

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron

Antonio Rogério Bezerra do Nascimento

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Antonio Rogério Bezerra do Nascimento
Biólogo

**Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron**

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Nascimento, Antonio Rogério Bezerra do
Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron / Antonio Rogério Bezerra do Nascimento. - - Piracicaba,
2013.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Inibidores de biossíntese de quitina 2. Herança da resistência 3. Transcritoma
4. Mecanismos de resistência 5. Enzimas de detoxificação I. Título

CDD 633.15
N244b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*A Deus pelo dom da vida e pela vida de todos aqueles que me cercam,
por ter me iluminado em todos os momentos deste trabalho.*

Agradeço

*A minha mãe Helena Maria do Nascimento Silva
e ao meu irmão Manuel Rodrigo Bezerra do Nascimento
que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando
em todos os momentos*

Dedico e Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade e oportunidade para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Consoli pela orientação, confiança e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelos conhecimentos transmitidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao IRAC-BR pelo auxílio na coleta de populações de *Spodoptera frugiperda*.

A todos os amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP) pelo agradável convívio e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Eloisa Salmeron, Daniel Bernardi, Juliano Farias, Oderlei Bernardi, Rebeca da Silva Ribeiro pela sincera amizade, pelo convívio, companheirismo e auxílio na condução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos (ESALQ/USP), Pablo Fresia, Felipe Antonio Domingues, Ligia Hasen e Bruna Laís Merlin, pela colaboração e pelos auxílios prestados.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP): Daniela Miyuki Okuma, Rogério Machado, Osmar Arias, Patrick Marques Dourado, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Alex Sandro Poltronieri, Rodrigo José Sorgatto, Everaldo Batista Alves, Dariane Sagassetta de Souza, pelo convívio, companheirismo e auxílios prestados.

À técnica do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP) Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos pelo convívio agradável e auxílios prestados.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Renato Jun Horikoshi e Amanda Lemes, pelo convívio, companheirismo e auxílio na condução desse trabalho.

Aos amigos com quem morei em Piracicaba, Juliano Antonio de Freitas e Odimar Zanardi, pelo convívio agradável, apoio em todos os momentos, companheirismo e incentivo.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pela dedicação e aos serviços prestados.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Bioecologia de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797)	21
2.2 Inseticidas inibidores de biossíntese de quitina.....	23
2.3 Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a inseticidas.....	25
2.4 Bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas.....	27
2.5 Bases moleculares da resistência de insetos a inseticidas	28
Referências	31
3 PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LUFENURON.....	43
Resumo.....	43
Abstract	43
3.1 Introdução	44
3.2 Material e métodos.....	45
3.2.1 Insetos	45
3.2.2 Caracterização da resistência de <i>S. frugiperda</i> a lufenuron	46
3.2.3 Padrão de herança de resistência de <i>S. frugiperda</i> a lufenuron.....	47
3.3 Resultados	49
3.4 Discussão.....	54
3.5 Conclusões	57
Referências	57

4 ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRITOMA DE LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LUFENURON	63
Resumo	63
Abstract	63
4.1 Introdução	64
4.2 Material e métodos	66
4.2.1 Preparação dos insetos	66
4.2.2 Coleta de tecidos e extração de RNA total	66
4.2.3 Montagem <i>de novo</i>	68
4.2.4 Anotação funcional	69
4.2.5 Expressão diferencial entre linhagem suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a lufenuron	69
4.2.6 Validação de genes candidatos por qPCR	70
4.3 Resultados	71
4.3.1 Montagem <i>de novo</i> do transcrito de referência	71
4.3.2 Anotação funcional	75
4.3.3 Expressão gênica diferencial entre linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a lufenuron	78
4.3.4 Análise por qPCR	90
4.4 Discussão	91
Referências	94
ANEXOS	101

RESUMO

Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron.

As bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a lufenuron foram exploradas no presente estudo. Inicialmente, uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a lufenuron foi selecionada a partir de uma população coletada na cultura do milho na região de Montevidéu-GO com intenso uso desse inseticida. As curvas de concentração-resposta a lufenuron para as linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS) e resistente (LUF-R) a lufenuron foram caracterizadas pelo método de bioensaio com tratamento superficial da dieta artificial. As CL_{50} (I.C. 95%) estimadas para as linhagens SUS e LUF-R foram de 0,23 (0,18 - 0,28) e 210,6 (175,90 - 258,10) μg de lufenuron.mL⁻¹ respectivamente, com razão de resistência de \approx 915 vezes. A partir dos resultados de cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e LUF-R, concluiu-se que a herança da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron é autossômica e incompletamente recessiva. Os testes de retrocruzamentos da progênie F₁ de cruzamentos recíprocos com o parental LUF-R demonstraram um efeito poligênico para a resistência, com a estimativa do número mínimo de segregações independentes entre 1,54 e 1,71, indicando que o número de *loci* associado à resistência é baixo. Para conhecer o perfil de transcritos de lagartas de *S. frugiperda* e avaliar o padrão de expressão gênica diferencial entre lagartas da linhagem LUF-R em comparação ao de lagartas da linhagem SUS, buscando identificar o(s) mecanismo(s) de resistência a lufenuron, foram utilizadas novas tecnologias de sequenciamento em larga escala. Para isso, foram utilizados sequenciamentos de quatro bibliotecas de cDNA (plataforma HiScan 1000, Illumina[®]) obtidas de lagartas de 4º instar de *S. frugiperda* das linhagens LUF-R e SUS, induzidas ou não com lufenuron. O transcrito foi construído utilizando aproximadamente 19,6 milhões de leituras *single-end*, o que gerou 18.506 transcritos, com N50 de 996 pb. A pesquisa contra o banco de dados nr (NCBI) proporcionou anotação funcional de 51,1% (9.457) dos transcritos obtidos, grande parte dos alinhamentos apresentaram homologia a insetos, com o maior número deles (45%) se assemelhando aos de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), enquanto 10% se assemelharam a sequências de diversas espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), sendo 3% dos alinhamentos obtidos contra sequências de *Spodoptera frugiperda*. A análise comparativa da expressão gênica entre lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível a lufenuron identificou 1.224 transcritos expressos diferencialmente ($p \leq 0,05$, teste t; expressão relativa > 2). Sete destes transcritos foram associados ao metabolismo da cutícula, sendo cinco deles superexpressos na linhagem LUF-R. O metabolismo de detoxificação apresentou 48 transcritos expressos diferencialmente, dos quais foram identificados 40 transcritos associados às monooxigenases P450, cinco a glutatona-S-transferase, dois às carboxilesterases e um a esterase. Foi observado que 39 dos 48 transcritos associados ao metabolismo de detoxificação foram superexpressos na linhagem resistente. Este padrão foi confirmado a partir da expressão relativa utilizando "PCR quantitativa em Tempo Real - qPCR". Estes resultados representam um importante passo para o entendimento dos mecanismos moleculares da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron, proporcionando, ainda, uma visão mais ampla do perfil de expressão gênica de insetos a inseticidas.

Palavras-chave: Inibidores de biossíntese de quitina; Herança da resistência; Transcritoma; Mecanismos de resistência; Enzimas de detoxificação

ABSTRACT

Genetic and molecular basis of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to lufenuron

The genetic and molecular basis of resistance to lufenuron in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) were exploited in this study. The resistant population of *S. frugiperda* was selected from a population collected in Montevidiu, Goiás. Initially, a lufenuron-resistant strain of *S. frugiperda* was selected from a population collected in cornfields located in Montevidiu, Goiás State, Brazil, with intense use of this insecticide. The diet surface treatment bioassay was used to characterize the concentration-response to lufenuron in the susceptible (SUS) and resistant (LUF-R) strains of *S. frugiperda*. The estimated LC_{50s} (95% C.I.) for the SUS and LUF-R strains were 0.23 (0.18 – 0.28) and 210.6 (175.90 – 258.10) µg of lufenuron.mL⁻¹ respectively, with resistance ratio of ≈ 915-fold. Based on reciprocal crosses between SUS and LUF-R strains, the inheritance of *S. frugiperda* resistance to lufenuron was incomplete autosomal recessive. Backcrosses between F₁ of the reciprocal crosses and the parental LUF-R revealed a polygenic resistance, with an estimation of the minimum number of resistance genes from 1.54 to 1.71, indicating that the number of loci associated to resistance is low. Then, a new high-throughput cDNA sequencing technologies was explored to characterize the transcriptional profile of larvae of *Spodoptera frugiperda*, and to compare the differential gene expression between resistant and susceptible strains of *S. frugiperda* to lufenuron in order to identify the resistance mechanism(s) involved. Four cDNA libraries obtained from fourth instars of the resistant (LUF-R) and the susceptible (SUS) *S. frugiperda* strains, exposed or not to lufenuron, were sequenced in a HiScan1000[®] platform (Illumina[®]). The transcriptome was *de novo* assembled using nearly 19.6 million single-end reads, leading to 18,506 transcripts with a N50 of 996 bp in length. A Blast search against the non-redundant database available in NCBI allowed the functional annotation of 51.1% (9,457) of the obtained transcripts. Most of these transcripts aligned with insect sequences, and a majority of them (45%) with *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Nearly 10% of the transcripts aligned with species belonging to *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), with 3% of the alignments matching sequences from *Spodoptera frugiperda*. Differential gene expression analysis between the resistant and the susceptible strains identified 1,224 differentially expressed transcripts ($p \leq 0.05$, t-test; fold change > 2). Seven of them were associated with the cuticle metabolism, and five out seven were up-regulated in the resistant strain (LUF-R). A large set of transcripts (48) associated with the detoxification metabolism was differentially expressed; 40 P450 monooxygenases, five glutathione-S-transferases, two carboxylesterase and one esterase were identified. Thirty-nine out of these 48 transcripts were up-regulated in the resistant strain. Gene expression data obtained by RNA-Seq analysis was validated by quantitative real time PCR (qPCR) of several selected target transcripts. These results represent an important step toward the understanding of the molecular mechanisms of resistance of *S. frugiperda* to lufenuron, and provide a broader view on the gene expression profile of insects to insecticides.

Keywords: Inhibitors of chitin biosynthesis; Inheritance of resistance; Transcriptome; Mechanisms of resistance; Detoxification enzymes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Log concentração-probit para linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS), resistente (LUF-R) e de progênies de cruzamentos recíprocos entre SUS e LUF-R..... 49
- Figura 3.2 - Efeito dominância da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron em função da concentração do inseticida..... 52
- Figura 4.1 - Fluxograma da estratégia adotada para caracterização do transcrito de *S. frugiperda* e da expressão gênica diferencial entre lagartas de linhagens suscetível e resistente a lufenuron..... 68
- Figura 4.2 - Distribuição de tamanho dos transcritos do transcrito de referência de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron 75
- Figura 4.3 – Distribuição dos valores de homologia dos transcritos do transcrito *de novo* de lagartas de *Spodoptera frugiperda* obtidos após busca no banco de dados (nr)(NCBI) 76
- Figura 4.4 - Distribuição dos alinhamentos dos transcritos do transcrito *de novo* de lagartas de *S. frugiperda* por espécie obtidos via BLAST 77
- Figura 4.5 - Distribuição das ontologias gênicas (GO) atribuídas ao transcrito de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron..... 78
- Figura 4.6 - Distribuição dos transcritos expressos diferencialmente na análise de RNA-seq de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron, induzidas ou não por esse inseticida..... 79
- Figura 4.7 - Distribuição comparativa de transcritos anotados funcionalmente de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos 83
- Figura 4.8 - Distribuição comparativa de transcritos associados ao metabolismo da cutícula de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos..... 84

- Figura 4.9 - Distribuição comparativa de transcritos associados a enzimas de detoxificação de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos..... 86
- Figura 4.10 – Análise de qPCR demonstrando a expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que foram induzidas ou não com lufenuron..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Concentração-mortalidade de linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível (SUS) e resistente a lufenuron (LUF-R) e de progênies de cruzamentos recíprocos entre SUS e LUF-R ao inseticida lufenuron.....	51
Tabela 3.2 - Análise de qui-quadrado da mortalidade de retrocruzamentos entre F ₁ (progênies de cruzamentos recíprocos entre linhagens <i>S. frugiperda</i> SUS e LUF-R) e LUF-R para diferentes concentrações de lufenuron	54
Tabela 4.1- Lista de iniciadores utilizados para as reações de qPCR.....	71
Tabela 4.2 - Pré-processamento de dados resultantes de sequenciamento de linhagens resistente e suscetível de <i>Spodoptera frugiperda</i> a lufenuron	72
Tabela 4.3 - Análise exploratória de montagens <i>de novo</i> em linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> a suscetível e resistente a lufenuron.....	73
Tabela 4.4 - Sumário de montagem <i>de novo</i> do transcrito de linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível e resistente a lufenuron.....	74
Tabela 4.5- Expressão diferencial dos 40 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível e resistente a lufenuron.	81
Tabela 4.6 - Expressão diferencial em transcritos associados ao metabolismo da cutícula em linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível e resistente a lufenuron	85
Tabela 4.7 - Expressão diferencial em transcritos associados a enzimas de detoxificação em linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível e resistente a lufenuron	87

1 INTRODUÇÃO

O controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tem se baseado na utilização de inseticidas e, mais recentemente, mediante o uso do milho geneticamente modificado que expressam proteínas Bt (*Bacillus thuringiensis* Berliner) no Brasil. A utilização indiscriminada de inseticidas tem possibilitado a evolução da resistência a inseticidas, ameaçando a eficiência de controle e, como consequência, levando ao comprometimento de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

A resistência de *S. frugiperda* a diversos inseticidas já tem sido documentada nos EUA (YU, 1991; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003; YU; McCORD JR, 2007). No Brasil, casos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas piretroides (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO et al., 2013) e organofosforados (CARVALHO et al., 2013), assim como reduções na suscetibilidade a inseticidas benzoifenilureias (SCHMIDT, 2002) e spinosinas (DOURADO, 2009) já têm sido relatadas. Nos últimos anos, com a utilização de variedades de milho híbrido geneticamente modificados (milho Bt) para o controle de alguns lepidópteros-praga (BUNTIN et al., 2001; BOKONON-GANTA et al., 2003), houve redução nas pulverizações de inseticidas o que pode auxiliar no restabelecimento da suscetibilidade de insetos a inseticidas, como ocorrido na China com a resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) a inseticidas com a introdução do algodão Bt (WU et al., 2005; YANG; LI; WU, 2013)

O conhecimento de fatores genéticos que afetam a evolução da resistência, tais como frequência inicial de alelos de resistência, número de alelos, grau de dominância, expressividade e interações de genes associados à resistência e de genes que conferem resistência com o genoma acarretando na presença de custo adaptativo, é de fundamental importância para avaliar o risco de evolução da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977) e elaborar estratégias eficientes de manejo da resistência de insetos (MRI) (TABASHNIK; CROFT, 1982; DENHOLM; ROWLAND, 1992).

O padrão de herança genética tem grande influência sobre a evolução da resistência de insetos a inseticidas, sendo determinante para a taxa de aumento de alelos que conferem resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Contudo, o padrão de herança da resistência não tem demonstrado padrões de similaridade em lepidópteros, devido à existência de diferentes mecanismos de resistência nas linhagens estudadas e suas possíveis interações (YU, 1993; TAN; McCAFFERY, 1999). Atualmente, informações relevantes têm sido obtidas para

caracterizar as bases genéticas e fisiológicas associadas à resistência de insetos a inseticidas, mediante o emprego de novas tecnologias associadas à biologia molecular, tais como o sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing*) (LIN et al., 2013). Com essa abordagem tem sido possível a produção de grande quantidade de dados de sequenciamento em curto período de tempo para o entendimento de processos associados à resistência de insetos a nível molecular, permitindo catalogar grande número de famílias gênicas com relevância em mecanismos que conferem resistência a inseticidas (OAKESHOTT et al., 2003), bem como para a elucidação de mecanismos de ação de inseticidas (MERZENDORFER et al., 2012).

Os inseticidas inibidores de biossíntese de quitina pertencem ao grupo das benzoilfenilureas e têm sido bastante utilizados em programas de MIP em diversos cultivos, devido ao seu mecanismo de ação único e sua baixa toxicidade a organismos não-alvos e ao ambiente (CASIDA; QUISTAD, 1998). Esses inseticidas causam distúrbios na formação da cutícula, em decorrência de falhas na deposição de quitina nos insetos (MERZENDORFER, 2006). No entanto, o sítio de ação específico das benzoilfenilureas ainda não foi descrito, dificultando o entendimento dos mecanismos de resistência de insetos a inseticidas inibidores de biossíntese de quitina.

Nas últimas décadas, os inseticidas do grupo das benzoilfenilureias têm sido amplamente utilizados para o controle de *S. frugiperda* no Brasil, com relatos frequentes de fracassos no controle dessa praga em condições de campo. Reduções significativas na suscetibilidade ao lufenuron em populações de *S. frugiperda* já foram relatadas em algumas áreas produtoras de milho do Brasil (SCHMIDT, 2002). No entanto, a caracterização da resistência de *S. frugiperda* a esse inseticida ainda não foi realizada. Neste contexto, o objetivo geral desse trabalho foi elucidar as bases genéticas e moleculares associadas à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron para a implementação de estratégias de manejo da resistência. Foram conduzidos estudos para:

- Caracterizar o padrão de herança associado à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron;
- Fornecer informações a respeito do transcrito de *S. frugiperda* baseado em sequenciamentos de bibliotecas de cDNA de populações suscetível e resistente a lufenuron;
- Avaliar as modificações no perfil de expressão gênica entre populações suscetível e resistente de *S. frugiperda* a lufenuron;

- Identificar os possíveis mecanismos de resistência de *S. frugiperda* associados a lufenuron.

Referências

- BOKONON-GANTA, A.H.; BERNAL, J.S.; PIETRANTONIO, P.V.; SÉTAMOU, M. Survivorship and development of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), on conventional and transgenic maize cultivars expressing *Bacillus thuringiensis* Cry9C and Cry1A(b) endotoxins. **International Journal of Pest Management**, London, v. 49, n. 2, p. 169–175, 2003.
- BUNTIN, G.D.; LEE, R.D.; WILSON, D.M.; McPHERSON, R.M. Evaluation of yieldgard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 1, p. 37-42, 2001.
- CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, e62268, 2013.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 1-16, 1998.
- CROW, F.J. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.
- DENHOLM, I.; ROWLAND, M.W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 91-112, 1992.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- DOURADO, P.M. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad no Brasil**. 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 3, p. 319–323. 1977.
- LIN, Q.; JIN, F.; HU, Z.; CHEN, H.; YIN, F.; LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, D.; REN, S.; FENG, X. Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e72314, 2013.
- MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, v. 176, p. 1-15, 2006.

MERZENDORFER, H.; KIM, H.S.; CHAUDHARI, S.S.; KUMARI, M.; SPECHT, C.A.; BUTCHER, C.A.; BROWN, S.J.; ROBERT MANAK, J.; BEEMAN, R.W.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 264-276, 2012.

OAKESHOTT, J.G.; HORNE, I.; SUTHERLAND, T.D.; RUSSELL, R.J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, London, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2003.

SCHMIDT, F.B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a Lufenuron na cultura do milho**. 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TABASHNIK, B.E.; CROFT, B.A. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. **Environmental Entomology**, College Park, v.11, p. 1137-1144, 1982.

TAN, J.G.; McCAFFERY, A.R. Expression and inheritance of nerve insensitivity resistance in larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. **Pesticide Science**, Tokyo, v. 55, p. 617-625, 1999.

WU, K.M.; MU, W.; LIANG, G.M.; GUO, Y.Y. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p.491-498, 2005.

YANG, Y.; LI, Y.; WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106, n. 1, p. 375-381, 2013.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991.

YU, S.J.; McCORD JR., E. Lack of cross-resistance to Indoxacarb in insecticide-resistant Fall Armyworms (Lepidoptera: Noctuidae) and diamondback moths (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, p. 63-67, 2007.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, n. 1, p. 1-11, 2003.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioecologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

A lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) tem como provável centro de origem a região tropical e subtropical do hemisfério ocidental (LUGINBILL, 1928), ocorrendo em praticamente todas as áreas do continente Americano (METCALF; FLINT; METCALF et al., 1962). A presença de *S. frugiperda* tem sido registrada em diversas culturas de importância econômica como algodão (SANTOS, 2011), milho (SILVA, 2000; VALICENTE, 2008), soja (MOSCARD; KASTELIC, 1985), feijão (ALTIERI et al., 1978), sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997), trigo (TAKAHASHI; NAKANO; OSI, 1980; SALVADORI, 2000), arroz (BOTTON et al., 1998; MARTINS et al., 2000), amendoim (ISIDRO; ALMEIDA; PEREIRA, 1997), frutíferas, tomate, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (SARMENTO et al., 2002), causando injúrias em diversas partes das plantas e podendo ocasionar perdas significativas na produção agrícola (LUTTREL; MINK, 1999; KING; SAUNDERS, 1984).

No Brasil, *S. frugiperda* é a principal espécie-praga na cultura do milho (SILVA, 2000; VALICENTE; TUELHER, 2009). Nos últimos anos, a elevação nas infestações de *S. frugiperda* tem causado grandes perdas econômicas na cultura do algodão, principalmente em áreas agrícolas do cerrado brasileiro (MIRANDA; SUASSUNA, 2004). Isso tem levado *S. frugiperda* ao status de praga primária na cultura do algodão (SOARES; VIEIRA, 1998). De modo geral, as infestações na cultura do algodão, ocorrem a partir de mariposas provenientes de áreas cultivadas com milho, milheto e outras gramíneas para o algodoeiro (SOARES; VIEIRA, 1998; MARTINELLI et al., 2006).

Dentre as causas do aumento populacional de *S. frugiperda* na cultura do milho e algodão envolvem o cultivo intensivo do solo praticado nestas áreas, com sucessão de ciclos de hospedeiros durante todo o ano, condições climáticas favoráveis (alta temperatura e baixa umidade relativa do ar), o uso excessivo e inadequado de inseticidas, o plantio de gramíneas como milho, sorgo e milheto em sucessão a culturas como algodão e soja. Estas gramíneas têm se mostrado como excelentes plantas hospedeiras para o desenvolvimento do inseto, favorecendo a ocorrência de surtos populacionais no algodoeiro, ao promover a manutenção do ciclo reprodutivo da praga (LUTTREL; MINK, 1999).

Os adultos de *S. frugiperda* possuem hábitos noturnos e elevada capacidade de dispersão, o que permite a busca por locais adequados para alimentação, acasalamento e

oviposição (SPARKS, 1979; SPARKS et al., 1986), conferindo grande sucesso do inseto em colonizar grandes áreas e permitindo sua rápida disseminação ao longo da faixa de distribuição de seus hospedeiros (SPARKS, 1979). No Brasil, em função da disponibilidade de plantas hospedeiras de *S. frugiperda* durante todo o ano, associada a condições climáticas favoráveis, a sua distribuição ocorre em todo território nacional (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999).

A oviposição de *S. frugiperda* ocorre preferencialmente na superfície abaxial da folha das plantas, contudo, em elevada densidade populacional pode ocorrer indiscriminadamente em todas as partes da planta (SPARKS, 1979). Os ovos são depositados em aglomerados de 100 a 200 ovos, com um total de aproximadamente 1500 a 2000 ovos por fêmea, com uma duração de dois a quatro dias até a eclosão das lagartas (NALIN, 1991).

As lagartas se caracterizam como a fase crítica de *S. frugiperda* para as plantas hospedeiras. Nesta fase os indivíduos se alimentam de folhas e estruturas reprodutivas causando grandes prejuízos na capacidade fotossintética da planta e, conseqüentemente, perdas de produção (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999; WILLIAMS; DAVIS, 1990). O estágio larval pode apresentar de 6 a 7 instares, com duração de aproximadamente 14 a 19 dias, variando em função da planta hospedeira (KARSTEN JR, 1978; CRÓCOMO; PARRA, 1985; BUSATO et al., 2005) e fatores climáticos (LUGINBILL, 1928).

O estágio de pupa de *S. frugiperda* ocorre frequentemente no solo, em aproximadamente 2-8 cm de profundidade. Em situações de solo compactado, as lagartas podem confeccionar envoltório formado a partir de restos de folhas e outros materiais presentes na superfície do solo para formação do casulo. As pupas medem aproximadamente 14 a 18 mm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro, apresentando coloração castanho-avermelhada e com período pupal bastante influenciado pela temperatura podendo variar de 8-9 dias no verão e alongar-se de 20-30 dias em períodos de baixa temperatura, podendo chegar até 55 dias (VICKERY, 1929).

Os aspectos bioecológicos, principalmente as fontes alimentares, têm grande influência sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*. Lagartas de *S. frugiperda* apresentaram maior tempo de desenvolvimento em algodão e soja, e pupas menores em comparação àquelas geradas de lagartas alimentadas com folhas de milho (PITRE; HOGG, 1983). O hábito polífago de *S. frugiperda* proporciona mudanças comportamentais e fisiológicas devido à utilização de diferentes plantas hospedeiras, permitindo a diferenciação de *S. frugiperda* em raças arroz e milho (PROWELL et al., 2004), apresentando duas raças morfologicamente idênticas, contudo, geneticamente distintas (BUSATO et al., 2004), e com aspectos biológicos

distintos, quanto a hábitos reprodutivos e desenvolvimento larval (JUAREZ et al., 2012). A existência de raças associadas a hospedeiros influencia nas medidas de controle e manejo de resistência desse inseto. As raças identificadas foram encontradas em plantas de milho e algodão (Raça C) e a plantas de arroz (Raça R) (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985), em praticamente, todas as regiões produtoras de milho na América do Sul (BUSATO et al., 2004; PROWELL et al., 2004; JUAREZ et al., 2012).

2.2 Inseticidas inibidores de biossíntese de quitina

A cutícula atua como principal barreira de proteção dos insetos. Além de constituir o exoesqueleto e revestir os sistemas digestório, respiratório, os órgãos reprodutivos e alguns canais glandulares (ANDERSEN, 1979; TUNAZ; UYGUN 2004). Em sua grande maioria a cutícula é formada por proteínas e quitina, um polissacarídeo presente em grande abundância nos artrópodes (ANDERSEN, 1979). A quitina é um dos amino-polissacarídeos naturais mais comuns na natureza, sintetizado principalmente por fungos, nemátodos e artrópodes. A cutícula atua no suporte de estruturas extracelulares, principalmente o exoesqueleto de artrópodes, e paredes celulares em fungos (COHEN, 1987). Este polímero é formado por microfibrilas pseudo-cristalinas de aproximadamente 20 cadeias de açúcares simples com elevado peso molecular formado por unidades de $\beta(1-4)$ N-acetilglucosamina (GlcNAc) (COHEN, 1987; KRAMER; DZIADIK; KOGA, 1985).

A quitina é sintetizada a partir de UDP-N-Acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc), uma molécula doadora de açúcares que é catalisada pela quitina sintetase (EC 2.4.1.16), uma enzima altamente conservada e encontrada em todos os organismos que sintetizam quitina (MERZENDORFER; ZIMOCH 2003), pertencente a uma família de glicosiltransferases, que catalisam a transferência de açúcares a partir de moléculas doadoras em receptores específicos (MERZENDORFER, 2006). De modo geral, a via de biossíntese de quitina é bem conservada, composta com reações enzimáticas que em planos gerais, convertem diferentes açúcares em GlcNAc (MERZENDORFER, 2011), podendo ser dividida em dois momentos distintos, eventos intracelulares e eventos extracelulares. Segundo Cohen (1987), no primeiro momento, moléculas de glicose e trealose sofrem biotransformações que incluem fosforilação da glicose, hidrólise da trealose, transmutação para formação de frutose fosforilada, aminação, acetilação resultando na formação UDP-GlcNAc. No segundo momento, este metabólito é translocado até a face externa da membrana celular, sítio de formação da quitina.

A produção de quitina, bem como a sua atuação em fases críticas do desenvolvimento dos insetos foram responsáveis pelo crescente interesse no conhecimento de suas características fisiológicas pela indústria fármaco-química (KUMAR, 2000), bem como a indústria de agroquímicos, devido a possibilidades de desenvolvimento de moléculas inseticidas (MERZENDORFER, 2011), com mecanismos inibidores da via biossintética da quitina, tendo em vista a especificidade das características da cutícula dos insetos a constituir um alvo, obviamente, desejável para moléculas inseticidas potencialmente seletivas aos homens e a um grande número de eucariontes (BEEMAN, 1982).

Os principais inibidores de biossíntese de quitina podem ser classificados em dois grandes grupos: compostos formados por nucleotídeos e peptídeos que atuam competindo pelo substrato da quitina sintetase e, o segundo pelo grupo das aciluréias que compõe o grupo dos inseticidas classificados como inibidores de biossíntese de quitina (COHEN, 2001). Atualmente, o principal grupo de inseticidas inibidores de biossíntese de quitina são as benzoilfenilureas, moléculas pertencentes ao grupo das aciluréias, formadas principalmente por dois anéis fenólicos substituídos e interligados por uma ponte de uréia (RETNAKARAN et al., 1985).

O primeiro protótipo de benzoilfenilureas foi diflubenzuron 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea, desenvolvido a partir de moléculas de dichlobenil e diuron, na década de 1970, como inseticida comercial. O composto resultante apresentou ação inseticida que inibe seletivamente a síntese de quitina em insetos, mas não em fungos (POST; VINCENT, 1973; ISHAAYA; CASIDA, 1974; POST; LJONG; VINCENT, 1974a, 1974b). Posteriormente, outras moléculas de benzoilfenilureas como triflumuron (HAMMAN; SIRRENBURG, 1980), chlorafluazuron (HAGA et al., 1982), teflubenzuron (BECHER et al., 1983), hexaflumuron (SBRAGIA et al., 1983), flufenoxuron (ANDERSON et al., 1986), lufenuron, e novaluron (ISHAAYA et al., 1996), foram produzidas e incorporadas no controle de insetos (MERZENDORFER et al., 2012).

Estes compostos caracterizam-se pela interrupção da formação de estruturas quitinizadas, pela formação defeituosa da quitina, tendo como consequência, uma deposição endocuticular anormal e muda abortiva (MULDER; GIJSWIJT, 1973). Os inseticidas inibidores de biossíntese de quitina são caracterizados por apresentar ação lenta quando comparado a inseticidas neurotóxicos. Estes compostos atuam especificamente na cutícula do inseto, exercendo ação tóxica sobre as formas imaturas, especialmente durante a ecdise. Alguns indivíduos afetados são aparentemente normais, contudo, as anomalias sobre a deposição de quitina acarretam muitas vezes em dificuldades para liberação da exúvia e

causando a morte do inseto (BEEMAN, 1982). Estes compostos inseticidas desempenham um papel importante no manejo integrado de pragas, devido à baixa toxicidade para parasitóides, predadores e outros inimigos naturais (COHEN, 2001; ISHAAYA, 1990; COHEN, 1987; MERZENDORFER, 2013).

Apesar da ampla utilização de benzoilfenilureas, o mecanismo de ação destes produtos ainda não foi bem descrito. Tunaz e Uygun (2004) propõem três hipóteses de possíveis sítios de ação para as benzoilfeniluréis, com destaque para a inibição da quitina sintetase (ou a sua biossíntese), a inibição de proteases (ou a sua biossíntese), e inibição do transporte de UDP-N-acetilglucosamina pela membrana.

Estudos têm demonstrado a possibilidade das benzoilfenilureas atuarem em passos pós-catalíticos da síntese de quitina (ASAHARA; UESUGI; OSAKABE 2008; VAN LEEUWEN et al., 2012), com ação das benzoilfenilureas sobre proteínas transportadoras ligadas a genes *sur*. Provavelmente, estas proteínas atuam sobre o metabolismo celular de K^+ e Ca^{2+} , evitando o transporte e polimerização da UDP-N-acetilglucosamina para a formação da quitina (ABO-ELGHAR; FUJIYOSHI; MATSUMURA, 2004; MATSUMURA, 2010; NAKAGAWA; MATSUMURA, 1994; NASONKIN et al., 1999).

2.3 Resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas

A resistência de insetos a inseticidas é caracterizada como um processo natural, pré-adaptativo, sendo decorrente da variabilidade genética presente na população de insetos (CROW, 1957). Contudo, a pressão seletiva exercida pelo uso intensivo de inseticidas, visando à manutenção de níveis satisfatórios da densidade populacional de insetos nos agroecossistemas tem levado à seleção de indivíduos capazes de sobreviver a aplicações do produto.

De acordo com o Arthropod Pesticide Resistance Database (2013), os primeiros registros de resistência de *S. frugiperda* foram reportados em 1965 na Bolívia. Desde então, falhas no controle dessa praga têm sido registrados em vários países do continente Americano, relacionadas a inseticidas de diversos grupos químicos.

Young e McMillian (1979) avaliaram a suscetibilidade de linhagens de *S. frugiperda* a carbaryl, e observaram CL_{50} distintas entre as linhagens avaliadas, presumindo a existência de uma linhagem resistente. Yu, Nguyen e Abo-Elghar (2003), estudando populações de lagarta do cartucho coletadas em cultivos de milho, na Flórida, Estados Unidos, observaram

resistência a carbaryl de 562 vezes, 354 vezes a methyl parathion e 4 vezes a permethrin. Yu (1991) avaliou o efeito de diversos produtos sobre linhagens de *S. frugiperda* coletadas em campos de milho, com detecção de razões de resistência entre 2 e 216 vezes para piretroides (permethrin, cypermethrin, cyhalothrin, fenvalerate, tralomethrin, bifenthrin, tetramethrin, e tau-fluvalinate), de 12 a 71 vezes para organofosforados (chlorpyrifos, parathion-methyl, diazinon, sulprofos, dichlorvos e malathion), e de 14 a 192 vezes para carbamatos (methomyl, carbaryl, e thiodicarb). Recentemente, trabalhos em insetos coletados em milho em Porto Rico tem demonstrando resistência de *S. frugiperda* ao milho transgênico, que expressa a proteína Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner (STORER et al., 2012).

Até o momento, não há grande número de registros na literatura a respeito de casos de resistência relacionados a benzoilfenilureas, isto pode esta relacionado ao modo de ação específico do grupo (ISHTIAQ; SALEEM; RAZAQ, 2012).

Apesar disso tem se observado um aumento nos casos de diminuição na eficácia destes produtos em decorrência da elevação no número de aplicações de inibidores de biossíntese de quitina. Ishtiaq et al. (2012), observaram um incremento na razão de resistência de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron, chegando ao um aumento na ordem de três vezes ao longo de 3 anos. Couso-Ferrer et al. (2011), observou razão de resistência de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) a lufenuron de apenas seis vezes.

Contudo, em áreas com grande pressão de seleção decorrente de grande número de aplicações, foram observados aumentos significativos na razão de resistência mesmo para grupos de inseticidas específicos como os inibidores de biossíntese de quitina. James et al. (2008), avaliando a resistência de *Bovicola ovis* (Phthiraptera: Trichodectidae), observaram razão de resistência de 67 e 94 vezes para triflumuron e diflubenzuron, respectivamente. Silva et al. (2011), avaliando a resistência de populações de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) a diversos inseticidas em cultivos de tomate em varias regiões do Brasil, observaram que inseticidas inibidores da biossíntese de quitina como diflubenzuron, teflubenzuron, triflumuron apresentaram razão de resistência de até 222 vezes. Santos et al., (2011), monitorando a resistência de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) a diversos inseticidas em regiões produtoras de brássicas no estado de Pernambuco, reportou o primeiro caso de resistência de insetos a inseticidas inibidores de biossíntese de quitina no Brasil, encontrando uma razão de resistência de aproximadamente 702 vezes em populações oriundas de locais com elevado número de pulverizações deste inseticida.

No Brasil apesar do controle de *S. frugiperda* ser feito em sua maioria por aplicações intensas de inseticidas sintéticos, ainda não há registros na literatura de casos de resistência a

campo desta praga a inseticidas inibidores de quitina. Contudo, agricultores têm reportado falhas no controle da lagarta do cartucho em culturas como milho e algodão no Cerrado brasileiro.

2.4 Bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas

Com a elevação no número de espécies de insetos resistentes a agentes de controle (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2013), os estudos que visam avaliar as bases genéticas associadas à resistência têm aumentado ao longo dos últimos anos (CAO; HAN, 2013), mediante estudos da herdabilidade de caracteres que conferem resistência a pesticidas e toxinas Bt, imprescindíveis para elaboração do manejo da resistência de insetos (TABASHNIK, 1991). O padrão de herança genética tem grande influência sobre a evolução da resistência de insetos, sendo determinante para a taxa de aumento de alelos que conferem resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Além disso, estudos da herdabilidade de linhagens de insetos expostas à elevada pressão de seleção exercida por inseticidas tem possibilitado o melhor entendimento da ação de forças seletivas sobre organismos complexos.

A primeira teoria sobre evolução da dominância é proposta por Fisher (1928), na qual foi proposta que a evolução de características da dominância está ligada ao acúmulo de mutações em *loci* distintos dos alelos observados. Na sua teoria, mutações deletérias (recessivas) foram originalmente codominantes, devido ao grande número de mutações que ocorre em populações naturais, contudo, o grande número de genes modificadores presentes em outros *loci* atuam modificando o nível de dominância de alguns fenótipos, proporcionando a seleção dos mais adaptados.

Em reação à teoria proposta por Fisher (1928), Wright (1929) propõe a teoria fisiológica da dominância, na qual o fenômeno da dominância está ligado à fisiologia do desenvolvimento e está associado a várias relações entre fatores epistáticos. Segundo Wright (1929), todas as mutações são deletérias causando redução na atividade enzimática, assim genes mutantes que atuam mediante a redução da atividade enzimática de processos importantes seriam recessivos. Ao longo dos últimos anos a teoria fisiológica proposta por Wright (1934) foi modificada, contudo, tem sido mais aceita, levando ao descrédito a teoria da dominância por modificadores específicos proposta por Fischer (1928) (BOURGUET, 1999).

O grau de dominância possibilita entender a dinâmica da resistência, tendo em vista que pode influenciar a rapidez com a qual a evolução da resistência é verificada no campo

com a pressão de seleção (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Em situação em que a resistência se caracteriza como recessiva, a presença de indivíduos que apresentam este caráter será baixa, de modo que, a expressão da característica resistente se dará em condição de homozigose, e os indivíduos heterozigotos seriam os mais frequentes na população. Em contrapartida, em populações na qual a resistência se caracteriza como uma herança dominante, o incremento de indivíduos resistentes na população ocorre de modo rápido, devido ao grande número de heterozigotos (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977).

A herança da resistência não apresenta um padrão para lepidópteros, devido à existência de diferentes mecanismos de resistência nas linhagens estudadas e suas possíveis interações (YU, 1993; TAN; McCAFFERY, 1999). Casos de resistência incompletamente recessiva e monogênica foram detectados para *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) a permethrin (PAYNE; BLENK; BROWN, 1988), *P. xylostella* a permethrin (YU, 1993), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) a fenvalerate (TAN; McCAFFERY, 1999), *S. frugiperda* a lambda-cyhalothrin (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001) e *S. exigua* a tebufenozide (JIA et al., 2009). Por outro lado, casos de resistência intermediária ou incompletamente dominante e monogênica já foram detectados para *H. virescens* a cypermethrin (ELZEN et al., 1994), *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) a permethrin (OSMAN; WATSON; SIVASUPRAMANIAM, 1992) e *H. armigera* a fenvalerate (DALY; FISK 1992, 1993), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) a emamectin benzoate (SHAD; SAYYED; SALEEM, 2009). Além disso, grande número dos estudos relacionados à herdabilidade da resistência de insetos tem sido relacionado a toxinas cry, levando grandes avanços no conhecimento da herdabilidade da resistência a estas toxinas (CAMPAGNE, et al., 2013).

2.5 Bases moleculares da resistência de insetos a inseticidas

Os mecanismos de resistência são classificados em detoxificação metabólica, insensibilidade enzimática, redução na penetração e transporte do inseticida e comportamental (GEORGHIOU, 1972). Com o advento de novas ferramentas em biologia molecular, pesquisas têm se intensificado na busca dos mecanismos moleculares que atuam em processos de resistência de insetos a inseticidas.

A partir de 2004, os estudos de genômica sofreram grande revolução com a introdução comercial de uma nova classe de sequenciadores conhecidos como "Next-Generation

Sequencing" (NGS), o que possibilitou grande exploração de dados biológicos relacionando a genomas (MADIS, 2008). Além disso, a utilização do NGS abriu oportunidade para análise genômica em organismos não-modelos (GIBBONS; JANSON; HITTINGER, 2009), assim como em insetos-praga de grande expressão econômica. Entre outras aplicações, NGS permitiu grandes avanços em estudos relacionados ao sequenciamento de cDNA ou RNA-seq, permitindo a caracterização e quantificação de vários transcritomas (OZSOLAK; MILOS, 2011).

O transcrito pode ser descrito como a lista completa de todas as classes de moléculas de RNA, codificantes ou não-codificantes, expresso em uma célula em particular, de tecidos, ou na totalidade do organismo. Um transcrito de RNA pode ser sujeito a uma grande variedade de diferentes processos de regulação, e pode-se servir em uma capacidade reguladora ou enzimática crítica. O papel central desempenhado pelo RNA, tanto como um molde para a expressão de proteína, bem como uma molécula reguladora, levou crescente interesse na tentativa de catalogar exaustivamente transcrições celulares (e viral) em contextos biologicamente importantes (BLENCOWE; AHMAD; LEE, 2009).

Apesar da ampliação nas possibilidades de estudos genômicos com utilização de NGS, a ausência de genomas de referência principalmente em espécies não-modelo, dificultam algumas das etapas relacionadas a montagem de transcritomas (SCHULZ et al., 2012), todavia, estratégias de montagem "*de novo*" de genomas a partir de RNA-seq, quando não há genomas de referência estão sendo cada vez mais empregadas (BIROL et al., 2009; JACKSON; SCHNABLE; ALURU, 2009). Nesta estratégia, algoritmos aproveitam as redundâncias nas sequências curtas produzidas em NGS para encontrar sobreposições permitindo a leitura e montagens do *contigs* (MARTIN; WANG, 2011). Nos últimos anos tem-se observado uma expansão da utilização de dados genômicos na entomologia, principalmente voltado para insetos de importância agrícola e vetores de doenças (HECKEL, 2003).

Com o aumento de casos de resistência de insetos a inseticidas e toxinas Bt, pesquisas utilizando-se de ferramentas moleculares estão sendo amplamente conduzidas no intuito de elucidar mecanismos de resistência de insetos e possibilidade de localização de novos alvos para moléculas inseticidas (OAKESHOTT, et al., 2003; RANSON, et al 2002; GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001), caracterizando diferentes genes e enzimas potencialmente envolvidos na resistência (RANSON et al., 2002).

Atualmente um dos principais mecanismos de resistência descritos na literatura e explorado pela biologia molecular são os processos de detoxificação de xenobióticos por

enzimas. Neste processo, enzimas são utilizadas para catabolizar as toxinas, sejam elas naturais ou sintéticas (SCHULER, 2012). Entre os principais grupos enzimáticos que compõem as enzimas de detoxificação estão os citocromos P450, as glutatona-S-transferases GST e as esterases ESTs (LI; SCHULER, 2007; FEYEREISEN, 2011).

Dentre as enzimas de detoxificação, os genes da superfamília *cyp* que codifica enzimas P450 são amplamente descritas em populações de insetos resistentes a praticamente todas as classes de inseticidas. Em *P. xylostella* foi observada elevação nos níveis de expressão de genes codificantes de enzimas de citocromos P450 em populações resistentes ao piretroide cipermetrin (BAEK CLARK; LEE, 2010). Chiu et al. (2008), avaliaram a expressão de enzimas de detoxificação em *Anopheles gambiae* e identificaram cinco genes P450, *cyp4c27*, *cyp4h15*, *cyp6z1*, *cyp6z2* e *cyp12f1*, em populações resistentes ao DDT. Em mosquitos *Aedes aegypti*, foram encontradas populações apresentando forte mecanismo de detoxificação ao organofosforado Temephos e ao piretroide deltamethrin, com elevação na expressão de genes das famílias de P450 *cyp6*, *cyp9*, glutatona-S-transferases GSTe7, carboxicolinesterase CCEae3A (MARCOMBE et al, 2009). Em *H. armigera* resistente a deltamethrin, foram constatadas a presença de 21 genes P450 em população resistente, com elevada expressão em transcritos de *cyp4L5*, *cyp4L11*, *cyp6AE11*, *cyp332A1* e *cyp9A14* (BRUN-BARALE, et al., 2010). Em novas moléculas inseticidas como chlorantraniliprole do grupo das diamidas foi identificado 22 genes relacionados a processos de detoxificação enzimática (incluindo 19 P450 e 3 GSTs) além de 17 receptores de rianodina RyR em população resistente de *P. xylostella*. Em benzoilfenilureas foi observado indução de *cyp1A1* (LEDIRAC et al., 2000). Em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) resistentes a lufenuron foi observada indução de enzimas P450, *cyp12a4* e *cyp6g1* tratadas com diflubenzuron e lufenuron (BOGWITZ et al., 2005).

Apesar das mutações serem descritas como mecanismos de resistência raros e decorrentes de elevadas pressões adaptativas, atualmente foi possível descrever uma grande variedade de mutações relacionadas ao mecanismo de resistência a insetos. Estas mutações possibilitam a modificação de sítios de ação de moléculas inseticidas (VILLATE et al., 2000). Mutações em receptores de γ -ácido aminobutírico (GABA) (FFRENCH-CONSTANT et al., 1993), canais voltagem-dependente de sódio (NARDINI et al., 2012) e acetilcolinesterase (MARCOMBE et al, 2009) são bem descritos como presentes em populações resistentes a ciclodienos, piretroides e organofosforados. Estudos recentes demonstraram que a resistência de insetos a inibidores de biossíntese de quitina podem estar relacionados a mutações em quitina sintetase (CHS1) (VAN LEEUWEN et al., 2012).

Referências

ABO-ELGHAR, G.E.; FUJIYOSHI, P.; MATSUMURA, F. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 743–752, 2004.

ALTIERI, M.A.; FRANCIS, C.A.; VAN SCHOONHOVEN, A.; DOLL, J.D. A review of insect prevalence in maize (*Zea mays*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) polycultural systems. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 1, p. 33-49, 1978.

ANDERSEN, S.O. Biochemistry of insect cuticle. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 24, p. 29-61, 1979.

ANDERSON, M.; FISHER, J.P.; ROBINSON, J. DEBRAY, P.H. Flufenoxuron—an acylurea acaricide/insecticide with novel properties. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 1., 1986, Brighton. **Proceedings...** Brighton: British Crop Protection Conference on Pests and Diseases, 1986. p. 89–96.

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org/>> Acesso em: 23 out. 2013

ASAHARA, M., UESUGI, R.; OSAKABE, M. Linkage between one of the polygenic hexythiazox resistance genes and an etoxazole resistance gene in the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, p. 1704–1710, 2008.

BAEK, J.H.; CLARK, M.; LEE, S.H. Cross-strain comparison of cypermethrin-induced cytochrome P450 transcription under different induction conditions in diamondback moth. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 96, n. 1, p. 43-50, 2010.

BECHER, H. M.; BECKER, P.; PROKIC-IMMEL, R.; WIRTZ, W. CME-134, a new chitin synthesis inhibiting insecticide. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PROTECTION, 10., 1983, Brighton. **Proceeding...** Brighton: IAPPS, 1983. p. 408–415.

BEEMAN, R.W. Recent advances in mode of action of insecticides. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 27, p. 253-281, 1982.

BIROL, I.; JACKMAN, S.D.; NIELSEN, C.B.; QIAN, J.Q.; VARHOL, R.; STAZYK, G.; MORIN, R.D.; ZHAO, Y.; HIRST, M.; SCHEIN, J.E.; HORSMAN, D.E.; CONNORS, J.M.; GASCOYNE, R.D.; MARRA, M.A.; JONES, S.J.M. *De novo* transcriptome assembly with ABySS. **Bioinformatics**, Oxford, v.25, n. 21, p. 2872–2877, 2009.

BLENCOWE, B.J.; AHMAD, S.; LEE, L.J. Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 23, p. 1379-1386, 2009.

BOGWITZ, M.R.; CHUNG, H.; MAGOC, L.; RIGBY, S.; WONG, W.; O'KEEFE, M.; MCKENZIE, J.A.; BATTERHAM, P.; DABORN, P.J. *Cyp12a4* confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12807–12812, 2005.

BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S. MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, p. 207-212, 1998.

BOURGUET, D. The evolution of dominance. **Heredity**, London, v. 83, p. 1-4, 1999.

BRUN-BARALE, A.; HÉMA, O.; MARTIN, T.; SURAPORN, S.; AUDANT, P.; SEZUTSU, H.; FEYEREISEN, R. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 900-909, 2010.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; ZOTTI, M.J.; STEFANELLO JUNIOR, G.J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 743-750, 2005.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J.M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 709-716, 2004.

CAMPAGNE, P.; KRUGER, M.; PASQUET, R.; RU, B.L.; Van den BERG, J. Dominant Inheritance of Field-evolved resistance to Bt corn in *Busseola fusca*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e69675, 2013.

CAO, G.; HAN, Z. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 746-751, 2006.

CHIU, T.L.; WEN, Z.M.; RUPASINGHE, S.G.; SCHULER, M.A. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105 p. 8855–8860, 2008.

COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 71-93, 1987.

_____. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, p. 946-950, 2001.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 407-410, 1997.

COUSO-FERRER, F.; AROURI, R.; BEROIZ, B.; PERERA, N.; CERVERA, A.; NAVARRO-LLOPIS, V.; CASTAÑERA, P.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; ORTEGO, F. Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 4, p. 1349-1356, 2011.

CRÓCOMO, W.B.; PARRA, P.R.P. Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 225-260, 1985.

CROW, F.J. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; MATOSO, M.J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1999. 40 p. (Circular Técnica, 30).

DALY, J.C.; FISK, J.H. Inheritance of metabolic resistance to the synthetic pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin Entomological Research**, Cambridge, v. 82, p. 5-12, 1992.

_____. Expression of pyrethroid resistance in adult *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and selective mortality in field populations. **Bulletin Entomological Research**, Cambridge, v. 83, p. 23-28, 1993.

DENHOLM, I.; ROWLAND, M.W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 91-112, 1992.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, 311-316, 2001.

ELZEN, G.W.; MARTIN, S.H.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Inheritance, stability, and reversion of insecticide resistance in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) field populations. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 87, p. 551-558, 1994.

FEYEREISEN, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, Amsterdam, v. 1814, p. 19-28, 2011.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; STEICHEN, J.C.; ROCHELEAU, T.A.; ARONSTEIN, K.; ROUSH, R.T. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 1957-1961, 1993.

FISHER, R.A. The possible modification of the response of the wild type to recurrent mutations. **The American Naturalist**, Chicago, v. 62, p. 115-126, 1928.

- GAHAN, L.J.; GOULD, F.; HECKEL, D.G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, Washington, v. 293, n. 5531, p. 857-860, 2001.
- GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 3, p. 133-168, 1972.
- GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. 809 p.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 3, p. 319-323, 1977.
- GIBBONS, J.G.; JANSON, E.M.; HITTINGER, C.T.; JOHNSTON, M.; ABBOT, P.; ROKAS, A. Benchmarking next-generation transcriptome sequencing for functional and evolutionary genomics **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 26, p. 2731-2744, 2009.
- HAGA, T.; TOBI, T.; KOYANAGI, T.; NISHIYAMA, R. Structure activity relationships of a series of benzoylpyridyloxyphenyl-urea derivatives. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY, 5., 1982, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto: IUPAC, 1982. p. IId-7.
- HAMMAN, I.; SIRRENBERG, W. Laboratory evaluation of SIR 8514, a new chitin synthesis inhibitor of the benzoylated urea class. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, Monheim am Rhei, v. 33, p. 1-34, 1980.
- HANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, n. 5591, p. 179-181, 2002.
- HECKEL, D.G. Genomics in pure and applied entomology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 235-260, 2003.
- ISHAAYA, I. Benzoylphenyl ureas and other selective control agents: mechanism and application. In: CASIDA, J.E. **Pesticides and alternatives**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 365-376.
- ISHAAYA, I.; CASIDA, J.E. Dietary TH-6040 alters cuticle composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 4, p. 484-490, 1974.
- ISHAAYA, I.; YABLONSKI, S.; MENDELSON, Z.; MANSOUR, Y.; HOROWITZ, A.R. Novaluron (MCW-275), a novel benzoylphenyl urea, suppressing developing stages of lepidopteran, whitefly and leafminer pests. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 3., 1996, Brighton. **Proceedings...** Brighton: British Crop Protection Council, 1996. p. 1013-1020.

ISHTIAQ, M.; SALEEM, M. A.; RAZAQ, M. Monitoring of resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of the Southern Punjab, Pakistan to four conventional and six new chemistry insecticides. **Crop Protection**, Guildford, v. 33, p. 13-20, 2012.

ISIDRO, R.; ALMEIDA, R.P. PEREIRA, J.O.V. Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* amendoim cultivares Tatu e CNPA BR-1. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 1, p. 37-42, 1997.

JACKON, B.G.; SCHNABLE, P.S.; ALURU, S. Parallel short sequence assembly of transcriptomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, 2009. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2105-10-S1-S14>. Acesso em: 20 nov. 2013.

JAMES, P.J.; CRAMP, A.P.; HOOK, S.E. Resistance to insect growth regulator insecticides in populations of sheep lice as assessed by moulting disruption assay. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 326-330, 2008.

JIA, B.; LIU, Y.; CHENG ZHU, Y; LIU, X.; GAO, C.; SHEN, J. Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 996-1002, 2009.

JUÁREZ, M.L.; MURÚA, M.G.; GARCÍA, M.G.; ONTIVERO, M.; VERA, M.T.; VILARDI, J.C.; GROOT, A.T.; CASTAGNARO, A.P.; GASTAMINZA, G.; WILLINK, E. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 105, n. 2, p. 573-582, 2012.

KASTEN Jr., P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 68-78, 1978.

KING, A.B.S.; SAUNDERS, J.L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America overseas development administration**. London: Overseas Development Administration, 1984. 166 p.

KRAMER, K. J.; DZIADIK-TURNER, C.; KOGA, D. Chitin metabolism in insects. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 75-115.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LEDIRAC, N.; DELESCLUSE, C.; LESCA, P.; PIECHOCKI, M. P.; HINES, R. N.; SOUSA, G.; PRALAVORIO, M.; RAHMANI, R. Diflubenzuron, a Benzoyl-Urea insecticide, is a potent inhibitor of TCDD-induced *cyp1a1* expression in HepG2 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 164, p. 273-279, 2000.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 231-253, 2007.

LUGINBILL, P. **The fall armyworm**. Washington: USDA, 1928. 910 p. (Technical Bulletin, 34).

LUTTREL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v. 3, p. 35-44, 1999.

MARCOMBE, S.; POUPARDIN, R.; DARRIET, F.; REYNAUD, S.; BONNET, J.; STRODE, C.; BRENGUES, C.; YEBAKIMA, A.; RANSON, H.; CORBEL, V.; DAVID, J. P. Exploring the molecular basis of insecticide resistance the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 494, p. 1-14, 2009.

MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARTIN, J.A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 671-682, 2011.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera :Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 99, n. 2, p. 519-526, 2006.

MARTINS, J.F.S.; CUNHA, U.S.; OLIVEIRA, J.V.; PRANDO, H.F. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM, CCR, DFS, 2000. p. 137-154.

MATSUMURA, F. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: a review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 92, p. 133-139, 2010.

McCAFFERY, A.R. Resistance to insecticides in Heliothine Lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 353, n. 1376, p. 1735-1750, 1998.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, v. 176, p. 1-15, 2006.

_____. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 90, p. 759-769, 2011.

_____. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. **Insect Science**, Beijing, v. 20, p. 121-138, 2013.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MERZENDORFER, H.; KIM, H.S.; CHAUDHARI, S.S.; KUMARI, M.; SPECHT, C.A.; BUTCHER, C.A.; BROWN, S.J.; ROBERT MANAK, J.; BEEMAN, R.W.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 264-276, 2012.

METCALF, C.L.; FLINT, W.P.; METCALF, R.L. **Destructive and useful insects: their habits and control**. New York: McGraw-Hill, 1962. 1087 p.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA, CNPA, 2004. 48 p.

MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.C. Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja/PR. In: EMBRAPA-CNPSO. **Resultados de pesquisa de soja 1984/85**. Londrina: Embrapa Centro de Pesquisa de Soja, 1985. 128 p. (EMBRAPA. CNPSO, Documento, 15).

MULDER, R.; GIJSWIJK, M.T. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle formation. **Pesticide Science**, Oxford, v. 4, p. 737–745, 1973.

NALIN, D.M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. 150p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

NAKAGAWA, Y.; MATSUMURA, F. Diflubenzuron affects gamma-thioGTP stimulated Ca^{2+} transport in vitro in intracellular vesicles from the integument of the newly molted American cockroach *Periplaneta americana* L. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 24, p. 1009–1015, 1994.

NARDINI, L.; CHRISTIAN, R.N.; COETZER, N.; RANSON, H.; COETZEE, M.; KOEKEMOER, L.L. Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin. **Parasites and Vectors**, London, v. 5, 2012. Disponível em: <doi:10.1186/1756-3305-5-113>. Acesso em: 20 nov. 2013.

NASONKIN, I.; ALIKASIFOGLU, A.; AMBROSE, C.; CAHILL, P.; CHENG, M.; SARNAIK, A.; EGAN, M.; THOMAS, P.M. A novel sulfonyleurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 41, p. 29420–29425, 1999.

OAKESHOTT, J.G.; FARNSWORTH, C.A.; EAST, P.D.; SCOTT, C.; HAN, Y.; WU, Y.; RUSSELL, R.J. How many genetic options for evolving insecticide resistance in heliothine and spodopteran pests. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 889-896, 2013.

OSMAN, A.A.; WATSON, T.F.; SIVASUPRAMANIAM, S. Inheritance of permethrin resistance in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 335- 339, 1992.

OZSOLAK, F.; MILOS, P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 87/98, p. 87-98, 2011.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J.; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 78, p. 756–762, 1985.

PAYNE, G.T.; BLENK, R.G.; BROWN, T.M. Inheritance of permethrin resistance in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 81, p. 65-73, 1988.

PITRE, H.N.; HOGG, D.B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society**, Athens, v. 18, p. 182-186, 1983.

POST, L.C.; VINCENT, W.R. A new insecticide inhibits chitin synthesis. **Naturwissenschaften**, Hamburg, v. 60, p. 431-432, 1973.

POST, L.V.; LJONG, B.J.; VINCENT, W.R. 1-(2,6-Disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 4, p. 473-483, 1974a.

_____. 1-(2,6-Disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 4, p. 473-483, 1974b.

PROWELL, D.P.; MCMICHAEL, M.; SILVAIN, J.F. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 97, p. 1034-1044, 2004.

RETNAKARAN, A.; GRANETT, G.; ENNIS, T. insect growth regulators. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 529-601.

SALVADORI, J.R. Pragas do trigo no Brasil. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM, CCR, DFS, 2000. p.155-168.

SANTOS, V.C.; SIQUEIRA, H.A.A.; SILVA, J.E.; FARIAS, M.J.D.C. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae), from the State Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 2, p. 264-270, 2011.

SANTOS, W.J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. **Algodão - No Cerrado do Brasil**. 2. ed. Aparecida de Goiânia: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011. p. 495-566.

SARMENTO, R.A.; AGUIAR, R.W.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G.; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SBRAGIA, R.J.; BISHABRI-ERSHADI, B.; RISTERINK, R.H.; CLIFFORD, D.P.; DUTTON, R. XRD-473, a new acylurea insecticide effective against *Heliothis*. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 10., 1982, Brighton. **Proceedings...** Croydon: British Crop Protection Council, 1983. p. 417-424.

SCHMIDT, F.B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho.** 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SCHULER, M.A. Insects P450: mounted for battle in their war against toxins. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, p. 4157-4159, 2012.

SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1086-1092, 2012.

SHAD, S.A.; SAYYED, A.H.; SALEEM, M.A. Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 839-846, 2010.

SILVA, G.A.; PICANÇO, M.C.; BACCI, L.; CRESPO, A.L.B.; ROSADO, J.F.; GUEDES, R.N.C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 913-920, 2011.

SILVA, M.T.B. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos.** Santa Maria: UFSM, CCR, DFS; Pallotti, 2000. p. 169-200.

SOARES, J.J.; VIEIRA, R.M. ***Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira.** Campina Grande: EMBRAPA, CNPA, 1998. 13 p. (Comunicado Técnico, 96).

SPARKS, A.N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 62, n. 2, p. 82-87, 1979.

SPARKS, A.N.; JACKSON, R.D.; CARPENTER, J.E.; MULLER, R.A. Insects captured in light traps in the Gulf of Mexico. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 79, n. 1, p. 132-139, 1986.

STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; EDKING, J.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 84, p. 703-712, 1991.

TABASHINIK, B.E.; Van RENSBURG, J.B.B.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, 2009.

TAKAHASHI, M.K.; NAKANO, O.; OSI, J.R. Avaliação de danos causados por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de trigo. **O Solo**, Piracicaba, v. 72, p. 43-44, 1980.

TAN, J.G.; McCAFFERY, A.R. Expression and inheritance of nerve insensitivity resistance in larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. **Pesticide Science**, Tokyo, v. 55, p. 617-625, 1999.

TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect pest control. **Turkish Journal Agriculture Forrestry**, Ankara, v. 28, p. 377-387, 2004.

VALICENTE, F.H. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* com *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2008. 9 p. (EMBRAPA. CNPMS, Circular Técnica, 105).

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus***. Sete Lagoas: Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (EMBRAPA. CNPMS, Circular Técnica, 114).

VAN LEEUWEN, T.; DEMAEGHT, P.; OSBORNE, E.J.; DERMAUW, W.; GOHLKE, S.; NAUEN, R.; GRBIC, M.; TIRRY, L.; MERZENDORFER, H.; CLARK, R.M. Populations bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 12, p. 4407-4412, 2012.

VICKERY, R.A. **Studies of the fall armyworm in the Gulf coast region of Texas**. Washington: USDA 1929. 63 p. (Technical Bulletin, 138).

VILLATE, F.; ZILIANI, P.; MARCEL, V.; MENOZZI, P.; FOURNIER, D. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 67, n. 2, p. 95-102, 2000.

WILLIAMS, W.P.; DAVIS, F.M. Response of corn to artificial infestation with fall armyworm and southwestern corn borer larvae. **Southwestern Entomologist**, Dallas, v. 15, p. 163-166, 1990.

WRIGHT, S. Fisher's theory of dominance. **The American Naturalist**, Chicago, v. 63, p. 274-279, 1929.

_____. Physiological and evolutionary theories of dominance. **The American Naturalist**, Chicago, v. 67, p. 24-53, 1934.

YOUNG, J.R.; McMILLIAN, W.W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl treated surfaces. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 72, p. 202-203, 1979.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991.

_____. Inheritance of insecticide resistance and microsomal oxidases in the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 86, p. 680-683, 1993.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, n. 1, p. 1-11, 2003.

3 PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LUFENURON

Resumo

O conhecimento de bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas é de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência. Sendo assim, o objetivo de presente estudo foi caracterizar o padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a lufenuron, um inseticida inibidor da biossíntese de quitina. Inicialmente foi selecionada uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a lufenuron, a partir de uma população coletada na cultura do milho na região de Montevidu-GO com intenso uso desse inseticida. As curvas de concentração-resposta a lufenuron das linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS) e resistente (LUF-R) a lufenuron foram caracterizadas pelo método de bioensaio com tratamento superficial da dieta artificial. As CL_{50} (I.C. 95%) estimadas para as linhagens SUS e LUF-R foram de 0,23 (0,18 - 0,28) e 210,6 (175,90 - 258,10) μg de lufenuron. mL^{-1} respectivamente, com razão de resistência de ≈ 915 vezes. A partir dos resultados de cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e LUF-R, concluiu-se que a herança da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron é autossômica e incompletamente recessiva. Os testes de retrocruzamentos da progênie F_1 de cruzamentos recíprocos com o parental LUF-R demonstraram um efeito poligênico para a resistência, com a estimativa do número mínimo de segregações independentes entre 1,54 e 1,71; indicando que o número de *loci* associado à resistência é baixo.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Herdabilidade; Inibidores de biossíntese de quitina; Manejo da resistência a inseticidas

Abstract

The knowledge of genetic basis of insect resistance to insecticides is of great importance for designing resistance management strategies. The objective of this research was to determine the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to lufenuron, a chitin synthesis inhibitor insecticide. Initially, a lufenuron-resistant strain of *S. frugiperda* was selected from a population collected in cornfields located in Montevidu, Goiás State, Brazil, with intense use of this insecticide. The diet surface treatment bioassay was used to characterize the concentration-response to lufenuron of the susceptible (SUS) and resistant (LUF-R) strains of *S. frugiperda*. The estimated LC_{50} s (95% C.I.) for the SUS and LUF-R strains were 0.23 (0.18 - 0.28) and 210.6 (175.90 - 258.10) μg of lufenuron. mL^{-1} respectively, with resistance ratio of ≈ 915 -fold. Based on reciprocal crosses between SUS and LUF-R strains, the inheritance of *S. frugiperda* resistance to lufenuron was incomplete autosomal recessive. Backcrosses between F_1 of the reciprocal crosses and the parental LUF-R revealed a polygenic resistance, with an estimation of the minimum number of resistance genes from 1.54 to 1.71, indicating that number of loci associated to resistance is low.

Keywords: Armyworm; Heritability; Inhibitors of chitin biosynthesis; Insecticides resistance Management

3.1 Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie polífaga, que se alimenta de plantas nativas e cultivadas como milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) em todo hemisfério ocidental (WYCKHUYS; O'NEIL, 2006). Em milho, os prejuízos causados pela praga variam de 20 a 100% (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999). Em virtude da ampla plasticidade biológica e características do sistema de cultivo de grãos no Brasil, a frequência na utilização de inseticidas para o controle de *S. frugiperda* têm se intensificado, acarretando em fracassos no controle do inseto com inseticidas (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO et al., 2013).

O uso intensivo de inseticidas tem ocasionado um aumento no número de casos de resistência de insetos a diversos grupos de inseticidas e tem levado uma grande preocupação para a agricultura mundial. Os inseticidas do grupo das benzoilfenilureas foram introduzidos no início da década de 1970, e tem se destacado no controle de muitas espécies de insetos-praga em virtude da alta atividade inseticida, baixa toxicidade aos organismos benéficos e aos animais superiores, mostrando-se adequados para uso nos programas de MIP (BEEMAN, 1982). Os inseticidas classificados como inibidores de biossíntese de quitina são peças importantes para o manejo de *S. frugiperda* (SCHMIDT 2002), uma vez que o seu mecanismo de ação é completamente diferenciado em relação aos principais grupos de inseticidas neurotóxicos utilizados para o controle da praga. Além do mais, podem ser utilizados como um componente para o sistema de rotação de inseticidas nos programas de MIP, proporcionando o retardamento da evolução de resistência dos insetos aos inseticidas e reduzir os riscos ambientais. Contudo, a grande utilização destes compostos tem levado à detecção de casos de resistência de insetos a este grupo de inseticidas (SANTOS et al., 2011). Dessa forma, faz-se necessário a utilização de medidas que proporcione retardar a evolução de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas inibidores de biossíntese de quitina, prolongando a vida útil destas moléculas.

O sucesso das estratégias de manejo da resistência depende de uma variedade de fatores, incluindo a caracterização do padrão de herança da resistência (ROUSH; CROFT, 1986). Uma melhor compreensão da genética da resistência aumenta a capacidade de projetar e aplicar em programas de manejo da resistência (WANG et al., 2009), tais como facilitar a elaboração de estratégias para retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida lufenuron. Estudos sobre o padrão da herança da resistência a inseticidas podem facilitar a

detecção da resistência, monitoramento, avaliação de riscos, modelagem e manejo da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977).

Deste modo, faz-se necessário o conhecimento das bases genéticas que regem os mecanismos de resistência a inseticidas tais como a herdabilidade da resistência (FABRICK; TABASHNIK, 2012), os níveis de dominância (SETHI; BONS; DILAWARI, 2008) e o padrão quantitativo de genes relacionados à resistência (ASSÍE, et al., 2007). Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar o padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Insetos

Para realização dos bioensaios foram utilizadas linhagens de *S. frugiperda* mantidas no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). Como população suscetível de referência (SUS) foi utilizada uma população mantida em laboratório sobre dieta artificial por mais de 10 anos, livres de pressão de seleção com inseticidas. A população de *S. frugiperda* resistente a lufenuron foi selecionada utilizando-se o método F₂ Screen (ANDOW; ALSTAD, 1998), a partir de populações coletadas em cultivos de milho durante a safra 2011/2012, no município de Montividiu, Estado de Goiás, com intenso uso de lufenuron. Para a seleção de uma população resistente foi utilizada a concentração diagnóstica de 10 µg de lufenuron.mL⁻¹ (SCHMIDT, 2002) em lagartas de terceiro instar provenientes de em 42 isofamílias.

Na realização dos bioensaios visando à seleção da uma linhagem resistente a lufenuron, foi utilizado o método ingestão com tratamento superficial de dieta artificial com o inseticida. Para tanto foram utilizadas placas de acrílico contendo 24 células (Costar[®]), onde foram depositadas 1,25 mL de dieta artificial por célula. Após a geleificação e resfriamento da dieta artificial, em cada célula foi aplicado na superfície da dieta 30 µL de solução lufenuron 10 µg.mL⁻¹ (Match EC[®] 50 g.i.a./L, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) diluídas em água destilada e surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%. Após a secagem da superfície da dieta, em cada célula foram individualizadas lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, que permaneceram alimentando-se do substrato tratado por um período de cinco dias, em câmara climatizada (Temperatura 25 ± 2°C e fotofase 14h). Após este período as lagartas de *S.*

frugiperda sobreviventes foram transferidas e mantidas em copos plásticos (100 mL) contendo dieta artificial em um volume de 50 mL e vedados com uma placa acrílica circular até a pupação. Foram testadas 150 lagartas por isofamílias e selecionadas aproximadamente 4,4% das lagartas testadas (270 insetos) que completaram o ciclo de desenvolvimento até a emergência de adultos. Estes indivíduos foram considerados os parentais da população resistente a lufenuron (LUF-R).

3.2.2 Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron

Para realização do bioensaio visando à caracterização da toxicológica das linhagens suscetível (SUS) e resistente (LUF-R) a lufenuron foi utilizado o método de bioensaio por ingestão com tratamento superficial da dieta artificial com o inseticida. Para isso foram utilizadas placas de acrílico contendo 24 células (Costar[®]) contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Após a geleificação e resfriamento da dieta foi aplicado superficialmente 30 µL de cada concentração de lufenuron (Match EC[®] 50 g.i.a./L, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.). O inseticida lufenuron foi diluído em água destilada e surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%. O tratamento testemunha foi constituído de água destilada + surfactante a 0,1% aplicado na superfície da dieta. Posteriormente, cada célula foi infestada com uma lagarta de início do terceiro ínstar de *S. frugiperda*. As placas foram armazenadas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase 14h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo testadas de 5 a 12 concentrações de lufenuron. Para cada concentração foram utilizadas sete repetições (24 lagartas/repetição), totalizando 168 lagartas testadas/concentração. Aos 5 dias após a infestação a avaliou-se a mortalidade larval, sendo consideradas mortas as lagartas que não apresentavam movimentos perceptíveis após o toque com um pincel.

Os dados de mortalidade das linhagens SUS e LUF-R foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1978), utilizando o programa POLO PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A razão de resistência entre as linhagens avaliadas foi estimada mediante a divisão da CL_{50} da linhagem LUF-R pela CL_{50} da linhagem SUS. A Foram conduzidos testes de paralelismo e igualdade para avaliar a diferença entre os parâmetros da regressão (ROBERTSON et al., 2007).

3.2.3 Padrão de herança de resistência de *S. frugiperda* a lufenuron

Na avaliação do padrão da herança associado à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron, pupas das linhagens SUS e LUF-R foram mantidas em placa de Petri (10 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) contendo papel filtro, para a manutenção da umidade e individualizadas e sexadas. Após a emergência dos adultos foram realizados cruzamentos recíprocos de ♂ (LUF-R) × ♀ (SUS) e ♀ (LUF-R) × ♂ (SUS) e mantidos em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm de altura × 15 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal (substrato de oviposição) e fechadas na parte superior com placas de Petri, sendo mantidas dez casais por gaiola. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10%, sendo o alimento substituído a cada 48 horas. As progênes dos cruzamentos recíprocos (Geração - F₁) foram criadas em dieta artificial até o terceiro ínstar larval. Posteriormente, lagartas de terceiro instar oriundas das linhagens parentais SUS, LUF-R e os heterozigotos, provenientes de cruzamentos recíprocos foram submetidas a bioensaios utilizando método ingestão com tratamento superficial da dieta artificial com lufenuron em diferentes concentrações com a finalidade de caracterizar as curvas de concentração-resposta, conforme metodologia descrita anteriormente.

O grau de dominância (D) foi estimado com base nas metodologias propostas por Bourguet; Genissel; Raymond (2000) e Stone (1968). O grau médio de dominância foi obtido a partir da equação proposta por Bourguet; Genissel; Raymond (2000):

$$D = \frac{M_{RS} - M_{SS}}{M_{RR} - M_{SS}}$$

Sendo; M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} são as mortalidades das linhagens resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente, nas concentrações avaliadas. Valor de D próximos a 0 (D= 0) será admitido como herança completamente recessiva, valores próximos a 1 (D=1) será considerada como uma resistência completamente dominante (BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND, 2000).

Os dados foram também analisados pelo método de Stone (1968):

$$D = \frac{(2X_F - X_R - X_S)}{(X_R - X_S)}$$

Sendo; X_F ; X_R e X_S os logaritmos das CL_{50} estimadas a partir das linhagens híbridas e F_1 (resistente e suscetível). Valores de D próximos a -1 ($D = -1$) será admitido como herança completamente recessiva, valores próximos a 1 ($D = 1$) será considerada como uma resistência completamente dominante.

Para avaliar o número de genes relacionados à resistência, foi utilizada metodologia proposta por (TSUKAMOTO, 1983, ROUSH; DALY, 1990). Retrocruzamentos utilizando as linhagens F_1 (heterozigotos) foram acasalados com indivíduos da linhagem resistente LUF-R. Para os bioensaios foi utilizado o mesmo procedimento de bioensaio descrito anteriormente.

A possibilidade de herança monogênica foi avaliada a partir do teste χ^2 -quadrado [1] (SOKAL; ROHLF, 1995):

$$\chi^2 = \frac{(Ni - pni)^2}{pqni} \quad [1]$$

Onde Ni foi a mortalidade observada na concentração i , p a mortalidade esperada calculada a partir do modelo mendeliano [2] (GEORGHIOU, 1969), ni número de indivíduos testados e $q = 1 - p$.

$$p = \frac{a+b}{2} \quad [2]$$

A hipótese de herança monogênica é rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelada a 1 grau de liberdade. Para estimar o número de *loci* relacionados à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron foi utilizado o método proposto por Lande (1981), para estimar o efeito aditivo de genes que contribuem em uma característica quantitativa (resistência).

$$n = \frac{\sum_{i=1}^N [\sigma]_i^2}{\sum_{i=1}^N (\sigma)_i^2}$$

$$\text{Sendo; } [\sigma]_i^2 = \left(\frac{1}{\text{inclinação}_{F_2}} \right)^2 \text{ e } (\sigma)_i^2 = \left(\frac{1}{\text{inclinação}_{LUF}} \right)^2.$$

3.3 Resultados

A variação na concentração resposta das linhas suscetível SUS e resistente LUF-R de *S. frugiperda* a lufenuron, assim como as linhagens oriundas de cruzamentos recíprocos (heterozigotos) estão caracterizadas na Figura 3.1. As CL_{50} (I.C. 95%) foram de 0,23 (0,18 - 0,28) e 210,57 (175,90 - 258,10) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as linhagens SUS e LUF-R respectivamente, com uma razão de resistência de ≈ 915 vezes. Para os cruzamentos recíprocos houve similar suscetibilidade a lufenuron, com valores de cada cruzamento na CL_{50} de 4,82 a 5,89 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não deferindo estatisticamente entre si, independentemente da ordem de cruzamento. Contudo, a razão de resistência foi 21 e 24 vezes para os heterozigotos em relação à população SUS (Tabela 3.1).

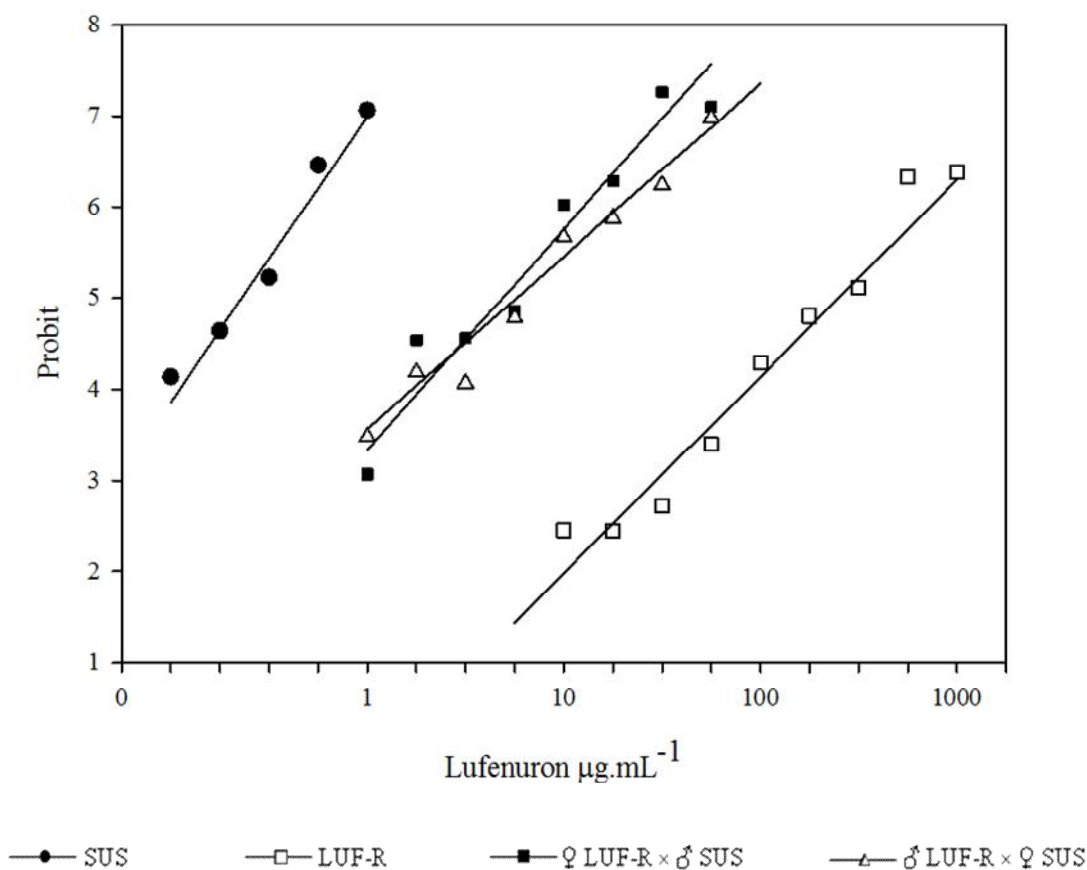


Figura 3.1 - Log concentração-probit para linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS), resistente (LUF-R) e de progênies de cruzamentos recíprocos entre SUS e LUF-R

A linhagem LUF-R não demonstrou χ^2 significativo a $P > 0,01$ ($\chi^2 = 10,13$; G.l. = 5) indicando um bom ajuste ao modelo de Probit. Contudo, foi observada ausência de resposta com o incremento das concentrações mais elevadas de lufenuron testadas. As demais linhagens avaliadas ajustaram-se ao modelo proposto, com os cruzamentos recíprocos ♂ LUF-R \times ♀ SUS apresentando CL_{50} (I.C. 95%) de 5,74 (4,70 – 6,91) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\chi^2 = 14,04$; G.l. = 7; $P > 0,01$) e ♀ LUF-R \times ♂ SUS com CL_{50} (I.C. 95%) 4,89 (3,79 – 5,97) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\chi^2 = 14,67$; G.l. = 7; $P > 0,01$). A avaliação de CL_{50} e CL_{90} demonstrou diferenças significativas entre os intervalos de confiança nas linhagens LUF-R, SUS e nos cruzamentos recíprocos, sendo confirmado pelo teste de igualdade ($\chi^2 = 3.290$; G.l. = 6; $P < 0,0001$) e paralelismo ($\chi^2 = 47,81$; G.l. = 3; $P < 0,0001$), demonstrando que as curvas de concentração-resposta apresentaram parâmetros distintos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Concentração-mortalidade de linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS) e resistente a lufenuron (LUF-R) e de progênies de cruzamentos recíprocos entre SUS e LUF-R ao inseticida lufenuron

Linhagem	n	Coefficiente angular ± EP	CL₅₀ (IC95%) (µg.mL⁻¹) *	CL₉₀ (IC 95%) (µg.mL⁻¹)*	χ²	G.I.	R.R.
SUS	1242	3,13 ± 0,21 a	0,23 (0,18 - 0,28) c	0,59 (0,47 - 0,80) c	11,99	5	-
LUF-R	1144	2,52 ± 0,13 b	210,57(175,90 - 258,10) a	677,64 (508,80 - 1004,02) a	10,13	5	907,62
♀ LUF-R × ♂ SUS	1312	2,42 ± 0,16 b	4,89 (3,79 - 5,97) b	16,51 (13,20 - 22,35) b	14,67	7	21,06
♂ LUF-R × ♀ SUS	1476	1,89 ± 0,08 c	5,74 (4,70 - 6,91) b	27,24 (21,46 - 36,62) b	14,04	7	24,74

Razão de resistência (RR) = CL₅₀ do resistente/CL₅₀ suscetível

G.I. Graus de liberdade

* Valores de CL₅₀ e CL₉₀ seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre os intervalos de confiança (95%). A significância dos intervalos de confiança foi determinada pelo teste da razão de verossimilhança da igualdade seguido por comparações múltiplas

Avaliando o padrão de herança da resistência *S. frugiperda* a lufenuron, pode-se observar a sobreposição dos intervalos de confiança entre os cruzamentos recíprocos de indivíduos resistentes e suscetíveis, dessa forma pode-se caracterizar que genes relacionados à resistência de *S. frugiperda* estão localizados em regiões autossômicas do cariótipo (Tabela 3.1).

O grau de dominância calculado a partir do método de Stone (1968) foi de - 0,12 e - 0,05. Portanto, a resistência a lufenuron é incompletamente recessiva. Contudo, avaliando pelo método de Bourguet; Genissel e Raymond (2000), os resultados diminuíram em função da elevação da concentração de lufenuron, apresentando-se como uma herança codominante em concentrações baixas tendendo a uma herança incompletamente recessiva com elevação da concentração próximas a concentração recomendadas para aplicação a campo (Figura 3.2).

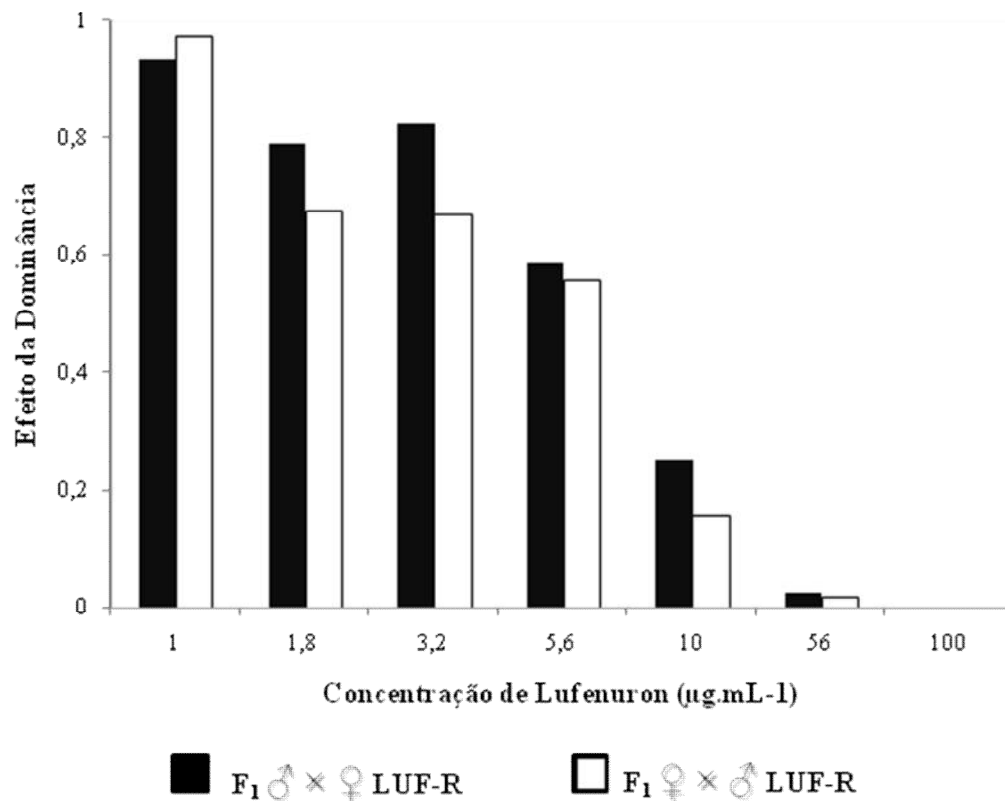


Figura 3.2 - Efeito dominância da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron em função da concentração do inseticida lufenuron

Os resultados relacionados aos retrocruzamentos das linhagens heterozigóticas com os parentais permitiram rejeitar a hipótese que a resistência esta ligada a apenas um gene. Os valores de χ^2 observados foram significativos a $P < 0,01$, rejeitando a possibilidade de efeito monogênico (Tabela 3.2). Portanto, a resistência de *S. frugiperda* a lufenuron é poligênica.

Ao aplicar o modelo de Probit sobre os retrocruzamentos $F_1 \text{ ♂} \times \text{♀ LUF-R}$ e $F_1 \text{ ♀} \times \text{♂ LUF-R}$ foi observado coeficientes angulares (\pm desvio-padrão) de 1,50 (\pm 0,08) e 1,66 (\pm 0,07), respectivamente. Esse padrão nos coeficientes angulares comparado com o parental resistente LUF-R 2,52 (\pm 0,13) indica um aumento na variância genética nos indivíduos oriundos de retrocruzamento e confirmada pelo teste de paralelismo, o que comprova diferenças entre os coeficientes angulares ($\chi^2 = 54,35$; G.l.= 2; $P < 0,05$). A estimativa do número mínimo de segregações independentes foi entre 1,71 e 1,54, sugerindo que apesar da resistência a lufenuron ser de caráter poligênico, o número de loci associados à resistência é baixo.

Tabela 3.2 - Análise de qui-quadrado da mortalidade de retrocruzamentos entre F₁ (progênies de cruzamentos recíprocos entre linhagens *S. frugiperda* SUS e LUF-R) e LUF-R para diferentes concentrações de lufenuron

Conc. µg.mL ⁻¹	F ₁ ♂ × ♀ LUF-R			F ₁ ♀ × ♂ LUF-R		
	Obs.	Exp.	χ ²	Obs.	Exp.	χ ²
5,6	40,28	22,20	38,68*	24,33	22,20	53,3*
10	64,74	42,56	100,6*	40,31	42,56	139,9*
18	80,28	45,26	114,5*	64,02	45,26	153,9*
32	87,50	49,96	140,3*	77,83	49,96	181,7*
56	90,97	51,82	151,1*	83,33	51,82	203,1*
100	99,16	62,09	191,4*	94,79	62,09	309,6*
180	97,22	71,17	348,9*	98,43	71,17	467,3*
320	100,0	77,27	480,8*	100,0	77,27	644,0*

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$, graus de liberdade = 1) entre mortalidade esperada (Exp.) e observada (Obs.) baseada em herança mendeliana

3.4 Discussão

Neste estudo foi observado um elevado nível de resistência (915,65 vezes) de *S. frugiperda* a lufenuron. Até o momento não havia registros de populações de *S. frugiperda* resistentes a lufenuron no Brasil. Schmidt (2002), monitorando a suscetibilidade *S. frugiperda* a lufenuron em diversos estados do Brasil, observou porcentagens de sobrevivência de lagartas inferiores a 13% quando submetidas nas concentrações de 3,2 e 10 µg.mL⁻¹. Contudo, com a elevada pressão de seleção decorrente do uso constante de lufenuron para controle de *S. frugiperda* nas áreas produtoras de milho pode ter levado à seleção de indivíduos resistentes

A resistência de *S. frugiperda* a lufenuron foi autossômica, devido às sobreposições dos intervalos de confiança observados entre as linhagens heterozigóticas resultantes de cruzamentos recíprocos e entre os parentais resistentes e suscetíveis indicam que *loci* relacionados à resistência estão localizados em cromossomos autossômicos, deste modo, o efeito maternal ou herança ligada ao sexo pode ser descartada para este estudo. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Diez-Rodriguez e Omoto (2001), avaliando uma população resistente de *S. frugiperda* a lambda-cyhalothrin, e Yu e Nguyen (1994), avaliando a herança da resistência de *S. frugiperda* a carbaryl. Apesar da herança autossômica relacionada à resistência a inseticidas ser considerada mais comum (HEATHER, 1986), os insetos tem demonstrado ampla plasticidade quanto a localização no cariótipo de genes relacionados a resistência a inseticidas de vários grupos, acarretando em um número considerável de espécies com herança da resistência ligada ao sexo, como em *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) resistente a diflubenzuron (KOLZE; SALES, 2001), *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) resistente a permethrin e deltamethrin (HEATHER, 1986), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a endosulfan (DALY; FISK, 1998). Apesar das dificuldades na caracterização de cariótipos de Lepidoptera (SAHARA; YOSHIDO; TRAUT, 2012), estudos posteriores buscando a construção de mapas genéticos em espécies de Lepidoptera poderão ser amplamente utilizados para localização de genes associados a resistência a inseticidas.

Nossos resultados demonstraram uma forte tendência de *S. frugiperda* apresentar uma resistência a lufenuron incompletamente recessiva. Apesar de que em concentrações inferiores a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentarem níveis de dominância caracterizadas como co-dominantes, a elevação da concentração de lufenuron leva a níveis de dominância incompletamente recessiva atingindo níveis de completamente recessiva próximas a concentração recomendada para utilização a campo de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Destes resultados, demonstram que o nível de dominância não se traduz em um parâmetro fixo, resultando apenas de parâmetros genéticos, do contrário a dominância, se caracteriza como a relação entre os fenótipos e três genótipos distintos (homozigoto-resistente, homozigoto-suscetível e heterozigoto) que pode ser variável segundo as condições do ambiente (BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND, 2000). Este parâmetro tem grande impacto sobre a implementação de tática de manejo da resistência a inseticidas (LENORMAND; RAYMOND; 1998). Tendo em vista que a evolução da

resistência tende a ser retardada quando a herança é recessiva (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; ROUSH; MCKENZIE, 1987); porém uma vez que a resistência atinge uma alta frequência, o restabelecimento da suscetibilidade na ausência da pressão seletiva pode se tornar mais retardada, pois a frequência de indivíduos resistentes (homozigotos) presentes no agroecossistema estaria ligeiramente estabilizada em virtude da baixa variabilidade genética (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001).

O elevado desvio entre a mortalidade esperada e mortalidade observada entre os retrocruzamento permitiu rejeitar o modelo de herança monogênica, deste modo, levantando à possibilidade de a herança da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron estar associada a vários genes. Apesar dos mecanismos de resistência a inibidores de biossíntese de quitina, foram descritos como redução da penetração cuticular do produto (PIMPRIKAR; GEORGHIOU, 1979), detoxificação metabólica (SONADA; TSUMUKI, 2005) e mutação em sítios de ação específicos (VAN LEEUWEN et al., 2012), há fortes evidências na relação entre resistência à inibidores de biossíntese de quitina e processos ligados a detoxificação por monooxigenases da família P450 (KOLZE; SALES, 2001), caracterizadas no uma a ampla diversidade de genes associados a processos de catalisação de xenobióticos. Assim múltiplos locos associados a enzimas de detoxificação podem ser relacionados à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron.

Estes resultados demonstram que os estudos relacionados à genética da resistência aos inibidores de biossíntese de quitina assumem um padrão complexo que pode levar ao surgimento de resistência múltipla a outros grupos de inseticidas (HEMINGWAY et al., 2004), devido a ampla gama de compostos que estas enzimas são capazes de catabolizar (RANSON et al., 2002), dificultando as possibilidades de manejo de populações de *S. frugiperda* resistentes.

Assim se faz necessário a implementação de uma abrangente e sistemática estratégias capaz de retardar o surgimento de populações resistentes, assim como, restabelecimento da suscetibilidade em áreas com elevada frequência de indivíduos resistentes (SHAD.; SAYYED.; SALEEM, 2010). Deste modo, os presentes resultados a respeito da caracterização dos padrões de herança associados a aspectos bioecológicos como, alta habilidade de dispersão de *S. frugiperda* (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985), o que aumentaria a possibilidade de encontro de indivíduos suscetíveis de outras áreas e/ou culturas não tratadas com inseticidas com indivíduos resistentes

possibilitando ao restabelecimento da suscetibilidade (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001). A introdução do milho que expressa proteína Bt nos agroecossistemas do cerrado brasileiro, pode ser considerada uma alternativa para o restabelecimento da suscetibilidade de *S. frugiperda*. A elevada adoção da tecnologia em grandes áreas produtoras de milho tem possibilitado a diminuição na utilização de inseticidas para o controle deste inseto-praga, diminuindo a pressão de seleção. Contudo, a necessidade de conscientização dos agricultores para utilização eficiente desta tecnologia, pautada na adoção de áreas de refugio e estratégias compatíveis com programas de MIP, retardando a evolução da resistência a proteínas Bt e a resistência múltipla (ALSTAD; ANDOW, 1995; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011).

Para tanto, há necessidade de implementação de um modelo eficiente de monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* aos principais inseticidas recomendados para o seu controle e de orientação de agricultores e técnicos com relação à adoção da rotação de inseticidas baseado no seu modo de ação, além de outras recomendações do manejo integrado de pragas, reduzindo a pressão de seleção sobre estes insetos, retardando o surgimento de populações resistentes, causando desequilíbrios ecológicos no agroecossistemas.

3.5 Conclusões

- A herança da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron é autossômico e incompletamente recessiva.
- A resistência de *S. frugiperda* a lufenuron é uma característica poligênica, porém associada a poucos *loci*.

Referências

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, n. 5219, p. 1894-1896, 1995.

ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F₂ screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.

ASSIÉ, L.K.; FRANCIS, F.; GENGLER, N.; HAUBRUGE, E. Response and genetic analysis of malathion-specific resistant *Tribolium castaneum* (Herbst) in relation to population density. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 43, p. 33-44, 2007.

BEEMAN, R.W. Recent advances in mode of action of insecticides. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 27, p. 253-281, 1982.

BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1588–1595, 2000.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e62268, 2013. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0062268. Acesso em: 27/09/2013.

CROW, F.J. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v.45, p.293-296, 1999.

DALY, J.C.; FISK, J.H. Sex-linked inheritance of endosulphan resistance in *Helicoverpa armigera*. **Heredity**, London, v. 81, p. 55-62, 1998.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, 311-316, 2001.

FABRICK, J.A.; TABASHNIK, B.E. Similar genetics basis of resistance to Bt toxin cry1Ac in boll-selected and diet-selected strains of pink bollworm. **PloS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e3565, doi:10.1371/journal.pone.0035658, 2012.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. **Journal of the Institute of Actuaries**, London, v. 78, n. 3, p. 388-390, 1978.

GEORGHIOU, G.P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Parasitological Review**, San Diego, v. 26, n. 2, p. 224-255, 1969.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 3, p. 319–323. 1977.

- HEATHER, N.W. Sex-linked resistance to pyrethroids in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 15-20, 1986.
- HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.J.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, p. 653-665. 2004.
- HUANG, F.; ANDOW, D.A.; BUSCHMAN, L.L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, West Sussex, v. 140, n. 1, p. 1-16, 2011.
- KOTZE, A.C.; SALES, N. Inheritance of diflubenzuron resistance and monooxygenase activities in a laboratory-selected strain of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 5, p. 1243-1248, 2001.
- LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within population. **Genetics**, Bethesda, v. 99, p. 541-553, 1981.
- LENORMAND, T.; RAYMOND, M. Resistance management: the stable zone strategy. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 65, p. 1-6, 1998.
- LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit Or LOGit analysis. Berkeley, 1987.
- PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J.; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 78, p. 756-762, 1985.
- PIMPRIKAR, G.D.; GEORGHIOU, G.P. Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly *Musca domestica* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 12, p. 10-22, 1979.
- RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, p. 179-181, 2002.
- ROBERTSON, J.L.; SAVIN, N.E.; PREISLER, H.K.; RUSSELL, R.M. **Bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 2007. 199 p.
- ROUSH, R.T.; CROFT, B.A. Experimental population genetics and ecological studies of pesticide resistance in insects and mites. In: GLASS, E.H. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington: National Academy of Sciences, 1986. p. 256-270.
- ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

- ROUSH, R.T.; MACKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.
- SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; TRAUT, W. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. **Chromosome Research**, Oxford, v. 20, p. 83-94, 2012.
- SANTOS, V.C.; SIQUEIRA, H.A.A.; SILVA, J.E.; FARIAS, M.J.D.C. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae), from the State Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 2, p. 264-270, 2011.
- SCHMIDT, F.B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a Lufenuron na cultura do milho**. 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SETHI, A.; BONIS, M.S.; DILAWARI, V.K. Realized heritability and genetic analysis of insecticide resistance in whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.). **Journal of Entomology**, London, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2008.
- SHAD, S.A.; SAYYED, A.H.; SALEEM, M.A. Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 839-846, 2010.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: the principles and practices of statistics in biological research**. New York: W.H. Freeman, 1995. 880 p.
- SONODA, S.; TSUMUKI, H. Studies on glutathione S-transferase gene involved in chlorfluazuron resistance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 82, p. 94-101, 2005.
- STONE, B.F. A formula for determining the degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 38, p. 325-326, 1968.
- TSUKAMOTO, M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 71-98.
- VAN LEEUWEN, T.V.; DEMAEGHT, P.; OSBORNE, E.J.; DERMAUW, W.; GOHLKE, S.; NAUEN, R.; GRBIC, M.; TIRRY, L.; MERZENDORFER, H.; CLARK, R. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 12, p. 4407-4412, 2012.

WANG, Y.H.; LIU, X.G.; ZHU, Y.C.; WU, S.G.; LI, S.Y.; CHEN, W.M.; SHEN, J.L. Inheritance mode and realized heritability of resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 629-634, 2009.

WYCKHUYS, K.A.G.; O'NEIL, R.J. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. **Crop Protection**, Guildford, v.25, p.1180-1190, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N. Inheritance of carbaryl resistance and microsomal oxidases in the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, p. 301-304, 1994.

4 ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRITOMA DE LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LUFENURON

Resumo

Este estudo explorou as novas tecnologias para sequenciamento em larga escala de cDNA para se conhecer o perfil de transcritos de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e avaliar o padrão de expressão gênica diferencial entre lagartas resistentes a lufenuron em comparação ao de lagartas suscetíveis, buscando identificar o(s) mecanismo(s) de resistência a esse produto. Para isso, foram utilizados sequenciamentos de quatro bibliotecas de cDNA em plataforma HiScan 1000, Illumina[®], obtidas de lagartas de 4^o instar de *S. frugiperda* de linhagens resistente (LUF-R) e suscetível (SUS) a lufenuron, induzidas ou não com esse produto. O transcriptoma foi construído utilizando aproximadamente 19,6 milhões de leituras *single-end* com escores de qualidade > 30, o que gerou 18.506 transcritos, com N50 de 996 pb. A pesquisa contra o banco de dados não-redundantes do NCBI proporcionou anotação funcional de 51,1% (9.457) dos transcritos obtidos, sendo que grande parte dos alinhamentos apresentou homologia a insetos, com o maior número deles (45%) se assemelhando aos de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), enquanto 10% se assemelharam a sequências de diversas espécies de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), sendo 3% dos alinhamentos semelhantes aos de *Spodoptera frugiperda*. A análise comparativa da expressão gênica entre lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível a lufenuron identificou 1.224 transcritos expressos diferencialmente ($p \leq 0,05$, teste t; expressão relativa > 2). Sete transcritos foram associados ao metabolismo da cutícula, sendo cinco deles superexpressos na linhagem LUF-R. O metabolismo de detoxificação apresentou 48 transcritos expressos diferencialmente, dos quais foram identificados 40 transcritos associados às monooxigenases P450, cinco a glutathione-S-transferase, dois às carboxilesterases e um a esterase. Foi observado que 39 dos 48 transcritos associados ao metabolismo de detoxificação foram superexpressos na linhagem resistente. Este padrão foi confirmado a partir da expressão relativa utilizando "PCR quantitativa em Tempo Real - qPCR". Estes resultados representam um importante passo para o entendimento dos mecanismos moleculares da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron, proporcionando, ainda, uma visão mais ampla do perfil de expressão gênica de insetos a inseticidas.

Palavras-chave: Expressão gênica diferencial; Inibidores de biossíntese de quitina; Mecanismo de resistência; Resistência de insetos

Abstract

This study explored the new high-throughput cDNA sequencing technologies to characterize the transcriptional profile of larvae of *Spodoptera frugiperda*, and to compare the differential gene expression between resistant and susceptible strains of *S. frugiperda* to lufenuron in order to identify the resistance mechanism(s) involved. Four cDNA libraries obtained from fourth instars of the resistant (LUF-R) and the susceptible

(SUS) *S. frugiperda* strains, exposed or not to lufenuron, were sequenced in a HiScan1000[®] platform (Illumina[®]). The transcriptome was *de novo* assembled using nearly 19.6 million single-end reads with quality scores higher than 30, leading to 18,506 transcripts with a N50 of 996 bp in length. A Blast search against the non-redundant database available in NCBI allowed the functional annotation of 51.1% (9,457) of the obtained transcripts. Most of these transcripts aligned with insect sequences, and a majority of them (45%) with *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Nearly 10% of the transcripts aligned with species belonging to *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), with 3% of the alignments matching sequences from *Spodoptera frugiperda*. Differential gene expression analysis between the resistant and the susceptible strains identified 1,224 differentially expressed transcripts ($p \leq 0.05$, t-test; fold change > 2). Seven of them were associated with the cuticle metabolism, and five out seven were up-regulated in the resistant strain (LUF-R). A large set of transcripts (48) associated with the detoxification metabolism was differentially expressed; 40 P450 monooxygenases, five glutathione-S-transferases, two carboxylesterase and one esterase were identified. Thirty-nine out of these 48 transcripts were up-regulated in the resistant strain. Gene expression data obtained by RNA-Seq analysis was validated by quantitative real time PCR (qPCR) of several selected target transcripts. These results represent an important step toward the understanding of the molecular mechanisms of resistance of *S. frugiperda* to lufenuron, and provide a broader view on the gene expression profile of insects to insecticides.

Keywords: Differential gene expression; Chitin synthesis inhibitor; Resistance mechanism; Insect resistance

4.1 Introdução

A lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ROJAS et al., 2004), causando grandes perdas de produção em culturas como algodão e milho nas Américas (MEAGHER; NAGOSHI, 2004). Recentes modificações no sistema de cultivo no cerrado brasileiro, integrando culturas como algodão, milho, soja e milheto, proporcionaram a elevação dos níveis populacionais de *S. frugiperda* (BARROS et al., 2010). O controle desta praga tem sido baseado na utilização de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) e na utilização de inseticidas sintéticos; contudo, a elevada pressão de seleção causada por estes métodos de controle tem levado à evolução da resistência de *S. frugiperda* a proteínas *Bt* e inseticidas de diferentes grupos químicos (DIEZ-RODRIGUEZ, OMOTO, 2001; STORER et al., 2012).

Os inseticidas inibidores da biossíntese de quitina são aqueles que atuam por interferência na síntese ou deposição de quitina no exoesqueleto e demais estruturas quitinizadas de insetos (MERZENDODORF; ZIMOCH, 2003). Devido à especificidade do modo de ação, este grupo de inseticidas tem demonstrado grande potencial em programas de MIP, dada a sua baixa toxicidade ao homem e animais superiores (BEEMAN, 1982). A elevada pressão proporcionada pela ampla adoção de inibidores de biossíntese de quitina, como o lufenuron, para o controle de insetos-praga no cerrado brasileiro, tem modificado a suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* (SCHMITH, 2002), comportamento que pode indicar a evolução da resistência a este inseticida. Deste modo, são necessárias medidas que possibilitem preservar a vida útil desta molécula.

Atualmente, os principais mecanismos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas envolvem mutações que levam à insensibilidade de sítios-alvo de ação (YU et al., 2003) e/ou alterações na atividade de enzimas de detoxificação ou sequestro de xenobióticos (RANSON et al., 2003; FEYEREISEN, 2005). Apesar disso, pouco se sabe sobre o perfil de expressão gênica de linhagens resistentes aos inibidores da biossíntese de quitina, sendo inexistentes estudos envolvendo linhagens resistentes de *S. frugiperda* a esse produto.

Os sequenciadores de nova geração (NGS – “Next-Generation Sequencing”), como as plataformas Solexa/Illumina™ (Illumina®), 454 (Roche®) e SOLID™ (Applied Biosystems®), tornaram cada vez mais possível a realização de montagens de transcritomas a um baixo custo, com grande velocidade e quantidade de dados (HUDSON, 2008).

Transcritomas são aplicados a uma ampla gama de estudos biológicos e fornecem informações fundamentais sobre o funcionamento e a resposta funcional de organismos a estímulos diversos, permitindo, por exemplo, acessar níveis e perfis de expressão gênica de forma comparativa ou não (TORRES et al., 2008; HEGEDUS et al., 2009), descobrir biomarcadores para tecidos e processos específicos (DISSET et al., 2009) e genes (HAHN et al., 2009), além de permitir a identificação de ortólogos conservados para fins filogenéticos (HUGHES et al., 2006; DUNN et al., 2008), entre outros.

Neste estudo buscou-se conhecer o perfil de transcritos de larvas de *S. frugiperda* e avaliar o padrão de expressão gênica diferencial entre lagartas resistentes e

suscetíveis a lufenuron. Essa abordagem possibilita avaliar a resposta de transcrição desse inseto e identificar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resistência a lufenuron.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Preparação dos insetos

Para realização dos sequenciamentos, foram utilizadas duas linhagens de *S. frugiperda*. A linhagem suscetível (SUS) e a resistente (LUF-R), as quais apresentam CL_{50} estimada em 0,23 e 210,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lufenuron, respectivamente. Lagartas do primeiro dia do quarto ínstar foram submetidas ao jejum por um período de 24 h. Após esse período, as lagartas suscetíveis e resistentes foram divididas em subgrupos, sendo submetidas ou não à indução com lufenuron. As lagartas foram transferidas para recipientes com dieta artificial tratada superficialmente com 3,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lufenuron (Match 50 EC, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) diluído em água destilada e surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%, permanecendo em contato com a fonte de alimento pelo período de uma hora (induzida). Para o tratamento controle foi oferecida dieta artificial tratada superficialmente com água destilada e o surfactante Triton[®] na concentração de 0,1% (não-induzida). Deste modo, os tratamentos para sequenciamento foram constituídos de SUS induzida, SUS controle, LUF-R induzida e LUF-R controle.

4.2.2 Coleta de tecidos e extração de RNA total

O RNA total foi extraído de cinco lagartas de quarto ínstar por tratamento utilizando o Trizol[®] Reagent (Invitrogen[™]), de acordo com as especificações do fabricante. O macerado das amostras (1 mL) foi homogeneizado com o auxílio de um Vortex[®] e adicionado a 200 μL de clorofórmio. A solução foi centrifugada durante 15 min a 12.000 g. A fase aquosa foi recuperada, adicionada a 500 μL de isopropanol e centrifugada (10 min x 12.000 g). Posteriormente, o sedimento foi lavado em 1 mL de 75% etanol gelado e a amostra novamente centrifugada (5 min x 7.500 g). O sedimento foi mantido em temperatura ambiente para evaporação do etanol e então ressuspensão em 60 μL de água milliQ estéril. O DNA residual foi eliminado após tratamento com 3 μL de DNase na concentração de 3 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. O sobrenadante foi retirado e adicionado a 300 μL de Trizol e 200 μL de clorofórmio. A solução foi agitada e centrifugada por 10 min

a 13.000 g. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, 300 µL de clorofórmio foram adicionados ao sedimento e a solução foi centrifugada por 5 min a 13.000 g. Posteriormente, 1 mL de 100% etanol foi adicionado ao sobrenadante e a amostra submetida a nova centrifugação (10 min x 13.000 g). O precipitado obtido foi mantido em temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol e ressuspensão em água com DEPC. A quantidade e qualidade do RNA foram verificadas em Picodrop-Spectrophotometer 4.0.4.0.

Cada amostra de RNA total foi submetida a tratamento para enriquecimento da população de RNA mensageiro (mRNA) pela remoção de RNA ribossômico (rRNA) utilizando-se do sistema comercial RiboMinus® Eukaryote Kit (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras enriquecidas em mRNA de *S. frugiperda* foram armazenadas a -80°C até o envio das mesmas ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba/SP, para a preparação das bibliotecas de cDNA e sequenciamento em plataforma HiScan 1000® (Illumina®).

As amostras de mRNA purificado foram fragmentadas em porções de 200 nucleotídeos e ligadas a iniciadores randômicos para posterior transcrição reversa e construção de bibliotecas de cDNA. O cDNA produzido foi purificado pela utilização de esferas magnéticas e lavagens com etanol para posterior reparação de suas terminações, para que cada molécula apresentasse extremidades abruptas. Além da reparação, ocorreu a adição de uma adenosina na extremidade 3' de cada fragmento, útil para a orientação dos adaptadores específicos que se ligaram às moléculas, os quais apresentam, além de iniciadores de transcrição, indexadores específicos para permitir a diferenciação das amostras. Após a ligação dos adaptadores, as amostras foram submetidas a PCR de ciclo limitado e análise para verificação do sucesso obtido durante a preparação das amostras para o sequenciamento. Para o sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi utilizado o protocolo *paired-end*, originando leituras de aproximadamente 100 pb.

4.2.3 Montagem *de novo*

As leituras obtidas pelo sequenciamento da plataforma Illumina HiScan 1000[®] foram filtradas para remover bases com escores de qualidade inferiores a 30 nas extremidades de ambas as fitas e utilizadas para a montagem de um transcrito único de referência (Figura 4.1) (Anexo A).

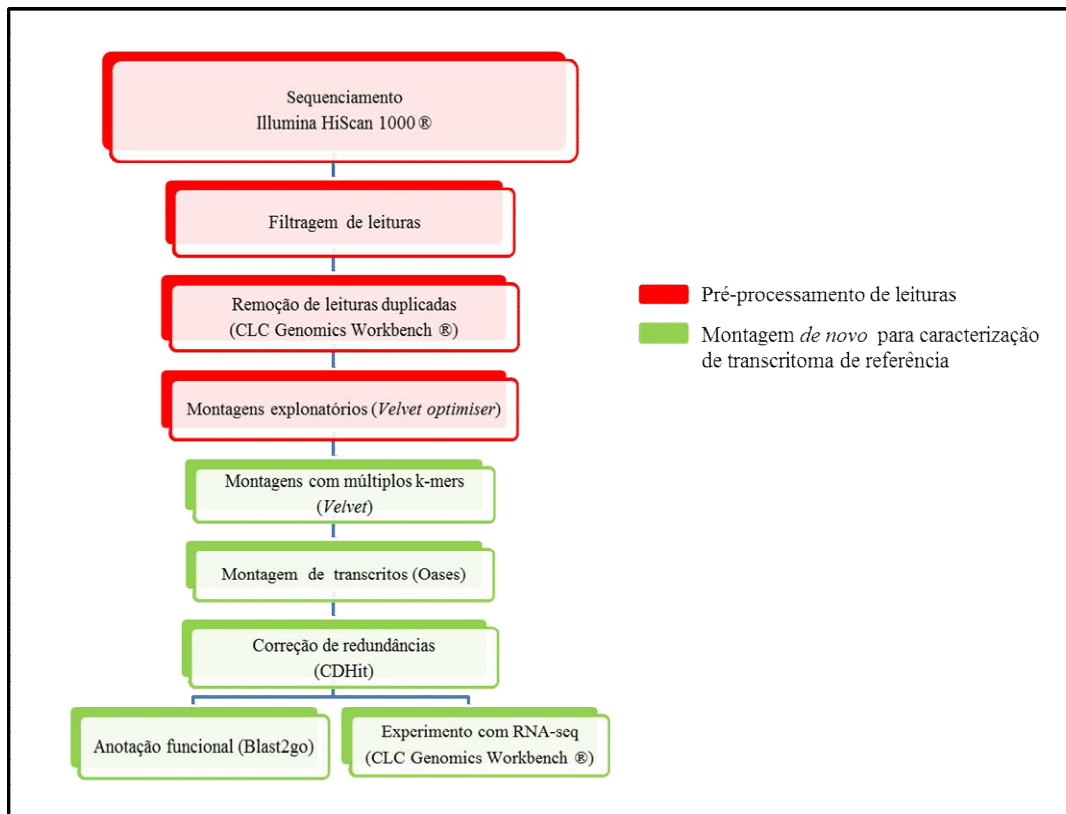


Figura 4.1 - Fluxograma da estratégia adotada para caracterização do transcrito de *S. frugiperda* e da expressão gênica diferencial entre lagartas suscetível e resistente a lufenuron

Posteriormente, com a finalidade de maximizar o desempenho computacional, as leituras duplicadas foram excluídas, minimizando o tempo utilizado para a montagem *de novo* do transcrito. As leituras únicas obtidas foram submetidas à análise exploratória utilizando o *Velvetoptimiser* versão 2.2.5 (ZERBINO; BIRNEY, 2008), visando avaliar a diversidade de transcritos montados em diferentes tamanhos de palavra (*k-mers*). Dessa forma, foram obtidas montagens com todos os tamanhos

ímpares de *k-mers* variando de 19 a 61, seguindo Zerbino e Birney (2008). A concatenação dos *contigs* das montagens obtidas a partir dos diferentes *k-mers* utilizados foi realizada no *Oases* versão 0.2.08 (SCHULZ et al., 2012). Os transcritos foram agrupados utilizando o *CD-hit* versão 4.6 (WEIZHONG; GODZIK, 2006), com a finalidade de eliminar erros e possíveis quimeras presentes na montagem final.

4.2.4 Anotação funcional

Os transcritos obtidos foram anotados após busca de similaridade dos transcritos contra sequências depositadas no banco de dados não-redundante do NCBI, utilizando o algoritmo BLASTx (ALTSCHUL et al., 1997) disponível junto ao programa BLAST2GO (CONESA et al., 2005), com valor de corte de 10^{-3} . Códigos de classificação de enzimas (CE) e de anotação de vias metabólicas (KEGG - Kyoto Genes and Genomes) foram gerados a partir do mapeamento direto de termo GO para seus códigos equivalentes de enzimas (KANEHISA et al., 1996). Para a classificação funcional, as sequências consenso foram comparadas àquelas dos bancos de dados de assinatura proteica Interpro pelo InterproScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001), com valor de corte de 10^{-5} .

4.2.5 Expressão diferencial entre linhagem suscetível e resistente de *S. frugiperda* a lufenuron

A expressão diferencial entre as linhagens LUF-R e SUS de *S. frugiperda* foi avaliada utilizando os dados oriundos do sequenciamento das quatro bibliotecas de cDNA. Para isso, a montagem *de novo* descrita anteriormente foi utilizada como transcrito de referência. O delineamento experimental foi constituído de dois grupos, as linhagens LUF-R e SUS, dos quais apresentavam os sub-grupos induzido e não-induzido. Com a finalidade de obter alta especificidade nos resultados, foram computadas apenas as leituras similares a um único transcrito, com similaridade mínima de 80% em um comprimento de leitura superior a 90%. A expressão de cada transcrito obtido foi calculada utilizando o número de leituras semelhantes por kilobase (kb) do alvo por milhão de leituras obtidas (RPKM). Os valores de RPKM calculados foram normalizados e ajustados pelo método de FDR. Os valores médios de RPKM obtidos

para a linhagem resistente (induzida e não-induzida) foram comparados àqueles da linhagem suscetível (induzida e não-induzida) e comparados pelo teste t ($p < 0,05$), utilizando o software CLC Genomics Workbench (QIAGEN® Company).

A validação da análise comparativa utilizando dados de RNA-seq entre linhagens resistente e suscetível de *S. frugiperda* a lufenuron foi realizada a partir de "PCR Quantitativa em Tempo Real" (qPCR). Para isso, foram selecionados aleatoriamente como genes candidatos para validação, transcritos associados ao metabolismo de cutícula e enzimas de detoxificação metabólica. Para isso, foram utilizados transcritos com diferenças significativas nos níveis de expressão, baseando-se nos valores discriminatório de significância ($p < 0,05$) e de expressão relativa (>2) aqui adotados.

4.2.6 Validação de genes candidatos por qPCR

Para validação dos resultados obtidos na avaliação da expressão diferencial entre as linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a lufenuron, 2 µg do RNA tratado com DNase obtido de cada tratamento foram utilizados em reação de transcrição reversa para produção de cDNA. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o sistema comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega©), de acordo com especificações do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20°C até uso.

A reação de qPCR consistiu de 0,4 µg de cDNA, 12,5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix® (Thermo Scientific©), 0,6 µM de cada um dos iniciadores (Tabela 4.1) e 10,3 µL de água, totalizando volume final de 25 µL. Os iniciadores, para cada alvo selecionado, foram construídos a partir do software Primer Express® versão 3.0.1 (Life Technologies©), baseando-se nas sequências do transcriptoma de *S. frugiperda*. As reações de amplificação foram realizadas em plataforma ViiA™ 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies©). As condições de termociclagem utilizadas foram: 2 min de pré-aquecimento a 50°C, 10 min para desnaturação inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30s. As curvas de dissociação foram analisadas para verificar a especificidade de amplificação. A normalização da amplificação foi feita utilizando-se o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como referência.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos semelhantes aos utilizados para o sequenciamento, contendo três repetições biológicas (cada repetição composta por cinco lagartas), sendo que cada repetição foi analisada em triplicata técnica. A comparação da expressão relativa de cada gene foi analisada de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4.1- Lista de iniciadores utilizados para as reações de qPCR

Transcrito		Sequência
L464_3/3_0.286_613	Senso	CAATGCAATTCCTTGGACCAA
	Antissenso	GCACACCATCGATCCAATGA
L406_12/23_0.041_667	Senso	TCGGTGAGAGGTATGCCAAAT
	Antissenso	AAGTTTCGCAAGACGTGCACTA
L669_9/12_0.129_717	Senso	CAAACCAGCCTGCACCTGTA
	Antissenso	GGGCAACAGGACGTGTATAGG
L1141_4/4_0.200_473	Senso	CCATCGAGGTTGTGCAAAAA
	Antissenso	CCTCAGCCAGTGTCTCCAT
L1141_1/4_0.600_552	Senso	CAATCCGCTCGCGTACATG
	Antissenso	AATCTTGACCCAATGCAATTCC

4.3 Resultados

4.3.1 Montagem *de novo* do transcrito de referência

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA em plataforma Illumina HiScan 1000[®] produziu 68.027.513 leituras de aproximadamente 100 pb, correspondendo a 6.802.751.300 de nucleotídeos, sendo descartados 23,2% das leituras devido ao padrão de qualidade adotado (Tabela 4.1).

Posteriormente, foram removidas as leituras duplicadas, sendo utilizadas aproximadamente 19 milhões de leituras com cerca de 90 pb para a montagem do transcrito de referência (Tabela 4.2). Os resultados das montagens exploratórias com a finalidade de avaliar o melhor *k-mer* a ser utilizado para construção do transcrito *de novo* estão na Tabela 4.3.

Tabela 4.2 - Pré-processamento de dados resultantes de sequenciamento de linhagens resistente e suscetível de *Spodoptera frugiperda* a lufenuron

Dados brutos	
Número de leituras (<i>single-end</i>)	68.027.513
Número total de nucleotídeos	6.802.751.300
Após filtragem	
Número de leituras (<i>single-end</i>)	52.280.210
Número total de nucleotídeos	4.705.218.900
Após remoção de leituras duplicadas	
Número de leituras (<i>single-end</i>)	19.969.569
Número total de nucleotídeos	1.797.261.210

* Sequenciamento Illumina 1.9

Tabela 4.3 - Análise exploratória de montagens *de novo* em linhagens de *Spodoptera frugiperda* a suscetível e resistente a lufenuron

<i>k-mer</i>	n° de transcritos	N50	Tamanho do maior transcritos	Total de bases em transcritos	n° de transcritos > 1k	Total de bases em transcritos > 1k
19	15563	299	1666	4774489	46	53084
21	20084	325	1827	6602807	160	190429
23	21295	330	1930	7081839	196	237443
25	21972	329	1930	7315647	203	246328
27	22913	327	2132	7589209	210	253358
29	23830	325	2759	7874519	215	264032
31	24726	324	2759	8153945	238	292700
33	25751	322	2759	8464652	267	327038
35	26529	323	2759	8728509	264	323776
37	27700	321	3076	9090666	268	331771
39	28761	322	2452	9452896	313	382965
41	29732	324	2452	9808008	353	429227
43	31031	324	2469	10254450	370	456786
45	32200	325	2469	10664873	397	491366
47	33023	327	2423	10979048	429	530833
49	33819	326	2520	11243998	437	536766
51	34688	325	2423	11485845	415	513622
53	34841	327	2427	11566833	428	526515
55	35000	326	2594	11619179	434	533791
57	35369	324	2594	11693969	416	510464
59	34736	326	2800	11497603	387	480907
61	34341	326	2594	11351874	371	457984

A alteração no parâmetro *k-mer* levou a modificações em praticamente todos as variáveis observadas. Dessa forma, para elaboração da montagem *de novo* de referência, foram selecionadas montagens com *k-mer* 23, 25, 47, 53 e 55, as quais utilizaram 14.337.437 nucleotídeos, equivalentes a 71,8 % de bases submetidas para análise

(Tabela 4.4). Essas montagens individuais foram fundidas em uma única montagem *de novo* de referência, a qual resultou na produção de 18.506 transcritos com tamanho variável de 100 a 6.517 pb (Figura 4.2), comprimento médio de 774,75 pb (Tabela 4.3), N50 de 996 pb e N90 de 411 pb.

Tabela 4.4 - Sumário de montagem *de novo* do transcrito de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

	Montagem
Número de transcritos	18.506
Tamanho min.	100
Tamanho max.	6.517
Total de bases	14.337.437
Tamanho > 1000	4.945
Tamanho médio de transcritos	774,75
N50	996
N90	411

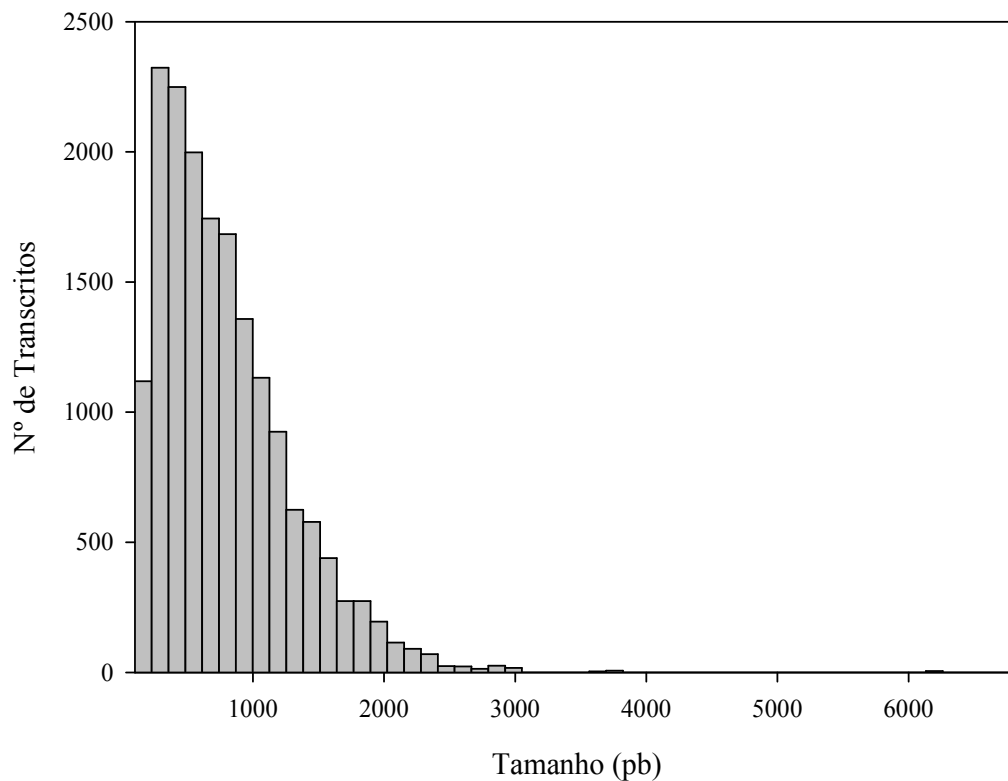


Figura 4.2 - Distribuição de tamanho dos transcritos do transcrito de referência de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

4.3.2 Anotação funcional

Dos 18.506 transcritos obtidos, apenas 51,1% (9.457) foram anotados funcionalmente após busca heurística contra o banco de dados não-redundante de proteínas do NCBI (Figura 4.3).

A análise de similaridade baseada no *e*-valor indicou forte homologia para a maioria dos transcritos mapeados, sendo encontrados valores de similaridade entre 10^{-3} e 10^{-32} para aproximadamente 30% dos transcritos. A maioria dos transcritos apresentaram *e*-valor ainda menores, com 24% deles entre 10^{-32} e 10^{-61} . As maiores significâncias no *e*-valor foram identificadas em 6% dos transcritos, variando de 10^{-148} e 10^{-177} (Figura 4.3).

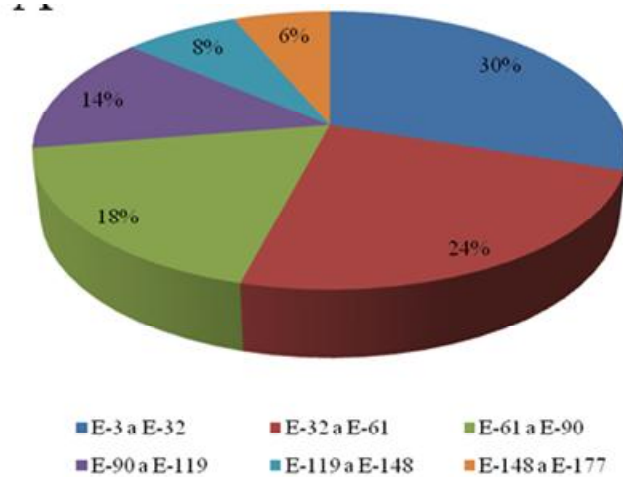


Figura 4.3 – Distribuição dos valores de homologia dos transcritos do transcrito *de novo* de lagartas de *Spodoptera frugiperda* obtidos após busca no banco de dados (nr)(NCBI)

Na distribuição de alinhamentos por espécie, a quase totalidade dos alinhamentos foi relacionada a insetos (Figura 4.4). O maior número de alinhamentos (45%) foi obtido contra o bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), seguido da borboleta monarca *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) (20%). Os representantes do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) observados na análise foram *S. littoralis*, *S. exigua*, *S. litura* e *S. frugiperda*, correspondendo a 10% dos alinhamentos obtidos, sendo *S. frugiperda* responsável por 3% deles.

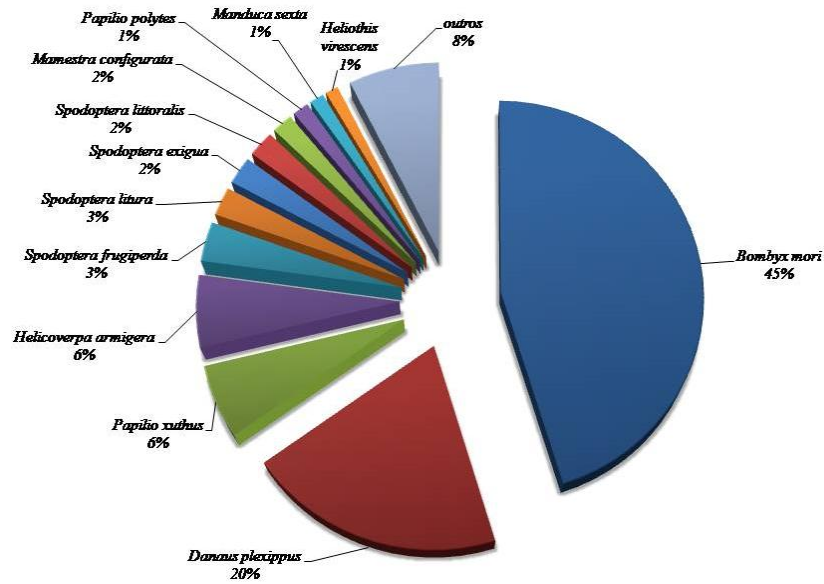


Figura 4.4 - Distribuição dos alinhamentos dos transcritos do transcriptoma *de novo* de lagartas de *S. frugiperda* por espécie obtidos via BLAST

A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 9.457 transcritos anotados permitiu agrupar 6.078 transcritos em 47 grupos funcionais, divididos em três categorias: *componentes celulares*, *função molecular* e *processo biológico*. Assim, foram identificados 13 grupos funcionais dentro da categoria de proteínas que apresentam função como *componentes celulares*, 11 grupos em *funções moleculares* e 23 grupos em *funções biológicas* (Figura 4.5).

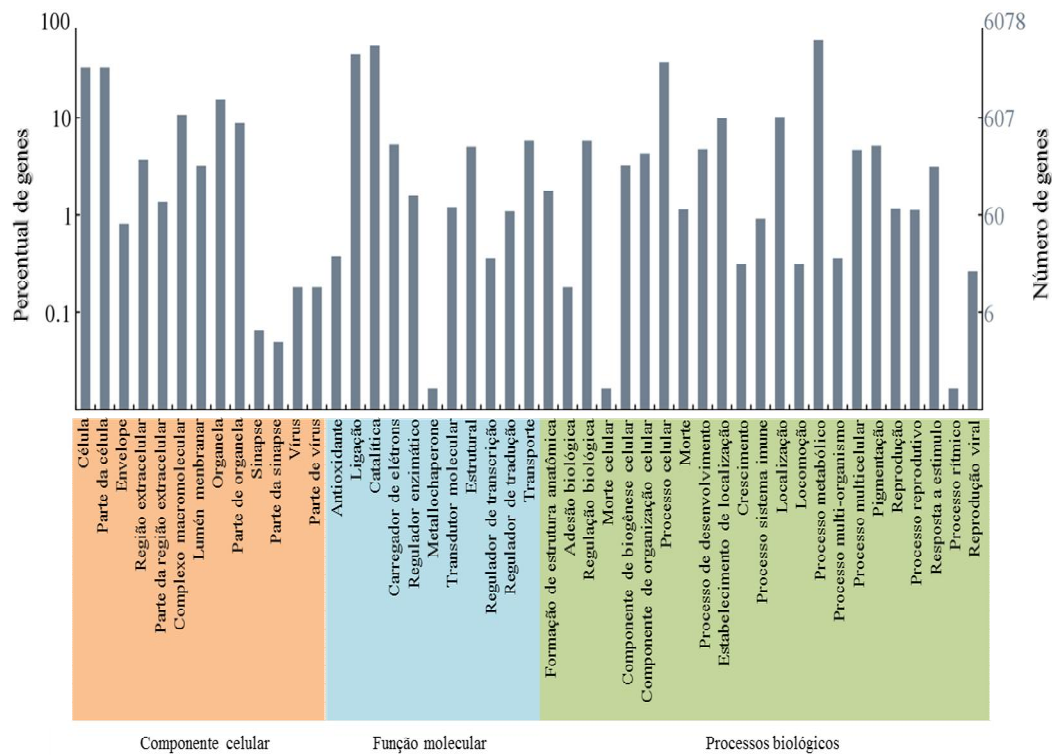


Figura 4.5 - Distribuição das ontologias gênicas (GO) atribuídas ao transcrito de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

4.3.3 Expressão gênica diferencial entre linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a lufenuron

A análise comparativa da expressão gênica entre lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível a lufenuron demonstrou modificações no perfil de expressão entre as linhagens avaliadas (Figura 4.6).

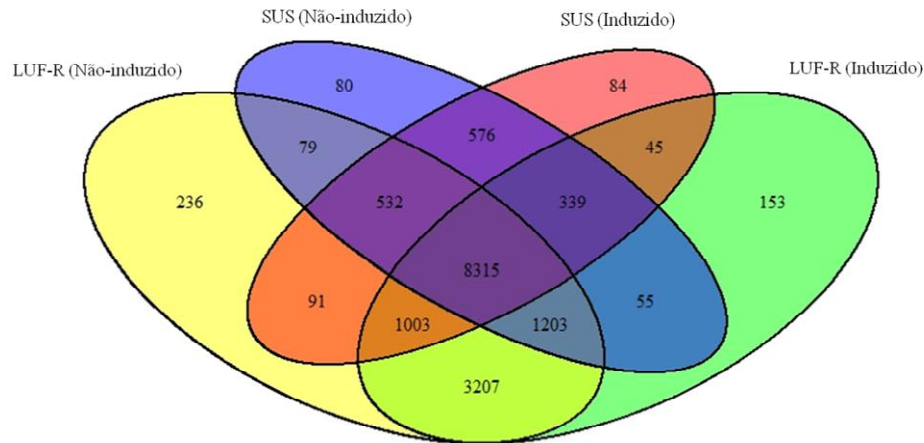


Figura 4.6 - Distribuição dos transcritos expressos diferencialmente na análise de RNA-seq de lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron, induzidas ou não por esse inseticida

Entre os 18.506 transcritos avaliados, 1.224 apresentaram expressão diferencial (teste-t, $p \leq 0,05$; expressão relativa > 2) (Figura 4.7), dos quais 40 foram superexpressos na linhagem LUF-R, com valores de expressão relativa superior a 100 vezes àqueles da linhagem SUS. Os 20 transcritos que apresentaram maior expressão relativa variaram de 194,45 a 1.193,44 vezes. Por outro lado, 23 transcritos apresentaram supressão na linhagem LUF-R, variando de -133,86 a -1.974,14 vezes a expressão em relação àquela da SUS. Contudo, para maioria dos transcritos que apresentaram grandes alterações quanto aos níveis de expressão, não foi possível a identificação putativa em buscas realizadas contra o banco de dados *nr* do NCBI (Tabela 4.4).

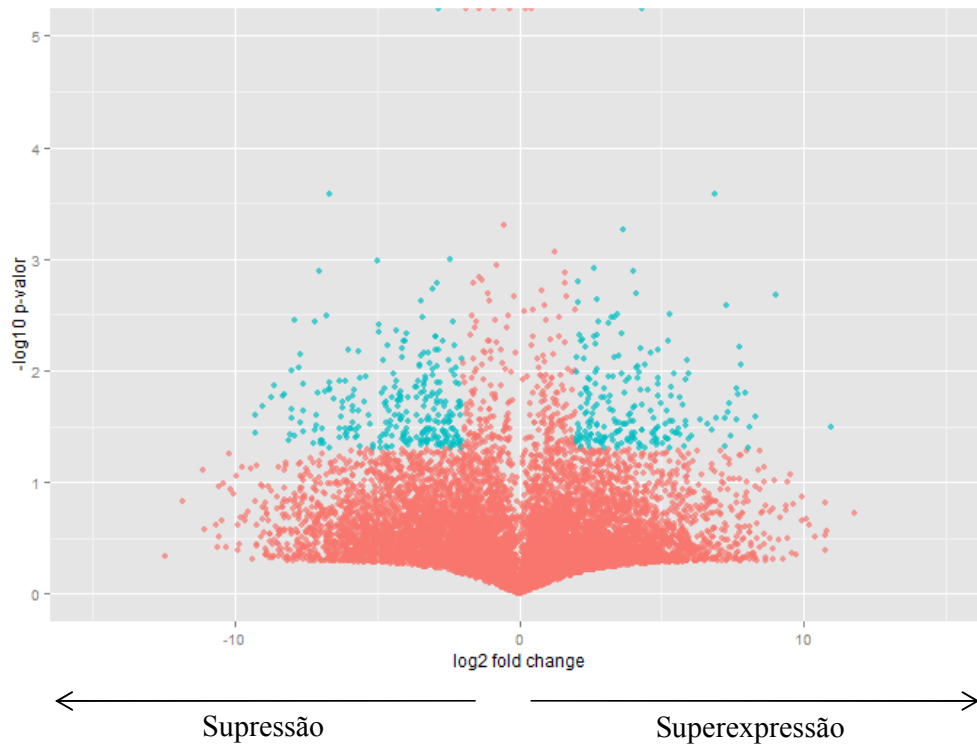


Figura 4.7 - Distribuição dos transcritos do transcriptoma de referência de *S. frugiperda* baseada na análise comparativa da expressão gênica de lagartas suscetível e resistente, induzidas ou não com lufenuron. Marcados em verde apenas aqueles transcritos com diferenças significativas nos níveis de expressão, baseando-se nos valores discriminatório de significância (teste t, $p < 0,05$) e de expressão relativa (>2) aqui adotados

Tabela 4.5- Expressão diferencial dos 40 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron (continua)

Transcrito	Expressão Relativa *	p-valor	Alinhamento	e-valor
L_2178_2/15_0.125_2005	+ 1.193,44	0,05	---NA---**	-
L_1097_4/4_0.100_586	+ 620,38	0,04	Subunidade 14kDa do complexo redutase do citocromo c-ubiquinol	1,20E-53
L_1980_3/5_0.000_285	+ 616,00	0,02	---NA---	-
L_689_1/3_0.571_1414	+ 516,77	0,02	Proteína da célula dendritica	0.0
L_13_11/14_0.148_620	+ 416,44	0,02	Proteína cuticular rr-1 motif 46	3,65E-24
L_527_3/3_0.000_752	+ 397,40	0,01	---NA---	-
L_765_9/9_0.100_483	+ 317,07	0,02	---NA---	-
L_292_4/4_0.222_1001	+ 305,11	0,02	Ácido lipoico sintase	9,41E-31
L_1510_3/6_0.400_1400	+ 277,00	0,04	---NA---	-
L_1009_4/5_0.455_1700	+ 266,53	0,04	fatty acyl-reductase cg5065-tipo	3,89E-123
L_814_1/1_0.750_240	+ 260,26	0,03	Subunidade mitocondrial da 2-oxoisovalerato deidrogenase	1,57E-27
L_2805_2/2_0.000_1581	+ 257,89	0,01	---NA---	-
L_66_4/5_0.417_939	+ 257,09	0,02	proteína ribossomal l7a	1,89E-150
L_2042_1/4_0.444_525	+241,26	0,04	---NA---	-
L_1465_5/6_0.400_1956	+ 240,78	0,00	Citocromo b5	0.0
L_2031_3/4_0.333_1392	+ 214,80	0,01	proteína fat3	2,54E-122
L_367_3/3_0.000_1018	+ 206,48	0,01	isoforma b	7,17E-175
L_759_2/3_0.333_626	+ 204,22	0,03	---NA---	-
L_5328_1/1_0.500_262	+ 196,33	0,01	---NA---	-
L_294_3/4_0.444_704	+ 194,45	0,04	proteína ligante do hormônio juvenil	5,11E-97
L_6635_1/1_0.500_375	-133,86	0,05	Isoforma 2 da proteína ligante a fosfatidiletanolamina	5,30E-09

Tabela 4.6- Expressão diferencial dos 40 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

(conclusão)				
Transcrito	Expressão Relativa *	p-valor	Alinhamento**	e-valor
L_1231_6/6_0.250_576	- 148,09	0,03	---NA---	-
L_2554_2/2_0.250_370	-148,76	0,05	---NA---	-
L_2139_1/2_0.500_1180	- 156,38	0,00	---NA---	-
L_748_12/14_0.179_1757	-162,59	0,02	Citocromo parcial	0.0
L_1824_4/5_0.385_1501	- 167,45	0,02	upf0568 proteína c14orf166 homóloga	2,56E-125
L_659_3/8_0.636_3683	- 172,53	0,04	purina 5-nucleotidase livre citosólica	0.0
L_965_5/5_0.000_887	- 201,75	0,01	---NA---	-
L_3106_3/3_0.143_1151	- 202,48	0,03	---NA---	-
L_1322_3/3_0.143_565	- 203,75	0,02	---NA---	-
L_5639_2/2_0.000_980	- 215,10	0,01	---NA---	-
L_2162_5/5_0.273_832	- 221,57	0,01	Domínio principal de proteína alergênica	1,11E-116
L_441_3/7_0.600_1076	- 250,38	0,02	---NA---	-
L_6630_1/1_0.500_657	- 259,00	0,05	---NA---	-
L_1592_5/12_0.150_1363	- 261,76	0,05	---NA---	-
L_1986_1/5_0.038_552	- 269,88	0,03	---NA---	-
L_1901_3/3_0.000_751	- 320,88	0,03	---NA---	-
L_1979_6/10_0.417_1979	- 347,76	0,05	ornitina mitocondrial	0.0
L_719_11/11_0.125_933	- 520,24	0,00	---NA---	-
L_194_3/3_0.000_1501	- 1974,18	0,03	Fator 3 iniciador de tradução de eucariotos	0.0

* (+)Superexpressão em indivíduos LUF-R em relação aos SUS, (-)Supressão da expressão em indivíduos LUF-R em relação aos SUS

** (---NA---) Não obteve anotação funcional

A análise de agrupamento obtida demonstrou que a maioria dos transcritos (69%) apresentou maior expressão na linhagem resistente se comparada à linhagem suscetível, enquanto 31% apresentaram supressão (Figura 4.8). Não foram observadas grandes diferenças no padrão de expressão diferencial dentro de cada linhagem SUS e LUF-R dada à indução das mesmas com lufenuron, indicando que a maioria dos transcritos superexpressos e supressos na linhagem LUF-R apresentam expressão constitutiva.

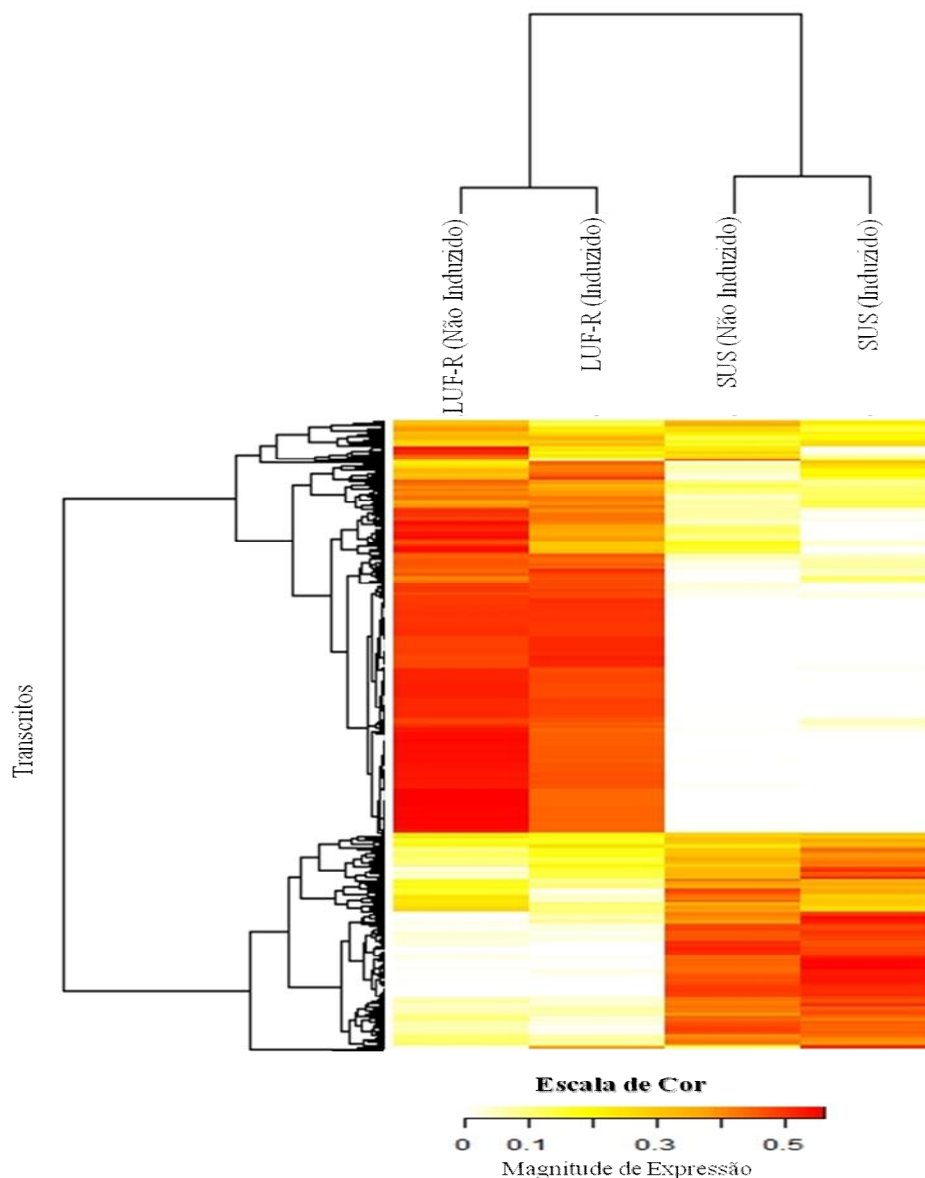


Figura 4.7 - Distribuição comparativa de transcritos anotados funcionalmente de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos

Foram selecionados dois grupos de transcritos candidatos possivelmente relacionados ao mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a lufenuron, dada a sua associação ao metabolismo da cutícula e aos processos de detoxificação. Com relação ao metabolismo da cutícula, foram relacionados sete transcritos expressos diferencialmente entre os tratamentos avaliados (Figura 4.9). Os transcritos L623_2/4_0.375_615 e L721_4/5_0.364_477 foram supressos na população LUF-R, enquanto os demais foram altamente expressos na linhagem LUF-R (Tabela 4.6).

O metabolismo de detoxificação apresentou 48 transcritos expressos diferencialmente (Figura 4.11). A maioria das enzimas de detoxificação identificadas foram associadas às monooxigenases. Foram identificados 40 transcritos associados às monooxigenases P450 (CYP), cinco glutatona-S-transferase (GST), duas carboxilesterase (CCE) e uma esterase (EST).

Foi observada grande diversidade de famílias CYP, das quais se destacaram a *cyp9A*, *cyp3*, *cyp4* e *cyp6*. Entre os transcritos de enzimas de detoxificação selecionados, a grande maioria deles apresentou superexpressão em lagartas de *S. frugiperda* da linhagem resistente (Tabela 4.7).

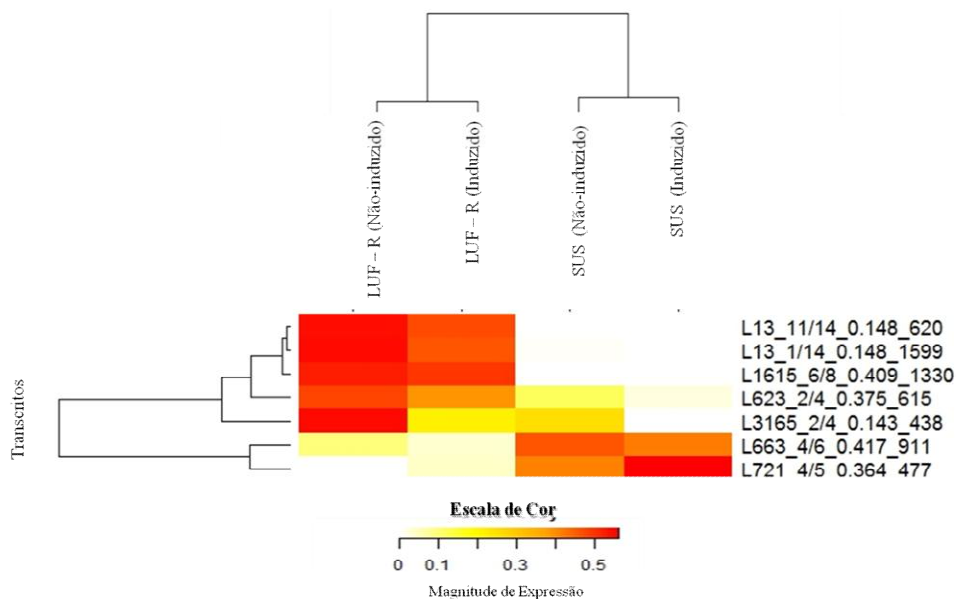


Figura 4.8 - Distribuição comparativa de transcritos associados ao metabolismo da cutícula de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos

Tabela 4.7 - Expressão diferencial em transcritos associados ao metabolismo da cutícula em linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

Transcrito	Expressão Relativa *	p -valor	Alinhamento	e-valor	AC **
L1615_6/8_0.409_1330	RR	< 0,01	Proteína cuticular isoforma A	5,72E-67	L1615_6/8_0.409_1330
L13_11/14_0.148_620	+416,44	0,02	Prot. cuticular 4 RR-1 (motif 46)	3,6E-29	L13_11/14_0.148_620
L13_1/14_0.148_1599	+138,88	< 0,01	Prot. cuticular RR -1 (motif 56)	1,1E-34	L13_1/14_0.148_1599
L663_4/6_0.417_911	+ 9,30	0,04	tpa: Prot. de cutícula	7,4E-11	L663_4/6_0.417_911
L3165_2/4_0.143_438	+2,71	0,01	Prot. cuticular RR-1 (motif 46)	4,2E-47	L3165_2/4_0.143_438
L623_2/4_0.375_615	- 2,72	0,01	tpa: Prot. de cutícula	1,2E-33	L623_2/4_0.375_615
L721_4/5_0.364_477	- 22,88	0,04	Prot. ligante a quitina (domínio 3)	1,0E-24	L721_4/5_0.364_477

*(+)-Elevação na regulação em relação a população SUS; (-)Diminuição na regulação em relação a população SUS; (^{RR})Apenas expresso em população resistente LUF-R;

** AC. Código de acesso no GenBank (NCBI) relativo ao melhor alinhamento identificado

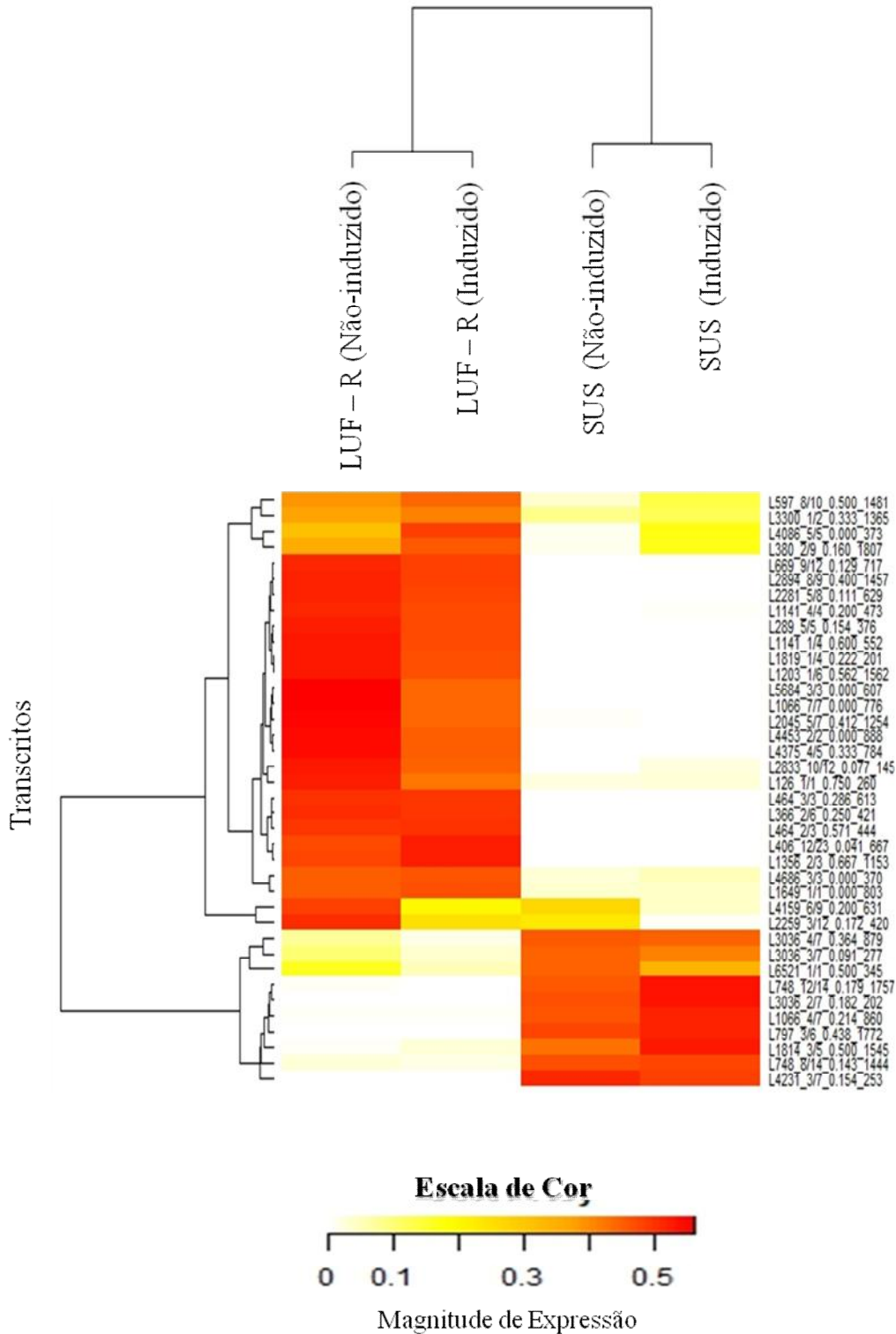


Figura 4.9 - Distribuição comparativa de transcritos associados a enzimas de detoxificação de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que apresentaram alteração em sua expressão. Os valores de RPKM foram transformados em uma escala de proporcionalidade, na qual a cor branca indica 0% e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos sub-grupos

Tabela 4.8 - Expressão diferencial em transcritos associados a enzimas de detoxificação em linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron (continua)

Transcrito	Expressão Relativa *	p-valor	Alinhamento	e-valor	AC **
L669_9/12_0.129_717	RR	0,01	citocromo P450 CYP321A10	4,10E-72	AGO62008.1
L2894_8/9_0.400_1457	RR	< 0,01	esterase CXE4	0.0	AGJ94046.1
L2281_5/8_0.111_629	RR	< 0,01	Carboxilesterase	6,31E-10	ABQ59309.1
L1141_1/4_0.600_552	RR	0,01	citocromo P450	2,05E-41	AAP80766.1
L289_5/5_0.154_376	RR	0,01	citocromo CYP9A51	2,82E-73	AFP20595.1
L1203_1/6_0.562_1562	RR	0,01	citocromo CYP340AA1	5,89E-124	AFP20604.1
L1819_1/4_0.222_201	RR	0,01	glutaciona S-transferase E2	1,04E-09	ACX85225.1
L1066_7/7_0.000_776	RR	0,05	citocromo CYP324A1	1,02E-168	AFP20597.1
L464_3/3_0.286_613	RR	0,02	citocromo P450	9,58E-41	ACV88722.1
L366_2/6_0.250_421	RR	0,02	carboxilcolinesterase CCE006b	1,47E-57	ADF43470.1
L4453_2/2_0.000_888	RR	0,04	Esterase	6,85E-72	ABD62775.1
L4375_4/5_0.333_784	RR	0,03	citocromo P450, parcial	3,10E-138	AGO36276.1
L5684_3/3_0.000_607	RR	0,05	citocromo P450 4V2	1,44E-61	XP_004922118.1

Tabela 4.9 - Expressão diferencial em transcritos associados a enzimas de detoxificação em linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

(continuação)

Transcrito	Expressão Relativa *	p-valor	Alinhamento	e-valor	AC **
L464_2/3_0.571_444	RR	0,03	citocromo P450	4,49E-40	ACV88722.1
L1356_2/3_0.667_1153	RR	0,05	citocromo CYP333B3	0.0	AFP20610.1
L406_12/23_0.041_667	RR	0,05	citocromo P450 CYP321A7	5,58E-59	AGO62005.1
L2045_5/7_0.412_1254	+128,11	0,04	Carboxilesterase	0.0	ABE01157.2
L1141_4/4_0.200_473	+101,63	< 0,01	citocromo P450	5,55E-45	AAP80766.1
L2833_10/12_0.077_1453	+35,66	0,05	citocromo P450	1,17E-132	AAP80766.1
L126_1/1_0.750_260	+17,43	0,05	citocromo P450	1,20E-16	AAP80766.1
L1649_1/1_0.000_803	+10,93	0,04	citocromo P450 CYP340L1	5,12E-20	AGO62010.1
L597_8/10_0.500_1481	+4,79	0,01	esterase CXE14	0.0	ACV60241.1
L4086_5/5_0.000_373	+4,17	0,05	glutaciona S-transferase E2	3,84E-38	ACX85225.1
L4086_5/5_0.000_373	+4,17	0,05	glutaciona S-transferase E2	3,84E-38	ACX85225.1
L380_2/9_0.160_1807	+4,44	0,02	citocromo P450 CYP9	0.0	AAR26518.1
L3300_1/2_0.333_1365	+3,6	0,05	citocromo CYP6AB14	0.0	AFP20592.1

Tabela 4.10 - Expressão diferencial em transcritos associados a enzimas de detoxificação em linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron

(conclusão)

Transcrito	Expressão Relativa *	p-valor	Alinhamento	e-valor	AC **
L2259_3/12_0.172_420	+2,91	0,01	glutaciona S-transferase epsilon 4	3,19E-25	ABS56977.1
L4159_6/9_0.200_631	+2,03	0,03	citocromo P450 CYP6AB12	4,09E-131	AGO62002.1
L6521_1/1_0.500_345	-3,83	0,04	glutaciona S-transferase delta 3	3,21E-10	ABC79690.1
L3036_3/7_0.091_277	-6,44	0,01	citocromo P450	1,67E-03	BAM73795.1
L3036_4/7_0.364_879	-9,49	<0,01	citocromo P450	5,07E-100	BAM73795.1
L1814_3/5_0.500_1545	-26,2	0,03	citocromo P450 monooxygenase CYP4M6	0.0	AAM54722.1
L1066_4/7_0.214_860	-62,18	0,01	citocromo CYP324A1	6,44E-130	AFP20597.1
L748_12/14_0.179_1757	-162,59	0,02	citocromo P450 CYP4L4	0.0	AAL48300.1
L3036_2/7_0.182_202	SS	0,02	citocromo P450	5,56E-10	BAM73795.1
L797_3/6_0.438_1772	SS	<0,01	citocromo P450	0.0	AEL87781.1
L4231_3/7_0.154_253	SS	0,05	citocromo P450 CYP306A1	1,18E-44	ACM45975.1

*(+) Elevação na regulação em relação a população SUS; (-) Diminuição na regulação em relação a população SUS; (^{RR}) Apenas expresso em população resistente LUF-R; (^{SS}) Apenas expresso em população suscetível SUS

** AC. Código de acesso no GenBank (NCBI) relativo ao melhor alinhamento identificado

4.3.4 Análise por qPCR

O padrão de expressão diferencial entre linhagens suscetível e resistente a lufenuron foi confirmado pela expressão relativa identificada por qPCR (Figura 4.11). Todos os transcritos avaliados demonstraram elevação na expressão gênica em LUF-R, com destaque para os transcritos L406_12/23_0.041_667 e L669_9/12_0.129_717, que apresentaram expressão relativa superior a 45 e 900 vezes, respectivamente, em relação a SUS não-induzida.

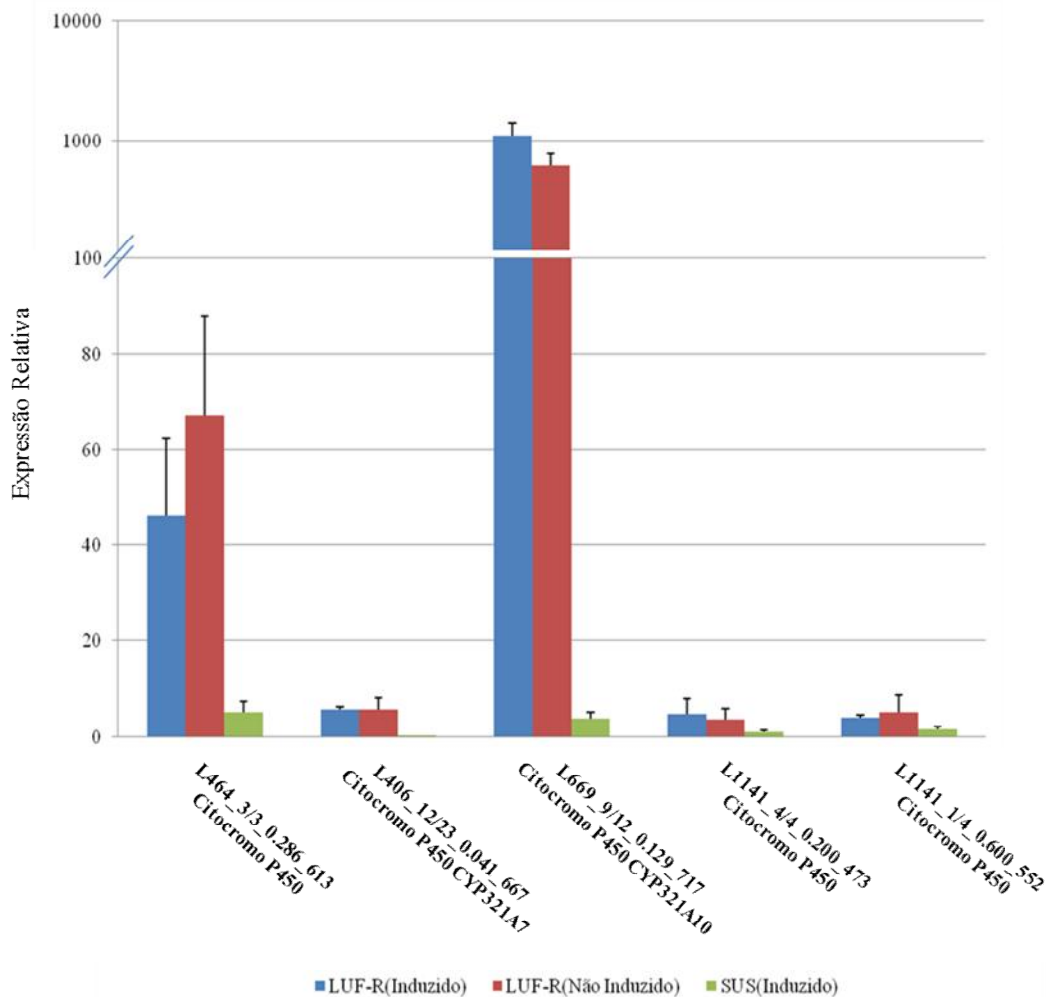


Figura 4.10 – Análise de qPCR demonstrando a expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a lufenuron que foram induzidas ou não com lufenuron

4.4 Discussão

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) têm trazido grandes avanços aos estudos de transcrito de organismos não-modelo. Estas tecnologias têm proporcionado um grande conjunto de dados a um baixo custo (ZHAO et al., 2011). Apesar disso, a exploração desta tecnologia para identificar mecanismos associados à resistência ainda é incipiente.

A busca por uma estratégia de montagem adequada para dados resultantes de sequenciamento de leituras curtas obtidas por plataformas Illumina vêm sendo bastante discutida na literatura (MARTIN; WANG, 2011). Deste modo, buscamos uma estratégia de montagem que possibilitasse ampla diversidade de *contigs*, cobertura e eficiência na identificação de transcritos, utilizando apenas leituras de qualidade elevada. Optou-se por uma abordagem interativa, utilizando várias montagens com variação de *k-mer*. Esta abordagem nos permitiu obter montagem com valores comparáveis àqueles relatados para outras espécies, comprovando sua eficiência em produzir transcritos longos e de permitir a detecção de transcritos de baixa abundância (CRAWFORD et al., 2010; SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS 2010). Isso aumenta as possibilidades de recuperação de respostas biológicas importantes presentes em transcritomas (HAZNEDAROGLU et al., 2012). Dessa forma, estas informações são de grande importância, tendo em vista que eventos como a resistência de insetos a inseticidas são considerados fenômenos de alta complexidade biológica, relacionando-se com processos de natureza adaptativa, como mutações e processos metabólicos vitais para a manutenção do organismo (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011).

A montagem *de novo* permitiu avaliar a expressão diferencial entre linhagem resistente e suscetível de *S. frugiperda* a lufenuron. Observou-se um grande número de transcritos apresentando expressão diferenciada entre as populações avaliadas, mas muitos destes transcritos, até o momento, não apresentou relação com mecanismos moleculares associados à resistência de insetos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Lin et al. (2013), que analisaram a expressão diferencial em linhagens suscetível e resistente de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Noctuidae) a chlorantraniliprole. Esses autores relataram 1.215 transcritos expressos diferencialmente, muitos deles associados a vias metabólicas distintas daquelas de processos de detoxificação ou de sítios-alvo de ação do inseticida. Neste trabalho, o

transcrito L_194_3/3_0.000_1501, caracterizado como fator de iniciação de tradução em eucariotos, apresentou supressão na linhagem LUF-R de 1.974 vezes em relação à linhagem SUS. Esse gene, de função conservada em eucariotos, está relacionado a eventos de tradução, recrutando RNAm e a maquinaria celular para síntese de proteínas (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010). Deste modo, alterações significativas na sua expressão podem ser relacionadas à forte regulação de eventos pós-transcricionais na síntese de proteínas. Por outro lado, o transcrito L_1097_4/4_0.100_586, associado ao complexo ubiquinol-citocromo c reductase, ligado ao transporte de elétrons no processo de respiração celular (VAN LOON; VAN EJK; GRIVELL, 1983), apresentou a maior superexpressão (620 vezes) na linhagem LUF-R.

Apesar de grande parte dos transcritos superexpressos e supressos não apresentar caracterização funcional, estes resultados permitem observar a complexidade de processos adaptativos decorrentes de seleção natural. A ampliação das pesquisas associadas à resistência de insetos utilizando estudos de genômica tem fortalecido a visão de que a resistência a vários inseticidas pode estar associada a fatores poligênicos (OAKESHOTT et al., 2013).

Não foram observadas grandes modificações em transcritos associados a enzimas que atuam na formação da cutícula, como quitina sintetase e quitinases; contudo, foi observada regulação positiva dos transcritos L1615_6/8_0.409_1330, L13_1/14_0.148_1599, L13_11/14_0.148_620 e L3165_2/4_0.143_438 associados às proteínas de cutícula do tipo RR-1, as quais conferem características mais flexíveis as regiões onde são localizadas (SUDERMAN, et al., 2006). Estes resultados condizem com os obtidos por Merzendorfer et al. (2012), que observaram que o tratamento de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) com diflubenzuron não alterou os níveis de expressão de quitina sintetase e quitinases, mesmo tendo sido observada alterações significativas na expressão de transcritos de proteínas de cutícula, sugerindo, assim, que genes envolvidos no metabolismo, modificação e degradação da quitina não são alvos de benzoilfeniluréias.

Avaliando a expressão diferencial em populações suscetível e resistente de *S. frugiperda*, observou-se um amplo número de transcritos associados a P450, GSTs e CCEs, dos quais muitos apresentaram expressão elevada na linhagem resistente a lufenuron. A detoxificação de inseticidas tem sido amplamente relatada como um dos principais mecanismos de adaptação de insetos à alta pressão de seleção exercida por

inseticidas (FEYEREISEN, 2005). Enzimas codificadas por genes da citocromo P450, GSTs e CCEs são amplamente associadas a mecanismos de resistência de insetos a pesticidas devido a degradação, detoxificação e/ou sequestro de xenobióticos (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011). Em população de *Tribolium castaneum* contaminado com diflubenzuron, o estudo de genômica funcional mostrou um grande incremento na transcrição de enzimas P450 e carboxilesterases, além de glucosil-transferases, sulfotransferases e glutationa-s-transferases, relacionando-as a processos de detoxificação de xenobióticos (MERZEDORFER et al., 2012).

Foi evidente um maior número de monooxigenases entre os ESTs com maior expressão relativa. Monooxigenases têm sido uma das principais classes de enzimas associadas à resistência de lepidópteros a inseticidas como piretroides (BRUNBARALE et al., 2010), organofosforados (CARVALHO et al., 2013) e diamidas (LIN et al., 2013). Vários estudos têm sido executados com a finalidade de avaliar a ação destas enzimas ao nível toxicológico (YU; NGUYEN, 1994). Yu (1991), avaliando o comportamento de populações resistentes de *S. frugiperda* a piretroides, organofosforados e carbamatos, observou incremento na mortalidade de insetos destas populações quando expostos a estes compostos, principalmente utilizando inibidores de monooxigenases. Estudos moleculares evidenciaram elevação na expressão de *cyp12a4* em população resistente de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) a lufenuron, sugerindo que as enzimas do citocromo P450 tenham função chave na resistência desse inseto aos inseticidas testados.

A evidência de múltiplas famílias *cyp* com elevada expressão na população LUF-R sugere que inúmeras P450 possam estar relacionadas à resistência de *S. frugiperda* a lufenuron. Famílias como *cyp3*, *cyp4*, *cyp6* e *cyp9* foram caracterizadas como sendo possivelmente relacionadas aos mecanismos de resistência de lepidópteros à inseticidas (PITTENDRIGH et al., 1997; RANASINGHE; HOBBS, 1998; YANG et al., 2006). Os níveis elevados de expressão associados aos genes codificadores de enzimas de detoxificação, mesmo na ausência do inseticida, demonstram que a alta expressão destes genes ocorre constitutivamente.

O metabolismo de inseticidas em insetos certamente envolve uma série de processos metabólicos complexos. Embora os processos bioquímicos relacionados à detoxificação sejam bem descritos, existem lacunas importantes a respeito dos

mecanismos fisiológicos e moleculares que regem o processo de detoxificação (YANG, et al., 2007).

O perfil de expressão gênica com grande número de transcritos com variações significativas nos níveis de expressão entre linhagens SUS e LUF-R pode indicar a participação de outras vias metabólicas na resistência da linhagem LUF-R de *S. frugiperda* a lufenuron. Deste modo, há a necessidade de estudos que proporcionem maior entendimento de vias metabólicas adjacentes às vias clássicas de detoxificação (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011). Durante anos, os estudos dos mecanismos de resistência de insetos a inseticidas foram pontuais; contudo, a ampliação das tecnologias de sequenciamento e a capacidade de geração de grande volume de informação tem proporcionado uma visão mais ampla dos mecanismos envolvidos nos processos que levam à resistência de insetos aos inseticidas (LIN et al., 2013).

4.5 Conclusões

- As linhagens suscetível e resistente de *Spodoptera frugiperda* a lufenuron diferem no seu padrão de expressão gênica;
- Lagartas da linhagem resistente apresentam superexpressão de transcritos relacionados às vias de detoxificação de xenobióticos em insetos;
- Os níveis elevados de transcrição das enzimas de detoxificação em insetos resistentes ocorrem de forma constitutiva;
- A diversidade de transcritos e as diferenças observadas nos níveis de transcrição das monooxigenases P450 indicam essas enzimas como um dos mecanismos de resistência da linhagem de *S. frugiperda* analisada ao inseticida lufenuron.

Referências

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.H.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.; GAPPED, J. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

BEEMAN, R.W. Recent advances in mode of action of insecticides. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 27, p. 253-281, 1982.

BRUN-BARALE, A.; HÉMA, O.; MARTIN, T.; SURAPORN, S.; AUDANT, P.; SEZUTSU, H.; FEYEREISEN, R. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 900-909, 2010.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e62268, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0062268>. Acesso em: 27 set. 2013.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

CRAWFORD, J.E.; GUELBEOGO, W.M.; SANOU, A.; TRAORÉ, A.; VERNICK, K.D.; SAGNON, N.; LAZZARO, B.P. Transcriptome sequencing in *Anopheles funestus* using illumina RNA-Seq technology. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e14202, 2010. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0014202>. Acesso em: 30 out. 2013.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, 311-316, 2001.

DISSET, A.; CHEVAL, L.; SOUTOURINA, O.; DUONG VAN HUYEN, J. P.; LI, G.; GENIN, C.; TOSTAIN, J.; LOUPY, A.; DOUCET, A.; RAJERISON, R. Tissue compartment analysis for biomarker discovery by gene expression profiling. **PLoS ONE**, San Francisco, v.4, n. 11, p. e7779, 2009. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0007779>. Acesso em: 19 nov. 2013.

DUNN, C.W.; HEJNOL, A.; MATUS, D.Q.; PANG, K.; BROWNE, W.E.; SMITH, S.A.; SEAVER, E.; ROUSE, G.W.; OBST, M.; EDGECOMBE, G.D.; SORENSEN, M.V.; HADDOCK, S.D.; SCHMIDT-RHAESA, A.; OKUSU, A.; KRISTENSEN, R.M.; WHEELER, W.C.; MARTINDALE, M.Q.; GIRIBET, G. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. **Nature**, London, v. 452, p. 745-749, 2008.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.) **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 1-77.

HAHN, D.A.; RAGLAND, G.J.; SHOEMAKER, D.D.; DENLINGER, D.L. Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **BMC Genomics**, London, v. 10, 2009. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2164-10-234>. Acesso em: 19 nov. 2013.

- HAZNEDAROGLU, B.Z.; REEVES, D.; RISMANI-YAZDI, H.; PECCIA, J. Optimization of *de novo* transcriptome assembly from high-throughput short read sequencing data improves functional annotation for non-model organisms. **BMC Bioinformatics**, London, v. 13, 2012. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2105-13-170>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- HEGEDÜS, Z.; ZAKRZEWKA, A.; ÁGOSTON, V.C.; ORDAS, A.; RÁCZ, P.; MINK, M.; SPAINK, H.P.; MEIJER, A.H. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 46, p. 2918-2930, 2009.
- HUDSON, M.E. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 3-17, 2008.
- HUGHES, J.; LONGHORN, S.J.; PAPADOPOULOU, A.; THEODORIDES, K.; DE RIVA, A.; MEJIA-CHANG, M.; FOSTER, P.G.; VOGLER, A.P. Dense taxonomic EST sampling and its applications for molecular systematics of the Coleoptera (beetles). **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 23, p. 268-278, 2006.
- JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.T.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 11, p. 113-127, 2010.
- KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; HIRAKAWA, M.; ITOH, M.; KATAYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; OKUDA, S.; TOKIMATSU, T.; YAMANISHI, Y. Kegg for linking genomes of life and the environment. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 480-484, 2008.
- LIN, Q.; JIN, F.; HU, Z.; CHEN, H.; YIN, F.; LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, D.; REN, S.; FENG, X. Transcriptome Analysis of Chlorantraniliprole Resistance Development in the Diamondback Moth *Plutella xylostella*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e72314, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0072314>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-2\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387-402, 2008.
- MARTIN, J.A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 671-682, 2011.
- MEAGHER, R.L.; NAGOSHI, R.N. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in Southern Florida. **Ecological Entomology**, London, v. 29, p. 614-620, 2004.

- MERZENDORFER, H.; KIM, H.S.; CHAUDHARI, S.S.; KUMARI, M.; SPECHT, C.A.; BUTCHER, C.A.; BROWN, S.J.; ROBERT MANAK, J.; BEEMAN, R.W.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 264-276, 2012.
- MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, p. 4393-4412, 2003.
- OAKESHOTT, J.G.; FARNSWORTH, C.A.; EAST, P.D.; SCOTT, C.; HAN, Y.; WU, Y.; RUSSELL, R.J. How many genetic options for evolving insecticide resistance in heliohine and spodopteran pests. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 889-896, 2013.
- PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P.J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v 41, p. 411–422, 2011.
- PITTENDRIGH, B.; ARONSTEIN, K.; ZINKOVSKY, E.; ANDREEV, O.; CAMPBELL, B.; DALY, J.; TROWELL, S.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. Cytochrome p450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid-susceptible and - resistant strain. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, p. 507–512, 1997.
- RANASINGHE, C.; HOBBS, A.A. Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hubner): possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 571–580, 1998.
- RANSON, H.; PATON, M.G.; JENSEN, B.; McCARROLL, L.; VAUGHAN, A.; HOGAN, J.R.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F.H. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 13, p. 379–386, 2004.
- ROJAS, J. C.; VIRGEM, A.; MALO, E.A. Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuidae) monitored by pheromone traps in the coast of Chiapas, Mexico. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 496-503, 2004.
- SCHMIDT, F.B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a Lufenuron na cultura do milho**. 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1086-1092, 2012.

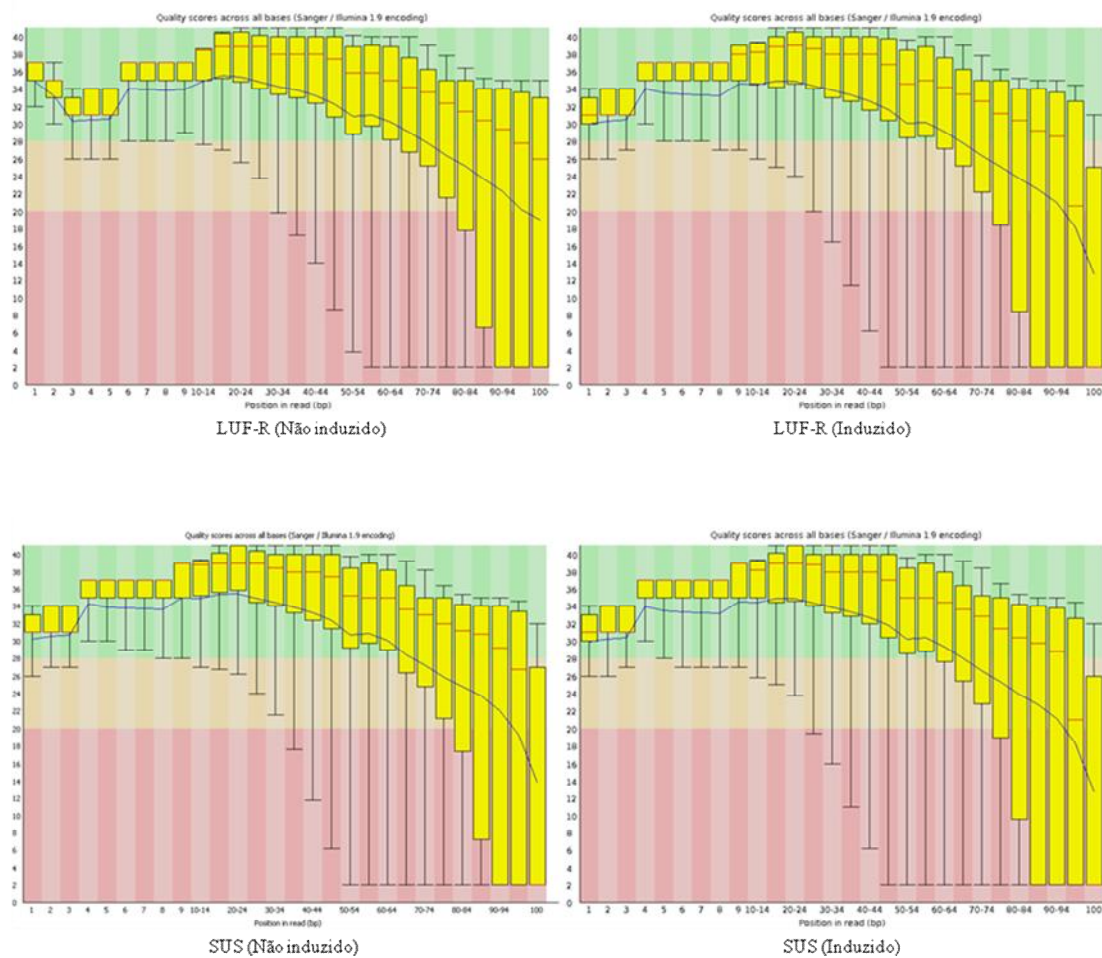
- STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.
- SUDERMAN, R.J.; DITTMER, N.T.; KANOST, M.R.; KRAMER, K.J. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. ***Insect Biochemistry and Molecular Biology***, Oxford, v. 36, n. 4, p. 353-365, 2006.
- SURGET-GROBA, Y.; MONTOYA-BURGOS, J.I. Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. ***Genome Research***, Cold Spring Harbor, v. 20, p. 1432–1440, 2010.
- TORRES, T.T.; METTA, M.; OTTENWALDER, B.; SCHLÖTTERER, C. Gene expression profiling by massively parallel sequencing. ***Genome Research***, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 172-177, 2008.
- VAN LOON, A.P.G.M.; VAN EIJK, E.; GRIVELL, L.A. Biosynthesis of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex in yeast. Discoordinate synthesis of the 11-kd subunit in response to increased gene copy number. ***The EMBO Journal***, Oxford, v. 2, n. 10, p. 1765-1770, 1983.
- WEIZHONG, L.; GODZIK, A. CD-HIT: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. ***Bioinformatics***, Oxford, v. 22, p. 1658-1659, 2006.
- YANG, Y.; CHEN, S.; WU, S.; YUE, Y.; WU, Y. Constitutive overexpression of multiple P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. ***Journal of Economic Entomology***, Lahman, v. 99, p. 1784–1789, 2006.
- YANG, Z.; YANG, H.; HE, G. cloning and characterization of two cytochrome P450 cyp6AX1 and cyp6AY1 cDNAs from *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae). ***Archives of Insect Biochemistry and Physiology***, New York, v. 64, p. 88-99, 2007.
- YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, San Diego, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991.
- YU, S.J.; NGUYEN, S.N. Inheritance of carbaryl resistance and microsomal oxidases in the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). ***Journal of Economic Entomology***, Lanham, v. 87, p. 301-304, 1994.
- YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, San Diego, v. 77, n. 1, p. 1-11, 2003.
- ZDOBNOV, E.M.; APWEILER, R. InterProScan: an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. ***Bioinformatics***, Oxford, v. 17, p. 847-848, 2001.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E, Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008.

ZHAO, Q.; WANG, Y.; KONG, Y.; LUO, D.; LI, X.; HAO, P. Optimizing *de novo* transcriptome assembly from short-read RNA-seq data: a comparative study. **BMC Bioinformatics**, London, v. 12, 2011. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2105-12-S14-S2>. Acesso em: 20 nov. 2013.

ANEXOS

Anexo A - Análise de eficiência de sequenciamento (antes da filtragem)



Análise de eficiência de sequenciamento (após da filtragem)

