias proteicas proporcionó información sobre la secuencia del gen *CHS1* de *H. hampei*, sugiriendo que este gen es miembro del grupo *CHS1* (Wang et al., 2019). Inferencia que pudo corroborarse al someter la secuencia de la *CHS1* de la broca del café a un análisis en InterProScan con la herramienta PANTHER (PTHR 22914: SF42) (Mi et al., 2019).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CHS1 DE BROCA DE CAFÉ

El árbol filogenético se construyó con base en las secuencias de aminoácidos de *CHS* de varias especies de insectos, esto con el fin de investigar la relación evolutiva de *HhCHS1* con las otras especies de insectos seleccionadas (Fig. 3). El análisis mostró que *HhCHS1* se agrupó en el mismo clado de *A. grandis*-*AgCHS1* (bootstrap 65,2 %), un insecto plaga del algodón del orden coleóptera. Además, el taxón (*D. ponderosae*) muy cercano a *CHS1* de la broca del café fue agrupado dentro del mismo clado (bootstrap 60,4 %), indicando un mismo ancestro común para estos dos organismos. El análisis también mostró que los coleópteros se agruparon dentro de un mismo clado (área sombreada en gris, bootstrap 100 %). En general, se formaron tres grupos de *CHS1* y *CHS2* de diferentes especies de insectos (regiones coloreadas en la Fig. 3). El análisis filogenético incluyó secuencias pertenecientes a insectos del orden lepidóptera como un grupo externo.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el patrón de expresión del gen *HhCHS1* fue estudiado en todas las etapas de desarrollo de la broca de café usando RT-qPCR. La mayor expresión del

transcripto se observó en larvas de segundo estadio (L2), instar que se sabe, en *H. hampei*, termina en la formación a hembra adulta (Fig. 1a). También se observaron niveles relativos de transcritos más elevados en los machos adultos en comparación con las hembras adultas. Tales diferencias de expresión del transcripto en cada etapa pueden demostrar la participación diferencial del gen *CHS1* en el desarrollo del insecto (Ye et al., 2019). Así mismo, el nivel dinámico de los transcritos de *HhCHS1* a través de las diversas etapas de desarrollo del insecto plaga, sugiere que la expresión constitutiva de *HhCHS1* podría ser necesaria en el desarrollo de la broca, como ocurre con otros insectos y como ha sido reportado en investigaciones similares hechas por Arakane et al. (2011) en el coleóptero *T. castaneum*. En contraste con estos resultados, los niveles de expresión relativos de *S. furcifera SfCHS1* fueron más altos justo después de cada muda, y los niveles de expresión más bajos para *SfCHS1* se observaron en adultos del tercer día (Wang et al., 2019). Así mismo, estudios realizados con *T. castaneum* mostraron que el gen de quitina sintasa *TcCHS1* está especializado en la síntesis de la cutícula epidérmica (Arakane et al., 2011).

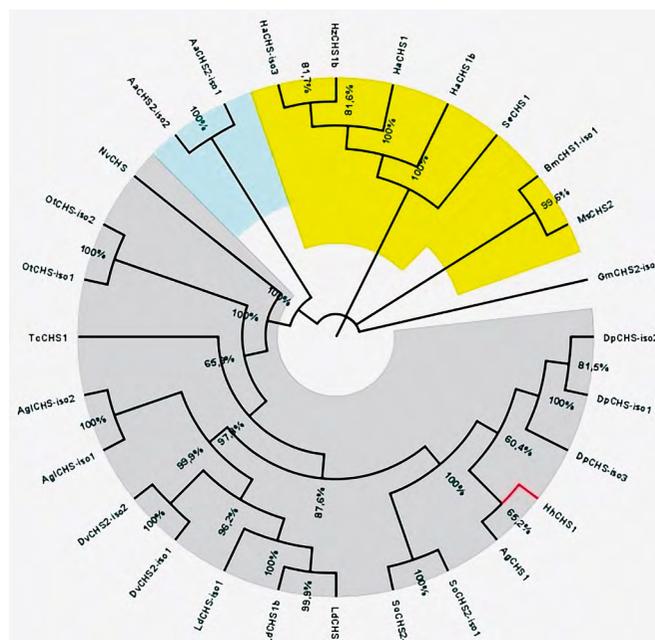


Figura 3. Árbol filogenético del gen quitina sintasa *HhCHS1* de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Análisis basado en el método de neighbour-joining según secuencias de aminoácidos utilizando MEGA X. Los valores de soporte Bootstrap con 1000 pseudoréplicas se muestran en las ramas. Quitina sintasas de *Anthonomus grandis* (Ag), *Dendroctonus ponderosae* (Dp), *Anoplophora glabripennis* (Ag), *Sitophilus oryzae* (So), *Leptinotarsa decemlineata* (Ld), *Tribolium castaneum* (Tc), *Diabrotica virgifera virgifera* (Dv), *Nicrophorus vespilloides* (Nv), *Onthophagus taurus* (Ot), *Aedes albopictus* (Aa), *Helicoverpa armigera* (Ha), *Spodoptera exigua* (Se), *Helicoverpa zea* (Hz), *Manduca sexta* (Ms), *Bombyx mori* (Bm) y *Galleria mellonella* (Gm), fueron escogidas en este estudio. *CHS* de Lepidópteros se usaron como un grupo externo.

Estudios sobre la regulación de la síntesis de quitina (*CHS1*) en los áfidos *Toxoptera citricida* (Shang et al., 2016) y *Sitobion avenae* (Zhao et al., 2018) mostraron que *TCiCHS* y *SvCHS* juegan un papel importante en el desarrollo de ninfa-adulto; algo que también pudiese ocurrir en las etapas de desarrollo de la broca del café, teniendo en cuenta que el gen *CHS* es altamente conservado en la mayoría de los insectos. El análisis por RT-PCR (Fig. 1b) indicó que los niveles de transcripción del gen blanco en la broca fueron muy similares a los obtenidos por RT-qPCR. La expresión del gen *HhCHS1* muy seguramente está involucrado en el desarrollo embrionario de la broca, como ocurre con otros insectos del orden coleóptera (Arakane et al., 2011).

El ARNcd empleado en este estudio se sintetizó *in vitro* y se suministró por vía oral a las hembras adultas de la broca en granos de café molido. La eficacia del silenciamiento génico mediado por ARNi de *HhCHS1* se evaluó mediante RT-qPCR con el ARN total extraído de las hembras. Se demostró que esta molécula desencadena el silenciamiento génico a través de ARNi, provocando una disminución de la expresión de transcriptos de *HhCHS1*, en comparación con el control; tal y como se planteó en la hipótesis del estudio (Fig. 2). Estos resultados fueron similares a los reportados en insectos adultos de *A. grandis* (holometábolo), donde el gen *AgraCHS2* fue silenciado mediante tratamiento con ARNcd, lo que redujo los niveles de transcriptos del gen (Macedo et al., 2017). Del mismo modo, Mansur et al. (2014) encontraron en *R. prolixus* una correlación positiva entre la reducción de la expresión de *CHS* y la inhibición severa de la muda observada en el 66 % de los insectos sometidos al silenciamiento del gen *CHS*. Por su parte, resultados obtenidos con ARNcd de *CHS1* en *A. pisum* muestran una supresión de la expresión génica en las etapas de desarrollo del insecto, lo que produjo malformaciones del cuerpo del insecto y su muerte (Ye et al., 2019).

Esto contrasta con los resultados obtenidos con la broca del café, en donde no se observaron diferencias significativas en la mortalidad de los insectos tratados respecto al grupo control (datos no mostrados), probablemente se debió a las concentraciones evaluadas, o eventualmente al tamaño final de la molécula de ARNcd. Sería interesante incluir estados inmaduros del insecto en las evaluaciones posteriores de silenciamiento, con miras a evaluar el impacto del silenciamiento del gen *HhCHS1* en la mortalidad o malformación en el insecto. Sin embargo, el nivel de silenciamiento de *HhCHS1* correspondiente al 84 % encontrado en nuestro estudio puede ser de interés para futuros trabajos focalizados en el manejo de este insecto plaga.

Estudios recientes de silenciamiento de genes esenciales para funciones celulares básicas y de respuesta a estrés (*hsp*, *shi*, *iap*) en el escarabajo del pino de montaña *D. ponderosae* reportados por Kyre et al. (2020), evidenciaron mortalidades de los adultos al cabo de siete días en todos

los tratamientos. A diferencia de nuestro trabajo con hembras adultas de broca, ellos observaron mortalidades hasta del 100 %, con datos estadísticamente significativos, probablemente porque combinaron la ingesta oral y la absorción dermal de la molécula silenciadora. Finalmente, Arakane et al. (2005), evaluaron el silenciamiento del gen *TcCHS1* y observaron dos fenotipos diferentes durante el silenciamiento de *TcCHS1* de *T. castaneum* en las larvas inyectadas (2 µg de ARNcd) en el penúltimo estadio larvario, las cuales no pudieron mudar para alcanzar la última etapa larval. Dichos estudios contrastan con nuestros resultados con la broca del café, en donde las hembras de este insecto solo fueron alimentadas con ARNcd mezclado con granos de café molido (no inyectadas). Cabe destacar que la eficiencia del silenciamiento génico a través del ARNi basado en la alimentación con ARNcd, es menor en comparación con la inyección de la molécula silenciadora (Ye et al., 2019), lo que podría ser insuficiente para desencadenar algún fenotipo letal en la broca del café.

La mayoría de los organismos e insectos que contienen quitina, un componente esencial de la cutícula de los artrópodos, deben disponer en su maquinaria molecular de quitina sintetasas (glicosiltransferasas), proteínas que participan de manera muy activa en las rutas metabólicas que conducen a la síntesis de quitina (Merzendorfer, 2006). Diversos estudios sobre estas enzimas *CHS*s han reportado su actividad biológica en órdenes de insectos, incluidos Himenóptera, Díptera, Ortóptera, Lepidóptera, Hemíptera, y Coleóptera (Alves et al., 2010; Chen et al., 2013; Zhuo et al., 2014; Alvarenga et al., 2016). Según sus relaciones y funciones de secuencias de aminoácidos, las *CHS*s de los insectos se clasifican en dos grupos, *CHS1* y *CHS2*. En el presente estudio se reporta la caracterización *in silico* de la proteína *CHS1* de *H. hampei*, llamada *HhCHS1*, lo que contribuye a la comprensión de las quitina-sintetasas en los insectos, y muy especialmente en la broca de café. El peso molecular y el punto isoeléctrico predicho para la proteína de broca del café son similares a los reportados para otros insectos (Bansal et al., 2012; Wang et al., 2012; Macedo et al., 2017).

Idéntico a las *CHS*s de otros insectos, se predice que *HhCHS1* es una proteína integral de membrana con 16 alfa hélices hidrofóbicas atravesando la membrana. Esta distribución y el número conservado de estos segmentos transmembranales de *HhCHS1* permiten que el dominio medio (dominio B), que es el dominio catalítico, se disponga hacia el citoplasma, lugar donde el sustrato enzimático está disponible para el comienzo de la reacción (Tellam et al., 2000). Su dominio catalítico es altamente conservado entre las *CHS*s de insectos, incluyendo las regiones conservadas de la familia de las glicosiltransferasas, GEDRW y QRRRW (Tellam et al., 2000; Kramer y Muthukrishnan, 2005; Merzendorfer, 2006; Mansur et al., 2014; Wang et al.,

2019). Entre las 16 regiones transmembrana previstas, la CHS1 de la broca del café tiene siete segmentos ubicados inmediatamente después del dominio catalítico medio, características típicas de las glicosiltransferasas, las cuales crean una topología que está presente en las CHSs de hongos e insectos (Merzendorfer, 2011). Otro motivo distintivo, el SWGTR que se supone juega un papel en la translocación de quitina (Merzendorfer, 2006), se encontró igualmente en el dominio C de la proteína CHS1 de la broca del café (Material suplementario 1) Además, se logró predecir que al menos nueve aminoácidos presentes en la estructura primaria de la proteína contienen sitios de N-glicosilación (Material suplementario 1).

El análisis del multialineamiento también se realizó con el objetivo de determinar el dominio catalítico medio de la estructura de la proteína. Este análisis mostró un dominio catalítico medio altamente conservado (dominio B) en *H. hampei*. Otros estudios sobre quitina sintasas (CHS) para otras especies, tales como *T. castaneum*, *Acyrtosiphon pisum* y *N. lugens*; muestran la proteína con aproximadamente 400 aminoácidos y con tres motivos definidos, a saber, GEDRW, QRRRW y SWGTR. En este estudio se encontraron resultados similares para la broca del café (Material suplementario 2). Además, se encontraron otros motivos de quitina-sintasas en las alineaciones de la secuencia de CHS1 de la broca con otros insectos, tales como; DID, FEYA y CSPGCFSLFR (Mansur et al., 2014).

El análisis *in silico* de la proteína deducida predijo que CHS1 de la broca tiene un potencial intrínseco para múltiples modificaciones postraduccionales como la N-y O-glicosilación, los cuales pueden participar en la regulación de la actividad enzimática como se encontró en el CHS2 de *A. grandis* (Macedo et al., 2017). El tamaño del marco de lectura del gen (4695 pb) que codifica para la CHS1 de la broca fue similar al marco de lectura del gen CHS1 en muchos insectos del orden coleóptera, díptera, lepidóptera, y hemíptera, principalmente. En consecuencia, los resultados de este estudio sugieren que el gen que codifica la quitina-sintasa en la broca del café pertenece al grupo CHS1, grupo que fue clasificado por Merzendorfer (2006).

Los hallazgos reunidos en el árbol filogenético fueron similares a los trabajos de Wang et al. (2012); Mansur et al. (2014); Ye et al. (2019); Wang et al. (2019), quienes hicieron agrupaciones dentro de los árboles filogenéticos construidos, con secuencias CHS1 y CHS2 de varios órdenes de insectos, tal y como se hizo con la broca del café, donde se logró evidenciar una alta relación evolutiva del gen *HhCHS1* con los de otros coleópteros (*AgraCHS1* y *DpCHS*) (Fig. 3). De igual manera el taxón *D. ponderosae* se agrupó en un clado monofilético, con la broca; corroborando la cercanía evolutiva de este coleóptero con *H. hampei*. De igual manera, como era de esperarse, el orden lepidóptera se agrupó en un clado aparte de los demás ordenes incluidos en el análisis.

CONCLUSIONES

Se logró caracterizar exitosamente el gen de la quitina sintasa (*HhCHS1*) de *H. hampei*, el cual se expresó en todas las etapas biológicas del insecto. El árbol filogenético demostró que el gen pertenece a la familia de CHS1, y que está altamente expresado en larvas de segundo instar y machos adultos principalmente. El silenciamiento génico basado en ARNi suprimió los niveles de transcritos de CHS1 en las hembras adultas de la broca del café. Sin embargo, no se obtuvieron datos de mortalidad con diferencias estadísticas significativas después de la alimentación de ARNcd en mezcla con café molido. Quizás si se suministraran las secuencias de ARNcd para CHS1 a estados inmaduros del insecto a través de otras vías, como dietas artificiales o inmersión en solución conteniendo secuencias de silenciamiento, podrían obtenerse fenotipos con alguna malformación en el desarrollo.

Los resultados indican que *HhCHS1* podría ser un objetivo potencial para el control de la broca del café basado en ARNi, porque se trata de un gen de interés para el crecimiento y desarrollo del insecto. Deben abordarse estudios futuros que involucren variantes del gen CHS1 (*CHS1a* y *CHS1b*), que se sabe están involucrados en la función fisiológica de diferentes tejidos en otras especies de insectos y posiblemente en *H. hampei*, en caso de que la broca del café presente en su transcriptoma dichas variantes de los transcritos de CHS1.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Caldas (Manizales, Colombia), el Departamento de Entomología de la Universidad de Nebraska (Lincoln, NE, EE. UU.), por apoyar esta investigación. El Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia, Francisco José de Caldas-MINCIENCIAS (Colombia) también apoyó este trabajo de investigación (código: 112771250888, contrato 253-2016).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aguilera, C., Padilla, B. E., Flórez, C. P., Rubio, J. D. y Acuña, J. R. (2011). ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2), 167-172.
- Alvarenga, E. S. L., Mansur, J. F., Justi, S. A., Figueira-Mansur, J., Dos Santos, V. M., Lopez, S. G., Masuda, H., Lara, F. A., Melo, A. C. A. and Moreira, M. F. (2016). Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 61-70.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.04.003>

- Alves, A. P., Lorenzen, M. D., Beeman, R. W., Foster, J. E., and Siegfried, B. D. (2010). RNA interference as a method for target-site screening in the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Insect Science*, 10(1), 162. <https://doi.org/10.1673/031.010.14122>
- Ampasala, D. R., Zheng, S. C., Zhang, D. Y., Ladd, T., Doucet, D., Krell, P. J., Retnakaran, A., and Feng, Q. (2011). An epidermis-specific chitin synthase CDNA in *Choristoneura fumiferana*: Cloning, characterization, developmental and hormonal regulated expression. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(2), 83-96. <https://doi.org/10.1002/arch.20404>
- Arakane, Y., Baguion, M. C., Jaspururia, S., Chaudhari, S., Doyungan, A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. and Beeman R. W. (2011). Two UDP N-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(1), 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.09.011>
- Arakane, Y., Hogenkamp, D. G., Zhu, Y. C., Kramer, K. J., Specht, C. A., Beeman, R. W., Kanost, M.R. and Muthukrishnan, S. (2004). 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.11.004>
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., Kanost, M. and Beeman, R. W. (2005). 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00576.x>
- Arakane, Y., Specht, C. A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. and Beeman, R.W. (2008). 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.07.006>
- Bansal, R., Rouf Mian, M. A., Mittapalli, O., and Michel, A. P. (2012). Characterization of a chitin synthase encoding gene and effect of diflubenzuron in soybean aphid, *Aphis glycines*. *International Journal Biological Sciences*, 8(10), 1323-1334. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4189>
- Barros Rodrigues, T., Khajuria, C., Wang, H., Matz, N., Cunha Cardoso, D., Valicente, F. H., Zhou, X. and Siegfried, B. (2014). Validation of Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *PLoS One*, 10(4), e0124187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109825>
- Basu, S., Pereira, A. E., Pinheiro, D. H., Wang, H., Valencia-Jiménez, A., Siegfried, B. D., Louis, J., Zhou, X. J. and Vélez, A. M. (2019). Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR analysis in southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Barber). *Scientific Reports*, 9, 10703. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47020-y>
- Bolognesi, R., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Terra, W. R., y Ferreira, C. (2005). Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(11), 1249-1259. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.06.006>
- Bustillo, A. E. (2006). Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32, 101-116.
- Chapman, R. (1998). Integument. In *The Insects: Structure and Function* (pp. 415-440). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi:10.1017/CBO9780511818202.017>
- Chen, L., Yang, W. -J., Cong, L., Xu, K. -K., y Wang, J. -J. (2013). Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a chitin synthase 2 gene from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *International Journal Molecular Sciences*, 14(8), 17055-17072. <https://doi.org/10.3390/ijms140817055>
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881-10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Firmino, A. A. P., Fonseca, F. C. dA., de Macedo, L. L. P., Coelho, R. R., Antonino de Souza Jr, J. D., Togawa, R. C., Silva-Junior, O. B., Pappas-Jr, G.J., Mattar da Silva, M. C., Engler, G. and Grossi-de-Sa M. F. (2013). Transcriptome Analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect Pests. *PLoS One*, 8(12), e85079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085079>
- Infante, F. (2018). Pest management strategies against the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 66(21), 5275-5280. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04875>
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S. and Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.11.005>
- Kramer, K. J. and Muthukrishnan, S. (2005). Chitin metabolism in insects: a revisit. En L. I. Gilbert, K. Iatrou, S. and Gill (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Press. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00051-X>
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. V. and Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete

- genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-80. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kyre, B. R., Bentz, B. J. and Rieske, L. K. (2020). Susceptibility of mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*, Hopkins) to gene silencing through RNAi provides potential as a novel management tool. *Forest Ecology and Management*, 473, 118322. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118322>
- Le, S. Q. and Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307-1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Liu, X., Zhang, H., Li, S., Zhu, K. Y., Ma, E. and Zhang, J. (2012). Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (*LmCHS2*) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(12), 902-910. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.09.002>
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Macedo, L. L. P., Antonino de Souza Jr., J. D., Coelho, R. R., Fonseca, F. C. dA., Firmino, A. A. P., Silva, M. C. M., Fragoso, R. R., Albuquerque, E. V. S., Silva, M. S., de Almeida Engler, J., Terra, W.R., and Grossi-de-Sa, M.F. (2017). Knocking down *chitin synthase 2* by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 72-86. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.04.001>
- Mansur, J. F., Alvarenga, E. S., Figueira-Mansur, J., Franco, T. A., Ramos, I. B., Masuda, H., Melo, A. C.A. and Moreira, M. F. (2014). Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.12.006>
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal Experimental Biology*, 206(24), 4393-4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>
- Merzendorfer, H. (2006). Insect chitin synthases: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 176, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0005-3>
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology*, 90(9), 759-769. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.014>
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. and Thomas, P. (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D419-D426. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>
- Moreira, M. F., Dos Santos, A. S., Marotta, H. R., Mansur, J. F., Ramos, I. B., Machado, E. A., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., Kaiser, C. R., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. and Vasconcellos, A. M. H. (2007). A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1249-1261. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.017>
- Noriega, D. D., Arias, P. L., Barbosa, H. R., Arraes, F. B. M., Ossa, G. A., Villegas, B., Coelho, R. R., Albuquerque, E. V. S., Togawa, R. C. Grynberg, P., Wang, H., Vélez, A. M., Arboleda, J. W., Grossi-de-Sa, M. F., Silva, M. C. M. and Valencia-Jiménez, A. (2019). Transcriptome and gene expression analysis of three developmental stages of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Scientific Reports*, 9, 12804. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49178-x>
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B. and Smagghe, G. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59(12), 1212-1221. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.08.014>
- Shang, F., Xiong, Y., Xia, W. K., Wei, D. D., Wei, D. and Wang, J. J. (2016). Identification, characterization and functional analysis of a chitin synthase gene in the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Hemiptera, Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 25(4), 422-430. <https://doi.org/10.1111/imb.12228>
- Shi, J. -F., Mu, L. -L., Chen, X., Guo, W. -C. and Li, G. -Q. (2016). RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), 1319-1331. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14464>
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. and Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), 246-258. <https://doi.org/10.1038/nrm3089>
- Tellam, R. L. and Eisemann, C. (2000). Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(12), 1189-1201. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00097-7](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00097-7)
- Tellam, R. L., Vuocolo, T., Johnson, S. E., Jarmey, J. and Pearson, R. D. (2000). Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *European Journal of Biochemistry*, 267(19), 6025-6043. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01679.x>
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B. and Zhang, W. (2009). Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of

- Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. *PLoS One*, 4(7), e6225.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006225>
- Wang, P. and Granados, R. R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), 135-143.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(99\)00108-3](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00108-3)
- Wang, Y., Fan, H. -W., Huang, H. -J., Xue, J., Wu, W. -J., Bao, Y. -Y., Xu, H. -J. and Zhu, Z. -R. (2012). 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.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.04.009>
- Wang, Y., Zuber, R., Oehl, K., Norum, M. and Moussian, B. (2015). Report on *Drosophila melanogaster* larvae without functional tracheae. *Journal of Zoology*, 296(2), 139-145.
<https://doi.org/10.1111/jzo.12226>
- Wang, Z., Yang, H., Zhou, C., Yang, W. -J., Jin, D. -C. and Long, G. -Y. (2019). Molecular cloning, expression, and functional analysis of the chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Scientific Reports*, 9, 1087.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37488-5>
- Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H. and Ling, E. (2016). Gut immunity in Lepidopteran insects. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 65-74.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.010>
- Yang, W. -J., Xu, K. -K., Cong, L. and Wang, J. -J. (2013). 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 Biological Sciences*, 9(4), 331-342.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.6022>
- Ye, C., Jiang, Y. -D., An, X., Yang, L., Shang, F., Niu, J. and Wang, J. -J. (2019). Effects of RNAi-based silencing of chitin synthase gene on moulting and fecundity in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Scientific Reports*, 9, 3694.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39837-4>
- Zhang, J., Liu, X., Zhang, J., Li, D., Sun, Y., Guo, Y., Ma, E. and Zhu, K. Y. (2010). 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.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.08.001>
- Zhang, X., Zhang, J., Park, Y. and Zhu, K.Y. (2012). Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9), 674-682.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.05.005>
- Zhao, Y., Sui, X., Xu, L., Liu, G., Lu, L., You, M., Xie, C., Li, B., Ni, Z. and Liang, R. (2018). Plant-mediated RNAi of grain aphid *CHS1* gene confers common wheat resistance against aphids. *Pest Management Science*, 74(12), 2754-2760, <https://doi.org/10.1002/ps.5062>
- Zhu, Y. -C., Specht, C. A., Dittmer, N. T., Muthukrishnan, S., Kanost, M. R. and Kramer, K. J. (2002). Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11), 1497-1506.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00070-x](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00070-x)
- Zhuo, W., Fang, Y., Kong, L., Li, X., Sima, Y. and Xu, S. (2014). Chitin synthase A: A novel epidermal development regulation gene in the larvae of *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 41(7), 4177-4186.
<https://doi.org/10.1007/s11033-014-3288-1>

Material suplementario 2. Alineamientos múltiples de proteínas CHSs.

HhCHS1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HhCHS1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
DpCHS-1so2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	DpCHS-1so2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
DpCHS-1so1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	DpCHS-1so1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
DpCHS-1so3	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	DpCHS-1so3	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
SoCHS2-iso1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	SoCHS2-iso1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
SoCHS2-iso2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	SoCHS2-iso2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
RgCHS1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	RgCHS1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
TcCHS1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	TcCHS1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
Rg1CHS1so1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	Rg1CHS1so1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
Rg1CHS1so2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	Rg1CHS1so2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
LdCHS1a	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	LdCHS1a	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
LdCHS1b	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	LdCHS1b	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
DvCHS2-iso1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	DvCHS2-iso1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
DvCHS2-iso2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	DvCHS2-iso2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
NvCHS	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	NvCHS	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
OLCHS-1so1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	OLCHS-1so1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
OLCHS-1so2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	OLCHS-1so2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
RhCHS2-iso1	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	RhCHS2-iso1	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
RhCHS2-iso2	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	RhCHS2-iso2	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1b	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1b	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1c	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1c	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1d	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1d	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1e	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1e	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1f	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1f	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1g	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1g	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1h	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1h	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1i	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1i	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1j	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1j	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1k	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1k	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1l	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1l	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1m	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1m	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1n	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1n	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1o	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1o	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1p	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1p	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1q	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1q	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1r	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1r	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1s	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1s	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1t	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1t	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1u	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1u	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1v	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1v	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1w	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1w	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1x	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1x	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1y	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1y	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI
HcCHS1z	QTHIRVPPKPIPTPYGRLIHLGPKTKTIAHLKDKKIRIRHKRSQSVYTHYLLGRLNELPISYORKEIARENTYLLTLDGDDIFQPSVLLLDLH	HcCHS1z	NLNNYSMTREYVVKTKEL EEEKKREARAKKRSKSLGFLG-GGVSDDEGSEIISLGLFCHLCTHWKSGDKRALITIGESLSLQKRLDHI

Secuencias de proteínas CHS1 de *H. hampei*-HhCHS (ID: QIB02551.1) y secuencias parciales CHS1 y CHS2 de otros insectos: *Dendroctonus ponderosae*-DpCHS-iso2 (XP_019756066.1), *DpCHS-iso1* (XP_019756065.1), *DpCHS-iso3* (XP_019756067.1), *Sitophilus oryzae*-SoCHS2-iso1 (XP_030746405.1), *S. oryzae*-CHS2-iso2 (XP_030746406.1), *Anthonomus grandis*-AgCHS1 (AHY28559.1), *Tribolium castaneum*-TcCHS1 (NP_001034491.1), *Anoplophora glabripennis*-Ag1CHS-iso1 (XP_018562636.1), *Ag1CHS-iso2* (XP_018562637.1), *Leptinotarsa decemlineata*-LdCHS-iso1 (XP_023029893.1), *L. decemlineata*-LdCHS1a (ALM23644.1), *LdCHS1b* (ALM23645.1), *Diabrotica virgifera virgifera*-DvCHS2-iso1 (XP_028131510.1), *DvCHS2-iso2* (XP_028131511.1), *Nicrophorus vespilloides*-NvCHS (XP_017770728.1), *Onthophagus taurus*-OtCHS-iso1 (XP_022919013.1), *O. taurus*-OtCHS-iso2 (XP_022919015.1), *Aedes albopictus*-AaCHS2-iso2 (XP_019534583.3), *AaCHS2-iso1* (XP_019534584.3), *Helicoverpa armigera*-HaCHS-iso3 (XP_021183982.1), *Helicoverpa zea*-HzCHS1b (ADX66429.1), *H. armigera*-HaCHS1 (AKJ54482.1), *H. armigera*-HaCHS1b (AKR54211.1), *Spodoptera exigua*-SeCHS1 (AAZ03545.1), *Galleria mellonella*-GmCHS2-iso1 (XP_026757206.1), *Bombyx mori*-BmCHS1-iso1 (XP_021206755.1), *Manduca sexta*-MsCHS2 (XP_030038724.1). Se destacan tres motivos característicos de secuencias distintivas de quitina sintasas (GEDRW, QRRRW, SWGTRE) y los dominios conservados DID, FEYA y CSPGCFSLFR para CHS de insectos. El recuadro resalta la región del gen que fue seleccionada para la síntesis del ARNcd