Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Bases moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F

Felipe Antonio Domingues

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba 2016 Felipe Antonio Domingues Licenciatura em Ciências Biológicas

Bases moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO LUIS CÔNSOLI

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba 2016

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

Domingues, Felipe Antonio

Bases moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F / Felipe Antonio Domingues. - - Piracicaba, 2016. 153 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Expressão diferencial 2. Manejo de resistência 3. Modo de ação 4. RNASeq 5. Sequenciamento de nova geração I. Título

> CDD 632.78 D671b

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

A Deus, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. A família, minha mãe Roseni, irmã Natália e sobrinha Manuela pelo amor, afeto, incentivo e

por sempre estarem ao meu lado,

Aos meus avós Edino e Dirce, pelo amor, orações e por nunca medir esfoços para que eu

conseguisse estudar, e a minha avó Maria, pelas orações, amor e carinho.

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Luis Cônsoli pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, oportunidades concedidas, confiança, ensinamentos, orientação profissional e pessoal para a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pelas oportunidades concedidas, confiança, ensinamentos, colaboração e orientação na condução de parte desse trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, pelos conhecimentos e apoio transmitidos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao querido amigo e colega de laboratório Antonio Rogério Bezerra da Silva, por toda ajuda com a parte de bioinformática e formatação da tese;

À querida amiga e colega de laboratório Bruna Laís Merlin, pelos bons momentos de café e pela ajuda na formatação da tese;

Aos queridos amigos do Laboratório de Interações em Insetos, ESALQ/USP, pelo agradável convívio e companheirismo e que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho: Ana Flávia Canovas Martinez, Fábio Cleisto Alda Dossi, Mirela Coelho, Aline Sartori Guidolin, Bruna Laís Merlin, Luis Gustavo de Almeida, Wanessa Scopel, Nathalia Cavichiolli de Oliveira, Bianca Carbogim Soares, Fábio Ramon Martins Duarte, Diandra Achre, Iara Donadão Preto, Taisa Pavani Gomes, Camila Paiva Gomes e Mariane Possignolo;

Aos queridos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelo agradável convívio e companheirismo;

A todas as secretárias do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos serviços prestados, em especial à Andréa, que foi fundamental assistência no encaminhamento da documentação para realização do doutorado sanduíche;

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pela dedicação aos serviços prestados, em especial aos funcionários Dino, Wilian, Carlinhos, Chicão, Carlão e Gorá, obrigado pelo café de todas as manhãs e pelas boas risadas; Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly, da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelo auxílio na formatação deste trabalho;

À toda minha família, que sempre está ao meu lado me apoiando, ajudando e rezando para que eu sempre alcance meus sonhos e objetivos;

À Maura Ferraz Donatz, pessoa querida, companheira e amiga, que sempre esteve presente, me ajudando com os experimentos nos finais de semana e me incentivando pessoal e profissionalmente. Muito do que conquistei na vida foi por ter você ao meu lado;

Aos queridos amigos de longa data, com quem compartilho momentos de descontração com muitas risadas. Aninha, Marcola, Bruna, Felipão, Léo, Ariane, Murilo, Clá, Mau, Keila, Paulão, Carol, Doney, Ana, Drape, Jazz, Jordão, Aline, Tato, Jaque, Bob, Zé Maria, Karina, Rafa, Biguete, Vivian, Michel, Jaque, Tete, Maurinha, Paulinha, Binho, Adauto, Jura, Denise, Rob, Sandra, Flávio, Sabrina e Nunes. Que nossa turma tenha sempre bons motivos para estar juntos, com muitas risadas, churrasco e boa cerveja;

Aos amigos que estão sempre presente e nunca perdem a descontração das quintas-feiras e muitas vezes entenderam minha ausência. Kiu, Ruy, Vandão, Bru, Fabinho, Rob, Sapo, Joãozinho, Tata, Xandão, Magrão, Aninha, Marcela, Sophia e Claudinha. Que sempre tenhamos motivo para descontrair;

Aos queridos amigos, Ju, Gusta, Tati, Bob, Andrine, Xandão, Gu, Lu e Moro. Obrigado por nossa amizade e que sempre sejamos sempre bons biólogos.

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
Referências	
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Spodoptera frugiperda (J. E. Smith)	
2.2 Toxinas de <i>Bt</i>	
2.3 Modo de ação das proteínas Cry	
2.4 Mecanismos de resistência	
Referências	40
3 ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA DE LAGARTAS DE LI	NHAGENS
DE Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RES	ISTENTES
E SUSCETÍVEIS À TOXINA Cry1F	51
Resumo	51
Abstract	51
3.1 Introdução	
3.2 Material e Métodos	
3.2.1 Linhagens e manutenção de S. frugiperda	
3.2.2 Preparo e coleta de amostras biológicas	
3.2.3 Extração do RNA	
3.2.4 Construção do transcritoma de novo	56
3.2.5 Anotação funcional	56
3.2.6 Análise da expressão gênica diferencial (RNAseq)	56
3.2.7 Validação da expressão diferencial pela análise de genes candidatos por qPCF	R57
3.3 Resultados	
3.3.1 Montagem do transcritoma de novo	
3.3.2 Análise da expressão gênica diferencial	61
3.4 Discussão	72
3.5 Conclusão	77
Referências	77

SUMÁRIO

4 ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA DO INTESTINO DE LAGARTA	S DE
LINHAGENS DE Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUI	DAE)
SUSCETÍVEL E RESISTENTE ISOGÊNICA À TOXINA Cry1F	89
Resumo	89
Abstract	89
4.1 Introdução	90
4.2 Material e Métodos	92
4.2.1 Linhagens e manutenção de S. frugiperda	92
4.2.2 Preparo e coleta das amostras biológicas de S. frugiperda	93
4.2.3 Extração de RNA	93
4.2.4 Construção do transcritoma de novo	94
4.2.5 Anotação funcional	94
4.2.6 Análise da expressão gênica diferencial (RNAseq)	95
4.3 Resultados	95
4.3.1 Transcritoma <i>de novo</i> de referência	95
4.3.2 Anotação funcional	96
4.3.3 Expressão diferencial	98
4.4 Discussão	112
4.5 Conclusão	117
Referências	117
5 CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRITO DO GENE CADERINA EM LINHAGEN	S DE
Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SUSCETÍV	EL E
RESISTENTES À TOXINA Cry1F	127
Resumo	127
Abstract	127
5.1 Introdução	128
5.2 Material e Métodos	131
5.2.1 Linhagens de Spodoptera frugiperda	131
5.2.2 Caracterização do cDNA da caderina de linhagens SUS, RES e RESIso	132
5.2.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA	132
5.2.2.2 Amplificação e sequenciamento do cDNA da caderina	132
5.2.3 Análises da expressão gênica diferencial do transcrito de caderina de S. frugi	perda
suscetível, resistente e resistente isogênica à proteína Cry1F	135
5.3 Resultados	136

5.3.1 Caracterização do transcrito de caderina nas linhagens de S. frugi	perda suscetível e
resistentes a Cry1F	136
5.3.2 Análise da expressão gênica diferencial do transcrito da caderina	de S. frugiperda
suscetível, resistente e resistente isogênica	143
5.4 Discussão	144
5.5 Conclusões	147
Referências	148

RESUMO

Bases moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F

A utilização de toxinas Cry de Bacillus thuringiensis (Bt) no controle de lepidópterospraga, principalmente em áreas onde a estratégia de refúgio não é regulamentada, facilita a evolução da resistência em populações de pragas-alvo. Há três relatos de resistência à campo para Spodoptera frugiperda (J.E. Smith), dois para a toxina Cry1F e um para Cry1Ab. No Brasil, ocorrem populações resistentes à Cry1F e Cry1Ab. Esse trabalho foi voltado à identificação do mecanismo de resistência de uma população de S. frugiperda à toxina Cry1F, baseando-se nas hipóteses existentes para explicar o modo de ação de toxinas Cry. Uma dessas hipóteses é baseada na formação de poros na membrana do epitélio intestinal, enquanto a outra na transdução de sinal intracelular e ativação do processo de morte celular. Para a identificação do mecanismo de resistência de S. frugiperda à toxina Cry1F, o receptor caderina de linhagens suscetível (SUS) e resistente (RES) foi caracterizado, bem como realizado estudos de expressão gênica diferencial comparativa pela análise do transcritoma dessas linhagens. Estudos de expressão gênica diferencial comparativa também foram realizados pela análise do transcritoma do intestino de lagartas de linhagens SUS e resistente isogênica (RESiso), para a identificação do mecanismo molecular de resistência à toxina Cry1F. A caracterização do transcrito do gene caderina das linhagens suscetível, resistente e resistente isogênica revelou diferenças na composição de aminoácidos da proteína caderina predita entre as linhagens suscetível e resistente à toxina Cry1F nos domínios de repetição CR5, CR6 e CR10 e no domínio C-terminal. Também foi verificado que das mutações encontradas na linhagem RES, apenas as mutações da região C-terminal foram fixadas na linhagem RESiso. A análise comparativa do transcritoma de linhagens SUS e RES indicou a maior expressão de genes relacionados à metabolização de xenobióticos, como as monoxigenases do citocromo P450, glutationa-S-transferases e carboxilcolinesterases, em lagartas resistentes, mas não foram encontradas diferenças na expressão de receptores Cry, como aminopeptidase N e fosfatase alcalina. Porém, caderina foi superexpressa e o transportador ABCg5 teve expressão reduzida na linhagem RES. O ABCg5 foi indicado como o provável mecanismo de resistência dessa linhagem à toxina Cry1F, juntamente com o aumento da capacidade de detoxificação relatada. A análise comparativa do transcritoma de linhagens SUS e RESiso produziu resultados semelhantes à análise anterior quanto ao padrão de expressão de enzimas de detoxificação, mas nesse caso foi observada redução da transcrição de caderina na linhagem RESiso em relação à SUS. A análise da linhagem isogênica também indicou alteração na expressão de transportadores ABC na linhagem RESiso; porém, para o transportador ABCb1. A análise comparativa do transcritoma de linhagens SUS e RESiso corroborou a participação do sistema de detoxificação e acrescentou a redução na expressão do receptor caderina como mecanismo de resistência dessa população à toxina Cry1F, assim como a de transportadores ABC, apesar do transportador ABCg5 não ter sido identificado nessa análise comparativa.

Palavras-chave: Expressão diferencial; Manejo de resistência; Modo de ação; RNASeq; Sequenciamento de nova geração

ABSTRACT

Molecular bases of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1F toxin

The broad use of Cry toxins from Bacillus thuringiensis (Bt) to control lepidopteran pests, particularly where refuge strategies are not legalized or implemented, has facilitated the evolution of resistance of pest populations. There are three records of resistance of Spodoptera frugiperda (J.E Smith) in field condition to Bt toxins so far, two of them to Cry1F and one to Cry1Ab toxins. In Brazil, field-evolved resistance of S. frugiperda has been recorded for both toxins. Thus, we aimed to identify the mechanisms associated to the resistance of S. frugiperda to Cry1F toxin based on the two concurrent hypotheses on the mode of action of Cry toxins. One of such hypotheses is based on the potential of Cry toxins to form pores in the membrane of the gut epithelium, while the other is based on the production of an intracellular transduction signal and the activation of the process of cell death. To identify the resistance mechanisms of S. frugiperda to Cry1F toxin, we characterized the transcript of the cadherin receptor of susceptible (SUS) and resistant (RES) strains of S. frugiperda to search for mutations and performed a comparative analysis of the transcriptome from SUS and RES strains. We also analyzed the transcriptome from the gut of SUS and isogenic resistant strains (RESiso) in order to identify the molecular mechanisms associated to the resistance of S. frugiperda to Cry1F. The characterization of cadherin receptor in SUS, Res and REsiso strains showed differences in the amino acid composition of the repeated domains CR5, CR6 and CR10 and in the C-terminal domain. Only mutations occurring on C-terminal of the RES strain were maintained in the RESiso strain. The comparative transcriptome between SUS and RES strains indicated a higher expression of genes related to the detoxification process, such as cytochrome P450s, glutathione-Stransferases and carboxylcholinesterases in the RES strain, while no differences in the expression of Cry receptors, such aminopeptidade N and alkaline phosphatase, were observed. However, transcriptomic analysis indicated up-regulation of cadherin and down-regulation of the ABCg5 transporter was down-regulated in the RES strain. We propose that ABCg5 is one of the mechanisms involved in S. frugiperda resistance to Cry1F, together with the increased detoxification activity observed. Analysis of the gut transcriptome from SUS and RESiso yielded similar results regarding the differential expression of detoxifying enzymes, but on this case cadherin was down-regulated in RESiso as compared to the SUS strain. Downregulation of ABC transporters in the RESiso strain was also observed, but for the ABCb1 transporter. Analyses of the transcriptome of SUS and RESiso strains also indicated the resistance of S. frugiperda to Cry1F is related to an increased transcription of detoxifying enzymes and a reduced transcription of the cadherin receptor. Our data also demonstrates the resistance is due to the existence of adequate constitutive levels of transcription of genes that respond to the intoxication with Cry1F.

Keywords: Differential expression; Resistance management; Mode of action; RNA-Seq; Next-gemeration sequecing

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Distribuição dos alinhamentos dos transcritos do transcritoma de novo de lagartas

de S. frugiperda obtidos via BLASTx60
Figura 3.2 - Distribuição dos valores de homologia dos transcritos do transcritoma de novo de
S. frugiperda obtidos após busca no banco de dados (nr) (NCBI)60
Figura 3.3 - Distribuição das ontologias (GO) atribuídas ao transcritoma de novo de largartas
de S. frugiperda suscetível e resistente, induzidas ou não com Cry1F61
Figura 3.4 - Distribuição dos transcritos de lagartas de S. frugiperda suscetível e resistente,
induzida ou não com a toxina Cry1F, detectados pela análise do transcritoma
<i>de novo</i> de referência62
Figura 3.5 - Distribuição da expressão diferencial dos transcritos do transcritoma de novo de
lagartas de S. frugiperda de linhagens suscetível e resistente a Cry1F. Pontos
azuis representam transcritos com expressão gênica diferencial significativa
(teste t, $p < 0.05$; expressão relativa >2 e -2<)
Figura 3.6 - Distribuição das ontologias (GO) atribuídas aos transcritos diferencialmente
expressos (test t, p <0,05; expressão relativa >2) das linhagens de S. frugiperda
suscetível e resistente, induzidas ou não com Cry1F64
Figura 3.7 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados a
receptores de toxinas Cry de lagartas de S. frugiperda resistente e suscetível
induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa
do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão
elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais escuro, significa
diminuição no nível de expressão65
Figura 3.8 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados à
membrana peritrófica de lagartas de S. frugiperda resistente e suscetível
induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa
do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão
elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais escuro, significa
diminuição no nível de expressão66
Figura 3.9 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados a
atividade enzimática (proteólise e detoxificação) de lagartas de S. frugiperda
resistente e suscetível induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete

a expressão relativa do tratamento. Cores mais próximas do vermelho

- Figura 3.10 Análise de qPCR demosntrando a expressão diferencial relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente induzidas ou não com toxina Cry1F. ABCg5 (contig_10446); Cyp321a (contig_23831); Tripsina (contig_23206); Serinoprotease (contig_25374); CCE (contig_20326); Peritrofina (contig_16395)......72

- Figura 5.4 Esquema representativo da estrutura da caderina de Spodoptera frugiperda e indicação de mutações não-sinônimas (E = ácido glutâmico, D = ácido aspártico, G = glicina, N = asparagina, P = prolina, S = serina, T = treonina) da caderina das linhagens suscetível (SUS_ e resistentes (RES = resistente; RESiso = resistente isogênica) encontradas. PS = Peptídeo sinal; 1 a 11 indica

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 Conjunto de iniciadores utilizados para a validação da expressão diferencial porPCR quantitativo em tempo real de genes candidatos da análise de RNAseq ...58

- Tabela 4.1 Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de S. frugiperda suscetível e resistente à toxina Cry1F, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry......103

1 INTRODUÇÃO

O controle de pragas por meio de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos vem sendo adotado em extensas áreas agrícolas (TABASHNIK et al., 2013). Existe grande interesse agronômico e científico em Bacillus thuringiensis (Bt) devido à sua capacidade de colonizar e matar, com alta especificidade, uma grande variedade de insetos de interesse econômico (DE MAAGD et al., 2001). B. thuringiensis é uma bactéria Grampositiva, anaeróbica facultativa e patogênica aos insetos, que tem sido isolada em todo o mundo a partir de uma grande diversidade de ecossistemas, incluindo solo, água, cadáveres de insetos, folhas de plantas e mamíferos insetívoros (HÖFTE; WHITELEY, 1989; ROH et al., 2007). Bt sintetiza cristais proteicos tóxicos contendo δ -endotoxinas. As principais δ endotoxinas dos cristais proteicos são as proteínas Cry, representadas por inclusões proteicas parasporais que apresentam efeito tóxico confirmado no organismo alvo, e as proteínas Cyt, representadas por proteínas de cristais que apresentam atividade citolítica (CRICKMORE et al., 1998; BRAVO et al., 2007; SOBRERÓN et al., 2009). Adicionalmente, isolados de Bt também podem sintetizar outras proteínas inseticidas durante a fase de crescimento vegetativo, as quais foram designadas como proteínas inseticidas vegetativas (VIP) (ESTRUCH et al., 1996; DE MAAGD et al., 2003) e proteínas inseticidas secretadas (SIP) (DONAVAN et al., 2006).

Plantas *Bt* desenvolvidas para o controle de insetos-praga são caracterizadas pela incorporação de genes codantes de proteínas entomotóxicas, principalmente a toxina Cry da bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*), fazendo com que as plantas passem a expressar esses genes e a produzir essas proteínas de forma constitutiva e em grande quantidade (JAMES, 2010; HOFMAN et al., 2014). Desde 1996, a área cultivada com plantas geneticamente modificadas que produzem proteínas inseticidas da bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*) para o controle de insetos-pragas aumentou, no mundo, mais de 150 vezes (JAMES, 2010; TABASHNIK et al., 2013, JAMES, 2014). No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a liberação comercial da primeira planta *Bt* em 2005 e, após 11 anos de comercialização, a área cultivada com essa tecnologia já alcançou aproximadamente 45 milhões de hectares (CÉLERES, 2016). Atualmente, diversos eventos *Bt* de transformação, sendo um na soja, sete no algodão e 24 no milho, estão liberados no Brasil (CTNBIO, 2015). Os benefícios de plantas GM que expressam proteínas inseticidas de *Bt* incluem, além da supressão de pragas-alvo, a redução no uso de inseticidas, a conservação de inimigos naturais,

a integração dessa tática ao controle biológico e o maior rendimento e lucro ao produtor (ROUSH; MCKENZIE, 1987; SHELTON et al., 2002).

Há duas hipóteses concorrentes para explicar o modo de ação das toxinas Cry nos organismos-alvo (ZHANG et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015). Uma diz respeito à formação de poros na membrana do epitélio intestinal (BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015), enquanto a outra baseia-se na transdução de sinal intracelular e na ativação da morte celular (ZHANG et al., 2006).

O modelo de formação de poros propõe que lagartas suscetíveis ingerem a toxina Cry, a qual é disponibilizada na planta já em sua forma ativa, que passa por eventos sequenciais de ligações com diferentes receptores de membrana das células do intestino médio das lagartas. A ligação a esses receptores leva ao processo de oligomerização da toxina e subsequente indução para a formação dos poros no epitélio intestinal (BRAVO et al., 2004; PIGOT; ELLAR, 2007; PACHECO et al., 2009; SOBERÓN et al., 2009). A interação das toxinas Cry com receptores de membrana envolve múltiplas proteínas inseridas/ligadas à membrana, tais como aminopeptidase N (APN), fosfatase alcalina (ALP) e caderina (CAD) (PIGOT; ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009). Em lepidópteros, a primeira ligação das toxinas Cry ocorre com proteínas ALP e APN ligadas à membrana (UPADHYAY; SINGH, 2011), estabelecendo interações de baixa afinidade. A interação com APN ocorre no domínio II da toxina, enquanto que com ALP, a interação ocorre no domínio III da toxina (MASSON et al., 1995; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). A interação com ALP e APN concentra a toxina ativa nas microvilosidades das células do intestino médio, onde a toxina é capaz de estabelecer interações de alta afinidade com receptores CAD (GÓMEZ et al., 2007; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). A interação Cry-CAD envolve domínios extracelulares da CAD que interagem com as toxinas Cry, promovendo a clivagem proteolítica da região amino-terminal da toxina, incluindo a α-1 hélice do domínio I, resultando na produção de oligômeros da toxina. Em seguida, o oligômero se liga novamente aos receptores secundários ALP ou APN, que facilitam sua inserção na membrana, causando a formação de poros e a decorrente lise da célula (PARDO-LÓPEZ et al., 2006; ARENAS et al., 2010).

De acordo com o modelo de transdução de sinal, proteínas Cry induzem uma cascata de sinais dependente de Mg²⁺. Esse modelo também depende da ligação da toxina Cry com o receptor CAD, que ativa uma proteína G acoplada ao receptor, resultando na produção de adenil-ciclase. A síntese de adenil-ciclase resulta na maior produção do mensageiro secundário monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Os altos níveis de cAMP ativam a

proteína quinase A (PKA), levando à desestabilização do citoesqueleto celular e dos canais iônicos da membrana da célula e, consequentemente, à indução do processo de morte celular, manifestada pela formação de bolhas na membrana e pelo inchaço celular, seguidos da lise celular (ZHANG et al., 2006).

A notável capacidade dos insetos de se adaptarem aos inseticidas e outras táticas de controle, bem como o uso crescente de culturas *Bt*, particularmente em áreas onde a estratégia de refúgio não é regulamentada, facilita a evolução da resistência em populações de pragasalvo, tornando-se a principal ameaça para a sobrevivência da tecnologia de controle (BRAVO; SOBERÓN, 2008). Após vários anos de comercialização de plantas *Bt* no mundo, vários casos de seleção direcionada para resistência em laboratório (MCGAUGHEY, 1985; FORCADA et al., 1999; LIU et al., 2001; AKHURST et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012) e de evolução de resistência a campo foram relatados para lepidópteros-pragas (VAN RENSBURG, 2007; TABASHNIK et al., 2009; STORER et al., 2010; DHURUA et al., 2011; FARIAS et al., 2014; GASSMANN et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

Dos casos de evolução de resistência às toxinas Bt em condições de campo, três referem-se à resistência de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae); um em Porto Rico (STORER et al., 2010) e dois no Brasil (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), sendo dois deles à toxina Cry1F (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014). Esse inseto é umas das principais pragas agrícolas na região Neotropical devido ao seu poder destrutivo, polifagia e resistência a diversos inseticidas (CAPINERA, 2008; CARVALHO et al., 2013; JAKKA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015). O cultivo conjunto e continuado de outras plantas de importância agrícola que também expressam toxinas Bt, como soja e algodão, pode oferecer hospedeiros alternativos para esse inseto, colocando em risco as tecnologias disponíveis atualmente, dada à pressão de seleção que o inseto está sujeito, bem como ao fato de que muitas das variedades comerciais apresentam eventos piramidados, que podem apresentar o mesmo sítio-alvo de ação (HERNÁNDEZ; FERRÉ, 2005; HERNÁNDEZ-RODRIGUES et al., 2013; MONNERAT et al., 2015; WELCH et al. 2015). No Brasil, dos sete eventos liberados para o algodão, cinco são eventos piramidados (Cry+Cry); para o milho, dos 24 eventos de Cry liberados, 16 são eventos piramidados (7 Cry+Cry; 7 Cry+Vip e 2 Cry+Cry+Vip) (CTNBIO, 2015).

A gestão eficaz de plantas *Bt* como estratégia de manejo para *S. frugiperda* depende do conhecimento detalhado do processo de intoxicação de insetos por proteínas Cry, sendo que alterações nesses processos podem resultar na resistência do inseto à toxina. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos de resistência de insetos às proteínas Cry é a chave para a implementação de estratégias de manejo para retardar e monitorar a evolução da resistência em campo, mantendo assim a eficácia da tecnologia *Bt* para o controle de *S. frugiperda*. Assim, esta tese apresenta estudos moleculares voltados à identificação do mecanismo de resistência de uma linhagem de *S. frugiperda* selecionada em laboratório à toxina Cry1F. Os estudos conduzidos foram dedicados à caracterização molecular do receptor CAD de *S. frugiperda* para a verificação da existência de mutações da CAD em insetos suscetíveis e resistentes e que pudessem explicar a resistência observada, bem como à caracterização da resposta transcricional diferencial entre indivíduos resistentes e suscetíveis, induzidos ou não com a toxina Cry1F. Os resultados obtidos levaram à melhor caracterização da resposta de *S. frugiperda* ao processo de intoxicação com a toxina Cry1F, bem como ao melhor entedimento do mecanismo de resistência a essa toxina na linhagem estudada.

Referências

AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 285, n. 23, p. 12497–12503, 2010.

BRAVO, A.; SOBERON, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. **Different models of the mode of action of** *Bt* **3d-Cry toxins**. Disponivel em: http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2015/20153137249.pdf>. Acesso em: abril 2015.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane icrodomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, Oxford, v. 1667, n. 1, p. 38–46, 2004.

CAPINERA, J.L. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Gainesville: Univers, 2008. 6 p. (EENY098). Disponível em: http://www.edis.ifas.ufl.edu.. Acesso em: 02 fev. 2011.

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.

CÉLERES, 1° levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra **2015/2016**. Disponível em: http://www.celeres.com.br/10-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201516/. Acesso em: março2016.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CTNBIO, **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. Disponível em:<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15558.html>. Acesso em: dez.2015.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E.; Structure, diversity, and evolution of protein toxin from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 409-433, 2003.

DHURUA, S.; GUJAR, G.T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science**, Malden, v.67, n. 8, p. 898-903, 2011.

DONOVAN, W.P.; ENGLEMAN, J.T.; DONOVAN, J.C.; BAUM, J.A.; BUNKERS, G.J.; CHI, D.J.; CLINTON, W.P.; ENGLISH, L.; HECK, G.R.; ILAGAN, O.M.; KRASOMIL-OSTERFELD, J.W.; PITKIN, J.K.; ROBERTS, M.R.; SHOW LESS, W. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 72, n. 4, p. 713-719, 2006.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 150-158, 2014.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M.D.; TATO, A.; MARTÍNEZ, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology,** New York, v. 42, n. 1, p. 51-63, 1999.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, A.M.; INGBER, D.A.; KEWESHAN, R.S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 111, n. 14, p. 5141-5146, 2014.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *bacillus thuringiensis*. **Peptides**, Philadelphia, v. 28, n, 1, 2007, Disponivel em: <doi:10.1016/j.peptides.2006.06.13>

HERNÁNDEZ, C.S.; FERRÉ, J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5627-5629, 2005.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2013, Disponivel em: <doi.org/10.137/journal.pone.0068164>.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HOFMANN, F.; OTTO, M.; WOSNIOK, W. Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation - results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). **Environmental Sciences of Europe**, Heidelberg, v. 26, n. 24, 2014. doi: 10.1186/s12302-014-0024-3.

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with fiel-evolved resistence to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**. San Diego, v. 122, p. 52-54, 2014.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA Briefs, 2010. 275 p. Disponivel em: < www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/download/isaaa-brief-46-2013.pdf> Acesso em: abril2015.

JAMES, C. 2014. **Global Status of commercialized biotech/GM crops**: 2014. ISAAA Brief, n. 49. ISAAA: Ithaca, NY. Disponivel em: www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/pdf/b49-execsum-english.pdf Acesso em: fev.2016.

LIU, Y.B.; TABASHNIK, B.E.; MAYER, S.K.; CARRIÉRE, Y.; BARTLETT, A.C. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 248-252, 2001.

MASSON, L.; LU, Y.J.; MAZZA, A.; BROSSEAU, R.; ADANG, M.J. The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Rockville, v. 270, n. 35, p. 20309-203015, 1995.

MCGAUGHEY, W.H. Insect resistence to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, n. 4709, p. 193-195, 1985.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; SOARES, M.S.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Evidence of fieldevolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLOS ONE**, San Francisco, v 10, n 4, 2015. Disponível em: < doi: 10.1371/journal.pone.0119544>.

NASCIMENTO, A.R.B.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Gnenomics**, London, v. 16, n. 1, p.985-996, 2015.

OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Fieldevolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Chichester, 2016, Disponivel em: < doi: 10.1002/ps.4201>.

PACHECO, S.; GOMEZ, I.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 284, n. 47, p. 32750-32757, 2009.

PARDO-LOPEZ, L.; GOMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBEÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, Washington, v. 45, n. 34, p. 10329–10336, 2006.

PEREIRA, E.J.G.; LANG, B.A.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 115-121, 2008.

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxinactivity. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.71, n. 2, p. 255–281. 2007.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 547-559, 2007.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.32, p. 361-380, 1987. SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Standford, v.47, p. 845-881, 2002.

SOBERÓN, M.; GILL, S.S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D.; MIRANDA, J.E. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 359-362, 2012.

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

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

TABASHINIK, B.E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÉRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, London, v. 31, p. 510-521, 2013.

UPADHYAY, S.K.; SINGH, P.K. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 33, n. 10, p. 2027-2036, 2011.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil,** Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

WELCH, K.L.; UNNITHAN, G.C.; DEGAIN, B.A.; WEI, J.; ZHANG, J.; LI, X.; TABASHNIK, B.E.; CARREIÈRE, Y. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, v. 132, p. 149-156, 2015.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR., L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2.1 Spodoptera frugiperda (J. E. Smith)

O gênero *Spodoptera* apresenta mais de 30 espécies, sendo amplamente distribuído no mundo, com cerca de metade das espécies reconhecidas como pragas de culturas de importância econômica (POGUE, 2002). Dentre as espécies-pragas, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida vulgarmente por lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, é restrita ao Novo Mundo, ocorrendo desde os Estados Unidos até o extremo sul da América Latina, destacando-se como praga na região Neotropical (CAPINERA, 2008; MACHADO et al., 2008), pois sua distribuição é limitada a regiões de clima quente devido à sua incapacidade de sobreviver em condições de inverno rigoroso (CAPINERA, 2008).

O principal hospedeiro dessa praga é o milho (*Zea mays*). No entanto, *S. frugiperda* apresenta hábito polífago, podendo se alimentar de mais de 80 espécies vegetais (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008), com destaque para o algodão (*Gossypium hirsutum*), arroz (*Oryza sativa*), cana de açúcar (*Saccharum* spp), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e trigo (*Triticum* spp.) (GIOLO et al., 2002; POGUE, 2002; SILOTO, 2002; CAPINERA, 2008; BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

Além da polifagia, outra característica que contribui para o sucesso de *S. frugiperda* é sua alta fecundidade, pois fêmeas produzem de cinco a seis posturas, cada qual contendo, em média, 200 ovos (SANTOS et al., 2004; CAPINERA, 2008). Na cultura do milho, lagartas neonatas iniciam a alimentação raspando as folhas, danificando as folhas à medida que se desenvolvem e, assim, progressivamente, chegam a causar a destruição total do cartucho da planta (SILVA, 2000). Com a destruição do cartucho, as plantas acabam sofrendo redução de sua área fotossintética, levando ao comprometimento da produção da cultura. A lagarta-do-cartucho também pode atacar a base da espiga, destruindo grãos e abrindo caminho para microrganismos fitopatogênicos, podendo resultar, ainda, na queda da espiga (SILOTO, 2002). No algodoeiro, as lagartas se alimentam de folhas, botões florais e maçãs (LUTTRELL; MINK, 1999), enquanto que na soja se alimentam de folhas e vagens em formação (BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

O adulto apresenta comportamento migratório com alta capacidade de dispersão, fato que permite a rápida infestação de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979; MARTINELLI et al., 2006; NAGOSHI, 2009). O plantio de diferentes culturas com fenologia distinta em áreas próximas, como é o caso da soja, do milho e do algodão, além de plantas de cobertura,

como o milheto, na entressafra, pode favorecer o movimento de *S. frugiperda* entre os cultivos (NAGOSHI, 2009).

O controle de *S. frugiperda* não tem se mostrado uma tarefa fácil, pois esse inseto possui resistência à maioria dos grupos químicos de inseticidas. A liberação comercial de plantas *Bt* tem fornecido tem sido uma alternativa para o controle de *S. frugiperda* No entanto, a grande capacidade reprodutiva, o intervalo relativamente curto entre gerações, a polifagia e o sistema de cultivo de milho, algodão e soja *Bt* expõe as populações de *S. frugiperda* à pressão de seleção às proteínas de *Bt*, com mesmo sítio de ação e conformação estrutural, de forma repetitiva e intensa, propiciando um cenário favorável a evolução da resistência, principalmente quando as estratégias de Manejo da Resistência (MRI) não são efetivamente implementadas (OMOTO et al., 2016).

2.2 Toxinas de Bt

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e patogênica aos insetos, isolada de uma grande diversidade de ecossistemas, incluindo solo, água, cadáveres de insetos, folhas de plantas e mamíferos insetívoros (HÖFTE; WHITELEY, 1989; ROH et al., 2007). A primeira descrição de *B. thuringiensis* foi em 1901, no Japão, por Shigetani Ishiwatari, que isolou o agente causador da podridão bacteriana em *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae). Essa bactéria foi posteriormente descrita por Berliner (1911) a partir de isolados obtidos de lagartas da traça-da-farinha, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) (SANAHUJA et al., 2011). *B. thuringiensis* pertence ao grupo de *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Bacillus weihenstephanensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus citotoxico* (RASKO et al., 2005; GUIMBRETIERE et al., 2013), mas ao contrário de algumas dessas espécies, como *B. anthracis, B. thuringiensis* não é patogênica a mamíferos, apresentando patogenicidade exclusivamente aos insetos (THORSEN, et al., 2015).

A maioria das cepas de *Bt* produz três importantes classes de proteínas inseticidas durante seu ciclo de vida. As proteínas Vip (proteína inseticida vegetativa) são produzidas durante a fase vegetativa, enquanto as proteínas de inclusão dos corpos parasporais (δ -endotoxinas), as proteínas Cyt (toxina citotóxica) e Cry (proteínas cristal), são produzidas durante a fase de esporulação (DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2011).

A nomenclatura das proteínas Cry foi baseada em ampla seleção de estirpes de *Bt*, que identificou mais de 700 sequências de genes *cry*. Essas sequências foram classificadas de

acordo com as sequências de aminoácidos, e pelo menos 70 grupos gênicos foram identificados. Dentre estes, sequências de aminoácidos com menos de 40% de identidade são separadas em grupos, os quais são indicados por numeração distinta (ex., Cry1, Cry2, Cry3.....Cry70). Dentro de cada grupo, toxinas que compartilham até 70% de identidade em sua sequência proteica são identificadas por uma letra maiúscula (Cry1A, Cry1B), adicionando-se uma letra minúscula àquelas que compartilham similaridade entre 70% e 95% (ex., Cry1Aa, Cry1Ab) (CRICKMORE et al., 1998; CRICKMORE et al., 2010; BRAVO et al., 2013). Essa mesma classificação é utilizada pra classificar as proteínas Cyt e Vip (CRICKMORE et al., 2010).

A estrutura terciária das toxinas Cry produzidas por *Bt* são formadas por três domínios conservados e apresentam elevado grau de semelhança na sua organização, indicando modo de ação similar (BRAVO et al., 2007; PALMA et al., 2014). O domínio I é um grupo de sete α -hélices responsável pela formação de poros na membrana das células epiteliais do intestino, que são alvo das toxinas Cry, enquanto o domínio II consiste de um β -prisma de três β -folhas antiparalelas envolvido por um núcleo hidrofóbico e, por último, o domínio III, que é β -sanduíche de duas β -folhas antiparalelas (SCHNEPF et al., 1998; PIGOTT; ELLAR, 2007; BRAVO et al., 2011). Os domínios II e III estão relacionados com a interação da toxina com receptores das células do epitélio intestinal dos insetos (BRAVO; SOBERÓN, 2008, BRAVO et al., 2011).

Apesar do grande número de proteínas Cry (775 proteínas Cry descritas; http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), apenas uma pequena fração é utilizada em formulações comerciais ou expressas em plantas geneticamente modificadas (BRAVO; SOBERÓN, 2008). No entanto, existe um grande interesse agronômico e científico em *B. thuringiensis* devido à sua capacidade de colonizar e matar um grande número de insetos de interesse econômico, como lepidópteros, coleópteros, dípteros e nematoides.

2.3 Modo de ação das proteínas Cry

Há duas hipóteses concorrentes para explicar o modo de ação das proteínas Cry (ZHANG et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015). Uma diz respeito à formação de poros na membrana do epitélio intestinal (BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015), enquanto a outra se baseia na ativação da transdução de sinal intracelular e de morte celular do epitélio intestinal do inseto (ZHANG et al., 2006).

O modelo de formação de poros propõe que lagartas suscetíveis ingerem a proteína Cry, a qual é disponibilizada na planta já em sua forma ativa, e que passa por eventos sequenciais de ligação com diferentes receptores de membrana do intestino médio de lagartas. A ligação a esses receptores leva ao processo de oligomerização da proteína Cry e a subsequente indução da formação de poros no epitélio intestinal (BRAVO et al., 2004; PIGOT; ELLAR, 2007; PACHECO et al., 2009; SOBERÓN et al., 2009). A interação das proteínas Cry com receptores envolve múltiplas proteínas inseridas/ligadas à membrana, tais como aminopeptidase N (APN), fosfatase alcalina (ALP) e caderina (CAD) (PIGOT; ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009). Em lepidópteros, as proteínas Cry se ligam inicialmente às proteínas ALP e APN aderidas à membrana (UPADHYAY; SINGH, 2011), estabelecendo interações de baixa afinidade. A interação com APN ocorre no domínio II da toxina Cry, enquanto que com ALP, a interação ocorre no domínio III (PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). A interação com ALP e APN mantém a proteína Cry ativada nas microvilosidades das células do intestino médio, onde a toxina é capaz de estabelecer interação de alta afinidade com receptores CAD (GÓMEZ et al., 2006; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). A interação Cry-CAD envolve domínios extracelulares que interagem com as proteínas Cry, promovendo a clivagem proteolítica de sua região aminoterminal, incluindo a α-hélice 1 do domínio I, resultando na oligomerização da proteína Cry. Em seguida, o oligômero se liga novamente aos receptores secundários ALP ou APN, que induzem sua inserção na membrana, causando a formação de poros e a decorrente lise da célula (PARDO-LÓPEZ et al., 2006; ARENAS et al., 2010).

De acordo com o modelo de transdução de sinal, proteínas Cry induzem uma cascata de sinais dependente de Mg⁺². Esse modelo também depende da ligação da proteína Cry com o receptor caderina, que ativa uma proteína G acoplada a receptor, resultando na produção de adenil-ciclase. A ativação de adenil-ciclase resulta na maior produção do mensageiro secundário monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Os altos níveis de cAMP ativa a proteína quinase A (PKA), resultando na desestabilização do citoesqueleto celular e dos canais da membrana das células, levando à indução do processo de morte celular, manifestada pela formação de bolhas na membrana e pelo inchaço celular seguido de lise celular (ZHANG et al., 2006).

2.4 Mecanismos de resistência

A notável capacidade de insetos de se adaptar a insecticidas e outras táticas de controle, bem como o uso crescente de culturas *Bt*, particularmente em áreas onde refúgios não são regulamentados, facilitam a evolução da resistência por pragas-alvo dessa tecnologia, tornando-se a principal ameaça para a sobrevivência dessa tecnologia de controle (BRAVO; SOBERÓN, 2008). Após vários anos de comercialização de plantas *Bt* no mundo, vários casos de seleção direcionada para resistência em laboratório (FORCADA et al., 1999; LIU et al., 2001; AKHURST et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012) e de evolução de resistência a campo foram relatados para lepidópteros-pragas (VAN RENSBURG, 2007; TABASHNIK et al., 2009; STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014; GASSMANN et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

Estudos transcritômicos, genômicos e proteômicos têm contribuído com informações relevantes e adicionais aos dados biológicos que possibilitam desvendar como pragas-alvo respondem e se defendem de processos de intoxicação por toxinas *Bt* ao nivel bioquímico e celular (JURAT-FUENTES et al., 2011; LEI et al., 2014; GONG et al., 2015). Em geral, a exposição às toxinas de *Bt* resulta na alteração de diferentes mecanismos fisiológicos do inseto, como alterações na expressão gênica de receptores (TIEWSIRI; WANG, 2011; ZHANG et al., 2013; GONG et al., 2015; GUO et al., 2015), proteólise, detoxificação e sequestro por esterases (VELLICHIRAMMAL et al., 2015; ZHU et al., 2015), e elevação da resposta imunológica (HERNÁNDEZ-MARTINEZ et al., 2010).

Altos níveis de resistência de insetos a toxinas Cry são comumente associados a alterações dos receptores da superfície do epitélio celular do mesêntero, como as aminopeptidases (APN), as fosfatase alcalinas (ALP), as caderinas (CAD) e os transportadores ABC, reconhecidos como os principais receptores de proteínas Cry (HECKEL, 2012; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; BRAVO et al., 2015). Diversos estudos têm demonstrado que alterações nos níveis de expressão e/ou mutações desses receptores estão relacionados aos mecanismos de resistência às proteínas Cry em diferentes insetos-pragas (TIEWSIRI; WANG, 2011; JURAT-FUENTES et al., 2011; GONG et al., 2015).

Análises proteômicas e moleculares mostraram que a resistência de *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) à Cry1Ac foi relacionada com a regulação negativa de APN1 e como forma compensatória, ocorreu aumento da regulação de APN6 (TIEWSIRI; WANG, 2011). Segundo Herrero et al., (2005), *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente à proteína Cry1Ca não apresenta uma das quatro APNs (APN1, APN2,

APN3 e APN4) identificadas nesse inseto, sendo a APN1 presente apenas na linhagem suscetível. Recentemente, a redução da expressão de genes codantes de uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK4) regulou negativamente a expressão de ALP em diversas linhagens de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) resistentes à Cry1Ac (GUO et al., 2015b).

Inúmeros trabalhos com o gênero *Spodoptera* têm demonstrado a relação dos níveis reduzidos de APN e ALP com a resistência a diversas toxinas Cry. Níveis reduzidos de APN1 em *S. exigua* estão ligados à sua resistência a Cry1Ca (HERRERO et al., 2005). Segundo Gong et al., (2015), a análise do transcritoma de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) permitiu a identificação de níveis reduzidos de ALP na linhagem de campo resistente à proteína Cry1Ca, enquanto a validação desses dados por meio da análise comparativa por PCR quantitativo em tempo real revelou redução acima de 98% nos níveis de transcrição de ALP na linhagem resistente quando comparada à suscetível.

Jurat-Fuentes et al., (2011) analisou a atividade enzimática de ALP e APN de *S. frugiperda* em linhagens resistente e suscetível à proteína Cry1F em Porto Rico, verificando que a atividade enzimática de ALP da linhagem resistente foi de 3 a 4 vezes inferior àquela apresentada pela linhagem suscetível. O mesmo foi relatado recentemente por Jakka et al., (2015) para linhagens resistentes às proteínas Cry1Fa e Cry1Ac coletadas na região de Santa Isabel, Porto Rico. Essas linhagens resistentes apresentaram redução de 90% na expressão de ALP quando comparadas com a linhagem suscetível de referência. A redução observada na transcrição levou à redução em 75% da atividade de ALP nas linhagens resistentes, sustentando a argumentação de que a resistência a Cry seja relacionada à redução dos níveis de ALP.

Existem numerosos relatos que demonstram o papel da caderina como receptor de proteínas Cry em espécies suscetíveis de lepidópteros (PIGOT; ELLAR, 2007; FABRICK et al., 2011; GAO et al., 2011). Além disso, há a relação entre mutações em genes da caderina e resistência a toxinas Cry em diferentes lepidópteros (GAHAN et al., 2001; MORIN, et al., 2003; XU, et al., 2005; FABRICK et al., 2011).

A ocorrência de mutação na caderina foi relacionada à resistência a Cry1Ac em *Chloridea virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). A mutação ocorreu no domínio de repetição 12 e resultou em resistência superior a 6.000 vezes à toxina Cry1Ac (GAHAN et al., 2001). Nesse estudo, um fragmento de 19 aminoácidos na região a partir do aminoácido 1422-1440 foi identificado como sendo o local de ligação da toxina Cry1Ac com o receptor caderina. A presença dos aminoácidos leucina (L), na posição 1425, e felilalanina (F), na

posição 1429, resultaram na perda da capacidade de ligação da Cry1Ac à caderina, explicando a resistência de *C. virescens* a essa toxina (XIE et al., 2005). A deleção de um aminoácido no domínio intracelular de caderina é relacionado à resistência não-recessiva de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac, sugerindo que este domínio intracelular está envolvido em eventos de sinalização após a ligação da Cry (ZHANG, et al., 2012). Esta evidência é consistente com o papel vital da região intracelular da caderina proposto pelo modelo de transdução de sinal (ZHANG, et al., 2012).

O sequenciamento do transcrito de caderina em *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) revelou alteração no resíduo 543, com a mudança de um aminoácido polar (Val) por um apolar (Arg), na linhagem resistente a Cry1Ab (MORIN et al., 2003). Além disso, ensaios de ligação utilizando toxinas marcadas com ¹²⁵I demonstraram que as toxinas Cry1A105, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F competem com elevada afinidade pelos mesmos sítios de ligação em *O. nubilalis* e *S. frugiperda* (HERNANDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de resistência cruzada entre essas proteínas é possível se ocorrerem alterações nos locais de ligação.

A redução na expressão do gene caderina em ensaios com RNA de interferência foi associada à tolerância à proteína Cry1Ab em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Manduca sexta* (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae) (SOBERÓN et al., 2007; YANG et al., 2011). Em *H. armigera*, uma deleção encontrada no gene caderina demonstrou ser a responsável pela produção de uma proteína truncada na linhagem resistente à Cry1Ac (XU et al., 2005). Em se tratando de um receptor da proteína Cry, a menor eficiência da toxina é observada com a menor disponibilidade desse receptor, assim como demonstrado pela disponibilização de competidores por sítios de ligação (RAHMAN et al., 2012) ou pela ocorrência de alterações em sua sequência (ZHANG et al., 2013).

Os transportadores ABC constituem uma grande família de proteínas integradas à membrana que utilizam a energia da hidrólise de moléculas de ATP para transportar substratos através da membrana (DEAN et al., 2001; LABBÉ et al., 2011; BROEHAN et al., 2013). Oito subfamílias (A-H) foram descritas em mamíferos e insetos (DEAN et al., 2001; LABBÉ et al., 2011). Esses transportadores participam na terceira fase do processo de detoxificação de xenobióticos (fase I = funcionalização, fase II = conjugação e fase III = excreção) (HECKEL, 2012). Além disso, foi relatada a interação do ABCC2 com proteínas Cry, sendo proposto que este transportador se liga às proteínas Cry oligomerizadas auxiliando a inserção desse oligômero na membrana (HECKEL, 2012). Porém, ainda não está claro o papel exato do ABCC2 no modo de ação de toxinas Cry.
A subexpressão de transportadores ABC das subfamílias B, C e G podem contribuir para a resistência de insetos a vários inseticidas (LABBÉ et al., 2011, DERMAUW; VAN LEEUWEN, 2014; MERZENDORFE, 2014), podendo ser essa resistência a proteínas Cry relacionada a mutações/alteração nos níveis de expressão nos transportadores das subfamílias C e G (GAHAN et al., 2010; BAXTER et al., 2011; ATSUMI et al., 2012; HECKEL, 2012; GUO et al., 2015a). Segundo Gahan et al., (2010), foi verificada mutação que inativa o transportador ABCC2 de *C. virescens* e que se relaciona com a perda do potencial de ligação da proteína Cry1Ac à membrana, sugerindo que ABCC2 desempenha papel-chave no modo de ação de proteínas Cry. Park et al., (2014), por meio de análise de segregação em massa (Bulk segregation analysis – BSA), identificaram locus em *S. exigua* contendo três genes ABCC (ABCC1, ABCC2 e ABCC3), sendo que a deleção de 82 aminoácidos na região do domínio intracelular do transportador ABCC2 foi associada à resistência a toxina Cry1Ca. Além disso, a redução da expressão dos transportadores ABCC2 e ABCC3 por meio de silenciamento gênico parcial utilizando RNA de interferência aumentou a tolerância da linhagem suscetível às proteínas Cry1Ac e Cry1Ca (PARK et al., 2014).

Para investigar a resposta de *P. xylostela* na defesa contra Cry1Ac, foi realizada análise comparativa do transcritoma do intestino médio de linhagens resistente e suscetível. A análise comparativa da expressão diferencial entre essas linhagens identificou a regulação negativa dos transportadores ABCC2 e ABCC10 na linhagem resistente, demonstrando que a baixa expressão desses dois transportadores ABCs pode estar relecionada à resistência de *P. xylostela* a proteína Cry1Ac (LEI et al., 2014). A resistência causada por mutação no transportador ABC (homólogo ao ABCC4 em humanos) foi confirmada por Atsumi et al., (2012). Usando *B. mori* como modelo e clonagem posicional, foi mapeado um transportador ABC (homologo ao ABCC4 em humanos) no cromossomo 15 da linhagem resistente à proteína Cry1AB. Comparando sequências de 10 linhagens suscetíveis e 7 resistentes, foi verificada mutação pela inserção de uma tirosina no loop exterior da estrutura transmembrana no alelo resistente. Foi confirmado o papel do gene ABC na resistência de *B. mori* à proteína Cry1Ab, utilizando-se de clonagem germinal para inserção do alelo suscetível desse ABC na linhagem resistente, convertendo a linhagem resistente em suscetível.

A comparação das sequências do transportador ABCG4 de *P. xylostella* de linhagens suscetível e resistente à proteína Cry1Ac não detectou mutações não-sinônimas. Contudo, foi verificado supressão do ABCG4 em todas as linhagens resistentes. Adicionalmente, foi realizada a subexpressão do transportador ABCG4 na linhagem suscetível por meio de RNA de interferência, o que reduziu a suscetibilidade larval de *P. xylostella* à proteína Cry1AC,

confirmando o envolvimento da baixa expressão desse transportador como mecanismo de resistência de *P. xylostella* à Cry1Ac (GUO et al., 2015a). Recentemente, esses mesmos autores demonstraram relação de baixa expressão de dois transportadores ABC (ABCC2, ABCC3) com a resistência de *P. xylostella* a proteína Cry1Ac (GUO et al., 2015b). A regulação negativa dos níveis de expressão desses dois ABC foi associada com a redução da expressão de uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK4). Esses resultados demonstram um papel crucial de genes ABCC no mecanismo de resistência à Cry1Ac em campo e também revelam um novo mecanismo de sinalização de transregulação responsável pela modulação da expressão destes genes cruciais em *P. xylostella* (GUO et al., 2015b).

O processo de detoxificação de xenobióticos ocorre em três fases. Na fase I, inúmeras enzimas atuam para introduzir grupos reativos e polares nos seus substratos, sendo as enzimas do citocromo P450 uma das mais comuns (GUENGERICH et al., 2001; SCHLICHTING et al., 2000). Na reação subsequente, a fase II, xenobióticos ativados podem ser conjugados com glutationa-s-transferase (GST), quando uma carboxila (-COOH), hidroxila (OH) ou amina (NH2) é transferida à molécula. A adição de grandes grupos aniônicos produz metabólitos mais polares que não podem difundir através de membranas (JAKOBY; ZIEGLER, 1990). Depois das reacões da fase II, os conjugados xenobióticos podem ainda ser metabolizados e/ou excretados na fase III, com os grupos aniônicos agindo como marcadores de afinidade para uma variedade de transportadores de membrana, como os transportadores ABCs (KÖNIG et al., 1999). Enzimas codificadas por genes da citocromo P450 (P450), glutationa-stransferase (GST) e esterases, como as carboxil-colinesterase (CCEs), são amplamente associadas aos mecanismos de resistência de insetos a inseticidas devido à degradação, detoxificação e/ou sequestro de xenobióticos (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011, NASCIMENTO et al., 2015). Além disso, inúmeros trabalhos também têm demonstrado elevada expressão dessas enzimas em insetos resistentes às proteínas Cry (VAN MUNSTER et al., 2007; VELLICHIRAMMAL et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Monoxigenases do citocromo P450 encontram-se envolvidas em diferentes processos, como em vias de biossíntese de ecdisteroides e do hormônio juvenil, no desenvolvimento e reprodução, na metabolização de inseticidas, resultando tanto na bioativação ou, mais frequentemente, na detoxificação de insetos (FEYEREISEN, 1999). Existem também relatos do envolvimento dessas enzimas com a resistência de insetos a proteínas Cry. Cancino-Rodezno et al. (2012) demonstraram a presença de níveis elevados de transcritos relacionados à citocromo P450 em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) após o tratamento com Cry1Aa. O mesmo foi observado em *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera:

Tortricidae) e *M. sexta* após exposição à pró-toxina Cry1Ab (VAN MUNSTER et al., 2007). A análise da expressão diferencial de linhagens suscetível e resistente de *O. nubilalis* a Cry1F revelou oito genes de citocromo P450 superexpressos em lagartas tratadas com Cry1F (VELLICHIRAMMAL et al., 2015). O papel preciso das monoxigenases do citocromo P450 no processamento de toxinas Cry é incerto, pois estas enzimas estão geralmente envolvidas na biotransformação de xenobióticos lipofílicos (HODGSON, 1985), assim como também não se sabe ao certo como estas enzimas poderiam estar envolvidas no mecanismo de resistência ou tolerância às toxinas Cry. No entanto, elas também funcionam na regulação de muitos compostos endógenos (SCOTT; WEN, 2001; SCOTT, 2008) envolvidos em outras vias que podem indicar a resposta geral ao estresse ambiental (por exemplo, exposição à proteína Cry1F) (VELLICHIRAMMAL et al., 2015). Estudos adicionais sobre os mecanismos de regulação da superexpressão dos genes P450, bem como a sua relação com a resistência às toxinas Cry, ainda são necessários.

As GSTs formam outro importante grupo de enzimas que participa da metabolização secundária de xenobióticos, do sequestro e transporte de moléculas naturais ou sintéticas, protegendo a célula do estresse oxidativo (VONTAS et al., 2001; ENAYATI et al., 2005). Foi verificado o aumento de 2,5 vezes da expressão de GST em populações de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) resistente à toxina Cry1Ab (CANDAS et al., 2003). Possivelmente a relação de GST na resistência e/ou tolerância às toxinas Cry pode estar ligada à resposta ao estresse devido aos efeitos tóxicos pós-ligação das toxinas Cry com os devidos receptores (CAD, APN, ALP, ABCs) (BOYER et al., 2012).

Em insetos, a imunidade consiste na combinação de respostas celulares (fagocitose, encapsulamento e melanização de microrganismos invasores) e humorais (ex.: peptídeos antimicrobianos secretados na hemolinfa) (HEDENGREN et al., 1999; BECKAGE, 2008). A imunidade é inata e depende da rápida ativação de cascatas de enzimas, como a cascata de fenoloxidase, ou da produção de peptídeos antimicrobianos (PARK et al., 2010; TSAKAS; MARMARAS, 2010). As principais vias ativadas devido ao estresse causado por patógenos são: Toll, IMD, JAK/STAT, JNK e MAPK p38 (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; JIANG; VILCINSKAS; KANOST, 2010). Além disso, a resposta imunológica em insetos pode ser classificada como sistêmica ou tecido-específico, por exemplo, quando as células do intestino respondem à intoxicação oral (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; JIANG; VILCINSKAS; KANOST, 2010). Segundo Cancino-Rodezno et al., (2010), células de eucariotos não relacionadas à resposta de defesa, tais como células epiteliais, evoluíram suas defesas através

da ativação das vias MAPK p38 e JNK, para lidar especificamente com proteínas formadoras de poros no epitélio, como as proteínas Cry.

A comparação da expressão de genes de apolipoforina-III, defensina-2 e defensina-3 após a indução de larvas suscetíveis de Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) com toxina Cry3Ba, demonstrou a regulação positiva dos três genes. Porém, apenas as defensinas foram superexpressas quando as larvas suscetíveis foram desafiadas com Cry3Aa. Esses resultados evidenciam a possível associação entre a resposta imunológica de T. castaneum e a suscetibilidade a proteínas Cry3Ba e Cry3Aa (CONTRERAS et al., 2015). Resultados similares foram demonstrados anteriormente por Contreras et al., (2013), quando larvas de T. castaneum expostas à mistura de esporos cristalinos da proteína Cry3Ba tiveram expressão de apolipoforina-III duas vezes maior que as larvas não-tratadas. Além disso, o nocaute de apolipoforina-III com RNA de interferência aumentou a suscetibilidade de larvas de T. castaneum à mistura de esporos cristalinos da proteína Cry3Ba, demonstrando envolvimento da apolipoforina-III na defesa do inseto a essa proteína Cry. A enzima apolipoforina-III ativa a cascata de fenoloxidase, sendo que seus níveis de atividade são aumentados significativamente após indução com esporos cristalinos de Cry3Ba em larvas tratadas quando em comparação às larvas de T. castaneum não-tratadas (CONTRERAS; RAUSELL; REAL, 2013).

A elevada resposta imunológica resultou em aumento de 16 vezes na tolerância de *A. kuehniella* a um formulado de *Bt* contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, proteínas e esporos. Os níveis de melanização foram aumentados, resultando na tolerância ao formulado de *Bt*. Os dados também indicaram que tanto a imuno-indução quanto a tolerância ao formulado de *Bt* podem ser transmitidas maternalmente aos descendentes. A explicação mais clara para estas observações é a incorporação de um elicitor do sistema imunológico por uma fêmea imuno-induzida para o oócito. O elicitor pode interagir com tecidos embrionários para induzir o sistema imunológico do recém-nascido e, no momento em que o recém-nascido imuno-induzido começa a se alimentar, suas chances de sobreviver à formulação de Bt são aumentadas (RAHMAN et al., 2004). A análise imunológica de linhagens de *H. armigera* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac provenientes de laboratório demonstrou resposta imunológica elevada, envolvendo o aumento da melanização e a presença de uma glicoproteína de ligação à Cry1Ac (lectina galactose) solúvel na hemolínfa e no lúmen do intestino de lagartas resistentes à proteína Cry1Ac (MA et al., 2005).

No que se refere à ativação da via MAPK p38 em resposta à intoxicação com toxinas Cry e/ou toxinas formadoras de poros, foi demonstrado por comparação da análise de 40

microarranjo no nematoide Caenorhabditis elegans (Maupas) (Rhabditida: Rhabditidae) do tipo selvagem, que responde fortemente à toxina Cry5B, que a MAPK p38 e JNK (c-Jun Nterminal-like MAPK) foram superexpressas pela intoxicação com a toxina Cry5B. O silenciamento da via MAPK p38 em C. elegans por RNA de interferência evidenciou que larvas tratadas com Cry5B apresentaram hipersensibilidade à toxina, confirmando a ligação da enzima MAPK p38 com a resposta imunológica de C. elegans à proteína Cry5B. Assim, foi identificado que o silenciamento da MAPK p38 interfere nos genes ttm-1 e ttm-2, necessários à defesa contra Cry5B (HUFFMAN et al., 2004). A análise da resposta imunológica de insetos pertencendo a duas ordens diferentes, M. sexta (Lepidoptera) e A. aegypti (Diptera), às suas proteínas específicas, respectivamente Cry1Ab e Cry11Aa, evidenciou a ativação da MAPK p38 por meio de PCR em tempo real e imunodetecção, demonstrando que ambas as ordens de insetos ativa a MAPK p38 após a intoxicação com as respectivas toxinas Cry. O silenciamento da MAPK p38 in vivo resultou na hipersensibilidade de ambas as espécies às proteínas Cry, demonstrando que a via da MAPK p38 está envolvida na defesa de M. sexta e A. aegypti contra Cry1Ab e Cry11Aa, respectivamente (CANCINO-RODEZNO et al., 2010).

Referências

AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac _endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 285, n. 23, p. 12497–12503, 2010.

ATSUMI, S.; MIYAMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; NARUKAWA, J.; KAWAI, S.; SEZUTSU, H.; KOBAYASHI, I.; UCHINO, K.; TAMURA, T.; MITA, K.; KADONO-OKUDA, K.; WADA, S.; KANDA, K.; GOLDSMITH, M.R.; NODA, H. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 109, n. 25, p. 1591-1598, 2012.

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.

BAXTER, S.W.; BADENES-PEREZ, F.R.; MORRISON, A.; VOGEL, H.; CRICKMORE, N.; KAIN, W.; WANG, P.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. **Genetics**, New York, v. 189, n, 2, p. 675-679, 2011.

BECKAGE, N.E. Insect immunology. In: BECKAGE, N.E. (Ed.). **Insect Immunology**. Amsterdam: Elservier, 2008. cap. 5, p. 25-96.

BOYER, S.; PARIS, M.; JEGO, S.; LEMPÉRIÈRE, G.; RAVANEL, P. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, Maryland Heights, v. 62, n. 2, p. 75-81, 2012.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. **Diferent models of the mode of action of Bt 3d-Cry toxins.** Disponível em: http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2015/20153137249.pdf 2015>. Acesso em: 12 set. 2015.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 41, p. 423-431, 2011.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M.; Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, Sheffield, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2013.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane icrodomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, Oxford, v. 1667, n. 1, p. 38–46, 2004.

BROEHAN, G.; KROEGER, T.; LORENZEN, M.; MERZENDORFER, H. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 6, p.1-8, 2013.

CANCINO-RODEZNO, A.; LOZANO, L.; OPPERT, C.; CASTRO, J.I.; LANZ-MENDOZA, H.; ENCARNACIÓN, S.; BRAVO, A. Comparative proteomic analysis of Aedes aegypti larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012, Disponível em: <doi:e37034>.

CANCINO-RODEZNO, A.; ALEXANDER, C.; VILLASEÑOR, R.; PACHECO, S.; PORTA, H.; PAUCHET, Y.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S.; BRAVO, A. The mitogenactivated protein Kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 40, n. 1, p. 58-63, 2010.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L.A.;. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. **Molecular and Cell Proteomics**, Rockville, v.2, n. 1, p. 19-28, 2003.

CAPINERA, J.L. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Gainesville: Univers, 2008. 6 p. (EENY098). Disponível em: http://www.edis.ifas.ufl.edu. Acesso em: 14 fev. 2011.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Disponível em:<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15558.html>. Acesso em: dez.2015.

CONTRERAS. E.; RAUSELL, C.; REAL, M.D. *Tribolium castaneum* Apolipophorin-III acts as an immune response protein against Bacillus thuringiensis Cry3Ba toxic activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 113, p. 209-2013, 2013.

CONTRERAS. E.; BENITO-JARDÓN, M.; LÓPEZ-GALIANO, M.J.; REAL, M.D.; RAUSELL, C. *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to Bacillus thuringiensis toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, Kidlington, v.50, p. 139-148, 2015.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html2010.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research**, New York, v. 11, n. 7, p. 1156-1166, 2001.

DERMAUW, W.; VAN LEEUWEN, T. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 45, p. 89-110, 2014.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 14, p. 3–8, 2005.

FABRICK, J.A.;MATHEW, L.G.; TABASHNIK, B.E. ; LI, X. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Insect Molecular Biology**, St Albans, v. 20, p. 651-665, 2011.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; dos SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil, **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 150-158, 2014.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 507-533, 1999.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M.D.; TATO, A.; MARTÍNEZ, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 51-63, 1999.

GAHAN, J.L.; 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.

GAHAN, L.J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D.G.An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 12, 2010, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pgen.1001248>.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, D.A.I.; KEWSHAN, R.S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 111, n. 14, p. 5141-5146, 2014.

GAO, Y.; JURAT-FUENTES, J. L.; OPPERT, B.; FABRICK, J.A.; LIU, C.; GAO, J.; LEI, Z. Increasedtoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa against *Crioceris quatuordecimpunctata*, *Phaedon brassicae* and *Colaphellus bowringi* by a *Tenebrio molitor* cadherin fragment. **Pest** Management Science, London, v. 67, n. 9, p. 1076-1081, 2011.

GUENGERICH, F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical research in toxicology**, v. *14*, *n*. 6, p. 611-650, 2001.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; BUSATO, G.R. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (lep.:noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n. 3, p. 219-224, 2002.

GÓMEZ, I.; ARENA, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, R.; ALMAGRO, J.C.; BRAVO, A.; SOBRÓN, M. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

GONG, L.; WANG, H.; QI, J.; HAN, L.; HU, M.; JURAT-FUENTES, J.L. Homologs to Cry toxin receptor genes in a *denovo* transcriptome and their altered expression in resistant *Spodoptera litura* larve. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 129, p. 1-6, 2015.

GUENGERICH, F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

GUINEBRETIERE, M.H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE, S.B.; DE BUYSER, M.L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E.; LERECLUS, D.; DE, V.P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 31, p. 31-40, 2013.

GUO, Z,; KANG, S.; ZHU, X.; XIA, J.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. Downregulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 59, p.30–40, 2015a.

GUO, Z.; KANG, S.; CHEN, D.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHU, X.; BAXTER, S.W.; ZHOU, X.; JURAT-FUENTES, J.L.; ZHANG, Y. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 11, n. 4, 2015b, Disponível em: <doi:10.1371/journal.pgen.1005124>.

HECKEL, D.G. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 104, n. 2, p. 103-110, 2012.

HEDENGREN, M.; ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; ANDO, I.; EKENGREN, S.; WIHLBORG, M.; HULTMARK, D. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. **Molecular Cell**, Cambride, v. 4, n. 5, p. 827-837, 1999.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NAVARRO-CERRILO, G.; DE MAAGD, R.A.; MOAR, W.J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*, **PLOS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 9, 2010, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0012795>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1F proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pest, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2013, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0068164>.

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P.L.; MOAR, W.J.; DE MAAGD, R.A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 96, 2005. Disponível em: <doi: 10.1186/1471-2164-6-96>.

HODGSON, E. Microsomal monooxygenases. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology** v. 11. Oxford: Pergamon, 1985. p. 250–321.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HUFFMAN, D.L.; ABRAMI, L.; SASIK, R.; CORBEIL, J.; VAN DER GOOT, F.G.; AROIAN, R.V. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial poreforming toxins. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 101, n. 30, p. 10995-11000, 2004.

JAKKA. S.R.K.; GONG, L.; HASLER, J.; BANERJEE, R.; SHEETS, J.J.; NARVA, K.; BLANCO, C.A.; JURAT-FUENTE, J.L. Field-evolved mode 1 fall armyworm resistance to Bt corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 4, p. 1023-1034, 2015.

JAKOBY, W.B.; ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 265, n. 34, p. 20715-20718, 1990.

JIANG, H.; VILCINSKAS, A.; KANOST, M.R. Immunity in Lepidopteran Insects. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 708, p. 181-204, 2010.

JURAT-FUENTES, J.L.; KARUMBAIAH, L.; JAKKA, S.R.K.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C.; PORTILLA, M.; PERERA, O.; ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 3, 2011, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pone.0017606>.

KÖNIG, J.; NIES, A.T.; CUI, Y.; LEIER, I.; KEPPLER, D.Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, Orlando, v. 1461, n. 2, p. 377-394, 1999.

LABBÉ, R.; CAVENEY, S.; DONLY, C. Genetic analysis of the xenobiotic resistanceassociated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. **Insect Molecular Biology**, St Albans, v. 20, n. 2, p. 243-256, 2011.

LEI, Y.; ZHU, X.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; GUO, Z.; XU, B.; LI, X.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Gene**, Amsterdam, v. 533, n. 1, p. 180-187, 2014.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annual Review Immunology, Palo Alto, v. 25, p. 697–743, 2007.

LIU, Y.B.; TABASHNIK, B.E.; MAYER, S.K.; CARRIÉRE, Y.; BARTLETT, A.C. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 94, n. 1, p. 248-252, 2001.

LUTTRELL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide). **The Journal of Cotton**, Washington, v. 3, p. 35-44, 1999.

MA, G.; ROBERTS, H.; SARJAN, M.; FEATHERSTONE, N.; LAHNSTEIN, J.; AKHURTS, R.; SHMIDT, O. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larve? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 35, p. 729-739, 2005.

MACHADO, V.; WUNDER, M.; BALDISSERA, V.D.; OLIVEIRA, J.V.; FIÚZA, L.M.; NAGOSHI, R.N. Molecular characterization of host strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in southern Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 101, n. 3, p. 619-626, 2008.

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.

MERZENDORFER, H. ABC Transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites. In: COHEN, E. (Ed.). **Target receptors in the control of insect pests**: Oxford:Elsevier, 2014. Pt 2 p. 1-73.(Advances in Insect Physiology,46)

MORIN, S.; BIGGS, R.W.; SISTERON, M.S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHAN, L.J.; HECKEL, D.G.; CARRIERE, Y.; DENNEHY, T.J.; BROWN, J.K.; TABASHNIK, B.E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy**, Washington, v.100, n. 9, p. 5004–5009, 2003.

NAGOSHI, R.N. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 1, p. 210-218, 2009.

NASCIMENTO, A.R.B.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Gnenomics**, London, v. 16, n. 1, 2015, Disponível em: < doi: 10.1186/s12864-015-2183z>.

OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Fieldevolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Chichester, 2016, Disponível em: < doi: 10.1002/ps.4201>.

PACHECO, S.; GOMEZ, I.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 284, n. 47, p. 32750-32757, 2009.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, p. 3-22, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; GOMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBEÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10329–10336, 2006.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: Na Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 3296-3325, 2014.

PARK, J.W.; KIM, C.H.; RUI, J.; PARK. K.H.; CHAI, J.H.; HWANG, H.O.; KUROKAWA, K.; HA, N.C.; SÖDERHILL, I.; SÖDERHILL, K.; LEE, B.L. Beetle immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 708, p. 163-180, 2010.

PARK, Y.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, R.M.; NAVARRO-CERRILLO, G.; CHAKROUN, M.; KIM, Y.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; FERRÉ, J.; HERRERO, S. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. **BMC Biology**, London, v. 12, n. 46, 2014, Disponível em: < doi: 10.1186/1741-7007-12-46>.

PEREIRA, E.J.G.; LANG, B.A.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 115-121, 2008.

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.

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxinactivity. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.71, n. 2, p. 255–281, 2007.

POGUE, G.M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Gainesville, v. 43, p. 1-202, 2002.

RAHMAM, K.; ABDULLAH, M.A.F.; AMBATI, S.; TAYLOR, M.D.; ADANG, M.J. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 354-362, 2012.

RAHMAN, M.M.; ROBERTS, H.L.S.; SARJAN, M.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Induction and transmission of *bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. **Proceedings of the National Academy Sciences, Washington**, v. 101, n. 9, p. 2696-2699, 2004.

RASKO, D.A.; ALTHERR, M.R.; HAN, C.S.; RAVEL, J.Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, n. 4, p. 547-559, 2007.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Chichester, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.

SANTOS, L.M.; REDAELLI, L.R.; DIEFENBACH, L.M.G.; EFROM, C.F.S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 345-350, 2004.

SCHLICHTING, I.; BERENDZEN, J.; CHU, K.; STOCK, A.M.; MAVES, S.A.; BENSON, D.E.; SWEET, R.M.; RINGE, D.; PETSKO, G.A.; SLIGAR, S.G. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. **Science**, Washington, v. 287, n. 5458, p. 1615-1622, 2000.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCOTT, J.G. Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification. **Recent Advances in Insect Physiology, Toxicology and Molecular Biology**, Malden, v. 1, p. 117–124, 2008.

SCOTT, J.G.; WEN, Z.M. Cytochrome P450 of insects: the tips of the iceberg. **Pest Management Science**, London, v. 57, n. 10, p. 958-967, 2001.

SILOTO, R.C. **Danos e biologia de** *Spodoptera frugiperda* (**J.E.Smith, 1797**) (**Lepidoptera: Noctuidae**) **em genótipos de milho**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, D.M.P.; OLIVEIRA, J.V.; TABOSA, J.N.; BARROS, R.; SANTOS, E.O.; AZEVEDO, S.S. Identificação de fontes de resistência de milho a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) em campo. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 3, p. 345-348, 2000.

SOBERÓN, M.; GILL, S.S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LOPEZ, I., GOMEZ, I.; TABASHNIK, B.E.; BRAVO, A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Science**, Washington, v. 318, p. 1640-1642, 2007.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MIRANDA, J.E. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 359-362, 2012.

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

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B.E.; RENSBURG, V.J.B.J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: Definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, 2009.

THORSEN, L.; KANDO, C.K.; SAWADOGO, H.; LARSEN, N.; DIAWARA, B.; OUÉDRAOGO, G.A.; HENDRIKSEN, N.B.; JESPERSEN, L. Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 196, p. 70-78, 2015.

TIEWSIRI, K.; WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 108, n. 34, p. 14037-14042, 2011.

TSAKAS, S.; MARMARAS, V.J. Insect immunity and its signalling: an overview. **Invertebrate Survival Journa**, Modena, v. 7, p. 228–238, 2010.

UPADHYAY, S.K.; SINGH, P.K. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 33, n. 10, p. 2027-2036, 2011.

VAN MUNSTER, M.; PRÉFONTAINE, G.; MEUNIER, L.; ELIAS, M.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ;MASSON, L. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 16, n. 1, p. 25-35, 2007.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil,** Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007

VELLECHIRAMMAL, N.N.; WANG, H.; EYUN, S.; MORIYAMA, E.N.; COATES, B.S.; MILLER, N.J.; SIGFRIED, B.D. Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 558, 2015. Disponível em: < doi: 10.1186/s12864-015-1751-6>.

VONTAS, J.G.; SMALL, G.J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal**, London, v. 357, 65–72, 2001.

XIE, R.; ZHUANG, M.; ROSS, L.S.; GOMES, I.; OLTEAN, D.I.; BRAVO, M.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **The Journal of Biological Chemistry**. Rockville Pike, v. 280, n. 9, p. 8416-8425, 2005.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Acendotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 948–954, 2005.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENEDER, C.; LEONARD B.R.; ABEL, C.; LUTTREL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011, Disponível em: < doi.org/10.1371/lournal.pone. 0025783>.

ZHANG, H.; WU, S.; YANG, Y.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by na intracellular cadherin mutation in Field-selected population of cotton bollworm. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, 2012, Disponível em: < doi.org/10.1371/lournal.pone 0053418>.

ZHANG, X.; KAIN, W.; WANG, P. Sequence variation and differential splicing of the midgut cadherin gene in *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Chichester, v. 43, p. 712-723, 2013.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR.; L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZHU, Y.C.; BLANCO, C.A.; PORTILLA, M.; ADAMCZYK, J.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 122, p. 15-21, 2015.

3 ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA DE LAGARTAS DE LINHAGENS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À TOXINA Cry1F

Resumo

Plantas geneticamente modificadas para a expressão de genes de toxinas de Bacillus thuringiensis (Bt) são eficazes no controle de lepidópteros, mas sofrem perda em sua eficiência devido à evolução de resistência pela praga-alvo, assim como observada para plantas geneticamente modificadas com Cry1F e Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Os mecanismos de resistência às toxinas Cry em S. frugiperda não são definidos, mas o entendimento dos mecanismos fisiológicos/moleculares que permitem ao inseto resistir às toxinas Cry são fundamentais para o manejo da resistência de insetos às toxinas Cry e uso de plantas Bt. Sendo assim, nós realizamos a análise comparativa do transcritoma de linhagens suscetível e resistente, induzidas ou não com a toxina Cry1F, para a identificação e caracterização funcional de transcritos envolvidos na resistência de S. frugiperda a essa toxina. O transcritoma gerou 29.514 transcritos, dos quais 1.970 foram diferencialmente expressos entre as linhagens suscetível e resistente, demonstrando que lagartas resistentes apresentam maior expressão de genes relacionados à metabolização de xenobióticos, como as monoxigenases do citocromo P450, glutationa-S-transferases e carboxilcolinesterases. Transcritos correspondentes ao grupo dos componentes da membrana peritrófica também apresentaram expressão aumentada na linhagem resistente. Foi ainda possível verificar que dos receptores envolvidos na interação com Cry, caderina foi mais expresso na linhagem resistente, enquanto aminopeptidase N e fosfatase alcalina apresentaram expressão similar em larvas suscetíveis e resistentes. Porém, os níveis de expressão do transportador ABCg5 foi inferior na linhagem resistente. Os resultados obtidos apontam para a participação do metabolismo de detoxificação e dos mecanismos mediadores da inserção de oligômeros da toxina na membrana para a produção de poros, que contam com a participação de transportadores ABCs, como os mecanismos moleculares da resistência de S. frugiperda à toxina Cry1F.

Palavras-chave: Transcritoma de novo; Expressão diferencial; RNAseq; Manejo da resistência

Abstract

Genetically-modified plants expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins are efficient to control lepidopteran pests, but efficiency in insect control has been affected by the evolution of insect resistance, as observed for Cry1F toxin to control *Spodoptera frugiperda*. The resistance mechanism of *S. frugiperda* to Cry1F remains to be elucidated. Therefore, studies that aim to comprehend the physiological and molecular mechanisms associated with resistance to Cry toxins are crucial to the management of resistance evolution to Cry toxins in insects and to the use of Bt plants. We performed a comparative transcriptome analysis of susceptible resistant strains of *S. frugiperda*, induced or not with Cry1F to identify and characterize the transcripts associated with resistance of *S. frugiperda* to Cry1F toxin. We obtained a reference transcriptome with 29.514 transcripts, from which 1.970 were differentially expressed in the resistant (RES) as compared to the susceptible (SUS) strain. Transcripts associated with the detoxification process, such as cytochrome P450, glutathione-S-transferases and carboxylcholinesterases, and components of the peritrophic membrane were overexpressed in RES as compared to SUS strain. We also observed changes in the

expression of Cry receptors; while the cadherin receptor was up-regulated in the RES strain, no differences for aminopeptidase N and alkaline phosphatase were detected. Furthermore, the RES strain also presented lower levels of transcription of the ABCg5 transporter. Our data indicate that the detoxification process and mechanisms associated with the regulation of pore formation caused by the oligomarization of the toxin on the membrane, which are associated to ABCs transporters, are molecular mechanisms involved with the resistance of *S. frugiperda* to Cry1F.

Keyword: de novo assembly; Differential expression RNA-Seq; Resistance management

3.1 Introdução

A resistência de insetos-alvo às toxinas derivadas do entomopatógeno Bacillus thuringiensis (Bt) em áreas de cultivo de plantas geneticamente modificadas tende a ser um evento crescente, particularmente em áreas onde as estratégias de manejo de resistência, como a adoção de áreas de refúgio, não são regulamentadas ou implementadas (BRAVO; SOBERON, 2008; HUANG et al.; 2011; TABASHNIK et al.; 2013). São inúmeros os casos de resistência de insetos às diversas toxinas Bt (Cry) utilizadas na produção de plantas geneticamente modificadas, relatados, em sua maioria, em estudos de seleção direcionada em condições de laboratório (AKHURST et al.; 2003; HUANG et al.; 2007; PEREIRA et al.; 2008; FARIAS et al.; 2014). Porém, a crescente adoção de cultivos de plantas Bt em áreas extensas e o baixo comprometimento de produtores e legisladores, respectivamente, em adotar, regular e fiscalizar a implementação de áreas de refúgio para retardar o processo de seleção de indivíduos resistentes às toxinas Bt, já levou ao surgimento de casos de seleção de populações resistentes em condições de campo, colocando em risco o futuro dessa estratégia de manejo sustentável de pragas (VAN RENSBURG, 2007; TABASHNIK et al.; 2008; LIU et al. 2010; STORER et al.; 2010; DHURUA; GUJAR, 2011; GASSMANN et al.; 2011, GASSMANN et al., 2014; FARIAS et al.; 2014; OMOTO et al., 2016).

Dos casos de seleção de resistência às toxinas Bt em condições de campo, dois deles se referem à resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F em Porto Rico (STORER et al.; 2010) e no Brasil (FARIAS et al.; 2014). Esse inseto é umas das principais pragas agrícolas na região Neotropical pelo seu poder destrutivo, resistência a diversos inseticidas e polifagia (CAPINERA, 2008; JAKKA et al.; 2014; CARVALHO et al.; 2013; NASCIMENTO et al.; 2015). O cultivo conjunto e continuado de outras plantas de importância agrícola que também expressam toxinas Bt, como soja e algodão, e que ainda servem como hospedeiros desse inseto,pode colocar em risco as tecnologias disponíveis dada a pressão de seleção que o inseto estará sujeito, bem como ao

fato de que muitas das variedades comerciais apresentam eventos piramidados, que podem apresentar o mesmo sítio-alvo de ação (HERNÁNDEZ; FERRÉ, 2005; HERNÁNDEZ-RODRIGUES et al.; 2013; MONNERAT et al.; 2015; WELCH et al.; 2015).

O modo de ação das toxinas Bt, particularmente das proteínas Cry, comumente utilizadas na produção de transgênicos, tem sido estudado principalmente em lepidópteros, sendo a especificidade das mesmas dependente dos distintos receptores da superfície do epitélio celular do mesêntero (ZHANG et al.; 2006; BRAVO et al.; 2011a; BRAVO et al.; 2011b). Uma vez ativada, a proteína Cry se liga a um receptor de membrana intestinal tipo caderina, levando à formação de oligômeros dessa toxina. O oligômero então se liga aos receptores secundários, que são proteínas ancoradas nas microvilosidades do intestino médio, como as aminopeptidases-N, as fosfatases alcalinas e os transportadores ABCs, levando à formação de poros na membrana e, consequentemente, à desestruturação do epitélio intestinal e morte do inseto (PARDO-LOPEZ et al.; 2006; ZHANG et al.; 2006; BRAVO et al.; 2007; PARDO-LÓPEZ et al.; 2013; BRAVO et al.; 2015).

Por ser um processo multipasso, qualquer alteração em uma das etapas envolvendo ativação, processamento e inserção da toxina na membrana pode levar à resistência de insetos, como *S. frugiperda*, às toxinas Cry (JURAT-FUENTES; ADANG, 2007). Apesar da importância do conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de insetos às toxinas Cry, para a melhor compreensão do seu funcionamento e planejamento de estratégias que permitam o monitoramento adequado da frequência natural de indivíduos resistentes, bem como os riscos envolvidos no uso de variedades com eventos piramidados, até recentemente eram poucos os estudos dedicados à identificação das bases moleculares da resistência (GAHAN et al.; 2001). No entanto, o advento e o barateamento de técnicas de sequenciamento em larga escala têm permitido a produção de dados de genoma e/ou transcritoma de espécies não-modelos, possibilitando a identificação de mecanismos moleculares envolvidos na resistência de algumas espécies de insetos a diferentes toxinas Cry (ZHANG et al.; 2012; CAMPAGNE et al.; 2013; XIAO et al.; 2014; TAY et al.; 2015).

A possibilidade de realização de análises comparativas da expressão gênica por sequenciamento em larga escala (RNA-Seq) permite a montagem de transcritomas com variabilidade reduzida, a um baixo custo e em curto espaço de tempo (HUDSON, 2008). A análise de RNA-Seq é um método cada vez mais atraente para estudos de expressão gênica em muitos sistemas biológicos, incluindo espécies com genoma não-sequenciado (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), como ainda é o caso de *S. frugiperda*.

Assim, neste estudo apresentamos análise baseada na montagem de transcritoma referência de larvas de *S. frugiperda* para avaliar o padrão de expressão gênica de lagartas resistentes e suscetíveis à toxina Cry1F, com vistas à identificação dos mecanismos moleculares de resistência dessa linhagem à toxina em questão.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Linhagens e manutenção de S. frugiperda

O projeto utilizou linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F. A população suscetível foi obtida junto à EMBRAPA Sete Lagoas, MG em 1995, e tem sido mantida em laboratório sem a adição de indivíduos de campo e na ausência de pressão de seleção. A população resistente foi coletada em Barreiras, estado da Bahia, Brasil, em áreas de cultivo comercial de milho Bt Herculex TC1507 (Dow Agrosciences), que expressa a toxina Cry1F. Essa população foi submetida a processo de seleção direcionada em laboratório, levando à seleção de linhagem com razão de resistência à Cry1F, variando de 280 a 5.524 vezes em relação à linhagem suscetível de referência, dependendo do modo de exposição à toxina (FARIAS et al.; 2014).Ambas as populações (suscetível e resistente) foram mantidas em condições de laboratório ($25\pm1^{\circ}$ C, $70\pm10\%$ UR, fotofase de 14 h), em dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura (KASTEN Jr. et al.; 1978).

3.2.2 Preparo e coleta de amostras biológicas

Lagartas de *S. frugiperda* das linhagens suscetível (Sf-CrySUS) e resistente (Sf-CryRES) à toxina Cry1F na fase de pré-muda do terceiro para o quarto ínstar foram selecionadas e mantidas isoladas em placas de acrílico (Costar[®], Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo 24 células sem acesso à alimentação por 24 h. Apenas as lagartas que realizaram a muda para o 4° ínstar nesse intervalo de tempo foram utilizadas na condução dos experimentos. Essas lagartas foram então divididas em subgrupos dentro de cada linhagem. Um subgrupo foi mantido como controle, enquanto o outro foi exposto à toxina Cry1F. Lagartas Sf-CrySUS e Sf-CryRES foram expostas individualmente à toxina Cry1F em placas de acrílico (Costar[®], Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo 24 células, sendo cada célula preenchida com aproximadamente 1 mL de dieta artificial e sua superfície (equivalente a 1.5 cm²) tratada com 30 μ L de solução de Cry1F (2 μ g/ μ L) em 25 mM ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico (CAPS, pH 10,3), 1 mM benzomidina-HCl, 1 mM

ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,2 mM de ditiotreitol (DTT) e 0.1% Triton X-100. Após o tratamento da superfície da dieta com Cry1F, as placas foram mantidas em capela de fluxo laminar para a completa absorção do líquido na superfície da dieta antes da inoculação das larvas. Lagartas controle de cada uma das linhagens testadas receberam dieta tratada apenas com a solução tampão de diluição da toxina + surfactante. As placas foram vedadas e acondicionadas em câmara climatizada (27±1°C; 60±10% UR; fotofase 14 h) pelo período de 1 h. Após esse período, apenas as lagartas que ingeriram a dieta, verificada pela raspagem da dieta, foram amostradas e submetidas à imediata extração de RNA.

3.2.3 Extração do RNA

O RNA total foi extraído de conjuntos de cinco lagartas utilizando-se do reagente Trizol (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi enriquecido em RNA mensageiro (mRNA) pela remoção do RNA ribossomal (rRNA), utilizando-se do sistema comercial RiboMinus Eukaryote Kit (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. O procedimento, em resumo, baseou-se na hibridação do rRNA das amostras a sondas específicas marcadas com biotina, seguida da posterior captura destes complexos por esferas magnéticas ligadas à estreptovidina. As amostras enriquecidas em mRNA foram quantificadas por espectrofotometria (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e encaminhadas 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 Illumina Hiseq 1000[®] (Illumina[®]).

Para a construção da biblioteca de cDNA, as amostras de mRNA foram fragmentadas em porções de 200 nucleotídeos e ligadas a iniciadores randômicos para reação de transcrição reversa. O cDNA produzido foi purificado utilizando-se esferas magnéticas e lavagens com etanol para reparação de suas terminações, para que cada molécula apresentasse extremidades abruptas. Após a reparação, foi adicionada adenosina à extremidade 3' de cada fragmento, permitindo, assim, a ligação de adaptadores acoplados a indexadores específicos para permitir a diferenciação das bibliotecas. 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 sequenciamento. O sequenciamento das bibliotecas de cDNA seguiu o protocolo paired-end, originando leituras de 100 nucleotídeos.

3.2.4 Construção do transcritoma de novo

As leituras do sequenciamento das bibliotecas de cDNA das linhagens de *S*. *frugiperda* suscetível e resistente, expostas ou não à toxina Cry1F, foram utilizadas na construção do transcritoma *de novo*. Essas leituras foram avaliadas quanto a sua qualidade utilizando o software FastQC (ANDREWS, 2010). A partir destes resultados, foi realizada a filtragem das sequências utilizando como ponto de corte o valor Q30 da escala de Phred. As leituras duplicadas foram removidas para diminuir o esforço computacional utilizando-se de plug-in disponível junto ao programa CLC Genomics Workbench® versão 5.1 (CLCBio, Denmark). Posteriormente, apenas leituras de tamanho superior a 25 bases foram utilizadas na montagem do transcritoma *de novo*, utilizando como parâmetros de montagem K-mer = 26 como tamanho de palavra, tamanho da bolha ("bubble size") = 50, também fazendo uso das ferramentas disponíveis no pacote CLC Genomics Workbench® versão 5.1.

3.2.5 Anotação funcional

A anotação funcional do transcritoma *de novo* obtido foi realizada com auxílio do programa Blast2GO v.2.5.0 (http://www.blast2go.org) (CONESA; GÖTZ, 2008). A busca por similaridade dos transcritos foi realizada no banco de dados não-redundante do NCBI, assumindo como valor de corte *e*-value = 10^{-3} usando o algoritmo BLASTx (ALTSCHUL et al.; 1997). Posteriormente, os dados foram mapeados para a identificação dos termos de ontologia gênica (GO), utilizando o programa Blast2GO v.2.5.0. Para obter a anotação funcional dos GOs, as sequências foram comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados para análise de assinatura proteica utilizando o InterproScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001), com valor de corte *e*-value = 10^{-5} . Os dados de GO foram carregados no programa WEGO (http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl) para a representação gráfica das classificações funcionais dos GOs.

3.2.6 Análise da expressão gênica diferencial (RNAseq)

O transcritoma obtido foi então utilizado para a análise da expressão gênica diferencial entre as amostras Sf-CrySUS e Sf-CryRES, induzidas ou não pela alimentação em dieta contendo a toxina Cry1F. A expressão relativa de cada transcrito foi calculada utilizando-se da contagem do número de leituras semelhantes por kilobase (kb) do alvo por milhão de leituras mapeadas (RPKM). Os valores de RPKM obtidos para os contigs das linhagens SfCrySUS e Sf-CryRES foram comparados pelo teste t ($p \le 0,05$). Foram considerados diferencialmente expressos aqueles transcritos que apresentaram valor de $p \le 0,05$ e razão de expressão (*fold change*) maior ou igual a 2 (superexpressão) ou menor ou igual a -2 (supressão). As análises de expressão diferencial foram realizadas utilizando-se das ferramentas disponíveis no pacote CLC Genomics Workbench® versão 5.1.

3.2.7 Validação da expressão diferencial pela análise de genes candidatos por qPCR

Para a validação da análise de expressão gênica diferencial conduzida pela comparação dos valores de RPKM para as diferentes amostras estudadas, foi selecionado um grupo de transcritos relacionados ao modo de ação de toxinas Cry ou aos mecanismos de resistência descritos para essas proteínas, para a realização de estudos de expressão gênica comparativa por PCR quantitativo (qPCR). Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR foram construídos utilizando-se do programa Primer Express® versão 3.0.1 (Life Technologies©), baseando-se nas sequências do transcritoma de referência de *S. frugiperda* (Tabela 3.1).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 μ g do RNA total de lagartas das linhagens Sf-CrySUS e Sf-CryRES, induzidas ou não com a toxina Cry1F, obtidas assim como descrito anteriormente. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o sistema comercial ImProm-II(TM) Reverse Transcription System (Promega©), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de qPCR foi composta de 0,4 μ g de cDNA, 12,5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix® (Thermo Scientific©), 0,6 μ M de cada um dos iniciadores e 10,3 μ L de água, em reação com volume final de 25 μ L.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se da plataforma ViiATM7 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies[®]). As condições de termociclagem utilizadas foram 2 min a 50°C, 10 min para desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. As curvas de dissociação foram analisadas para verificar a especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação de cada alvo. A normalização da amplificação foi feita utilizando o gene da proteína ribossomal 30S (30S rRNA) como referência PR30sF (5'-CAC CCT CGG TGT TAG ACG TT-3') e PR30sR (5'-CCA CCG GGA AAG TGA TAC TGT-3') (SOUZA, 2013). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos (suscetível e resistente, induzidas ou não por Cry1F), contendo três repetições biológicas (composta por 5 lagartas cada), sendo que cada repetição biológica foi analisada em triplicata técnica. A comparação da expressão

relativa de cada gene foi realizada de acordo com o método $\Delta\Delta_{Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3.1 - Conjunto de iniciadores utilizados para a validação da expressão diferencial por PCR quantitativo em tempo real de genes candidatos da análise de RNAseq

Transcrito	Identificação putativa (hit mais próximo)	Sequência (5'- 3')	
Contig_10446	ABC a5 (VP 012201100 1)	F-GAGCGGTTTACGTCCAAGAGTT	
	ADCg5 (AI_015201109.1)	R-TACCAAGGGAGAAGGCGAAAG	
Contig_20326	CCE(ADE/24051)	F-ACAACCTCCGCTTGGAGAATT	
	CCE (ADF43493.1)	R-TTGGTAGCATTTTGAACCGAACT	
Contig_23831	Cyp321a7 (AGO62005.1)	F-TTGTCATCGATCCGAAGAATGT	
		R-TCACTCAATTGATCCCCTTCAA	
Contig16395	Peritrofina (AFK27934.1)	F-GAAGGAAAGCCTGCAGCATT	
		R-TACGGTTGCCACAGTCAACATT	
Contig_25374	Some and taken 5 (AID00769 1)	F-GTGGCTCCCCTACTAACATCCA	
	Sennoprotease 5 (AIR09768.1)	R-AGCAAGGAACCTCCACAAGCT	
Contig_23206	Tringing $(\mathbf{A}, \mathbf{A}, \mathbf{D}, \mathbf{O}, \mathbf{O}, \mathbf{O}, \mathbf{O})$	F-ATAGGAGACTCCCCAGCAACAA	
	Tupsina (AAK98920.2)	R-GTGGTCACTATCGCAGCATCAT	

3.3 Resultados

3.3.1 Montagem do transcritoma de novo

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA de linhagens suscetível e resistente de *S*. *frugiperda*, expostas ou não à toxina Cry1F, gerou um total de 44.565.928 de leituras. Após a aplicação dos filtros de qualidade (valor de qualidade = Q>30; tamanho superior a 25 bases) e remoção das leiuras duplicadas, 18.486.583 leituras foram utilizadas para a montagem de transcritoma *de novo*, gerando transcritoma com 29.514 contigs, com N50 de 578 pb (Tabela 3.2).

Dados brutos					
Número de leituras	44.565.928				
Após filtragem					
Número de leituras	18.486.583				
% GC	39,1				
Após montagem	Transcritos				
Número	29.514				
Tamanho mínimo	148				
Tamanho mínimo Tamanho máximo	148 5.145				
Tamanho mínimo Tamanho máximo Tamanho médio	148 5.145 501				
Tamanho mínimo Tamanho máximo Tamanho médio N50	148 5.145 501 578				

Tabela 3.2 - Sumário da montagem do transcritoma de novo de linhagens de S. frugiperdasuscetível e resistente, induzidas ou não com Cry1F

A maioria dos transcritos (89%) alinharam com sequências de espécies de Lepidoptera (Figura 3.1). A maior parte dos transcritos anotados (49%) apresentou alta homologia com *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae). Quatro espécies do gênero Spodoptera foram observadas nos alinhamentos: Spodoptera exigua (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), S. frugiperda, Spodoptera littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) e Spodoptera litura (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Essas espécies responderam por 4% dos alinhamentos, correspondendo a 1% para cada espécie.



Figura 3.1 - Distribuição dos alinhamentos dos transcritos do transcritoma *de novo* de lagartas de *S. frugiperda* obtidos via BLASTx

A maior parte dos transcritos mapeados (43%) apresentou alta similaridade a sequências depositadas no banco de dados do NCBI, com e-valores entre 10^{-3} e 10^{-32} , sendo que esses valores foram ainda mais significativos para 6% dos transcritos, os quais variaram de 10^{-149} a 10^{-180} (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Distribuição dos valores de homologia dos transcritos do transcritoma *de novo* de *S. frugiperda* obtidos após busca no banco de dados (nr) (NCBI)

As atribuições das ontologias gênicas (GO) foram aplicadas para classificar os transcritos de *S. frugiperda*. Um total de 9.592 sequências foram atribuídas a pelo menos um GO dentro de 48 grupos funcionais (Figura 3.3). Desses, 4.413 foram atribuídos a pelo menos um GO na categoria de *Componente Celular*, 8.050 na categoria de *Função Molecular* e 5.885 de *Processos Biológicos*. Estes transcritos foram ainda classificados em subcategorias funcionais. Sequências com GOs correspondentes ao *Componente Celular* foram divididas em nove subcategorias, *Função Molecular* em 11 e *Processos Biológicos* em 15. A maior porcentagem de ontologias encontradas no *Componente Celular* (47%) foi correspondente à subcategoria *célula* (em geral). Na *Função Molecular* e *Processos Biológicos* as subcategorias *atividade catalítica* (54,3%) e *processos metabólicos* (57,5%) foram, respectivamente, as mais abundantes (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Distribuição das ontologias (GO) atribuídas ao transcritoma *de novo* de largartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente, induzidas ou não com Cry1F

3.3.2 Análise da expressão gênica diferencial

A utilização do transcritoma de referência para a análise da expressão diferencial de transcritos obtidos de lagartas oriundas das linhagens Sf-CrySUS e Sf-CryRES, induzidas ou não com a proteína Cry1F, permitiu verificar que dos 29.514 transcritos obtidos, 19.226 foram comuns aos diferentes tratamentos, ou seja, aproximadamente 65% dos transcritos foram expressos em lagartas de *S. frugiperda*, independentemente da linhagem e da indução ou não

com a toxina Cry1F (Figura 3.4). A indução com a toxina Cry1F levou à expressão de 799 transcritos nos indivíduos suscetíveis e resistentes. Desses, 124 transcritos foram expressos exclusivamente nos indivíduos resistentes e 118 nos suscetíveis, sendo 557 comuns a ambos. Indivíduos resistentes apresentaram expressão exclusiva de 2.230 transcritos, dos quais 2.075 foram comuns aos indivíduos resistentes, induzidos ou não com a toxina Cry1F. Cerca de 890 transcritos ocorreram unicamente nas lagartas suscetíveis, sendo que a expressão de 650 deles foi independente da indução ou não com a toxina Cry1F, 125 foram exclusivos de lagartas que não entraram em contato com a toxina e 118 ocorreram apenas nas lagartas induzidas (Figura 3.4). Lagartas da linhagem Sf-CryRES não-induzida contou com o menor número de transcritos exclusivos (31), enquanto os demais tratamentos apresentaram cerca de quatro vezes mais transcritos exclusivos (Figura 3.4).



Figura 3 4 - Distribuição dos transcritos de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente, induzida ou não com a toxina Cry1F, detectados pela análise do transcritoma *de novo* de referência

A análise da expressão diferencial dos 29.514 contigs da montagem *de novo* de referência resultou na seleção de 1.970 contigs expressos diferencialmente (teste t, $p \le 0,05$; expressão relativa >2 ou -2<), sendo a grande maioria deles superexpressos em lagartas Sf-CryRES em relação à Sf-CrySUS (Figuras 3.5 e 3.6). Apenas 329 dos 1.970 transcritos expressos diferencialmente sofreram redução da expressão gênica nas lagartas Sf-CryRES (Figuras 3.5).



Figura 3.5 - Distribuição da expressão diferencial dos transcritos do transcritoma *de novo* de lagartas de *S. frugiperda* de linhagens suscetível e resistente a Cry1F. Pontos azuis representam transcritos com expressão gênica diferencial significativa (teste t, p < 0.05; expressão relativa >2 e -2<)

Dos 1.970 transcritos expressos diferencialmente, apenas 763 foram atribuídos a pelo menos um GO dos grupos funcionais (Figura 3.6). Desses, 444 transcritos foram atribuídos a pelo menos um GO na categoria *Componente Celular*, 513 na de *Função Molecular* e 654 a *Processos Biológicos*. A maior porcentagem de ontologias encontradas em *Componente celular* foi *célula* (em geral), que compreendeu 35.7% dos transcritos na subcategoria. Na *Função Molecular* e em *Processos Biológicos*, as subcategorias *atividade catalítica* e *processos metabólicos* foram os mais abundantes, perfazendo 50,2% e 54,4% cada subcategoria, respectivamente. Além disso, houve elevada porcentagem de transcritos nas subcategorias *organelas, ligação e processos celulares*.



Figura 3.6 - Distribuição das ontologias (GO) atribuídas aos transcritos diferencialmente expressos (test t, p <0,05; expressão relativa >2) das linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente, induzidas ou não com Cry1F

Os transcritos diferencialmente expressos foram separados em três grupos baseando-se no modo como esses transcritos interagem com a toxina Cry: (1) receptores de toxinas Cry, (2) componente da membrana peritrófica e (3) atividade enzimática (proteólise e detoxificação).

A análise comparativa da expressão de transcritos selecionados devido à sua participação reconhecida em processos de interação com toxinas Cry em insetos indicou que a expressão de genes do grupo dos receptores de toxinas Cry entre Sf-CrySUS e Sf-CryRES foi variável. Enquanto os contigs referentes aos receptores caderina (contig_24849 e contig_12002) e aos transportadores ABC (ABCc1, ABCb3 e ABCb7) foram superexpressos em lagartas da linhagem Sf-CryRES, o transportador ABCg5 (contig_10446) teve sua expressão reduzida quando comparada à expressão observado em lagartas da linhagem Sf-CrySUS (Figura 3.7, Tabela 3.3).

Também foi possível observar que os níveis de transcrição dos contigs identificados como caderina (contigs 24849 e 12002) e ABCg5 (contig 10446) praticamente não sofreram alterações dentro de cada linhagem quando as lagartas foram induzidas com a toxina Cry1F (Figura 3.7, Tabela 3.3). No entanto, os transportadores ABCb7 (contig 5663) e ABCc1 (contig 24539) sofreram forte indução da expressão em lagartas Sf-CrySUS e Sf-CryRES quando induzidas pela toxina Cry1F, enquanto o ABCb3 (contig 6315) sofreu supressão em

ambas as linhagens (Figura 3.7, Tabela 3.3). Vale ressaltar que transcritos dos também receptores de toxinas Cry, aminopeptidase (APN) e fosfatase alcalina (ALP), não foram diferencialmente expressos entre as linhagens Sf-CrySUS e Sf-CryRES.



Figura 3.7 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados a receptores de toxinas Cry de lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais escuro, significa diminuição no nível de expressão

Todos os transcritos correspondentes ao grupo dos componentes da membrana peritrófica foram constitutivamente superexpressos na linhagem Sf-CryRES (Figura 3.8). A expressão desses transcritos na linhagem Sf-CryRES foi de cerca de três (contig_15139 = domínio 3 da proteina ligante à quitina) a 10 vezes (contig_17212 = proteína ligante à quitina) àquela observada em lagartas Sf-CrySUS (Figura 3.8, Tabela 3.3). Todos os transcritos selecionados no grupo dos componentes da membrana peritrófica tiveram sua expressão aumentada em lagartas induzidas com a toxina Cry1F em ambas as linhagens Sf-CrySUS e Sf-CryRES (Figura 3.8, Tabela 3.3). No entanto, duas dessas proteínas (contig 9592 e contig 15139) merecem destaque pela diferença na alteração dos valores de RPKM obtida dentro de cada linhagem após a indução com Cry1F. Lagartas de Sf-CrySUS induzidas com Cry1F apresentaram valores de RPKM cerca de 2 (contig 15139) a 15 (contig 9592) vezes superiores

aos de lagartas não-induzidas, enquando em lagartas de Sf-CryRES induzidas essa diferença foi, respectivamente, de 1,05 a 1,2 vezes àquela das não-induzidas (Tabela 3.3).



Figura 3.8 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados à membrana peritrófica de lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais escuro, significa diminuição no nível de expressão

Dos transcritos pertencentes ao grupo de atividade enzimática, 22 são ligados ao metabolismo de detoxificação, sendo 12 deles pertencentes ao grupo das monoxigenases do citocromo P450 (CYP), oito glutationa-s-transferases (GST) e três carboxil-colinesterase (CCE) (Figura 3.9). Com exceção do contig_21358 (GSTe11), todos os demais transcritos foram superexpressos na linhagem Sf-CryRES, independentemente da indução das lagartas com Cry1F (Figura 3.9). No geral, a maioria dos transcritos de CYP, GST e CCE foram mais expressos em lagartas induzidas com Cry1F em ambas às linhagens estudadas (Figura 3.9). No entanto essa regulação positiva é maior dentro da linhagem resistente (Tabela 3.3).



Figura 3.9 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos relacionados a atividade enzimática (proteólise e detoxificação) de lagartas de *S. frugiperda* resistente e suscetível induzido ou não com Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais escuro, significa diminuição no nível de expressão

Identificação	p-valor	Expressão relativa normalizada	SUS RPKM (média)	RES RPKM (média)	Hit mais próximo
contig_1426	0,03	-532,77	310,45	1,17	Subunidade 3 do fator de iniciação de tradução
contig_2185	0,05	-134,21	186,25	1,87	Transcritase reversa
contig_2886	0,02	-55,24	218,53	16,80	Flavoproteína polipeptídeo beta de transferência de elétrons
contig_665	0,02	-40,37	215,58	7,27	Fator de elongação de ácido graxo de cadeia longa tipo aael008004
contig_9374	0,00	-37,50	20,11	0,72	Transcritase reversa-endonuclease
contig_5320	0,03	-24,05	31,48	1,48	Tipo inibidor de protease
contig_5162	0,01	-19,33	40,57	2,82	Precursor do inibidor de serino protease 7
contig_7731	0,01	-18,03	28,98	1,88	Facilitador do transportador de trealose tipo tret1-1
contig_12999	0,02	-16,91	41,26	2,57	Sulfatase
contig_14300	0,00	-14,21	13,12	1,29	Tipo lipase pancreatica 2
contig_17769	0,01	-13,76	6,24	0,49	Heparano-alfa-glucosaminida N-acetiltransferase
contig_5686	0,01	-12,86	40,03	3,42	Glucose desidrogenase
contig_18631	0,05	-12,00	33,30	4,66	Proteína neurogênica homóloga ao locos notch 1
contig_7592	0,02	-10,16	141,11	14,96	Fosfoglicerato quinase
contig_7448	0,04	-9,89	9,54	1,32	Glucose desidrogenase
contig_10470	0,02	-8,47	8,80	2,58	Proteína isoforma a
contig_3910	0,01	-7,80	84,53	11,88	Serino protease 37
contig_5010	0,05	-7,65	137,18	18,90	Lactase-florizina hidrolase
contig_4030	0,01	-7,52	42,43	7,64	Esterase da antena cxe16
contig_11240	0,00	-6,93	15,05	2,56	Proteina de ligação a odores
contig_16542	0,03	-5,86	11,40	2,58	Aldeído desidrogenase
contig_6390	0,01	-5,74	422,45	77,19	Repat33
contig_1276	0,04	-5,36	167,13	32,96	Subunidade reguladora de protease Af115331_126s
contig_21358	0,03	-5,30	4,75	1,14	Glutationa-s-transferase e11
contig_21358	0,03	-5,30	4,75	1,14	Glutationa-s-transferase e11

 Tabela 3.3 - Transcritos anotados e diferencialmente expressos entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de S. frugiperda e que tiveram as maiores alterações na taxa de expressão relativa

 (continua)

Identificação	p-valor	Expressão relativa normalizada	SUS RPKM (média)	RES RPKM (média)	Hit mais próximo
contig_15832	0,03	-5,23	5,47	1,12	Facilitador do transportador de trealose tipo tret1-1
contig_10446	0,02	-4,09	21,72	5,60	Tipo ABCg5
contig_6315	0,03	2,07	11,36	24,69	ABCb3
contig_7365	0,02	2,18	21,72	49,38	Glutationa-S-transferase omega
contig_2402	0,02	2,24	301,28	698,43	Glutationa-S-transferase s3
contig_3735	0,05	2,48	29,58	69,36	Citocromo P450
contig_24539	0,05	2,98	1,12	2,18	ABCc1
contig_15139	0,02	3,02	13,67	42,32	Domínio 3 de proteína de ligação à quitina
contig_27430	0,03	4,04	1,83	6,12	Carboxilcolinesterase cce016d
contig_6734	0,04	4,10	12,95	55,01	Glutationa-S-transferase 1
contig_4261	0,03	4,81	12,20	61,52	Glutationa-S-transferase 1
contig_20326	0,04	4,90	1,77	7,47	Carboxilcolinesterase
contig_13172	0,04	4,93	6,89	34,68	Carboxilcolinesterase cxe28
contig_10513	0,04	5,72	525,09	3159,68	Citocromo parcial
contig_24077	0,04	5,82	0,42	2,16	Citocromo P450
contig_5663	0,04	5,82	0,56	2,86	ABCb7
contig_20284	0,04	6,26	2,80	15,86	Citocromo P450 parcial
contig_23334	0,01	8,03	1,97	16,47	Tipo mucina 2
contig_8122	0,00	8,54	2,47	20,44	Citocromo P450
contig_453	0,04	8,66	2,76	25,18	Citocromo P450
contig_16395	0,02	8,86	33,57	311,71	Proteína de ligação a quitina
contig_26156	0,02	9,09	0,42	3,53	Citocromo parcial
contig_9592	0,05	9,57	7,54	72,83	Mucina intestinal de inseto
contig_12002	0,01	9,85	0,42	4,23	Caderina mutante
contig_10714	0,01	10,53	2,52	26,53	Citocromo P450

 Tabela 3.3 - Transcritos anotados e diferencialmente expressos entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de S. frugiperda e que tiveram as maiores alterações na taxa de expressão relativa

 (continuação)

	-	-			(continuação)
Identificação	p-valor	Expressão relativa normalizada	SUS RPKM (média)	RES RPKM (média)	Hit mais próximo
contig_17212	0,02	10,84	3,93	44,65	Proteína de ligação a quitina
contig_5260	0,04	11,43	7,94	92,95	Citocromo P450
contig_24849	0,02	13,15	2,46	34,27	Caderina mutante
contig_17853	0,05	24,84	1,34	35,44	Proteína cuticular rr-1 motivo 52
contig_13936	0,03	25,12	3,01	79,78	Homólogo a ester hidrolase c11 ou f54
contig_15418	0,03	25,41	1,11	29,49	transferidor de alfa-tocoferol
contig_13625	0,02	26,96	6,00	166,98	Proteína conservada de plasmódio
contig_21283	0,01	30,64	0,51	15,75	RNA polimerase I dependente de DNA subunidade maior
contig_14374	0,03	31,55	1,23	40,83	Transposon poliproteína Bel12_ag
contig_17872	0,00	32,52	0,64	21,82	Pro-X-carboxipeptidase lisossomal
contig_11890	0,01	34,43	1,44	50,42	Ecdisteroide quinase-22
contig_17159	0,03	37,33	0,38	15,38	Proteína serino hidrolase tipo 2
contig_27258	0,00	38,00	0,14	5,95	Provável galactose-1-fosfato -uridililtransferase
contig_6586	0,03	39,66	1,33	50,54	Tipo-subunidade a-aglutinina de ancoragem
contig_4490	0,03	44,99	2,07	89,10	Galerimicina
contig_23110	0,00	45,20	0,37	17,49	Proteína tipo coq4 da biosíntese de ubiquinona
contig_9533	0,02	57,77	1,67	97,99	IMP desidrogenase/GMP redutase
contig_24083	0,04	75,19	4,01	318,28	UDP-glicosiltransferase ugt33j1
contig_27272	0,01	82,53	0,28	23,95	Homólogo a proteína ltv1
contig_27536	0,05	84,00	0,10	9,31	Proteínas do domínio das integrases nuclear
contig_15926	0,01	89,84	0,65	62,37	Desidrogenase hidroxibutirato
contig_12906	0,05	186,36	2,38	461,07	Domínio único do alérgeno principal 1
contig_8957	0,02	193,64	0,37	70,51	Esterase da antena cxe11
contig_524	0,02	219,00	0,20	51,64	Proteína tipo-lebocina
contig_15939	0,01	233,50	0,21	56,68	Subunidade da proteina do vitelo do epitélio folicular

Tabela 3.3 - Transcritos anotados e diferencialmente expressos entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* e que tiveram as maiores alterações na taxa de expressão relativa

					(conclusão)
Identificação	p-valor	Expressão relativa normalizada	SUS RPKM (média)	RES RPKM (média)	Hit mais próximo
contig_7618	0,04	286,00	0,16	49,98	Proteína de choque térmico
contig_3158	0,04	308,04	0,20	62,98	Tirosina aminotransferase
contig_202	0,04	723,75	0,11	88,15	Tipo glicina-N-metiltransferase
contig_28798	0,05	INF	0,00	2,61	CYP340ab1
contig_23831	0,05	INF	0,00	8,98	CYP321a7
contig_25220	0,04	INF	0,00	4,21	Glutationa-S-transferase epsilon 2
contig_27727	0,02	INF	0,00	16,81	Glutationa-S-transferase epsilon 6
contig_27789	0,03	INF	0,00	2,31	Citocromo P450

Tabela 3.3 - Transcritos anotados e diferencialmente expressos entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* e que tiveram as maiores alterações na taxa de expressão relativa
O padrão de expressão diferencial entre linhagens suscetível e resistente à toxina Cry1F foi confirmada pela expressão relativa identificada por qPCR (Figura 3.10), sendo os valores de expressão correspondentes àqueles obtidos na análise de RNA-Seq.



Figura 3.10 - Análise de qPCR demosntrando a expressão diferencial relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente induzidas ou não com toxina Cry1F. ABCg5 (contig_10446); Cyp321a (contig_23831); Tripsina (contig_23206); Serinoprotease (contig_25374); CCE (contig_20326); Peritrofina (contig_16395)

3.4 Discussão

Insetos apresentam elevada capacidade de adaptação a fatores de estresse e fontes diversas de pressão de seleção, incluindo patógenos e xenobióticos diversos, contando com vários mecanismos biológicos, fisiológicos e moleculares que permitem a evolução da resistência a agentes biológicos (virus e bactérias) (NARAYANAN, 2004) e toxinas diversas (TIEWSIRI; WANG, 2011; ZHANG et al., 2013; LEI et al., 2014; GONG et al., 2015). Acredita-se que vários fatores genéticos e metabólicos sejam responsáveis pela evolução da resistência às toxinas Cry em insetos (GRIFFITTS; AROIAN, 2005; HECKEL et al.; 2007; LEI et al.; 2014). Estudos de transcritômica, genômica e proteômica têm aumentado as informações de dados biológicos importantes que possibilitam desvendar como as defesas de pragas-alvo respondem às toxinas Bt aos níveis bioquímico e celular (JURAT-FUENTES et al.; 2011; LEI et al.; 2014; GONG et al.; 2015). Em geral, a exposição às toxinas Bt resulta na alteração de diferentes mecanismos de resistência, incluindo alterações na ativação ou na ligação das toxinas, alterações nas vias oxidativas e da resposta imunológica, ou no

metabolismo em geral (PARK et al.; 2010; CONTRERAS et al.; 2013; NAVARRO-CERRILLO et al.; 2013; YAO et al.; 2014; AYRA-PARDO et al.; 2015).

A análise de expressão gênica diferencial de *S. frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F demontrou diferenças significativas na expressão de conjunto significativo de genes de *S. frugiperda* resistente à toxina Cry1F, pertencendo a inúmeras vias metabólicas, independentemente da indução com a toxina, incluindo vias clássicas de detoxificação.

O processo de detoxificação de xenobióticos ocorre em três fases, todas elas representadas na análise comparativa da expressão gênica de linhagens de S. frugiperda resistente e suscetível a toxina Cry1F. As duas primeiras fases do processo de detoxificação envolvem enzimas hidrolíticas ou de modificação do xenobiótico para aumentar a sua solubilidade para facilitar sua excreção (JAKOBY; ZIEGLER, 1990). Monoxigenases do citocromo P450 são as enzimas mais comuns atuando na primeira etapa pela incorporação de um átomo de oxigênio à molécula-alvo (FEYEREISEN, 1999; GUENGERICH et al.; 2001; SCHLICHTING et al.; 2000), enquanto glutationa-s-transferase (GST) atuam na etapa subsequente, modificando o substrato pela adição de grupamentos carboxila (-COOH), hidroxila (OH) ou amina (NH2) (VONTAS et al.; 2001; ENAYATI et al.; 2005). Esterases e carboxil-colinesterase também atuam nessas fases promovendo a hidrólise das moléculas-alvo (LI et al., 2013). São vários os exemplos da participação dessas enzimas como mecanismo de resistência, dado o aumento da expressão de genes dessas enzimas em insetos resistentes a inseticidas (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011, NASCIMENTO et al.; 2015). Também são vários os exemplos de elevação da expressão gênica de P450 (VAN MUNSTER et al.; 2007; CANCINO-RODEZNO et al.; 2012; VELLICHIRAMMAL et al.; 2015; ZHU et al.; 2015) e GSTs (CANDAS et al.; 2003, GUNNING et al.; 2005) em insetos mastigadores resistentes a toxinas Cry, mas não foi verificada ativação de genes de detoxificação em sugadores em resposta à toxina (MANNAKKARA et al., 2013).

Lagartas de *S. frugiperda* resistente à toxina Cry1F apresentaram expressão constitutiva elevada de inúmeras P450, glutationa-s-transferase (GST) e carboxil-colinesterase (CCEs) em relação às lagartas suscetíveis. A importância desses transcritos na detoxificação dessa toxina foi evidenciada pela resposta positiva da transcrição gênica em lagartas das linhagens Sf-CrySUS e Sf-CryRES expostas à Cry1F. Fica assim evidente que enzimas ligadas aos processos do metabolismo de detoxificação (P450, GST e CCE) respondem à intoxicação com Cry1F e insetos resistentes apresentam taxas basais de expressão gênica muito superiores àquela dos insetos suscetíveis à toxina Cry1F. No entanto, alguns autores sugerem que a elevada expressão de genes relacionados às vias de detoxificação em insetos

resistentes a toxinas Cry seja decorrente da existência de mecanismos de resistência cruzada a inseticidas, assim como proposto para a linhagem de *S. frugiperda* de Porto Rico resistente à toxina Cry1F (7.000x), que também apresentou aumento significativo na atividade enzimática de GST e PNPA esterases em decorrência da resistência cruzada a organofosforados, via atividade aumentada do metabolismo de detoxificação (ZHU et al.; 2015).

Proteínas que participam da terceira fase do processo de detoxificação promovendo a excreção de compostos xenobióticos, como os transportadores cassetes ligantes de ATP ("ATP-binding cassettes transporters"), os transportadores ABCs (KÖNIG et al.; 1999), também tem sido envolvidos na resistência de insetos a toxinas Cry (HECKEL.; 2012). Transportadores ABCs constituem uma grande família de proteínas integradas à membrana que utilizam a energia da hidrólise do ATP para transportar substratos através da membrana (DEAN et al.; 2001; LABBÉ et al.; 2011; BROEHAN et al.; 2013). Oito subfamílias (A-H) foram descritas em eucariotos (DEAN et al.; 2001; LABBÉ et al.; 2011), sendo que alguns desses transportadores tem atividade comprovada na excreção de inúmeras substâncias tóxicas, incluindo inseticidas, do meio intracelular para o meio extracelular, reforçando sua participação em diversos mecanismos de resistência de insetos a inseticidas (BUSS; CALLAGHAN, 2008). Há pelos menos quatro espécies de insetos resistentes a toxinas Cry em decorrência de mutações nos transportadores da família ABCC2 que, em alguns casos, leva à interrupção da expressão desse gene (GAHAN et al.; 2010; BAXTER et al.; 2011; ATSUMI et al.; 2012; HECKEL, 2012). A resistência a toxinas Cry observada por mutações e ausência de expressão de genes ABCC2 levou à proposição de que esses receptores participariam de etapa importante na interação com as toxinas Cry, sendo sugerida a sua participação na interação com a estrutura oligomerica da Cry para auxiliar sua inserção e a formação de poros na membrana (GAHAN et al., 2010; HECKEL, 2012). Com isso, esperaríamos padrão de expressão gênica de transportadores ABC em insetos resistentes a inseticidas distinto daquele relatado em insetos resistentes a toxinas Cry, caso ABCCs realmente atuem como receptores no processo de intoxicação com toxinas Cry. Em casos de resistência a inseticidas, ABCs transportadores de toxinas (subfamílias B, C e G) deveriam ter sua expressão aumentada para facilitar a rápida excreção de toxinas (LABBÉ et al., 2011; BARIAMI et al., 2012; EPIS et al., 2014), enquanto nos insetos resistentes a Cry, seria esperada a redução de sua expressão gênica (LEI et al., 2014; PARK et al., 2014; GUO et al., 2015ab). A análise do transcritoma das linhagens resistente e suscetível de S. frugiperda a toxinas Cry1F não indicou diferenças nos níveis de expressão de transportadores ABCC, mas indicou forte supressão da expressão gênica de um transportador ABCG (contig_1446) na linhagem resistente a Cry1F, assim como recentemente demonstrado para *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) resistente à toxina Cry1Ac (GUO et al. 2015ab). A subfamília ABCG está relacionada com funções de transporte de precursores do pigmento dos olhos, regulação de tráfico de lipídios e resistência a drogas pleiotrópicas (TARR et al, 2009). A resistência de *P. xylostella* a Cry1Ac dada pela forte supressão do transportador ABCG (GUO et al. 2015a) e a competição por sítios de ligação entre Cry1Ac e Cry1F (HERNANDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013, DAVALOS, et al., 2015; MONNERAT et al., 2015), permite hipotetizar que a resistência da linhagem de *S. frugiperda* à toxina Cry1F seja decorrente da supressão do transportador ABCG, a qual levaria à redução na formação de poros na membrana.

Além da participação de transportadores ABC na resistência de insetos a toxinas Cry, atuando também como um receptor, outras proteínas que interagem com toxinas Cry, como aminopeptidases, fosfatase alcalina e caderina, também são envolvidas na resistência de insetos. Apesar da maioria dos relatos de resistência de insetos a toxinas Cry ser comumente associado a mutações dos distintos receptores de toxina Cry da superfície do epitélio celular do mesêntero, principalmente caderina (GAHAN et al., 2001; HERRERO et al., 2005; GAHAN et al., 2010; FABRICK et al., 2011; ZHANG, et al., 2012; PARK et al., 2014), há também relatos de resistência de insetos a toxinas Cry devido a alterações na expressão de genes que interagem com essas toxinas, sejam eles receptores ou proteínas envolvidas na sua degradação e/ou sinalização (HERNÁNDEZ-MARTINEZ et al., 2010; TIEWSIRI; WANG, 2011; JURAT-FUENTES et al.; 2011; BOYER et al., 2012; CANCINO-RODEZNO et al., 2012; CONTRERAS et al., 2015; GONG et al.; 2015; VELLICHIRAMMAL et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Análises moleculares e proteômicas apontam a participação da regulação negativa da transcrição de aminopeptidase-1 (APN) na resistência de *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *S. exigua* à toxina Cry1Ac (HERRERO et al., 2005; TIEWSIRI; WANG, 2011), enquanto a redução nos níveis de expressão da fosfatase alcalina (ALP) foi observada como sendo o mescanismo de resistência de *S. litura* à essa mesma toxina (GONG et al.; 2015). Alteração na disponibilidade de ALP também foi verificada como mecanismo de resistência de população de *S. frugiperda* de Porto Rico à toxina Cry1F (JURAT-FUENTES et al.; 2011). Apesar dos relatos da participação de ALP e APN na resistência de insetos às toxinas Cry, nossas análises moleculares da expressão gênica comparativa de linhagens resistente e suscetível de *S. frugiperda* a Cry1F não apontam ALP e APN como mecanismos

único da resistência de insetos a toxinas Cry foi demonstrado para *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) em estudos de silenciamento gênico (GOMÈZ et al.; 2015).

A redução nos níveis do receptor caderina também tem sido sugerida como mecanismo de resistência às toxinas Cry, dada a menor disponibilidade de um receptor de Cry, assim como demonstrado pela disponibilização de sítios competidores de ligação (RAHMAN et al, 2012). No entanto, a expressão de genes caderina responde positivamente à exposição do inseto à toxinas Cry, e há insetos resistentes que apresentaram expressão aumentada do gene caderina se comparado ao inseto suscetível (LEI et al.; 2014; XU et al.; 2015). A linhagem de *S. frugiperda* resistente a Cry1F analisada apresentou dois transcritos caderina expressos diferencialmente entre lagartas resistentes e suscetíveis, os quais foram 9,8 (contig_12002) e 13,8 vezes (contig_24849) mais expressos no resistente do que no suscetível. Um terceiro transcrito caderina (contig 23093) só sofreu alteração em sua expressão quando as lagartas foram expostas à toxina Cry1F, independentemente de se tratar de lagarta suscetível ou resistente a Cry1F. Assim, os valores de expressão observados para alcalino fosfatases, aminopeptidases-N e caderina para a linhagem resistente de *S. frugiperda* à toxina Cry1F não indicam a participação dessas proteínas no mecanismo de resistência em questão.

A expressão de genes de proteínas-ligantes a quitina também foi demonstrada sofrer regulação positiva após a exposição do inseto ao contato com toxinas Cry (OPPERT et al., 2012), e a indução dessas proteínas parece estar ligada ao papel da membrana peritrófica (MP) como barreira para evitar o contato de toxinas com os receptores de membrana do epitélio intestinal (HAYAKAWA et al.; 2004). A membrana peritrófica atua como uma barreira contra bactérias patogênicas, mas toxinas Cry são capazes de se difundir através dela (ADANG; SPENCE, 1983). Embora as toxinas Cry consigam atravessar a MP, estudos de localização de sítios de ligação de toxinas Cry no intestino têm demonstrado que a MP é um local de acumulação de Cry em vários lepidópteros (HAYAKAWA et al, 2004; CHEN et al, 2005; REES et al, 2009). Segundo Valaitis e Podgwaite (2013), Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac se ligam fortemente à MP de Orgyia pseudotsugata (McDunnough) (Lepidoptera: Lymantriidae), promovendo a lise da MP. Assim, acreditamos que a elevada expressão de mucinas, importante componentes da membrana peritrófica (MP) de insetos (HEGEDUS et al, 2009; TOPRAK et al, 2010), nas linhagens RES e SUS em resposta à indução com toxina Cry1F e os elevados níveis de expressão constitutiva da linhagem resistente quando comparado ao da suscetível, indicam a participação dessas proteínas como mecanismo de proteção à intoxicação por Cry1F, minimizando o processo de lise da MP induzido pela ação

de Cry1F e, consequentemente, auxiliando na resistência do inseto a essa toxina. Além disso, a elevada expressão constitutiva de mucinas na linhagem resistente indicam o maior teor dessas proteínas complexadas à membrana peritrófica, o que pode reduzir a porosidade da mesma, fator esse também importante na determinação da suscetibilidade aos patógenos intestinais (WANG; GRANADOS, 1997). Segundo Yao et al (2014), a regulação negativa de um gene de quitinase e a regulação positiva da quitina-sintase e glicosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) podem atuar como mecanismo de defesa em resposta à ingestão de Cry1Ab por lagartas de Ostrinia nubilalis (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). É possível que a MP sequestre as toxinas Cry ou impeca sua passagem devido sua composição e espessura e, em seguida, proteases associadas à MP, podem então clivar a toxina tornando-a inativa (REES et al, 2009). Verificamos níveis de expressão elevados de proteínas associadas à MP na linhagem RES, e esses são aumentados ainda mais quando as lagartas se alimentam de Cry1F. Estes resultados sugerem que a linhagem resistente tem menor permeabilidade da MP, diminuindo a capacidade da toxina Cry1F atravessá-la e se ligar aos receptores CAD, APN e ALP. Porém, as informações da importância da MP associada à perda da suscetibilidade de insetos pragas para toxinas Cry não são bem compreendidas.

3.5 Conclusão

• As linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F diferem no seu padrão de expressão gênica;

 Lagartas da linhagem resistente apresentam superexpressão constitutiva de genes ligados à diferentes mecanismos de resistência;

• A resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1F está associada à maior expressão das enzimas monoxigenases do citocromo P450 e glutationa-s-transferases, que auxiliam no processo de detoxificação, à redução da expressão gênica do transportador ABCG2, que reduz a produção de poros na membrana do epitélio intestinal, e à maior expressão de mucinas, que atuam na manutenção da integridade da membrana peritrófica e proteção do epitélio intestinal do inseto.

Referências

ADANG, M. J.; SPENCE, K.D. Permeability of the peritrophic membrane of the Douglas fir tussock moth (*Orgyia pseudotsugata*).**Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Philadelphia, v. 75, n. 2, p. 233-238. 1983.

AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.

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.

ANDREWS, S. FASTqc: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<u>http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc</u>> acesso em: ago.2015.

ATSUMI, S.; MIYAMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; NARUKAWA, J.; KAWAI, S.; SEZUTSU, H.; KOBAYASHI, I.; UCHINO, K.; TAMURA, T.; MITA, K.; KADONO-OKUDA, K.; WADA, S.; KANDA, K.; GOLDSMITH, M.R.; NODA, H. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings National of Academy Science**, Washington, n. 109, 2012, Disponível em: < doi: 10.1073/pnas.1120698109>.

AYRA-PARDO, C.; RAYMOND, B.; GULZAR, A.; RODRIGUEZ-CABRERA, L.; MORAN-BERTOT, I.; CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L.A. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. **Molecular and Cell Proteomics**, Rockville, n. 2, p. 19–28, 2003.

BARIAMI, V.; JONES, C.M.; POUPARDIN, R.; VONTAS, J.; RANSON, H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2012, Disponível em: <doi:10.1371/journal.pntd.0001692>.

BAXTER, S.W.; BADENES-PEREZ, F.R.; MORRISON, A.; VOGEL, H.; CRICKMORE, N.; KAIN, W.; WANG, P.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. **Genetics**, New York, n.189, 2011, Disponível em: < doi: 10.1534/genetics.111.130971>.

BOYER, S.; PARIS, M.; JEGO, S.; LEMPÉRIÈRE, G.; RAVANEL, P. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, Maryland Heights, v. 62 p. 75–81, 2012.

BRAVO, A.; SOBERON, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 41, p. 423-431, 2011a.

BRAVO, A.; DEL RINCON-CASTRO, M.C.; IBARRA, J.E.; SOBERÓN, M. Towards a healthy control of insect pest: potential use of microbial insecticides. In: LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. (Ed.). Green trends in insect control. Cambride:Royal Society of Chemistry, 2011b. p. 266-299.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Diferent Models of the mode of action of Bt 3d-Cry toxins. Disponível em:</www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2015/20153137249.pdf > Acesso em:03/2016.

BROEHAN, G.; KROEGER, T.; LORENZEN, M.; MERZENDORFER, H. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 6, p.1-8, 2013.

BUSS, D.S.; CALLAGHAN, A. Interaction of pesticides with P-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 90, n. 3, p. 141-153, 2008.

CAMPAGNE, P.; KRUGER, M.; PASQUET, R.; LE, R.U.B.; VAN DEN BERG, J. Dominant inheritance of field-evolved resistance to Bt corn in *Busseola fusca*. **PLOS ONE**, San Francisco, v.8, n. 7, 2013, Disponível em: < doi:10.1371/journal.pone.0069675>.

CANCINO-RODEZNO, A.; LOZANO, L.; OPPERT, C.; CASTRO, J.I.; LANZ-MENDOZA, H.; ENCARNACIÓN, S.; BRAVO, A. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pone.0037034>.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L.A.;. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. **Molecular and Cell Proteomics**, Rockville, v.2, n. 1, p. 19-28, 2003.

CAPINERA, J.L. **Fall Armyworm**, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Gainesville: Univers, 2008. 6 p. (EENY098). Disponível em: http://www.edis.ifas.ufl.edu. Acesso em: 02/2011.

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, 2013, Disponivel em: < doi: 10.1371/journal.pone.0062268>.

CHEN, J.; BROWN, M.R.; HUA, G.; ADANG, M.J. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Cell and tissue research**, Heidelberg, v. 321, n. 1, p. 123-129. 2005.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, 2008, Disponível em: < doi: 10.1155/2008/619832>.

CONTRERAS, E.; RAUSELL, C.; REAL, M.D. *Tribolium castaneum* Apolipophorin-III acts as an immune response protein against *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxic activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, n. 113, p. 209–213, 2013.

CONTRERAS. E.; BENITO-JARDÓN, M.; LÓPEZ-GALIANO, M.J.; REAL, M.D.; RAUSELL, C. *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, Kidlington, v.50, p. 139-148, 2015.

DAVALOS, C.C.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; CRIALESI-LEGORI, P.C.B.; DESIDÉRIO, J.A.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; LEMOS, MV. F. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cambidae). Journal of Invertebrate Pathology, Maryland Heights, v. 127, p. 32-34, 2015.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research**, New York, v. 11, n. 7, p. 1156-1166, 2001.

DHURUA, S.; GUJAR, G.T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science,** Malden, v. 67, n. 8, p. 898-903, 2011.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 14, p. 3–8, 2005.

EPIS, S.; PORRETTA, D.; MASTRANTONIO, V.; COMANDATORE, F.; SASSERA, D.; ROSSI, P.; BANDI, C. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*.**Parasit & Vectors**, London, v. *7*, n. 349, p. 2-7, 2014.

FABRICK, J.A.; MATHEW, L.G.; TABASHNIK, B.E.; LI, X. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 20, p. 651-665, 2011.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; dos DANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 150-158, 2014.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 507-533, 1999.

GAHAN, L.J.; GOULD, F.; HECKEL, D.G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science, Washington, v. 293, p. 857-860, 2001.

GAHAN, L.J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D.G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 6, 2010, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pgen.1001248>.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; KEWESHAN, R.S.; DUNBAR, M.W. Field-evolved resistance to Bt Maize by Western corn rootworm. **PLOS ONE**, San Franscisco, v. 6, n. 7, 2011, Disponível em: < doi:10.1371/journal.pone.0022629>.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, A.M.; INGBER, D.A.; KEWESHAN, R. S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **Proceedings of National Academy Science**, Washington, v. 111, n. 14, p. 5141-5146, 2014.

GÓMEZ, I.; FLORES, B.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*. **Peptides**, Philadelphia, v. 68, p. 130-133, 2015.

GONG, L.; WANG, H.; QI, J.; HAN, L.; HU, M.; JURAT-FUENTES, J.L. Homologs to Cry toxin receptor genes in a *denovo* transcriptome and their altered expression in resistant *Spodoptera litura* larve. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 129, 2015, Disponível em: < doi:10.1016/jip.2015.05.008>.

GRIFFITTS, J.S, AROIAN, R.V. Many roads to resistance: How invertebrates adapt to Bt toxins. **Bioessays**, Chichester, v. 27, p. 614–624, 2005.

GUENGERICH, F.P.Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical research in toxicology**, Washington, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C.; MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2558-2563. 2005.

GUO, Z.; KANG, S.; CHEN, D.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHU, X.; BAXTER, S.W.; ZHOU, X.; JURAT-FUENTES, J.L.; ZHANG, Y. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 11, 2015a, Disponível em: < doi: 101371/journaç.pgen.1005124>.

GUO, Z.; KANG, S.; ZHU, X.; XIA, J.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. Down-regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.59, p. 30–40, 2015b.

HAYAKAWA, T.; SHITOMI, Y.; MIYAMOTO, K.; HORI, H. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. **FEBS letters**, Chichester, v. 576, n. 3, p 331-335. 2004.

HECKEL, D.G. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. **Pesticide Biochemiatry and Physiology**, Maryland Heights, v. 104, p. 103–111, 2012.

HECKEL, D.G.; GAHAN, L.J.; BAXTER, S.W.; ZHAO, J.Z.; SHELTON, A.M. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, p. 192–197, 2007.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v. 54, p 285-302. 2009.

HERNÁNDEZ, C.S.; FERRÉ, J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera, Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua*. **Applied and Environ Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5627-5629, 2005.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NAVARRO-CERRILO, G.; DE MAAGD, R.A.; MOAR, W.J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S. Constitutive Activation of the Midgut Response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-Resistant *Spodoptera exigua*, **PLOS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 9, 2010, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pone.0012795>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, 2013, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.ponr.0068164>.

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P.L.; MOAR, W.J.; DE MAAGD, R.A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 96, 2005, Disponível em: < doi: 10.1186/1471-2164-6-96>.

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**, Chichester, v. 140, p. 1-16, 2011.

HUANG, F.; LEONARD, B.R; ANDOW, D.A. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 100, n. 1, p. 164-171, 2007.

HUDSON, M.E. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology, **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, n.1, 2008, Disponível em: <doi: 10.1111/j.1570-7458.2011.01138.x>.

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with fiel-evolved resistence to bt maize are susceptible to bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 122, p. 52-54, 2014.

JAKOBY, W.B.; ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. Journal of Biological Chemistry, v. 265, n. 34, p 20715-20718. 1990.

JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. A proteomic approach to study resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in *Heliothis virescens* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, v. 95, n. 3, p. 187–191, 2007.

JURAT-FUENTES JL, KARUMBAIAH L, JAKKA SRK, NING C, LIU C, et al. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n.3, 2011, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0017606>.

KASTER JR., P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P.Dados biologicos 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.

KÖNIG, J.; NIES, A.T.; CUI, Y.; LEIER, I.; KEPPLER, D.Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, Orlando, v. 1461, n. 2, p. 377-394, 1999.

LABBÉ, R.; CAVENEY, S.; DONLY, C. Genetic analysis of the xenobiotic resistanceassociated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. **Insect Molecular Biology**, St Albans, v. 20, n. 2, p. 243-256, 2011.

LEI, Y.; ZHU, X.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; GUO, Z.; XU, B.; LI, X.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Gene**, Amsterdam, v. 533, p. 180–187, 2014.

LI, Y.; FARNSWORTH, C.A.; COPPIN, C.W.; TEESE, M.G.; LIU, J.W.; SCOTT, C.; ZHANG, X.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. Organophosphate and pyrethroid hydrolase activities of mutant esterases from the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*.**PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n.10, 2013, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0077685>.

LIU, F.X.Z.; ZU, Y.C.H.F.; WANG, Y.; LI, H.; GAO, C.; ZHOU, W.; SHEN, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northen China. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, p.156-161, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ method. **Methods**, Maryland Heights, v. 25, p. 402-408, 2001.

MANNAKKARA, A.; NIU, L.; MA, W.; EI, C. Zero effect of Bt rice on expression of genes coding for digestion, detoxification and immune responses and developmental performances of Brown Planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 10, p. 985-993, 2013.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; SOARES, M.S.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Evidence of fieldevolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLOS ONE**, San Francisco, v 10, n 4, 2015, Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0119544>.

NARAYANAN, K. Insect defence: its impact on microbial control of insect pests. **Current Science**, Rajasthan, v. 86, n. 6, p. 800-814, 2004.

NASCIMENTO, A.R.B.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, London, v. 21, n. 16, 2015, Disponível em: <doi:10.1186/s12864-015-2183-z>.

NAVARRO-CERRILLO, G.; HERN_ANDEZ-MART_INEZ, P.; VOGEL, H.; FERR_E, J. AND HERRERO, S. A new gene superfamily of pathogenresponse (repat) genes in Lepidoptera: classification and expression analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Phyladelphia, v. 164, p. 10–17, 2013.

OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Fieldevolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Chichester, 2016, Disponível em: <doi: 10.1002/ps.4201>.

OPPERT, B.; DOWD, S.E.; BOUFFARD, P.; LI. L.; CONESA, A.; LORENZEN, M.D.; TOUTGES, M.; MARSHALL, J.; HUESTIS, D.L.; FABRIC, J.; OPPERT, C.; JURAT-FUENTES, J.L. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012, Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0034624>.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, p. 3-22, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; GOMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBEÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, Washington, v. 45, n. 34, p. 10329–10336, 2006.

PARK, J.W.; KIM, C.H.; RUI, J.; PARK, K.H.; RYU, K.H.; CHAI, J.H.; HWANG, H.O.; KUROKAWA, K.; HA, N.C.; SÖDERHILL, I.; SÖDERHILL, K.; LEE, B.L.Beetle immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology, New Yorkv 708, p. 163–180, 2010.

PARK, Y.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, R.M.; NAVARRO-CERRILLO, G.; CHAKROUN, M.; KIM, Y.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; FERRÉ, J.; HERRERO, S. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. **BMC Biology**, London, v. 12, n. 46, 2014, Disponível em: <doi: 10.1186/1741-7007-12-46>.

PEREIRA, E.J.G.; LANG, B.A.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 115-121, 2008.

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.

RAHMAM, K.; ABDULLAH, M.A.F.; AMBATI, S.; TAYLOR, M.D.; ADANG, M.J. Differential Protection of Cry1Fa Toxin against *Spodoptera frugiperda* Larval Gut Proteases by Cadherin Orthologs Correlates with Increased Synergism. **Applied and Environental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 354-362, 2012.

REES, J.S.; JARRETT, P.; ELLAR, D.J. Peritrophic membrane contribution to *Bt* Cry deltaendotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 100, n. 3, p. 139–146, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (3Ed.). **Molecular cloning**: A laboratory manual.New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344p.

SCHLICHTING, I.; BERENDZEN, J.; CHU, K.; STOCK, A.M.; MAVES, S.A.; BENSON, D.E.; SWEET, R.M.; RINGE, D.; PETSKO, G.A.; SLIGAR, S.G. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. **Science**, Washington, v. 287, n. 5458, p. 1615-1622, 2000.

SOUZA, T.P. **Efeitos dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de** *Spodoptera frugiperda.* 2013. 85p. (Tese Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TABASHINIK, B.E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÉRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 510-521, 2013.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 1999-2002, 2008.

TARR, P.T.; TARLING, E.J.; BOJANIC, D.D.; EDWARDS, P.A.; BALDAN, A. Emerging new paradigms for ABCG transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, Orlando, v. 1791, p. 584-593, 2009.

TAY, W.T.; MAHON, R.J.; HECKEL, D.G.; WALSH, T.K.; DOWNES, S.; JAMES, W.J.; GORDON, K. H. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab Is Conferred by Mutations in an ABC Transporter Subfamily A Protein. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 11,n.11, 2015, Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.org.pgen.1005534>.

TIEWSIRI, K.; WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceedings of National** Academy Sciences, Washington, v. 108, p. 14037–14042, 2011.

TOPRAK, U.; BALDWIN, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; HEGEDUS, D.D. Insect intestinal mucins and serine proteases associated with the peritrophic matrix from feeding, starved and moulting *Mamestra configurata* larvae. Insect molecular biology, Chichester, v. 19, n. 2, p. 163-175. 2010.

VALAITIS, A.P.; PODGWAITE, J.D. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding glycoconjugates present on the brush border membrane and in the peritrophic membrane of the Douglas-fir tussock moth are peritrophins. **Journal of invertebrate pathology**, San Diego, v. 112, n. 1, p. 1-8, 2013.

VAN MUNSTER, M.; PRÉFONTAINE, G.; MEUNIER, L.; ELIAS, M.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 16, n. 1, p. 25-35, 2007.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

VELLICHIRAMMAL, N.N, WANG, H.; EYUN, S-I, MORIYAMA, E.N.; COATES, B.S.; MILLER, N.J.; SIEGFRIED, B.D. Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin. **BMC Genomics,** London, v. 16, n.558, 2015, Disponível em: <doi: 10.1186/s12864-015-1751-6>.

VONTAS, J.G.; SMALL, G.J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemistry Journal**, Bussum, v. 357, p.65–72, 2001.

WANG, P.; GRANADOS, R.R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 13, p. 6977-6982.1997.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomic. **Nature Reviews Genetics**. London, v. 10, n. 1, 2009, Disponível em: <doi: 10.1038/nrg2484>.

WELCH, K.L.; UNNITHAN, G.C.; DEGAIN, B.A.; WEI, J.; ZHANG, J.; LI, X.; TABASHNIK, B.E.; CARREIÈRE, Y. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 132, p.149-156, 2015.

XIAO, Y.; ZHANG, T.; LIU, C.; HECKEL, D.G.; LI, X.; TABASHNIK, B.E.; WU, K. Missplicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. **Scientific reports**, London, v. 4, n.6184, 2014, Disponível em: <doi:10.1038/srep06184>.

XU, L.N.; WANG, Y.; WANG. Z.; HU, B.; LING, Y.; HE, K. Transcriptome differences between Cry1Ab resistant and susceptible strains of Asian corn borer. **BMC Genomics**, London, v. 16, 2015, Disponível em: <doi:10.1038/srep06184>.

YAO, J.; BUSCHMAN, L.L.; LU, N.; KHAJURIA, C. AND ZHU, K.Y. Changes in gene expression in the larval gut of *Ostrinia nubilalis* in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1ab protoxin ingestion. **Toxins**, Oxford, v. 6, p. 1274–1294, 2014.

ZDOBNOV, E.M.; APWEILER, R. InterProScan: an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 847-848, 2001.

ZHANG, H.; TIAN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, J.; LIU, C.; TABASHNIK, B.E. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10275-10280, 2012.

ZHANG, X.; KAIN, W.; WANG, P. Sequence variation and differential splicing of the midgut cadherin gene in *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, p. 712-723, 2013.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR.; L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZHU, Y.C.; BLANCO, C.A.; PORTILLA, M.; ADAMCZYK, J.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 122, p. 15-21, 2015.

4 ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA DO INTESTINO DE LAGARTAS DE LINHAGENS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SUSCETÍVEL E RESISTENTE ISOGÊNICA À TOXINA Cry1F

Resumo

Insetos, em geral, se adaptam rapidamente às diferentes táticas de controle, sejam elas baseadas em inseticidas orgânicos ou plantas geneticamente modificadas, como as plantas Bt. Inúmeros casos de resistência de insetos às toxinas Bt (Cry) têm sido relatado em laboratório e campo, como os da resistência de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1F e Cry1Ab em populações naturais. Nesse trabalho, utilizamos o sequenciamento de RNA (RNAseq) em larga escala para a realização de estudos comparativos da expressão de genes do intestino de lagartas de linhagens de S. frugiperda suscetivel (SUS) e resistente isogênica (RESiso), induzidas ou não com toxina Cry1F, para a identificação de mecanismos ligados à resistência à toxina Cry1F, bem como os mecanismos de resposta desencadeados pela intoxicação com essa toxina. O transcritoma de novo de referência obtido apresentou 10.289 transcritos, dos quais pouco mais de 40% foram anotados. Análises comparativas da expressão gênica indicaram a supressão na expressão dos receptores de toxinas Cry, como as proteínas caderina e transportadores ABCb1 na linhagem RESiso, quando comparadas à expressão na linhagem SUS. Redução na expressão gênica dos receptores de toxina Cry, a caderina e aminopeptidase n6, também foi observada na linhagem SUS, mas apenas quando a mesma foi induzida com Cry1F. A linhagem RESiso também apresentou maior taxa de expressão de transcritos relacionados à degradação de toxinas Cry, como proteases, detoxificação e resposta imunológica. A indução de alterações na expressão gênica de lagartas quando expostas à toxina Cry1F foi muito mais evidente na linhagem SUS do que na RESiso, indicando que os níveis de transcrição gênica constitutiva no RESiso seriam equivalentes aos níveis de transcrição esperados após o contato com a toxina. As análises realizadas indicaram que a resistência de S. frugiperda à toxina Cry1F é decorrrente de um conjunto de fatores, como a redução na taxa de expressão de receptores caderina e transportador ABC, maior expressão de transcritos ligados à proteólise e detoxificação e de transcritos ligados ao sistema de defesa imunológico e de resposta de defesa ao processo de intoxicação pela toxina Cry1F. Este estudo expande as ideias sobre os principais mecanismos envolvidos na resistência e na resposta à intoxicação por Cry1F em S. frugiperda.

Palavras-chave: Defesa imunológica; Expressão constitutiva; Proteólise; Transportador ABC

Abstract

Insects generally become quickly adapted to different control strategies regardless if they are based on synthetic organic insecticides or on genetically-modified plants, such as Bt plants. There is a growing body of reports on insect resistance to Bt toxins (Cry) in filed populations and laboratory-selected strains, as the reports on Cry1F and Cry1Ab resistance for *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). We report data on our investigation on the molecular mechanisms involved in the resistance and response of *S. frugiperda* to intoxication with Cry1F by using large scale, comparative RNA sequencing analysis (RNASeq) of the gut of susceptible (SUS) and resistant (RESiso) larvae of *S. frugiperda*, induced or not with Cry1F toxin. RNA sequencing yielded a reference *de novo* transcriptome with 10,289 transcripts, out of which nearly 40% were annotated. Comparative gene expression analysis demonstrated suppression of the Cry toxin receptors cadherin and ABCb1 transporters in the gut of RESiso larvae when compared to SUS. Reduction in gene expression of the Cry toxin receptors cadherin and aminopeptidase-n6 was also observed in SUS larvae, but only when intoxicated with Cry1F. Differential gene expression also demonstrated higher expression of proteases involved in Bt toxin degradation and enzymes/transporters involved in detoxification and immune response in RESiso as compared to SUS larvae. Changes in gene expression due to intoxication with Cry1F were much more conspicuous in SUS than in RESiso larvae, indicating RESiso larvae express most of the genes involved in the response against the intoxication with Cry1F constituvely. Thus, analyses of our data indicate *S. frugiperda* resistance to Cry1F toxin is associated to multiple factors, such as the reduced expression of the Cry-receptors cadherin and ABC transporters, increased expression of transcripts involved with Cry proteolysis and detoxification and immune response, and the constitutive expression of genes involved in the response against the intoxication with Cry1F toxin is of insect resistance against Cry toxins and on the response of *S. frugiperda* to the intoxication with Cry1F toxin.

Keywords: ABC transporter; Constitutive expression; Immune defense; Proteolysis

4.1 Introdução

Insetos têm demonstrado rápida adaptação a diferentes táticas de controle, principalmente a inseticidas e, mais recentemente, a culturas Bt, devido à constante pressão de seleção e à falta de plantio ou manutenção de áreas de refugio. A evolução da resistência a culturas Bt é observada em diferentes insetos-alvo, tornando-se a principal ameaça para a utilização dessa tecnologia (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

Com o aumento da comercialização de plantas *Bt* e seu uso indiscriminado, vários casos de seleção direcionada para resistência em laboratório (FORCADA et al., 1999; LIU et al., 2001; AKHURST et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012) e de evolução de resistência a campo foram relatados para insetos-pragas, principalmente lepidópteros (VAN RENSBURG, 2007; TABASHNIK et al., 2009; STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014; GASSMANN et al., 2014).

Em geral, a exposição às toxinas *Bt* resulta na alteração de diferentes mecanismos de resistência, incluindo alterações na ativação ou na ligação das toxinas, alterações nas vias oxidativas e na resposta imunológica do inseto-alvo, ou em seu metabolismo em geral (PARK et al.; 2014; CONTRERAS et al.; 2013; NAVARRO-CERRILLO et al.; 2013; YAO et al.; 2014; AYRA-PRADO et al.; 2015).

A interação das toxinas Cry com os receptores do epitélio da membrana intestinal dos insetos, como caderina (CAD), aminopeptidase N (APN), fosfatase alcalina (ALP) e transportadores ABC (ABCs) é um importante passo para oligomerização da proteína Cry e sua inserção na membrana e/ou transdução do sinal que desencadeia a morte celular (ZHANG

et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008). Dessa forma, a resistência é comumente associada a alterações na expressão desses receptores (HECKEL, 2012; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; BRAVO et al., 2015). Estudos têm demonstrado que a supressão de CAD, APN, ALP e ABCs está relacionado a altos níveis de resistência de inúmeros insetos-pragas a diferentes toxinas Cry (HERRERO et al., 2005; SOBERÓN et al., 2007; YANG et al., 2011; ATSUMI et al., 2012; HECKEL, 2012; GUO et al., 2015b; JAKKA et al., 2015).

Outro mecanismo de defesa de insetos contra toxinas Cry é o aumento na expressão de enzimas que participam no processo de detoxificação do organismo, como enzimas citocromo P450, glutationa-s-transferases (GSTs) e esterases (CANCINO-RODEZNO et al.; 2012; VELLECHIRAMMAL et al., 2015). De forma geral, essas enzimas participam da hidrólise e/ou sequestro de xenobióticos (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011; NASCIMENTO et al., 2015) e diversos trabalhos têm demonstrado que essas enzimas também respondem à intoxicação com toxinas Cry, e o aumento da expressão dessas enzimas têm sido relacionado à resistência de diferentes ordens de insetos a inúmeras toxinas Cry (CANDAS et al., 2003; VAN MUNSTER et al., 2007; CANCINO-RODEZNO et al.; 2012; VELLECHIRAMMAL et al., 2015). Apesar dos relatos da elevada expressão das enzimas participantes no processo de detoxificação, não se sabe ao certo como estas enzimas poderiam estar envolvidas no mecanismo de resistência ou tolerância às toxinas Cry.

Outro fator que pode contribuir para a resistência ou tolerância a toxinas Cry é a imunidade inata contra potenciais patógenos. Essa imunidade envolve uma série de reações que incluem coagulação e melanização da hemolinfa, ativação de cascatas de enzimas, como a cascata de fenoloxidases, e a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (HEDENGREN et al., 1999; BECKAGE, 2008; PARK et al., 2010; TSAKAS; MARMARAS, 2010). Segundo Cancino-Rodezno et al., (2010), a ativação das vias MAPK p38 e JNK respondem especificamente a proteínas formadoras de poros no epitélio, como as proteínas Cry. A superexpressão de genes como MAPK p38, apolipoforinas, proteínas de choque térmico (HSP), lipases, fosfolipases, REPAT, é constantemente relatada em insetos resistentes ou expostos a toxinas Cry (CANCINO-RODEZNO et al., 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; CANTON et al., 2015; CONTRERAS et al., 2015).

Além de superar os mecanismos relatados anteriormente, uma das primeiras barreiras que as proteínas Cry necessitam ultrapassar antes de ligar-se aos receptores do epitélio intestinal é a membrana peritrófica (MP). Esta membrana atua como uma barreira contra bactérias patogênicas, mas toxinas Cry são capazes de se difundir através dela (ADANG; SPENCE, 1983). Embora as toxinas Cry consigam atravessar a MP, estudos de localização de

sítios de ligação de toxinas Cry no intestino têm demonstrado que a MP é um local de acumulação de Cry em vários lepidópteros (HAYAKAWA et al, 2004; CHEN et al, 2005; REES et al, 2009). A expressão positiva de genes de proteínas-ligantes a quitina, mucinas e peritrofinas, importantes componentes da membrana peritrófica, bem como regulação positiva da quitina-sintase e glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT), podem atuar como mecanismo de defesa para manter a integridade do sistema intestinal (OPPERT et al., 2012; VALAITIS; PODGWAITE, 2013; YAO et al., 2014). Alguns estudos sugerem a ligação da superexpressão dessas proteínas ao papel da membrana peritrófica (MP) como barreira para evitar o contato de toxinas com os receptores de membrana do epitélio intestinal (HAYAKAWA et al.; 2004). A expressão positiva desses genes, dessa forma, pode estar relacionada à capacidade da MP em impedir a passagem das toxinas Cry devido sua composição e espessura ou ainda à tentativa de manter sua integridade (HAYAKAWA et al, 2004; CHEN et al, 2005; VALAITIS; PODGWAITE, 2013).

S. frugiperda é umas das principais pragas agrícolas na região Neotropical (CAPINERA, 2008), e já demonstrou habilidade em evoluir resistência em condições de campo a duas toxinas *Bt*, como Cry1F e Cry1Ab (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016). Sendo assim, uma análise da expressão diferencial de transcritos intestinais entre linhagens suscetível e resistente isogênica, pode levar a um melhor entendimento dos mecanismos de resistência, bem com as vias de defesa que são alteradas em *S. frugiperda* mediante a exposição à toxina Cry1F.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Linhagens e manutenção de S. frugiperda

O projeto utilizou linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS) e resistente isogênica (RESiso) à toxina Cry1F. A população suscetível foi obtida junto à EMBRAPA Sete Lagoas, MG em 1995, e tem sido mantida em laboratório sem a adição de indivíduos de campo e na ausência de pressão de seleção. A população resistente isogênica RESiso foi produzida via introgressão por cruzamentos sucessivos (HORIKOSHI, et al., 2015) entre linhagens suscetível e resistente selecionada em laboratório (FARIAS et al., 2014). A linhagem selecionada para resistência à toxina Cry1F foi coletada em Barreiras, estado da Bahia, Brasil, em áreas de cultivo comercial de milho Bt Herculex TC1507 (Dow Agrosciences), que expressa a toxina Cry1F. Essa população foi produzida por Farias et al., (2014) pelo processo de seleção direcionada em laboratório, que levou à seleção de linhagem com razão de

resistência de cerca de 280 a 5.524 vezes à Cry1F em relação à linhagem suscetível de referência. Ambas as populações SUS e RESiso foram mantidas em condições controladas de laboratório (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 h) em dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura (KASTEN Jr. et al., 1978).

4.2.2 Preparo e coleta das amostras biológicas de S. frugiperda

Lagartas de *S. frugiperda* das linhagens suscetível (SUS) e resistente isogênica (RESiso) à toxina Cry1F foram selecionadas na fase de pré-muda do terceiro para o quarto ínstar e mantidas isoladas em placas de acrílico de 24 células (Costar[®], Cambridge, Massachusetts, EUA), sem acesso à alimentação por 24 h. Apenas as lagartas que realizaram a muda para o 4º ínstar nesse intervalo foram utilizadas na condução dos experimentos. Essas lagartas foram então divididas em subgrupos dentro de cada linhagem. Um subgrupo foi mantido como controle, enquanto o outro foi exposto à toxina Cry1F. Lagartas SUS e RESiso foram expostas individualmente a toxina Cry1F. O procedimento de exposição dos subgrupos à toxina Cry1F foi realizado de forma análoga àquela descrita anteriormente (Capítulo 3 item 3.2.2). Após o período de exposição à toxina Cry1F, apenas as lagartas que ingeriram a dieta, verificada pela raspagem da mesma, foram amostradas e submetidas à imediata dissecação para a coleta do intestino médio em solução de RNA Later refrigerada, em condições assépticas. O intestino coletado foi rapidamente transferido para tubo contendo solução nova de RNA Later e armazenado a -80° C para posterior extração do RNA total. Cada tratamento contou com três repetições, sendo cada repetição composta por grupo de cinco intestinos.

4.2.3 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi enriquecido em RNA mensageiro (mRNA) pela remoção do RNA ribossomal (rRNA), utilizando-se o sistema comercial RiboMinus Eukaryote Kit (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. O enriquecimento e a quantificação do mRNA foram realizados assim como descrito anteriormente (ver capítulo 3 item 3.2.3). As amostras de mRNA foram encaminhadas 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 Illumina, Hiseq 1000[®] (Illumina[®]).

Para a construção da biblioteca de cDNA, as amostras de mRNA foram fragmentadas em porções de 200 nucleotídeos e ligadas a iniciadores randômicos para realização da transcrição reversa. O cDNA produzido foi purificado utilizando-se esferas magnéticas e lavagens com etanol para reparação de suas terminações, para que cada molécula apresentasse extremidades abruptas. Após a reparação, foi adicionado adenosina à extremidade 3' de cada fragmento, permitindo, assim, a ligação de indexadores para a diferenciação das bibliotecas produzidas para cada amostra. O sequenciamento das bibliotecas de cDNA seguiu o protocolo paired-end, originando leituras de aproximadamente 100 nucleotídeos.

4.2.4 Construção do transcritoma de novo

As leituras do sequenciamento das bibliotecas de cDNA das linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica, expostas ou não à toxina Cry1F, foram utilizadas na construção do transcritoma *de novo*. Essas leituras foram avaliadas quanto à sua qualidade utilizando o software FastQC (ANDREWS, 2010). A partir destes resultados foi realizada a filtragem das sequências, utilizando como ponto de corte o valor Q30 da escala de Phred. As leituras duplicadas foram removidas para diminuir o esforço computacional utilizando-se de plug-in disponível junto ao programa CLC Genomics Workbench® versão 5.1 (CLCBio, Denmark). Posteriormente, apenas leituras de tamanho superior a 25 bases foram utilizadas na montagem do transcritoma *de novo*, utilizando como parâmetros de montagem K-mer = 23 como tamanho de palavra e 50 como tamanho da bolha ("bubble size"), também fazendo uso das ferramentas disponíveis no pacote CLC Genomics Workbench® versão 5.1. A estratégia de montagem do transcritoma de referência seguiu a montagem dos transcritomas *de novo* das linhagens SUS (induzida ou não) e RESiso (induzida ou não), com posterior união dos transcritomas pela remoção de redundâncias utilizando-se do programa CD-HIT (Weizhong Li's Group[©]), com limite de similaridade de 95%.

4.2.5 Anotação funcional

A anotação funcional do transcritoma *de novo* obtido foi realizada com auxilio do programa Blast2GO v.2.5.0 (http://www.blast2go.org) (CONESA; GÖTZ, 2008). A busca por similaridade dos transcritos foi realizada no Banco de Dados do NCBI assumindo *e*-valor de 10⁻³, usando o algoritmo BLASTx (ALTSCHUL et al., 1997). Posteriormente, os transcritos foram mapeados para a identificação dos termos de ontologia gênica (GO), utilizando o

programa Blast2GO v.2.5.0. Para obter a anotação funcional dos GOs, as sequências foram comparadas com aquelas de bancos de dados de assinatura proteica pelo InterproScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001), assumindo *e*-valor de 10⁻⁵ como valor de corte. Os dados de GO foram carregados no programa WEGO (http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl) para a representação gráfica de suas classificações funcionais.

4.2.6 Análise da expressão gênica diferencial (RNAseq)

O transcritoma *de novo* obtido foi utilizado como referência para a análise da expressão gênica diferencial entre as amostras SUS e RESiso, induzidas ou não pela alimentação em dieta contendo a toxina Cry1F. A expressão relativa de cada transcrito foi calculada utilizando-se a contagem do número de leituras semelhantes por kilobase (kb) do alvo por milhão de leituras mapeadas (RPKM). Os valores de RPKM obtidos para os contigs das linhagens SUS e RESiso, induzida ou não com a toxina Cry1F, foram submetidos à análise diferencial, seguindo o protocolo EDGE (ROBINSON; SMYTH, 2008) disponível no CLCBio Genomics Workbench® versão 5.1. Foram considerados diferencialmente expressos aqueles transcritos que apresentaram valor de $p \le 0,05$ e razão de expressão (*fold change*) maior ou igual a 2 (superexpressão) ou menor ou igual a -2 (subexpressão).

4.3 Resultados

4.3.1 Transcritoma de novo de referência

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA de *S. frugiperda* suscetível e resistente a toxina Cry1F, induzidas ou não, gerou 316.878.124 milhões leituras variando de 75.298.427 (SUS) a 86.401.681 (RES). Após a filtragem por qualidade e a remoção das leituras duplicadas foram obtidos 56.090.466 leituras, das quais 68% foram mapeadas e utilizadas na montagem de 10.289 contigs de 125 a 4.124 pb, com N50 de 396 pb (Figura 4.1).



Figura 4.1 - Tamanho dos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina

4.3.2 Anotação funcional

A análise de similaridade baseada no *e-valor* indicou forte homologia para a maioria dos transcritos mapeados, variando de 10^{-7} a 10^{-918} , sendo que 81% estão com *e-valor* entre 10^{-7} e 10^{-151} (Figura 4.2.).



Figura 4.2 - Distribuição dos valores de homologia dos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina

A quase totalidade dos alinhamentos obtidos para os transcritos do transcritoma *de novo* de referência obtido foi similar a sequências de outras espécies de lepidópteros (Figura 4.3), sendo 25% deles semelhantes a transcritos de *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera:

Bombycidae) e 21% a *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). Cerca de 3% das sequências alinharam com espécies de *Spodoptera*, distribuídos entre *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) e *S. frugiperda* (Figura 4.3).

A anotação funcional dos transcritos obtidos foi comparada com base na similaridade com transcritos já descritos no banco de dados não-redundantes (*nr*) de nucleotídeos NCBI. Dos 10.289 transcritos obtidos, 40% foram anotados funcionalmente. A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 4.120 transcritos distribuidos nas três categorias, rendeu 16 subcategorias em *componente celular*, 15 em *função molecular* e 28 em respectivamente (Figura 4.4). No geral o número de transcritos anotados em cada subcategoria foi similar entre as linhagens SUS e RESiso (Figura 4.4).



Figura 4.3 - Distribuição dos alinhamentos obtidos via BLASTx dos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina



Figura 4.4 - Distribuição das ontologias gênicas (GO) atribuídas aos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina

4.3.3 Expressão diferencial

A comparação da expressão gênica no intestino de lagartas dos insetos suscetíveis (SUS) e resistentes (RESiso) indicou que a quase totalidade (99,9%) dos 10.289 transcritos do transcritoma *de novo* de referência obtido foram expressos constitutivamante em uma e/ou outra linhagem, independentemente de sua exposição à toxina Cry1F (Figura 4.5A). Dos 10.289 transcritos expressos, 10.273 foram expressos no intestino de lagartas SUS e 10.132 no de RESiso, sendo que 154 transcritos ocorreram exclusivamente na linhagem SUS e 13 na linhagem RES (Figura 4.5A). A análise do número de transcritos identificados após a indução dos insetos com a toxina Cry1F indicou a supressão da expressão de alguns transcritos em ambas as linhagens suscetível e resistente, visto que 9.989 transcritos foram identificados no intestino de lagartas resistentes induzidas (RES-Cry1F), uma redução de 284 e 46 transcritos, respectivamente, em comparação às linhagens não-induzidas (Figura 4.5A, B). Lagartas SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F compartilharam 9.809 transcritos, sendo que a indução com a toxina Cry1F aumentou o número de transcritos com expressão exclusiva no intestina de lagartas da linhagem SUS

(180) e RESiso (277) quando em contato com a toxina Cry1F (Figura 4.5B). A comparação da expressão gênica dentro das linhagens demonstrou que a exposição de lagartas da linhagem SUS à toxina Cry1F não induziu a expressão de nenhum gene que já não estivesse sendo expresso constitutivamente nas largatas não-induzidas, sendo que as mesmas compartilham a expressão de 9.989 transcritos (Figura 4.5C). Adicionalmente, as lagartas SUS não-induzida contaram com a expressão de 284 transcritos exclusivos que não foram observados quando as mesmas foram induzidas com Cry1F (Figura 4.5C). Lagartas da linhagem RESiso compartilham a expressão de 9.993 dos seus 10.132 (RESiso) e 10.086 (RESiso-Cry1F) transcritos identificados, resultando na expressão de 139 transcritos exclusivamente no intestino de lagartas RESiso e 93 no de lagartas Reiso-Cry1F (Figura 4.5D).



Figura 4.5 - Distribuição dos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* expressos em lagartas suscetíveis (SUS) e resistentes (RES) à toxina Cry1F, induzidas (SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F) ou não (SUS e RESiso) com essa toxina. Transcritos expressos no intestino de lagartas (A) SUS e RESiso; (B) SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F; (C) SUS e SUS-Cry1F; (D) RESiso e RESiso-Cry1F

Dos transcritos expressos no intestino de lagartas SUS e RESiso, 980 foram expressos diferencialmente (teste t, $p \le 0.05$; expressão relativa >2 ou -2<), sendo que a grande maioria (870) deles sofreu redução nos níveis de expressão em lagartas RESiso (Figuras 4.6A, 4.7A).

A análise do nível de expressão entre linhagens suscetível e resistente induzidas com a toxina Cry1F identificou 219 transcritos expressos diferencialmente, sendo que 69 (31,5%) deles foram superexpressos na linhagem RESiso induzida com Cry1F (Figuras 4.6B, 4.7B). Os níveis de expressão dos transcritos do intestino de lagartas suscetíveis quando expostas à toxina Cry1F sofreram forte alteração, sendo encontrados 732 transcritos expressos diferencialmente, com a redução da expressão de 481 deles em lagartas expostas à toxina Cry1F (Figuras 4.6C, 4.8A). Ao contrário do que fora observado na linhagem SUS, lagartas resistentes RESiso apresentaram um baixo número de transcritos expressos diferencialmente em relação a lagartas expostas à toxina Cry1F (RESiso-Cry1F), sendo encontrados 95 transcritos expressos diferencialmente, sendo que, nesse caso, a exposição à toxina Cry1F induziu ao aumento da expressão da maioria dos transcritos expressos (Figuras 4.6D, 4.8B).



Figura 4.6 - Distribuição da expressão diferencial dos transcritos do transcritoma *de novo* de referência do intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina. Pontos azuis representam transcritos com expressão gênica diferencial significativa (teste t, *p* <0,05; expressão relativa >2 e -2<). Transcritos expressos no intestino de lagartas (A) SUS e RESiso; (B) SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F; (C) SUS e SUS-Cry1F; (D) RESiso e RESiso-Cry1F



Figura 4.7 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos do intestino de linhagens de lagartas de *S. frugiperda* suscetível (SUS) e resistente (RESiso) à toxina Cry1F, induzidas (SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F) ou não (SUS e RESiso) com essa toxina. A intensidade da cor reflete uma escala relativa da expressão gênica. Cores mais próximas ao vermelho significam expressão elevada, enquanto que a mudança para o verde indica a diminuição do nível de expressão

Os transcritos expressos diferencialmente foram agrupados em categorias que refletissem moléculas que apresentariam alguma interação com a toxina, sendo então formados os seguintes grupos: receptores de toxinas Cry, componente da membrana peritrófica, atividade enzimática (proteólise e detoxificação) e resposta imunológica (Tabela 4.1). Dos transcritos relacionados com a recepção, processamento e inserção da toxina na membrana intestinal, foi possível verificar a redução de cerca de 7 vezes na expressão de um transcrito caderina (contig_1138) na linhagem RESiso quando comparada à expressão observada em lagartas SUS. No entanto, outros transcritos de moléculas que também interagem diretamente com toxinas Cry, como transportadores ABC: ABCb1 (contig_1026) e ABCc2 (contig_3718) apresentaram superexpressão na linhagem RESiso (Tabela 4.1).

Transcritos relacionados com a composição ou formação da membrana peritrófica, apenas os transcritos indentificado como mucina intestinal 8 (contig_9) e quina sintase b (contig_1926), apresentaram superexpressão na linhagem RESiso (Tabela 4.1).

Dos transcritos envolvidos com atividade proteolítica e detoxificação, a maioria foi superexpressa na linhagem RESiso, como aqueles de carboxilpepitidase (contig_2291), quimotripsinas (contig_1201, contig_35, contig_268), citocromo P450 (contig_2324) e proteínas do tipo serino-proteases (contig_1001, contig_3707, contig_1984) (Tabela 4.1). Apenas os transcritos identificados como sendo da família CYP321a (contig_7478 e contig_2354) e a serino-protease contig_1002, tiveram os níveis de expressão reduzidos na linhagem RESiso (Tabela 4.1)

Transcritos relacionados com a resposta imunológica foram na sua maioria subexpressos na linhagem RESiso (Tabela 4.1). Foi verificada a redução da expressão gênica de anquirinas (contig_4988 – 5x; contig_7114 – 21x) na linhagem RESiso, quando comparada à linhagem SUS. Transcritos da chaperona HSP81-1 (contigs 9975, 10064 e 10075) foram expressos exclusivamente na linhagem SUS (Tabela 4.1). O aumento da expressão gênica ocorreu apenas em três transcritos no intestino de lagartas resistente, proteínas de choque térmico (HSPs) (contig_301, contig_1488) e de proteínas de resposta a patógenos (REPAT) (contig_827) (Tabela 4.1).

					(continua)
Contig	p-valor	Expressão relativa	SUS RPKM normalizado	RESiso RPKM normalizado	Hit mais próximo
Receptores					
contig_1138	0,01	-6,77	16,88	1,73	Caderina mutante
contig_3718	0,02	12,03	0,11	2,37	Transportador ABCc2
contig_1026	0,00	46,25	0,00	6,13	Transportador ABCb1
Componente da membrana peritrófica					
contig_53	0,01	-8,93	26,15	2,61	Mucina intestinal 8
contig_7002	0,04	-3,51	6,04	1,47	Mucina intestinal
contig_9	0,04	3,28	53,16	149,43	Mucina intestinal 8
contig_1926	0,04	4,51	2,23	7,27	Quitina sintase b
Atividade proteolítica ou detoxificação					
contig_1002	0,04	-34,24	5,41	0,00	Proteína divergente de serino-protease
contig_2354	0,04	-4,29	5,96	0,99	CYP321a9
contig_7478	0,03	-4,29	6,02	0,95	CYP321a8
contig_2324	0,04	3,26	1,60	5,04	Citocromo P450
contig_35	0,01	4,34	9,88	38,43	Quimotripsina c9
contig_2291	0,05	4,40	1,19	4,33	Carboxilpeptidase 4
contig_234	0,03	5,07	1,48	5,43	CYP6ae47
contig_1984	0,01	5,06	5,16	24,67	Serino-protease 36
contig_3707	0,01	5,35	1,17	5,20	Divergiu de serino protease
contig_1201	0,01	5,97	0,81	4,10	Quimotripsina
contig_1106	0,01	6,05	3,05	16,73	Proteína semelhante à quimotripsina 2
contig_1001	0,00	6,05	9,25	48,55	Proteína divergente de serino-protease
contig_268	0,00	11,91	2,07	22,72	Proteína semelhante à quimotripsina 2

Tabela 4.1 - Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry

					(conclusao)
Contig	p-valor	Expressão relativa	SUS RPKM normalizado	RESiso RPKM normalizado	Hit mais próximo
Resposta imunológica					
contig_10013	0,00	-40,03	6,28	0,00	Chaperonina
contig_10122	0,00	-33,19	5,18	0,00	Chaperonina
contig_10027	0,01	-26,22	4,01	0,00	Chaperonina
contig_10064	0,01	-23,41	3,51	0,00	Proteína de resposta ao choque térmico 81-1
contig_10075	0,02	-21,56	3,33	0,00	Proteína de resposta ao choque térmico 81-1
contig_7114	0,01	-21,41	47,41	1,46	Anquirina unc44
contig_9975	0,02	-19,55	2,83	0,00	Proteína de resposta ao choque térmico 81-1
contig_10232	0,03	-18,58	2,66	0,00	Chaperonina
contig_10036	0,04	-14,13	2,32	0,04	Proteína antimicrobiana tipo gloverina
contig_9024	0,01	-13,87	4,82	0,12	Hdd1 imuno-relacionada
contig_9471	0,01	-6,21	6,67	0,68	Domínio de repetição anquirina
contig_4988	0,02	-5,31	5,79	0,66	Domínio de repetição anquirina
contig_1488	0,02	4,67	1,73	6,36	Proteína de choque térmico pequena
contig_827	0,00	5,75	4,10	21,10	Proteína de resposta a patógenos (REPAT1)
contig_301	0,00	9,69	0,43	4,15	Proteína de resposta ao choque térmico 70

Tabela 4.1 - Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de S. frugiperda suscetível e resistente à toxina Cry1F, selecionados de	evidc) ao	
seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry			

A análise comparativa do RNAseq entre as linhagens SUS e RESiso induzidas com a toxina Cry1F levou à identificação de transcritos expressos diferencialmente relacionados à função de receptor de toxina Cry (1), componentes de membrana peritrófica (1), atividade proteolítica ou de detoxificação (10) e resposta imunológica (11) (Tabela 4.2). A comparação da expressão gênica no intestino de insetos SUS e RESiso após a indução com toxina Cry1F indicou a supressão da expressão de transportadores dependentes de ATP do tipo ABC, o transportador ABCb1 (contig_2437), na linhagem RESiso. Não foi verificada alteração na expressão gênica no intestino de lagartas SUS e RESiso após indução com a toxina Cry1F para as demais proteínas descritas como receptores de inúmeras toxinas Cry, como caderina, aminopeptidase-n e fosfatase alcalina (Tabela 4.2). O componente da membrana peritrófica, a mucina intestinal 8 (contig_53), também sofreu redução na expressão em lagartas RESiso-Cry1F, quando comparadas às SUS-Cry1F (Tabela 4.2). Dentre os 10 transcritos relacionados à proteólise e detoxificação que foram expressos diferencialmente, apenas o contig_1002 apresentou superexpressão (70x) na linhagem SUS-Cry1F se comparada a RESiso-Cry1F (Tabela 4.2). Dos 11 transcritos expressos diferencialmente nas lagartas SUS-Cry1F e RESiso-Cry1F, a proteína de resposta ao choque térmico HSP70 (contig_184), duas hidroxibutirato dehidrogenases (contigs 677 e 678) e uma lipase neutra (contig 2973) foram superexpressas no intestino de RESiso-Cry1F, enquanto os demais sofrem redução em sua expressão. Os transcritos que sofreram maior redução na transcrição no intestino de lagartas RESiso-Cry1F quando comparados a lagartas SUS-Cry1F foram a cobatoxina b (146x) (contig 10153), a cecropina f2 (15x) (contig_6991) e a HSP81-1 (20x) (contig_10075) (Tabela 4.2)

~			SUS-Cry1F	RESiso-Cry1F	· · · · · · · ·
Contig	p-valor	Expressão relativa	RPKM	RPKM	Hit mais próximo
			normalizado	normalizado	
Receptor					
contig_2437	0,00	-43,18	3,32	0,00	ABCb1
Componente da membrana	peritrófica				
contig_53	0,01	-10,59	5,50	0,69	Mucina intestinal 8
Atividade proteolítica ou de	toxificação				
contig_1002	0,01	-69,98	5,24	0,00	Proteína divergente de serino-protease
contig_5706	0,00	-7,88	5,38	0,87	CYP6ab14
contig_2737	0,01	-5,26	9,31	1,94	Serino protease 5
contig_4599	0,03	16,47	0,04	2,81	Precursor da serino protease semelhante à quimotripsina
contig_268	0,00	13,63	0,55	11,97	Proteína tipo quimotripsina 2
contig_1106	0,01	9,48	0,62	10,94	Proteína tipo quimotripsina 2
contig_327	0,02	8,12	0,25	3,60	Сурбаb
contig_3675	0,04	7,07	0,18	2,01	Cyp321a7
contig_1527	0,00	6,45	2,99	20,45	Precursor da carboxipeptidase
contig_225	0,01	6,26	0,67	4,90	Tripsina t6
Resposta imunológica					
contig_10153	0,00	-146,37	11,07	0,00	Cobatoxina b
contig_10075	0,00	-19,78	2,04	0,04	Proteína de resposta ao choque térmico 81-1
contig_6991	0,02	-15,30	1,60	0,03	Cecropina f2
contig_5099	0,00	-12,35	11,45	1,13	Relacionada ao sistema imunológico hdd13
contig_10012	0,00	-7,98	5,65	0,65	REPAT40, partial
contig_3435	0,04	-7,64	3,18	0,32	REPAT46
contig_1352	0,05	-3,91	8,27	2,26	REPAT18
contig_678	0,05	3,57	2,30	11,87	Hidroxibutirato dehidrogenase
contig_184	0,05	4,96	2,21	19,95	Proteína de resposta ao choque térmico 70 cognato
contig_2973	0,02	7,01	1,61	19,67	Lipase neutra
contig_677	0,00	10,53	3,03	27,76	Hidroxibutirato dehidrogenase

Tabela 4.2 - Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível e resistente induzidas com a toxina Cry1F, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry



Figura 4.8 - Distribuição comparativa da expressão diferencial dos transcritos dentro de cada linhagem (suscetível e resistente) de *S. frugiperda* induzida ou não com toxina Cry1F. A intensidade da cor reflete a expressão relativa do tratamento. Cores mais próximas do vermelho significam expressão elevada, enquanto que a mudança para o verde, até o mais claro, significa diminuição no nível de expressão

Quando comparamos a resposta de lagartas SUS à indução com a toxina Cry1F, foi verificada a redução na expressão proteínas relacionadas à função de receptor de toxina Cry, como a aminopeptidase n6 e a caderina. Proteínas ligadas à composição ou formação da membrana peritrófica também foram afetadas pela exposição das lagartas SUS à toxina Cry1F, com a elevação da expressão da quitina sintetase b (contig 1926) e redução na expressão de seis transcritos relacionados à proteínas da membrana peritrófica, como mucinas e peritrofinas, nas lagartas SUS induzidas com Cry1F (Tabela 4.3). A atividade de transcrição de transcritos relacionados à atividade proteolítica ou de detoxificação predominada pela redução da expressão dos transcritos no intestino de lagartas SUS-Cry1F quando comparada a de lagartas SUS, com a redução na expressão de 14 dos 19 transcritos identificados como sendo expressos diferencialmente (Tabela 4.3). A indução de lagartas SUS com a toxina Cry1F levou ao aumento da expressão gênica da maioria dos transcritos expressos diferencialmente relacionados ao sistema imunológico, como a cobatoxina b, a coronina, as proteínas de resposta a patógenos (REPAT) e várias chaperoninas (HSP) (Tabela 4.3).
Tabela 4.3	- Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de S. frugiperda suscetível à toxina Cry1F, induzidas ou não com
	essa toxina, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry

(continua)

Contig	p-valor	Expressão relativa	SUS RPKM normalizado	SUS-Cry1F RPKM normalizado	Hit mais próximo
Receptor					
contig_7984	0,02	-13,46	3,47	0,07	Aminopeptidase n6
contig_1615	0,05	-4,74	12,63	1,07	Caderina mutante
Componente da memb	orana peritrófica				
contig_6349	0,00	-9,05	6,16	0,24	Mucina 2 do intestino de inseto
contig_7002	0,04	-5,21	6,05	0,53	Mucina intestinal
contig_158	0,04	-4,46	22,99	2,43	Proteína de membrana peritrofina 1
contig_65	0,03	-4,46	86,53	9,60	Proteína de membrana peritrofina 2
contig_157	0,04	-4,31	199,51	24,13	Proteína de membrana peritrofina 3
contig_1926	0,00	7,11	2,24	7,39	Quitina sintase b
contig_989	0,03	4,32	2,60	5,92	Semelhante ao domínio da peritrofina 4
Atividade proteolítica	ou detoxificação				
contig_652	0,00	-34,22	1759,02	20,03	Serino acetiltransferase
contig_8300	0,05	-17,85	2,59	0,00	Glutationa-s-transferase 1
contig_4599	0,02	-16,80	3,97	0,04	Precursor da serino protease semelhanta a quimotripsina
contig_5384	0,02	-15,83	3,98	0,06	Citocromo P450
contig_1342	0,00	-12,27	169,44	6,86	Parte da subunidade do citocromo oxidase
contig_114	0,04	-11,64	241,40	8,19	Serino acetiltransferase
contig_4537	0,02	-10,26	2,81	0,08	CYP332a1
contig_7010	0,04	-8,83	4,13	0,17	Glutationa-s-transferase epsilon 2
contig_4289	0,03	-7,63	3,59	0,17	Citocromo P450
contig_2929	0,02	-7,44	3,83	0,20	Citocromo P450
contig_5185	0,04	-6,39	5,66	0,38	CYP9a9
contig_327	0,05	-6,31	4,01	0,25	CYP6ab
contig_3383	0,04	-6,07	3,94	0,28	Serino hidroximetiltransferase
contig_3659	0,04	-5,29	4,47	0,38	CYP4g75
contig_1001	0,02	3,84	9,25	18,50	Proteína divergente de serino-protease

					(conclusio)
Contig	p-valor	Expressão relativa	SUS RPKM normalizado	SUS-Cry1F RPKM normalizado	Hit mais próximo
	0.02	4.07	2.05		
contig_44/4	0,03	4,07	3,05	5,76	Citocromo P450
contig_6901	0,02	4,65	3,05	6,50	CYP6ab14
contig_2036	0,01	4,81	3,31	8,40	Protease semelhante à tripsina
contig_10179	0,04	10,35	0,30	1,77	Serino acetiltransferase
Resposta Imunológica					
contig_4331	0,04	-9,60	3,00	0,06	Proteína de resposta ao choque térmico 70
contig_1265	0,05	3,46	3,48	6,56	Proteína de resposta ao choque térmico 70 cognato 5
contig_1352	0,05	3,73	4,10	8,27	REPAT18
contig_1492	0,04	5,76	0,63	2,28	Lectina do tipo c
contig_7292	0,04	6,09	0,51	1,89	Coronina 6 isoforma x2
contig_10012	0,00	9,75	1,31	5,65	REPAT40
contig_5099	0,00	11,75	1,82	11,45	hdd13 imuno-relacionada
contig_10153	0,00	50,40	0,42	11,07	Cobatoxina b

Tabela 4.3 Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de *S. frugiperda* suscetível à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry

(conclusão)

A indução de lagartas resistentes com a toxina Cry1F induziu pouca alterou a taxa de expressão gênica no intestino das lagartas. Dentre as categorias de transcritos selecionados, foram identificados apenas 10 transcritos expressos diferencialmente, sendo um relacionado à morte celular, dois componentes da membrana peritrófica, seis com atividade proteolítica ou de detoxificação e um relacionado à resposta imunológica (Tabela 4.4). Nenhum transcrito relacionado como receptor de toxinas Cry, tais como caderina, APN, ALP e transportadores ABC, teve alteração nos níveis de expressão quando lagartas RES foram induzidas com Cry1F. Todos os transcritos, com exceção dos transcritos representantes de componentes da membrana peritrófica (contigs 1483 e 1602) (proteínas ligantes à quitina), de atividade proteolítica ou detoxificação (contig_8693) e resposta imunológica (contig 59 – lipase-3-pancreática), apresentaram elevada transcrição no RESiso-Cry1F em comparação ao RESiso (Tabela 4.4).

Contig	p-valor	Expressão relativa	RESiso RPKM normalizado	RESiso-Cry1F RPKM normalizado	Hit mais próximo
Morte celular					
contig_3762	0,05	-4,14	403,76	785,33	Culina isoforma1
Componente da membrana peritrófica					
contig_1602	0,04	-3,95	17,79	2,98	Proteína ligante a quitina
contig_1483	0,02	-3,87	21,09	4,43	Proteína ligante a quitina
Atividade proteolítica ou detoxificação					
contig_8693	0,03	-6,54	2,21	0,17	CYP9a59
contig_430	0,02	16,33	1,20	9,29	Serino acetiltransferase
contig_9230	0,03	20,39	0,18	2,62	Serino acetiltransferase
contig_114	0,02	21,49	1,28	13,21	Serino acetiltransferase
contig_652	0,02	21,86	1,27	13,30	Serino acetiltransferase
contig_2317	0,01	28,84	0,96	12,99	Serino acetiltransferase
Resposta imunológica					
contig_59	0,02	-5,32	12,74	1,60	Lipase 3 pancreatica

 Tabela 4.4 - Transcritos diferencialmente expressos no intestino de lagartas de S. frugiperda resistente à toxina Cry1F, induzidas ou não com essa toxina, selecionados devido ao seu envolvimento com processos ligados à resposta a intoxicação com toxinas Cry

4.4 Discussão

A análise comparativa do transcritoma do intestino de linhagem suscetível de *S. frugiperda* e sua linhagem resistente isogênica correspondente, induzidas ou não com a toxina Cry1F, baseando-se nos mecanismos de ação propostos para ação de toxinas Cry (ZHANG et al. 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008), auxiliou na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1F. Os resultados obtidos demonstraram alterações nos níveis de expressão em diferentes vias já relacionadas com a resistência de insetos-praga às toxinas Cry (PARK et al.; 2010; CONTRERAS et al.; 2013; NAVARRO-CERRILLO et al.; 2013; YAO et al.; 2014; AYRA-PRADO et al.; 2015).

Dentre os possíveis mecanismos de resistência já descritos, identificamos alterações na expressão dos receptores de toxinas Cry, componentes da membrana peritrófica e atividade enzimática (proteólise e detoxificação). São inúmeros os relatos de mecanismos de resistência associados à diminuição da ativação das toxinas Cry devido à redução dos níveis/atividade de enzimas proteolíticas necessárias ao processamento da protoxina (RODRÍGUEZ-CABRERA et al., 2010; CANCINO-RODEZNO et al., 2012; YAO et al., 2012; LIU et al., 2014). Mesmo para casos em que as toxinas Cry já são fornecidas em sua forma ativada, como é o caso da toxina Cry1F nesse estudo, proteinases do intestino médio de lagartas podem degradar essas toxinas, tornando os insetos tolerantes ou resistentes às mesmas (LOSEVA et al., 2002; BAH et al., 2004), incluindo espécies do gênero Spodoptera, como S. frugiperda (RAHMAN et al., 2012) e S. exigua (MA et al., 2013). A análise comparativa do transcritoma realizada indicou a maior expressão de quimotripsinas, tripsinas e serino-proteases no intestino de lagartas RESiso em relação ao de lagartas SUS, enzimas essas que são ativadas em resposta à intoxicação por Cry1F, visto que a expressão das mesmas foi elevada em ambas as linhagens SUS e RESiso quando alimentadas com Cry1F. Porém, as diferenças na expressão entre RESiso e RESiso induzida não foram significativas, demonstrando que a linhagem resistente apresenta expressão constitutiva adequada em resposta à intoxicação com Cry1F quando comparada à lagarta SUS.

As alterações no padrão de expressão de proteínas da membrana peritrófica também podem ser diretamente relacionadas à resistência à toxina Cry1F observada em *S. frugiperda*, visto o papel da membrana peritrófica (MP) na proteção do epitélio intestinal (ADANG; SPENCE, 1983; HAYAKAWA et al., 2004), sendo as mucinas, peritrofinas e quitina importantes componentes da MP de *S. frugiperda* (HEGEDUS et al, 2009; TOPRAK et al, 2010). Além disso, esses componentes da membrana peritrófica formam complexos com

patógenos e macromoléculas tóxicas (BOLOGNESI et al., 2008), incluindo toxinas Cry, que teriam sua disponibilidade reduzida para ligação ao epitélio intestinal devido à sua retenção pela membrana peritrófica (BRAVO et al., 1992; HAYAKAWA et al, 2004; REES et al., 2009; VALAITIS; PODGWAITE 2013; FENG et al., 2015). Adicionalmente, a regulação negativa de quitinase e a regulação positiva de quitina-sintase e glicosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) foram descritas como mecanismo de defesa à intoxicação de lagartas de *Ostrinia nubilalis* com Cry1Ab (YAO et al., 2014). Dos transcritos de mucina identificados no transcritoma de referência de *S. frugiperda*, apenas um (contig_9) foi superexpresso na linhagem RESiso, que também apresentou maior expressão de quitina sintase em relação à linhagem SUS. Quando induzidas com a toxina Cry1F, não foi verificada alteração na expressão desses transcritos entre SUS e RESiso. Além disso, esses transcritos sofreram regulação na SUS após indução com Cry1F, mas não na RESiso, indicando, mais uma vez, que os níveis de transcrição de genes importantes ao processo de defesa contra a intoxicação por Cry1F já são constitutivamente expressos em níveis adequados na linhagem RESiso.

Uma vez vencida a barreira da membrana peritrófica, as toxinas devem se ligar a receptores de membrana para induzir alterações no epitélio intestinal para o desenvolvimento da patologia. Alteraçãoes nos níveis de expressão dos receptores de proteínas Cry (HECKEL, 2012; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; BRAVO et al., 2015), como as aminopeptidases (APN), fosfatase alcalinas (ALP), caderinas (CAD) e os transportadores ABC, também são comuns em casos de resistência a essas toxinas (YANG et al., 2011; TIEWSIRI; WANG, 2011; JURAT-FUENTES et al., 2011; GONG et al., 2015). Lagartas de *S. frugiperda* resistentes à toxina Cry1F apresentaram menor expressão da caderina (contig_1138) em relação às lagartas SUS, sendo também inibida a expressão do transportador ABCb1 (contig_2437), quando comparados os níveis de expressão após a intoxicação com Cry1F. Não foi observada alteração desses transcritos na linhagem RESiso quando exposta à toxina Cry1F. Esses resultados demonstram que a redução na expressão do gene de caderina é um mecanismo inato de resistência na linhagem RESiso, enquanto a linhagem suscetível busca regular a transcrição desse gene em resposta à intoxicação, como tentativa de diminuir a formação de poros ou a transdução do sinal intracelular que levaria à indução do processo de morte celular.

Inúmeros trabalhos com o gênero *Spodoptera* têm demonstrado a relação dos níveis reduzidos de APN e ALP com a resistência a diversas toxinas Cry (HERRERO et al., 2005; GONG et al., 2015), mas nossos estudos de expressão diferencial entre as linhagens aqui estudadas não indicaram a regulação dos níveis de transcrição de APN e ALP como

mecanismo de resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1F, apesar de notarmos regulação negativa da aminopeptidase n6 (contig_7984) em resposta à intoxicação com Cry1F.

Os transportadores ABC também são relatados como receptores de toxinas Cry, sendo proposto que este transportador se ligue às proteínas Cry oligomerizadas auxiliando a inserção desse oligômero na membrana (HECKEL, 2012). Porém, ainda não está claro o papel exato desses transportadores no modo de ação de toxinas Cry. Contudo, é evidente a participação dos transportadores ABC no mecanismo de resistência em diferentes lepidópteros-praga (GAHAN et al., 2010; BAXTER et al., 2011; ATSUMI et al., 2012; HECKEL, 2012). Além da resistência decorrente de mutações, a subexpressão dos transportadores ABC também está associada à resistência a toxinas Cry (LEI et al., 2014; PARK et al., 2014; GUO et al., 2015a). São diversos os transportadores ABC relacionadas à resistência a toxinas Cry (LEI et al., 2015a,b), havendo casos em que diferentes transportadores estão relacionados à resistência de uma mesma espécie à uma mesma toxina (GUO et al., 2015a,b).

A análise do transcritoma das linhagens suscetível e resistente isogênica de *S. frugiperda* à toxina Cry1F identificou diferenças nos níveis de expressão de transportadores ABCc2 e ABCb1 (contig_3718 e contig_1026), sendo os dois superexpressos na linhagem RESiso, enquanto outro transportador ABCb1 (contig_2437) sofreu regulação negativa na linhagem RESiso após exposição à toxina Cry1F. Assim, a participação desses transportadores ABC na resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1F é inconclusiva, especialmente pelo fato de que análises do transcritoma da linhagem resistente selecionada em laboratório apresentou redução significativa nos níveis de expressão do transportador ABCg5 (ver Capítulo 4), em concordância com os relatos de GUO et al. (2015b).

A análise de expressão gênica diferencial de *S. frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F demonstrou diferenças significativas nos transcritos relacionados com detoxificação e resposta imunológica. Diversos trabalhos tem demonstrado alterações da expressão dessas vias em linhagens de insetos-praga resistentes às toxinas Cry (CANDAS et al., 2003; GUNNING et al., 2005; VELLECHIRAMMAL et al., 2015; ZHU et al., 2015). Com relação aos processos de detoxificação, Cancino-Rodezno et al. (2012) demonstraram a presença de níveis elevados de transcritos relacionados à citocromo P450 em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) após o tratamento com Cry1Aa. Em relação as GST, que participam da fase II do processo de detoxificação (JAKOBY; ZIEGLER, 1990), foi verificado o aumento de 2,5 vezes na expressão de GSTs em populações de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) resistentes à toxina Cry1Ab (CANDAS et

al., 2003). Nossos resultados demonstraram grupos de CYP450 que foram regulados negativa ou positivamente na linhagem RESiso, dependendo da família à qual a enzima pertence, sendo Cyp6ae47 (contig_234) superexpressa na linhagem RESiso. Essa familia de CYP apresenta expressão tecido específico, sendo dois outros membros (Cyp6ae43 e Cyp6ae44) ativados em S. frugiperda em resposta à intoxicação por aleloquímicos e inseticidas (GIRAUDO et al., 2015). CYP450s, incluindo a familia Cyp6ae, são constantemente relatadas em processos de detoxificação de inseticidas (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011; NASCIMENTO et al., 2015) e apesar de inúmeros trabalhos apresentarem superexpressão de diferentes famílias de CYP450 em linhagens de insetos resistente e/ou intoxicados por toxinas Cry, ainda não se sabe a função dessas enzimas no mecanismo de resistência ou detoxificação de toxinas Cry (VAN MUNSTER et al., 2007; CANCINO-RODEZNO et al., 2012; VELLECHIRAMMAL et al., 2015; CANTON et al., 2015; ZHU et al., 2015). Há autores que sugerem que a expressão elevada de CYP450 em insetos resistentes a toxinas Cry seja decorrente da existência de processo de seleção a inseticidas orgânicos, assim como proposto para a linhagem de S. frugiperda de Porto Rico resistente à Cry1F e organofosforados (ZHU et al., 2015). Assim, a participação dessas enzimas no processo de defesa contra a intoxicação por toxinas Cry deve ainda ser melhro investigada.

A expressão diferencial dos transcritos envolvidos na resposta imunológica foram bastante variados, com inúmeros transcritos ligados à resposta a patógenos e, em alguns casos, com comprovada participação na resposta às toxinas Cry (HUFFMAN et al., 2004; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; CONTRERAS et al., 2015), como peptídeos antimicrobianos e proteínas de resposta a patógenos, que foram alvo de regulação positiva ou negativa. A maioria dos transcritos dentro da categoria de resposta imunológica foram superexpressos na linhagem RESiso se comparados à SUS, sendo a sua transcrição inalterada na linhagem RESiso após indução com Cry1F, indicando, novamente, níveis adequados de transcrição constitutiva.

No geral, foi evidente a existência de expressão constitutiva no intestino de lagartas resistentes para vários dos transcritos envolvidos no processo de resposta à intoxicação com Cry1F, indicando que os indivíduos RESiso já apresentavam taxas de expressão gênica adequadas ao processo de intoxicação com toxina Cry1F. Isso foi confirmado pelo fato de que as alterações na taxa de expressão gênica de lagartas resistentes expostas à toxina Cry 1F em relação à lagarta resistente foi muito pequena se comparada a alteração na expressão gênica quando lagartas suscetíveis foram comparadas às lagartas suscetíveis expostas às toxinas Cry1F. Esse fato indica que lagartas resistentes sofreram seleção para se manterem

precondicionadas fisiologicamente ("physiological priming") a responderem ao processo de intoxicação com a toxina Cry1F, pela manutenção de níveis adequados de transcrição de genes relacionados ao processo de defesa/detoxificação à essa fonte de estresse, e de que os mecanismos reguladores da expressão gênica adequada em resposta à essa fonte de estresse foi herdada da geração parental.

Precondicionamento fisiológico é uma resposta comum a diversos organismos em defesa a inúmeras fontes de estresse (ROMERO 2004; SCHMID-HEMPEL, 2005; BECKERS; CONRATH, 2007; GAMIR et al., 2014), sendo o precondicionamento imunológico em insetos um exemplo. Assim como observado em nossos dados, o precondicionamento imunológico pode ocorrer transgeracionalmente, apesar dessa capacidade poder ser influenciada por inúmeros fatores (FREITAK et al., 2009; MOREAU et al., 2012). Há vários relatos de que a capacidade de resposta de insetos a patógenos pode ser melhorada pelo precondicionamento da expressão de genes de defesa pela geração parental (FISHER; HAJEK, 2015; TRAUER-KIZILELMA; HILKER, 2015), assim como pela exposição a substâncias tóxicas em outros organismos (CANO et al., 1991; PHILIP et al., 2006). O precondicionamento fisiológico pode levar também a respostas adaptativas do organismo, como aquelas demonstradas pelos mecanismos de raparo de tecidos em ratos submetidos a exposições repetidas a percloroetileno (PHILIP et al., 2007).

Além do precondiciomento fisiológico que pode ocorrer pela exposição a patógenos e toxinas, assim como discutido anteriormente, a microbiota associada ao trato digestivo está intimamente associada à regulação da fisiologia do organismo hospedeiro, influenciando vários aspectos de seu desenvolvimento e aptidão biológica (CLARKE et al., 2014). Ainda, membros da microbiota intestinal de *S. frugiperda* foram relacionados à sensibilidade do inseto a inseticidas (ALMEIDA, 2013), assim como o aumento na densidade da microbiota intestinal foi demonstrado produzir um efeito de precondicionamento fisiológico em *S. exigua* e *T. castaneum*, aumentando a tolerância desse inseto a infecções por *Bacillus thuringiensis* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; FUTO et al., 2015). Entretando, dados recentes demonstraram que a seleção de lagartas de *Galleria mellonella* resistentes a infecções por *B. thuringiensis* apresentaram drástica redução da microbiota intestinal, mas uma variedade de adaptações imuno-fisiológicas permitiram a evolução da resistência a esse agente patogênico, sem a existência de qualquer custo adaptativo associado (DUBOVSKIY et al., 2016). A associação com bactérias que são transferidas verticalmente, como algumas daquelas associadas ao trato digestivo de *S. frugiperda* relacionadas à menor sensibilidade a inseticidas

orgânicos (ALMEIDA, 2013), tem a capacidade de induzir o precondicionamento imunológico transgeracionalmente (FREITAK et al., 2014).

Apesar das evidências de que a exposição a toxinas e bactérias pode levar ao precondicionamento fisiológico e induzir a tolerância a essas fontes de estresse pela regulação dos níveis de transcrição gênica do organismo, sendo inclusive possível a contribuição parental dessas informações à geração filial, ainda não dispomos de informações conclusivas da atuação de toxinas Cry como moléculas indutoras do precondicionamento fisiológico/imunológico em insetos, sendo ainda necessário a condução de estudos adicionais a esse respeito.

4.5 Conclusão

 As linhagens de Spodoptera frugiperda suscetível e resistente isogênica à toxina Cry1F diferem no seu padrão de expressão gênica;

• Lagartas da linhagem resistente isogênica apresentam superexpressão constitutiva de genes ligados à diferentes mecanismos de resistência;

• Fatores ligados à regulação dos níveis de expressão gênica adequados à resposta a toxina Cry1F em lagartas resistentes de *S. frugiperda* são transmitidos pela geração parental;

• A resistência de *Spodoptera frugiperda* à toxina Cry1F se dá pela regulação de um conjunto de transcritos envolvidos na degradação enzimática e detoxoficação da toxina, na ligação e inserção da toxina à membrana do epitélio intestinal e no mecanismo de resposta imunológica.

Referências

ADANG, M. J.; SPENCE, K.D. Permeability of the peritrophic membrane of the Douglas fir tussock moth (*Orgyia pseudotsugata*).**Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Philadelphia, v. 75, n. 2, p. 233-238. 1983.

AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac _endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.

ALMEIDA, L.G. Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro. 2013. 104 p. (Dissertação Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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.

ANDREWS, S. FASTqc: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<u>http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc</u>> acesso em: ago.2015.

ATSUMI, S.; MIYAMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; NARUKAWA, J.; KAWAI, S.; SEZUTSU, H.; KOBAYASHI, I.; UCHINO, K.; TAMURA, T.; MITA, K.; KADONO-OKUDA, K.; WADA, S.; KANDA, K.; GOLDSMITH, M.R.; NODA, H. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 109, n. 25, p. 1591-1598, 2012.

AYRA-PARDO, C.; RAYMOND, B.; GULZAR, A.; RODRÍGUEZ-CABRERA, L.; MORÁN-BERTOT, I.; CRICKMORE, N.; WRIGHT, D.J. Novel genetic factors involved in resistance to Bacillus thuringiensis in *Plutella xylostella*. **Insect molecular biology**, Chichester, v. 24, n. 6, p. 589-600, 2015.

BAH, A.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; BROUSSEAU, R., MASSON, L. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 85, n.2, p. 120-127, 2004.

BAXTER, S.W.; BADENES-PEREZ, F.R.; MORRISON, A.; VOGEL, H.; CRICKMORE, N.; KAIN, W.; WANG, P.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. **Genetics**, New York, n.189, p. eU675-eU814, 2011.

BECKAGE, N.E. Insect immunology. In: BECKAGE, N.E. (Ed.). **Insect Immunology**. Amsterdam: Elservier, 2008. cap. 5, p. 25-96.

BECKERS, G.J.M.; CONRATH, U. Priming for stress resistance: from the lab to the field. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxforad, v. 10, p. 425-431. 2007.

BOLOGNESI, R.; TERRA, WR.; FERREIRA, C. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: Theoretical and experimental models. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 54,n.10/11;p. 1413–1422, 2008.

BRAVO, A.; SOBERON, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, n.3,: p. 237–246, 1992.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Different models of the mode of action of *Bt* 3d-Cry toxins. In: *Bt* resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. CABI,Wallinford, p. 56-8, 2015. Disponível em:</www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2015/20153137249.pdf > Acesso em: mar.2016.

CANCINO-RODEZNO, A.; ALEXANDER, C.; VILLASEÑOR, R.; PACHECO, S.; PORTA, H.; PAUCHET, Y.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S.; BRAVO, A. The mitogenactivated protein Kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 40, n. 1, p. 58-63, 2010.

CANCINO-RODEZNO, A.; LOZANO, L.; OPPERT, C.; CASTRO, J.I.; LANZ-MENDOZA, H.; ENCARNACIÓN, S.; BRAVO, A. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <doi: e37034>.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L.A.;. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. **Molecular and Cell Proteomics**, Rockville, v.2, n. 1, p. 19-28, 2003.

CANO, E.A.; BOLARIN, M.C.; PEREZ-ALFOCEA, F.; CARO, M. Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. **Journal of Horticultural Science**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 621-628, 1991.

CANTON, P.E.; CANCINO-RODEZNO, A.; GILL, S.S.; SOBRÓN, M.; BRAVO, A. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from*Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1042, p. 1-17, 2015.

CAPINERA, J.L. **Fall Armyworm**, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Gainesville: Univers, 2008. 6 p. (EENY098). Disponível em: http://www.edis.ifas.ufl.edu. Acesso em: fev.2011.

CHEN, J.; BROWN, M.R.; HUA, G.; ADANG, M.J. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Cell and tissue research**, Heidelberg, v. 321, n. 1, p. 123-129. 2005.

CLARKE, G.; O`MAHONY, S.M.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Priming for health: gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behavior. Acta Paediatrica, Chichester, v. 103, n. 8, p. 812-819. 2014.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2008, p. 1-13, 2008

CONTRERAS. E.; RAUSELL, C.; REAL, M.D. *Tribolium castaneum* Apolipophorin-III acts as an immune response protein against *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxic activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 113, p. 209-2013, 2013.

CONTRERAS. E.; BENITO-JARDÓN, M.; LÓPEZ-GALIANO, M.J.; REAL, M.D.; RAUSELL, C. *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, Kidlington, v.50, p. 139-148, 2015.

DUBOVSKY, I.M.; GRIZANOVA, E.V.; WHITTEN, M.M.A.; MUKHERJEE, K.; GREIG, C.; ALIKINA, T.; KABILOV, M.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V.V.; BUTT, T.M. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Virulence**, Austin, v. 1, n. 11, 2016, Disponível em: <doi: 10.1080/21505594.2016.1164367>.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 150-158, 2014.

FENG, D.; CHEN, Z.; WANG, Z.; ZHANG, C.; HE, K.; GUO, S. Domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie toxin plays an important role in binding to peritrophic membrane of asian corn borer. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10. n. 8, 2015, Disponível em: <doi: e0136430>.

FISHER, J.J.; HAJEK, A.E. Maternal exposure of a beetle to pathogens protects offspring against fungal disease. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, 2015, Disponível em: < doi:10.1371/journal.pone.0125197>.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M.D.; TATO, A.; MARTÍNEZ, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology,** New York, v. 42, n. 1, p. 51-63, 1999.

FREITAK, D.; HECKEL, D.G.; VOGEL, H. Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 276, p. 2617-2624. 2009.

FREITAK, D.; SCHMIDTBERG, H.; DICKEL, F.; LOCHNIT, G.; VOGEL, H.; VILCINSKAS, A. The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. **Virulence**, Austin, v. 5, n. 4, p. 547-554, 2014.

FUTO, M.; ARMITAGE, S.A.O.; KURTZ, J. Microbiota plays a role in oral immune priming in *Tribolium castaneum*. **Fronties in Microbiology**, Sydney, v. 6,n. 1383, 2015, Disponível em: < doi:10.3389/fmicb.2015.01383>.

GAHAN, L.J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D.G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 6, p. e1001248, 2010.

GAMIR, J.; SÁNCHEZ-BEL, P.; FLORS, v. Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental changes. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 33, n. 12, p. 1935-1949. 2014

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, A.M.; INGBER, D.A.; KEWESHAN, R.S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple Bacillus thuringiensis toxins in transgenic maize. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 111, n. 14, p. 5141-5146, 2014.

GIRAUDO, M.; HILLIOU, F.; FRICAUX, T.; AUDANT, P.; FEYERISEN, R.; LE GOFF, G. Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): response to plant allelochemicals and pesticides. **Insect Molecular Baiology**, Chichester, v. 24, n, 1, p. 115-128, 2015.

GONG, L.; WANG, H.; QI, J.; HAN, L.; HU, M.; JURAT-FUENTES, J.L. Homologs to Cry toxin receptor genes in a *denovo* transcriptome and their altered expression in resistant *Spodoptera litura* larve. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 129, p. 1-6, 2015.

GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C.; MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. *71*, *n*. 5, p. 2558-2563. 2005.

GUO, Z,; KANG, S.; ZHU, X.; XIA, J.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. Downregulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 59, p.30–40, 2015a.

GUO, Z.; KANG, S.; CHEN, D.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHU, X.; BAXTER, S.W.; ZHOU, X.; JURAT-FUENTES, J.L.; ZHANG, Y. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-32, 2015b.

HAYAKAWA, T.; SHITOMI, Y.; MIYAMOTO, K.; HORI, H. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. **FEBS letters**, Chichester, v. 576, n. 3, p 331-335. 2004.

HECKEL, D.G. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. **Pesticide Biochemiatry and Physiology**, Maryland Heights, v. 104, p. 103–11, 2012.

HEDENGREN, M.; ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; ANDO, I.; EKENGREN, S.; WIHLBORG, M.; HULTMARK, D. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 827-837, 1999.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v. 54, p 285-302. 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NASERI, B.; NAVARRO-CERRILLO, G.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; HERRRERO, S. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. Environmental Microbiology, Chichester, v. 12, n. 10, p.2730-2737. 2010.

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P.L.; MOAR, W.J.; DE MAAGD, R.A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 96, p. 1-10, 2005.

HORIKOSHI, R.; BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; OKUMA, D.M.; FARIAS, J.R.; MIRALDO, L.L.; AMARAL, F.S.; OMOTO, C. Near-Isogenic Cry1F-Resistant Strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Investigate Fitness Cost Associated With Resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 0, n. 0, p. 1-6, 2015.

HUFFMAN, D.L.; ABRAMI, L.; SASIK, R.; CORBEIL, J.; VAN DER GOOT, F.G.; AROIAN, R.V. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial poreforming toxins. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 101, n. 30, p. 10995-11000, 2004.

JAKKA. S.R.K.; GONG, L.; HASLER, J.; BANERJEE, R.; SHEETS, J.J.; NARVA, K.; BLANCO, C.A.; JURAT-FUENTE, J.L. Field-evolved Mode 1 fall armyworm resistance to Bt corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 4, p. 1023-1034, 2015.

JAKOBY, W.B.; ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 265, n. 34, p 20715-20718. 1990.

JURAT-FUENTES, J.L.; KARUMBAIAH, L.; JAKKA, S.R.K.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C.; PORTILLA, M.; PERERA, O.; ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.

KASTER JR., P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P.Dados biologicos 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.

LEI, Y.; ZHU, X.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; GUO, Z.; XU, B.; LI, X.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), **Gene**, Amsterdam, v. 533, n. 1, p. 180-187, 2014.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annual Review Immunology, Palo Alto, v. 25, p. 697–743, 2007.

LIU, C.; XIAO, Y.; LI, X.; OPPERT, B.; TABASHNIK, B.E.; WU, K. Cis-mediated down-regulation of a trypsin gene associated with Bt resistance in cotton bollworm. **Scientific reports**, London. v, 4, 2014, Disponível em: <doi:10.1038/srep07219>.

LIU, Y.B.; TABASHNIK, B.E.; MAYER, S.K.; CARRIÉRE, Y.; BARTLETT, A.C. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 94, n. 1, p. 248-252, 2001.

LOSEVA, O.; IBRAHIM, M.; CANDAS, M.; KOLLER, C.N.; BAUER, L.S.; BULLA JR, L.A. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 32, n.5, p. 567-577, 2002.

MA, G.; ROBERTS, H.; SARJAN, M.; FEATHERSTONE, N.; LAHNSTEIN, J.; AKHURTS, R.; SHMIDT, O. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larve? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 35, p. 729-739, 2013.

MOREAU, J.; MARTINAUD, G.; TROUSSARD, J.P.; ZANCHI, C.; MORET, Y. Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. **Oikos**, Medellin, v. 121, n. 11, p. 1828-1832. 2012.

NASCIMENTO, A.R.B.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Gnenomics**, London, v. 16, n. 1, p.985-996, 2015.

NAVARRO-CERRILLO, G.; HERN_ANDEZ-MART_INEZ, P.; VOGEL, H.; FERR_E, J. AND HERRERO, S. A new gene superfamily of pathogenresponse (repat) genes in Lepidoptera: classification and expression analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Phyladelphia, v. 164, p. 10–17, 2013.

OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Fieldevolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Chichester, 2016, Disponível em: <doi:10.1002/ps.4201>.

OPPERT, B.; DOWD, S.E.; BOUFFARD, P.; LI. L.; CONESA, A.; LORENZEN, M.D.; TOUTGES, M.; MARSHALL, J.; HUESTIS, D.L.; FABRIC, J.; OPPERT, C.; JURAT-FUENTES, J.L. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012, Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0034624>.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Bacillus thuringiensis insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, p. 3-22, 2013.

PARK, J.W.; KIM, C.H.; RUI, J.; PARK. K.H.; CHAI, J.H.; HWANG, H.O.; KUROKAWA, K.; HA, N.C.; SÖDERHILL, I.; SÖDERHILL, K.; LEE, B.L. Beetle immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 708, p. 163-180, 2010.

PARK, Y.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, R.M.; NAVARRO-CERRILLO, G.; CHAKROUN, M.; KIM, Y.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; FERRÉ, J.; HERRERO, S. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple *Bt* toxins revealed by bulk segregant analysis, **BMC Biology**, London, v. 12, n. 46, p. 1-15, 2014.

PEREIRA, E.J.G.; LANG, B.A.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 115-121, 2008.

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.

PHILIP, B.K.; MUMTAZ, M.M.; LATENDRESSE, J.R.; MEHENDALE, H.M. Impact of repeated exposure on toxicity of perchloroethylene in Swiss Webster mice. **Toxicology**, Shannon, v. 232, n. 1-2, p 1-14. 2007.

PHILIP, B.K.; ANAND, S.S.; PALKAR, P.S.; MUMTAZ, M.M.; LATENDRESSE, J.R.; MEHENDALE, H.M. Subchronic chloroform priming protects mice from a subsequently administered lethal dose of chloroform. **Toxicology and applied pharmacology**, Maryland Heights, v. 216, n. 1, p.108-121. 2006.

RAHMAM, K.; ABDULLAH, M.A.F.; AMBATI, S.; TAYLOR, M.D.; ADANG, M.J. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism. **Applied and Environental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 354-362, 2012.

REES, J.S.; JARRETT, P.; ELLAR, D.J. Peritrophic membrane contribution to *Bt* Cry deltaendotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 100(3), p. 139–146, 2009. doi: 10.1016/j.jip.2009.01.002

ROBINSON, M.D.; SMYTH, G.K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321-332, 2008.

RODRÍGUEZ-CABRERA, L.; TRUJILLO-BACALLAO, D.; BORRÁS-HIDALGO, O.; WRIGHT, D. J.; & AYRA-PARDO, C. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. **Environmental microbiology**, Chichester, v. 12, n. 11, p. 2894-2903. 2010.

ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends** in **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 249-255. 2004.

SCHMID-HEMPEL, P. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. **BioEssays**, Chichester, v. 27, n. 10, p.1026-1034. 2005.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. E.; BRAVO, A. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. **Science**, Washington, v. 318, p. 1640-1642, 2007.

SOSA-GÓMEZ, D.; MIRANDA, J.E. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 359-362, 2012.

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

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

TIEWSIRI, K.; WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 34, p. 14037-14042, 2011.

TOPRAK, U.; BALDWIN, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; HEGEDUS, D.D. Insect intestinal mucins and serine proteases associated with the peritrophic matrix from feeding, starved and moulting *Mamestra configurata* larvae. Insect molecular biology, Chichester, v. 19, n. 2, p. 163-175. 2010.

TRAUER-KIZILELMA, U.; HILKER, M. Insect parents improve the anti-parasitic and antibacterial defence of their offspring by priming the expression of immune-relevant genes. **Insect Biochemistry and Molecualr Biology**, Oxford, v. 64, p. 91-99, 2015.

TSAKAS, S.; MARMARAS, V.J. Insect immunity and its signalling: an overview. **Invertebrate Survival Journal**, Modena, v. 7, p. 228–238, 2010.

VALAITIS, A.P.; PODGWAITE, J.D. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding glycoconjugates present on the brush border membrane and in the peritrophic membrane of the Douglas-fir tussock moth are peritrophins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, n. 1, p. 1-8, 2013.

VAN MUNSTER, M.; PRÉFONTAINE, G.; MEUNIER, L.; ELIAS, M.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 16, n. 1, p. 25-35, 2007.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil,** Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

VELLECHIRAMMAL, N.N.; WANG, H.; EYUN, S.; MORIYAMA, E.N.; COATES, B.S.; MILLER, N.J.; SIGFRIED, B.D. Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin, **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 558, p. 1-11, 2015.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENEDER, C.; LEONARD B.R.; ABEL, C.; LUTTREL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*, **PLOSOne**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e25783, 2011.

YAO, J.; BUSCHMAN, L.L.; LU, N.; KHAJURIA, C.; ZHU, K.Y. Changes in gene expression in the larval gut of *Ostrinia nubilalis* in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin ingestion. **Toxins**, Oxford, v. 6, p. 1274–1294, 2014.

YAO, J.; BUSCHMAN, L.L.; OPPERT, B.; KHAJURIA, C.; ZHU, K.Y. Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n, 8, 2012. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0044090>.

ZDOBNOV, E.M.; APWEILER, R. InterProScan: an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 847-848, 2001.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR., L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZHU, Y.C.; BLANCO, C.A.; PORTILLA, M.; ADAMCZYK, J.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 122, p. 15-21, 2015.

5 CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRITO DO GENE CADERINA EM LINHAGENS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SUSCETÍVEL E RESISTENTES À TOXINA Cry1F

Resumo

O modo de ação de proteínas com atividade entomotóxica produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*, principalmente o das δ -endotoxinas, também conhecidas por proteínas do cristal ou proteínas Cry, tem sido amplamente estudado. Devido ao modo de ação das toxinas Cry ser um processo que ocorre em diversas etapas e depende da especificidade da ligação com distintos receptores, qualquer alteração nos receptores de proteínas Cry pode levar à evolução da resistência de insetos. O receptor caderina é tido como um dos mais importantes no processo de intoxicação com toxinas Cry. A caracterização do transcrito do gene caderina das linhagens suscetível, resistente e resistente isogênica de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) revelou uma proteína composta por três domínios, um ectodomínio formado por 11 domínios de repetição (CRs), seguido por uma região de membrana proximal (DMP), um domínio transmembrana (TM) e um domínio intracelular (C-terminal). Foram verificadas diferenças na composição de aminoácidos da proteína caderina predita entre as linhagens suscetível e resistente à toxina Cry1F nos domínios de repetição CR5, CR6 e CR10 e no domínio C-terminal. Também foi verificado que das mutações encontradas na linhagem resistente, apenas as mutações da região Cterminal foram fixadas na linhagem resistente isogênica. Dada à importância de receptores de caderina na interação com toxinas Cry, nossos resultados sugerem que as mutações encontradas na linhagem resistente que se fixaram na linhagem isogênica podem estar ligadas com a perda da capacidade de ligação da toxina Cry1F com caderina e, consequentemente, ter impedido a oligomerização e a formação de poros no epitélio da membrana intestinal, sendo o provável mecanismo de resistência dessa linhagem à Cry1F.

Palavras-chave: Manejo da resistência; Mutação; Poros; Receptor

Abstract

The mode of action of proteins with entomotoxic activity produced by Bacillus *thuringiensis*, mainly the δ -endotoxin, also known as crystal or Cry proteins, has been widely studied. The mode of action of Cry toxins requires different steps and it depends on the binding specificity to distinct receptors. Thus, any changes in Cry proteins receptors can lead to the evolution of insect resistance. Cadherin is one of such receptors, as it has been involved in a major step of the intoxication process with Cry toxins. Characterization of the cadherin transcript from susceptible, resistant and isogenic resistant strains of Spodoptera frugieprda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) revealed a predicted protein containing three domains, one ectodomain formed by 11 cadherin-repeated domains (RC), followed by a membraneproximal region (MPC), a transmembrane (TM) and an intracellular domain (C-terminal). Cadherin from resistant insects differed from the susceptible at the repeated domains CR5, CR6 and CR10 and the C-terminal domain. But only differences in the C-terminal region of the cadherin from the resistant line were fixed in the resistant introgressed line (isogenic). Our data demonstrate the resistant line carries mutations in the cadherin receptor that were maintained in the resistant introgressed line, providing strong evidence that resistance of S. frugiperda is due to target-site mutations of this receptor.

Keywords: Mutation; Pores; Receptor; Resistance management

5.1 Introdução

O modo de ação de proteínas com atividade entomotóxica produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*, principalmente o das δ -endotoxinas, também conhecidas por proteínas do cristal ou proteínas Cry, tem sido amplamente estudado em Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011; OPPERT et al., 2012; ZHANG et al., 2012; CAMPAGNE et al., 2013; SPARKS et al., 2013; CANTON et al., 2015; XIAO et al., 2014; TAY et al., 2015). A especificidade dessas proteínas depende dos distintos receptores da superfície celular do epitélio intestinal do mesêntero dos insetos (ZHANG et al., 2006, BRAVO et al., 2011a; BRAVO et al., 2011b). Devido ao modo de ação das toxinas Cry ser um processo multipasso dependente da especificidade da ligação com vários receptores, qualquer alteração em uma dessas proteínas ligantes às proteínas Cry pode levar à evolução da resistência de insetos (JURAT-FUENTES; ADANG, 2007). A redução na ligação de toxinas Cry aos receptores do epitélio intestinal é o mais comum e potente mecanismo de resistência de insetos a esse grupo de toxinas (FERRÉ; VAN RIE, 2002; WU, 2004).

Há duas hipóteses concorrentes para explicar o modo de ação das toxinas Cry (ZHANG et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015). Uma diz respeito à formação de poros na membrana do epitélio intestinal (BRAVO; SOBERÓN, 2008), enquanto a outra se baseia na transdução de sinal intracelular e ativação do processo de morte celular (ZHANG et al., 2006). O modelo que mais tem recebido aceitação e suporte na literatura indica que o processo patológico pelo contato do epitélio intestinal de insetos com proteínas Cry se dá pela formação de poros na membrana do epitélio intestinal. Nesse caso, a proteína Cry ativa se liga a um receptor de membrana intestinal do tipo caderina, o qual facilita a remoção da região amino-terminal da toxina, incluindo a alfa hélice-1 e parte da alfa hélice-2, e o processo de oligomerização da toxina junto à superfície do epitélio intestinal (GÓMEZ et al., 2014). Uma vez oligomerizada, o oligômero de proteínas Cry se liga a proteínas ancoradas às microvilosidades do mesêntero por ligações a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), atuando como receptores secundários. As principais proteínas GPI-ancoradas que atuam nesse processo são as aminopeptidases-N e as fosfatases alcalinas. A ligação do oligômero de proteína Cry aos receptores secundários leva à sua inserção na membrana e à subsequente formação de poros, resultando na morte do inseto (VADLAMUDI et al., 1995; GÓMEZ et al., 2002; PARDO-LÓPEZ et al., 2006; BRAVO et al., 2007).

A oligomerização é um passo importante no mecanismo de ação de toxinas Cry (GÓMEZ et al., 2002; PARDO-LÓPEZ et al., 2006). Segundo Pardo-López et al. (2006), a toxina Cry1Ac interage com caderina induzindo o processamento proteolítico que resulta na oligomerização. O oligômero formado possui maior afinidade com os receptores subsequentes, como a aminopeptidase N (APN) e a fosfatase alcalina (ALP), e apresenta maior toxicidade quando comparado aos monômeros. Resultados similares foram apresentados para a toxina Cry1Ab, demonstrando que o receptor caderina facilita a clivagem da alfa hélice-1 do domínio I, permitindo a formação do oligômero (GOMÉZ et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado a toxina Cry1A modificada pela remoção de sua região Nterminal foi capaz de se oligomerizar na ausência de caderina, sendo altamente tóxica para as larvas de S. frugiperda resistentes à toxina Cry1F, demonstrando que a oligomerização é um processo importante na toxicidade da Cry1F a S. frugiperda (MONNERAT et al., 2015). Segundo esta autora, é possível supor que o alelo resistente pode estar afetando uma molécula receptora envolvida na oligomerização de Cry1F (MONNERAT et al., 2015). Toxinas modificadas reverteram a resposta de resistência associada a mutações no gene de caderina (SOBERÓN et al., 2007). A suscetibilidade à toxina Cry1Ab foi reduzida após o silenciamento do gene caderina com RNA de interferência em Manduca sexta (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae).

Caderinas representam uma grande família de proteínas transmembrana cálciodependentes, responsáveis por manter a integridade e a adesão célula-célula em muitos organismos (NOLLET; KOOLS; VAN ROY, 2000; ANGST; MARCOZZI; MAGEE, 2001). Em insetos, esta proteína é composta por três domínios, um ectodomínio formado por 11 a 12 domínios de repetição caderina (CRs), seguido por uma região de membrana proximal (DMP), um domínio transmenbrana (TM) e um domíno intracelular (C-terminal) (VADLAMUDI et al., 1995; RAHMAN et al., 2012). Os domínios de repetição caderina são locais de interação com toxinas Cry, e qualquer alteração nesses domínios pode impedir a ligação da proteína Cry com o receptor ou levar a ligações de baixa afinidade, comprometendo a oligomerização e, consequentemente, a formação de poros no epitélio do intestino e toxicidade ao inseto (ZHANG et al., 2006; BRAVO et al., 2007; SOBERÓN et al., 2009; PARDO-LÓPEZ et al., 2012).

A resistência a toxinas Cry associadas a mutações em genes caderina demonstra a importância da caderina no modo de ação dessas toxinas (GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001; MORIN et al., 2003; JURAT-FUENTES et al., 2004; XU et al., 2005; SOBERÓN et al., 2007; FABRICK et al., 2009). Mutações no gene caderina foram identificadas como as

causas para a resistência em inúmeros lepidópteros-pragas importantes, como *Chloridea* virescens (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes à toxina Cry1Ac (FERRÉ; VAN RIE, 2002; HECKEL et al., 2007). A resistência à Cry1Ac em *P. gossypiella* foi associada a deleções nos três alelos do gene de caderina identificados (r1, r2, r3), como as deleções de 24 nucleotídeos (3386-3407 e 3413-3414) na região do domínio CR8 no alelo r1, de 202 nucleotídeos (2415-2616) no alelo r2 e de 126 nucleotídeos (3302-3427) no alelo r3, que resultaram na alteração da sequência de aminoácidos da proteína codificada. O alelo r2 também apresentou o surgimento de um códon de parada prematuro no domínio de repetição CR6, dando origem a uma caderina truncada, com apenas 805 aminoácidos (MORIN et al., 2003; FABRICK et al., 2011).

O sítio de ligação da toxina Cry1Ab à caderina de *C. virescens* está localizado no domínio de membrana proximal (posição na cadeia proteica: 1422-1440) (GAHAN; GOULD;HECKEL, 2001). Mutações nesta região resultaram na perda da ligação da toxina Cry1Ab/Cry1Ac à caderina, sendo os aminoácidos leucina (L) (1425) e fenilalanina (F) (1429) críticos para a ligação. A substituição de leucina por arginina no mutante L1425R de *C. virescens*, também foi demonstrada como a responsável pela diminuição da capacidade de ligação à toxina Cry1A (XIE et al., 2005).

A linhagem de laboratório de *H. armigera* resistente às toxinas Cry1Ac/Cry1Aa/ Cry1Ab apresentou códon de parada prematuro no domínio de repetição CR3, resultando em caderina truncada com 429 aminoácidos, a qual foi associada aos níveis elevados de resistência a essas toxinas (Cry1Ac - 564x; Cry1Aa - 103x; Cry1Ab - >46x) (XU et al., 2005). A resistência de *H. armigera* à toxina Cry1Ac também foi relacionada à deleção de um fragmento entre os éxons 8 e 25 do gene caderina, o que resultou na produção de sequência proteica de caderina truncada (YANG et al., 2006). Foram oito os alelos do gene caderina identificados na linhagem resistente de *H armigera*, que apresentaram códon de parada prematuro e que foram associados à resistência desse inseto à toxina Cry1Ac (ZHAO et al., 2010).

A linhagem resistente de *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) à toxina Cry1Ac apresenta três alelos mutantes de caderina (MPR-R1, MPR-R2, MPR-R3), sendo que todos os alelos apresentaram três substituições de aminoácidos na região de membrana proximal da caderina (MPR-1R – T1407A, T1457S e D1489N), (MPR-R2 – D1381N, I1386T e T1457S) e (MPR-R3 – D1381N, I1386T e T1457S). O alelo MPR-R2 também apresentou deleção de 26 aminoácidos (136-161) no domínio de membrana proximal,

resultando na redução da ligação de Cry1Ac à caderina quando comparada a linhagem suscetível. Além da associação da resistência de *O. furnacalis* às mutações e deleções nos alelos descritos, foi verificado que a resistência desse inseto também está ligada à redução no nível de expressão gênica da caderina (JIN et al., 2014).

A resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho Bt em Porto Rico foi relatada apenas quatro anos após a liberação comercial do produto, inviabilizando o uso dessa tecnologia no controle da praga naquele país (STORER et al., 2010). No Brasil, também foi relatada a resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1F para linhagens de laboratório e campo (FARIAS et al., 2014). Recentemente, foi relatada a resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1Ab no Brasil (OMOTO et al., 2016). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares da resistência dessa espécie às toxinas Cry1F e Cry1Ab.

Dada a importância de receptores caderina na interação com toxinas Cry, a sua participação em diversos casos de resistência de insetos a toxinas Cry1A e ao fato dessa toxina compartilhar sítio de ligação no epitélio do intestino médio com Cry1F em pelo menos duas espécies de lepidópteros-pragas, incluindo *S. frugiperda* (HERNÁNDEZ-RODRÍGEZ et al., 2013), esse trabalho teve por objetivo caracterizar o transcrito de caderina de *S. frugiperda* em linhagem suscetível, linhagem de laboratório resistente selecionada por F2 screening (FARIAS et al., 2014) e linhagem resistente à toxina Cry1F produzida por introgressão (HORIKOSHI et al., 2015), para verificar a existência de mutações no transcrito caderina e diferenças nos níveis de expressão entre linhagens suscetível e resistentes que possam explicar a redução observada na eficiência dessa toxina a populações desse inseto no Brasil.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Linhagens de Spodoptera frugiperda

A caracterização completa do transcrito da caderina foi realizada em três linhagens de *S. frugiperda*, sendo uma linhagem suscetível de referência (SUS), uma linhagem resistente à toxina Cry1F (RES) produzida por seleção direcionada em laboratório (FARIAS et al., 2014) e uma linhagem resistente isogênica (RESiso), produzida via introgressão por cruzamentos sucessivos entre as linhagens SUS e RES (HORIKOSHI et al., 2015).

A população suscetível foi obtida junto à EMBRAPA Sete Lagoas, MG em 1995, e tem sido mantida na ausência de pressão de seleção e sem a introdução de indivíduos de campo. A população resistente foi coletada em Barreiras, BA em áreas comerciais de milho

Bt (evento TC1507) expressando a toxina Cry1F. Essa população passou por processo de seleção direcionada em condições de laboratório, levando à produção de linhagem com razão de resistência à Cry1F superior a 5.524 vezes (FARIAS et al., 2014).

Ambas as populações resistentes (RES e RESiso) foram mantidas sob pressão de seleção com a toxina Cry1F no laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ-USP). Todas as linhagens foram criadas em dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura (KASTEN Jr. et al., 1978), e mantidas em condições controladas de laboratório ($25\pm1^{\circ}$ C, $70\pm10\%$ UR, fotofase de 14 h).

5.2.2 Caracterização do cDNA da caderina de linhagens SUS, RES e RESIso 5.2.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total do intestino de lagartas de *S. frugiperda* foi extraído utilizando o reagente Trizol (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 1 μ g do RNA total obtido foi utilizado para a síntese de cDNA, utilizando o sistema comercial de transcrição reversa Standard Reverse Transcription (Promega), conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, cerca de 1 μ g de RNA total foi misturado a 20 pM do iniciador Oligo(dT)₁₈, contendo a sequência adaptadora 5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG(T)₁₈-3', em volume final de 5 μ L, incubado a 70°C por 5 min e, na sequência, mantido a 4°C por 5 min. Após esse período, foram adicionados tampão da reação (1x), 3 mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 20 U de Rnasin e 1 μ L de transcritase reversa ImProm-IITM Reverse (Promega), para reação em volume final de 20 μ L. A reação foi então incubada a 25°C por 5 min, seguida de incubação a 42°C por 60 min para a extensão da fita simples de cDNA, seguida pela inativação da transcritase reversa a 70°C por 15 min. O cDNA de fita simples obtido foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

5.2.2.2 Amplificação e sequenciamento do cDNA da caderina

A caracterização completa dos transcritos de caderina das linhagens SUS, RES e RESiso foi realizada após amplificação e sequenciamento dos fragmentos obtidos. Foram desenvolvidos conjuntos de iniciadores senso e antissenso (Tabela 5.1) a partir de sequência de um contig obtido de um transcritoma de *S. frugiperda* (dados não-publicados) (Figura 5.1, Tabela 5.1).

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
Sfcad98f Sfcad1020r	AGCTGTAACATCACTAGAGAAGTG TGCACAGCAAAGATCTCCAT	55	922
Sfcad856f Sfcad2046r	ATTGGACGAAGGTGTATATGGT CTTCTACACTTGGACTGGAACGT	54	1190
Sfcad1576f Sfcad2720r	TCACCATAGGTACTAGAATCC TCAAGAGAGCACTTATCGCTG	55	1144
Sfcad2305f Sfcad2983r	TGACCATCGATTACGAGAAGT GAAGAAGTTCTCCAGCCTGT	57	678
Sfcad2782f Sfcad3783r	ATCGCGATAACCGATACGAAC CGTGAGCATTGCAGTGTTGTCA	57	1001
Sfcad3380f Sfcad4577r	ATGATCTCGATACCTGGAAATTCG CTAACGCGAGTCGATATCATGT	56	1197
Sfcad4043f Sfcad4822r	TCTACTACTCTATCGTTGATGGC CTGAGTACTCAGTACGTCTCTGAT	57	779
Sfcad4423f Sfcad5176r	TCGACATTAACTCTGCAACC CAAGTCTTCGACATCCAGCA	55	753
Sfcad4822f 3'-Nested primer	CTGAGTACTCAGTACGTCTCTGAT GCTCACCATGGATGATGATATCGC	57	450

Tabela 5.1 - Conjunto de iniciadores utilizados para a amplificação de amplicons parciais do transcrito caderina de linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível (SUS), resistente (RES) e resistente isogênica (RESIso) à toxina Cry1F

As reações de PCR foram padronizadas para um ciclo de desnaturação inicial a 94° por 5 min, 35 ciclos compostos por 30 s de desnaturação a 94°C, 45 s com temperatura de anelamento adequada para cada conjunto de iniciadores (Tabela 5.1), e extensão final a 72°C por 10 min. As reações de PCR foram preparadas em volume final de 25 μ L, contendo 5 ng de cDNA fita simples, 1,5 mM de MgCl₂, 1x PCR buffer, 200 μ M de cada dNTP, 0,32 μ M de cada iniciador e 0,5U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen).



Figura 5.1 - Esquema representativo da estratégia de amplificação do transcrito de caderina de *Spodoptera frugiperda*, representando os iniciadores utilizados e a posição dos amplicons parciais produzidos

Os amplicons obtidos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão 1x TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA, pH 7,2), sob voltagem constante (100V), e visualizados em transiluminador UV. Os amplicons foram purificados usando o produto comercial Montage® PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore) e enviados para sequenciamento bidirecional utilizando-se dos conjuntos de iniciadores originalmente empregados nas reações de amplificação, bem como de iniciadores internos para o completo sequenciamento bidirecional das amostras. O sequenciamento foi realizado no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), ESALQ-USP, em sequenciador automático ABI (modelo 3730), utilizando o sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Os sequenciamentos obtidos foram analisados no programa FinchTV v. 1.4.0 (Geospiza Inc.) e as sequências deduzidas alinhadas com auxílio da ferramenta ClustalW no programa Mega 5 (TAMURA et al., 2011). As sequências proteicas preditas de caderina de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* à toxina Cry1F foram analisadas para a detecção do peptídeo sinal com o programa SignalP 4.1 (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</u>). Os domínios de repetição extracelular, domínio transmembrana e domínio intracelular foram detectados com o programa ISREC ProfileScan (<u>http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN)</u>.

As sequências de aminoácidos das linhagens SUS, RES e RESiso foram alinhadas com auxilio da ferramenta ClustalW no programa Mega 5 (TAMURA et al., 2011) contra sequências proteicas de caderina descrita para outras espécies: *Bombyx Mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (BAA99406.1; BAA99405.1), *C. virescens* (AAK85198.1; AAV80768.1), *H. armigera* (AEE44121.1; AEE44122.1), *Lymantria díspar* (Linnaeus) (Lepidoptera: Lymantriidae) (AAL26896.1), *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera:

Noctuidae) (AEI61920.1), *M. sexta* (AAM21151.1), *O. furnacalis* (ABS59299.1), *Ostrinia Nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) (AAY44392.1), *P. gossypiella* (AIA80597.1; AAP30715.1), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lapidoptera: Plutellidae) (NP_001292423.1; ABU41413.1), *Spodoptera exígua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (AFH96949.1) e *Spodoptera Litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (AFJ04291.1), para comparação de regiões já descritas como sítios de ligação da toxinas Cry1A - ₈₆₁DIEIEIIDTNN₈₇₁, ₁₃₂₈IPLQTSILVVTV₁₃₃₉ e ₁₄₂₃GVLSLNFQ₁₄₃₀ (COATES et al., 2005; XIE et al., 2005; CHEN et al., 2014).

5.2.3 Análises da expressão gênica diferencial do transcrito de caderina de *S. frugiperda* suscetível, resistente e resistente isogênica à proteína Cry1F

A análise da expressão diferencial do transcrito de caderina entre as linhagens suscetível (SUS), resistente (RES) e resistente isogênica (RESiso) de *S. frugiperda* foi realizada utilizando-se lagartas recém-mudadas para o quarto ínstar (0-24 h). As lagartas foram submetidas à dissecação em solução de RNALater refrigerada em condições assépticas, para a coleta do intestino médio. O intestino coletado foi rapidamente transferido para tubo contendo solução nova de RNALater e armazenado a -80°C para posterior extração do RNA total. Os intestinos foram submetidos à extração do RNA total, assim como descrito anteriormente.

Para a análise da expressão gênica diferencial do gene de caderina para as diferentes amostras estudadas por PCR quantitativo (qPCR) foram utilizados os iniciadores Sfcad1348qRTf (5'-CGC TCA GTA CGA CGT TCA CTT AGA-3') e Sfcad1448qRTr (5'-GGT GAA AGA CTG GGC CTG GTA-3'), selecionados com auxílio do programa Primer Express® versão 3.0.1 (Life Technologies©).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 μ g do RNA total de lagartas das linhagens SUS, RES e RESiso, obtidas assim como descrito anteriormente. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o sistema comercial ImProm-II(TM) Reverse Transcription System (Promega©), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de qPCR foi composta de 0,4 μ g de cDNA, 12,5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix® (Thermo Scientific©), 0,6 μ M de cada um dos iniciadores e 10,3 μ L de água, em reação com volume final de 25 μ L.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se da plataforma ViiA[™] 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies[®]). As condições de termociclagem

utilizadas foram de 2 min a 50°C, 10 min para desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. As curvas de dissociação foram analisadas para verificar a especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação do alvo. A normalização da amplificação foi feita utilizando o gene da proteína ribossomal 30S (30S rRNA) como referência PR30sF (5'-CAC CCT CGG TGT TAG ACG TT-3') e PR30sR (5'-CCA CCG GGA AAG TGA TAC TGT-3') (SOUZA, 2013). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por três tratamentos (suscetível, resistente e resistente isogênica), contendo três repetições biológicas (composta por 5 lagartas cada), sendo que cada repetição biológica foi analisada em triplicata técnica. A comparação da expressão relativa de cada gene foi realizada pelo método $\Delta\Delta_{Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização do transcrito de caderina nas linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistentes a Cry1F

Os transcritos de caderina isolados de linhagens SUS, RES e RESiso de *S. frugiperda* possuem 5.235 pb, que codificam por proteína predita de 1.734 aminoácidos. As proteínas codificadas pelos transcritos caracterizados compartilharam 99% de similaridade, sendo compostas por peptídeo sinal de 22 aminoácidos, ectodomínio composto por 11 domínios de repetição caderina (CRs), seguido pelos domínios de membrana proximal (DMP), transmembrana (TM) e C-terminal (Figura 5.2).

As sequências de aminoácidos de regiões da caderina descritas como sítios de ligação a toxinas Cry1A, como os CR7, CR11, DMP (COATES et al., 2005; XIE et al., 2005; CHEN et al., 2014), e a Cry1F, como porção da região CR10 até parte da DMP (RAHMAN et al., 2012), foram similares entre as três linhagens de *S. frugiperda* analisadas (Figura 5.2). A sequência ₈₆₁DIEIEIIDTNN₈₇₁ descrita em *O. nubilais* (COATES et al., 2005) é homóloga à região de CR7 das linhagens analisadas nesse trabalho e possuem os aminoácidos ₈₆₂I, ₈₆₄I, ₈₆₆I e ₈₆₈DTNN₈₇₁ conservados em diferentes espécies (Figura 5.3). Já a sequência ₁₃₂₈IPLQTSILVVTV₁₃₃₉, localizada no domínio CR11 de *O. nubilais* (COATES et al., 2005), foi homóloga a das linhagens de *S. frugiperda*, todas apresentando conservação dos aminoácidos ₁₃₃₀L, ₁₃₃₃S, ₁₃₃₅L, ₁₃₃₇V e ₁₃₃₈T (Figura 5.3). Porém, a maioria das espécies apresenta conservação apenas dos aminoácidos ₁₃₃₅L, ₁₃₃₇V e ₁₃₃₈T. A região localizada nos domínios CR12/DMP (₁₄₂₃GVLSLNFQ₁₄₃₀) de *C. virescens* também foi descrita como região de ligação para as toxinas Cry1A (XIE et al, 2005). Quatro dos oito resíduos que compõem essa região apresentaram variação, sendo eles os resíduos 1426 (S/T/I), 1428 (N/K/R), 1429 (F/M/I) e 1430 (Q/K). Entre esses, os resíduos $_{1429}$ F e $_{1430}$ Q são considerados sítios importantes para a ligação da proteína Cry1Ac (XIE et al., 2005), mas todos idênticos entre as linhagens de *S. frugiperda* estudadas (Figura 5.3).

As sequências proteicas das linhagens SUS e RESiso de *S. frugiperda* foram idênticas à região da caderina descrita como sítio de ligação para a proteína Cry1F nesse inseto (CR10 até parte da DMP) (RAHMAN et al., 2012), sendo encontrada uma única mutação na linhagem RES, localizada no CR10, com o aminoácido ₁₂₁₀S sendo substituído por ₁₂₁₀T na linhagem RESiso (Figura 5.2).



Figura 5.2 - Sequência de aminoácidos da caderina da linhagem de S. frugiperda suscetível à toxina Cry1F. Peptídeo sinal (sublinhado duplo), domínios de repetição (CR) em cinza, domínio de membrana proximal (DMP) em verde, região transmembrana (TM) em laranja e região intracelular (C-terminal) em roxo. As setas indicam início e fim de cada domínio. Em azul, regiões da caderina indicadas como sítios de ligação às toxinas Cry1A descritas em outras espécies. A sequência sublinhada marca a região descrita como sítio de ligação à toxina Cry1F em S. frugiperda. Resíduos da suscetível que diferem da linhagem resistente à toxina Cry1F estão marcados com *

E. mort (BAA99406.1)	01	7	VIO	21	I	D	Т	N	1	N	N	A	. 1	A	р	s	S	I	. 1	L	•	Т	١	17	r i	I		G V	1	I	s	L	N	F	Q	ł
B. mori (BAA99405.1)	01	1	VIO	è i	1	D	Т	N	1	N	A	v	1	L	Q	A	s	1	1	L		Т	1	1 7	r '	v		G V	11	L	т	L	N	F	Q	į.
C. virescens (AAK85198.1)	D	L	T I I	H	T	D	Т	N	1	N	I	P	1	L	Q	т	s	1	1	L	•	V	V	1 7	C.	v		G V	t)	L	s	L	N	M	Q	į.
H. armigera (AEE44121.1)	EI	Ľ	T I I	H	T	D	T	N	1	N	N	A	. 1	L,	P	s	N	1	1	L	-	T	١	7 7	Ľ	v		3 1	7 1	L	т	L	N	I	Q	į
H. armigera (AEE44122.1)	E I	I	ГІІ	H I	Т	D	Т	N	1	N	Т	D	1	V	р	т	N	1	1	L.	•	T	1	7	Ľ.	V		3 V	11	L	т	L	N	Μ	Q	ķ.
H. virescens (AAV80768.1)	E I	E	TII	11	T	D	Т	N	1	N	I	P	• 1	L	P	А	S	1	1	L	-	1	1	7]	r	v	(G V	11	L	т	L	к	I	K	i.
L. dispar (AAL26896.1)	LI	I.	SI	Y I	I	D	T	N	1	N	I	P	1	L,	р	G	S	I	. 1	Ľ,	-	Т	1	77	C)	V		G V	11	L	I	L	R	I	Q	į.
M. separata (AEI61920.1)	DI	5	гіс	21	L	D	Т	N	1	N	A	V.	1	L,	Q	A	s	1	1	L	N	T	1	17	r i	V		J V	11	L	s	L	N	F	Q	į.
M. sexta (AAM21151.1)	NI	E	T I I	11	Т	D	Т	N	1	N	A	V	1	L	Q	A	S	1	1	L	•	Т	١	1	r 1	V		3 V	11	L	s	L	N	F	Q	ĺ
O. fumacalts (ABS59299.1)	DI	I .	EII	E I	I	D	Т	N	1	N	N	A	. 1	P.	s	A	s	1		v	÷	T	1	7 7	r i	v	(G I	٠,	v ·	V	L	R	I	Q	į.
O. nubilalis (AAY44392.1)	DI	1	EII	E I	I	D	Т	N	1	N	T	A	. 1	N	P	s	S	ç	2.1	L.	÷	T	١	17	Г	1		J V	11	L	s	L	N	F	Q	į.
P. gossypiella (AIA80597.1)	DN	v	VII	1 1	V	D	I	N	1	N	A	V	1	4	Q	A	s	1	1	L	-	1	٦	7 1	Ľ	v		3 1	1	L	Т	L	N	F	Q	į
P. gossyptella (AAP30715.1)	DN	1	VIT	N I	V	D	I	N	1	N	I	P	1	Ŀ.	P	G	s	I	, 1	Ľ	•	T	1	17	r i	V		3 1	11	Ŀ	I	L	R	I	Q	į.
P. sylostella (NP_001292423.1)	NI	E :	TI.	11	T	D	T	N	1	N	I	P	1	6	Q	Т	S	1	1	L	S)	V	1	7 7	ſ	v	(G V	71	L	s	L	N	M	Q	į
P. xylostella (ABU41413.1)	NI	Ľ	ΓI /	4]	Т	D	Т	N	1	N	Т	D	1	V	P	т	N	1	1	L.	÷	T	1	17	C.	V		3 1	11	L	т	L	K	1	K	ŝ.
S. exigua SUS (AFH96949.1)	E I	Ľ.	AIG	21	Т	D	Т	N	1	N	I	A	. 1	L	т	s	Т	1	ĺ.,		-	Т	1	57	F I	V		зv	11	L	Т	L	N	I	Q	į.
S. litura (AFJ04291.1)	E 1	Ι.	AII	E 1	Т	D	Т	N	1	N	I	A	. 1	L	т	s	Т	1		•	•	Т	1	77	Ľ	V	1	J V	11	Ľ	Т	L	N	1	Q	į.
S. frugiperda RES	EI	Γ.	AI	1	T	D	T	N	1	N	S	1	1	L,	s	s	S	1	, 1	L	4	1	١	1.1	F	1	(3 1	1	I	s	L	N	F	Q	į
S. frugiperda RESiso	E	ι.	AI	11	T	D	T	N	1	N	\$	1	1	6	s	s	s	1	, 1	L		1	1	1	C.	I	(G V	1	I	s	L	N	F	Q	į
S frugiperda SUS	E I	I,	AI	A J	Т	D	Т	N	1	N	s	1	1	L	s	s	S	1	, 1	L.	•	T	1	17	Ľ	1	4	GΝ	l	I	s	L	N	F	Q	į

Figura 5.3 - Alinhamento de regiões da caderina descritas como sítios de ligação a toxinas Cry1A em diferentes espécies de lepidópteros. Em negrito linhagens resistentes a toxinas Cry1A e/ou Cry1F. (-) indica a existência de um gap

A sequência nucleotídica da linhagem SUS apresentou 31 pontos polimórficos, sendo 3 de primeira, 2 de segunda e 26 de terceira base do códon. As linhagens resistentes RES e RESiso apresentaram 34 e 28 pontos polimórficos, respectivamente, sendo que a RES apresentou 5, 4 e 25 sítios polimórficos na primeira, segunda e terceira base, respectivamente, enquanto a linhagem RESiso apresentou 3, 6 e 19 sítios polimórficos na primeira, segunda e terceira base (Tabela 5.2). A análise comparativa das sequências nucleotídicas do transcrito caderina das linhagens SUS e RES identificou 78 pontos de incongruência, sendo 58 pontos polimórficos, ou seja, nessas regiões podem ocorrer nucleotídeos presentes em ambas as linhagens, com 20 mutações identificadas exclusivamente na linhagem RES quando comparada à linhagem SUS. Das 20 mutações nucleotídicas verificadas na sequência de caderina da linhagem resistente a Cry1F, apenas cinco delas corresponderam a mutações nãosinônimas (Figura 5.4, Tabela 5.2). Estas mutações estão distribuídas nos domínios de repetição CR5, CR6 e CR10 e no domínio C-terminal (Figura 5.4). Das mutações nãosinônimas observadas na linhagem RES, apenas aquelas dos resíduos 695 e 1723 levaram à substituição por aminoácidos com características químicas distintas daquelas apresentadas pelos aminoácidos da sequência de referência (SUS) (Tabela 5.2). As demais mutações nãosinônimas encontradas no transcrito de caderina da linhagem RES envolveram a substituição entre aminoácidos polares (Tabela 5.2).

A caracterização do transcrito de caderina da linhagem resistente isogênica (RESiso) foi realizada para verificar a fixação de mutações da linhagem resistente (RES) na linhagem isogênica pelo processo de introgressão gênica, acompanhada de seleção por resistência a

Cry1F. Apenas as mutações nos resíduos 1639 (Ser1639Asn) e 1723, (Pro1723Ser), ambas localizadas no domínio C-terminal foram fixadas na linhagem RESiso (Figura 5.4). As mutações encontradas nos domínios repetidos caderina CR5 (Glu577Asp), CR6 (Gly695Glu) e CR10 (Ser1210Thr) da linhagem resistente não foram fixadas na linhagem isogênica, a qual apresentou os mesmos resíduos que a linhagem suscetível (Figura 5.4, Tabela 5.2).



Figura 5.4 - Esquema representativo da estrutura da caderina de Spodoptera frugiperda e indicação de mutações não-sinônimas (E = ácido glutâmico, D = ácido aspártico, G = glicina, N = asparagina, P = prolina, S = serina, T = treonina) da caderina das linhagens suscetível (SUS_ e resistentes (RES = resistente; RESiso = resistente isogênica) encontradas. PS = Peptídeo sinal; 1 a 11 indica cada um dos domínios repetidos caderina; DMP = domínio de membrana proximal; TM = domínio transmembrana; C-terminal = domínio C-terminal

						(continua)						
	S	SUS	I	RES	R	ESiso						
Resíduo	aa^1	códon	aa ¹	códon	aa^1	Códon	-					
45	D	GAC	D/E	GAS	D	GAC	-					
62	D	GAC	D/E	GAS	D	GAC						
89	E	GAA	E	GA R	E	GAA						
124	R	CGT	R	CGY	R	CGT						
170	Ι	ATY	Ι	AAT	Ι	ATC						
180	Ι	ATY	Ι	ATT	Ι	ATT						
246	V	GT K	V	GTT	V	GTT						
252	S	TC K	S	TCT	S	TCT						
275	T/R	ASG	R	AGG	R	AGG						
306	K/Q	MAG	Q	CAG	K/Q	MAG						
345	G	GGG	G	GGS	G	GGG						
355	V	GT R	V	GTG	V	GTG						
397	I/M	AT R	Ι	ATA	Ι	ATA						
424	Т	ACC	Т	ACC	Т	ACY						
436	D	GAY	D	GAY	D	GAT						
449	S	AGY	S	AGT	S	AGY						
453	E	GAG	D/E	GAS	D/E	GAS						
487	D/E	GAS	D	GAT	D	GAC						
495	L	СТА	L	СТА	L	CTW						
542	D	GAT	D/E	GAW	D/E	GAW						
550	R	CGG	R/L	CKG	R/L	CKG						
552	Κ	AAA	K/T	AMA	K/T	AMA						
556	Ι	ATC	I/V	RTC	I/V	RTC						
557	G	GGT	D/G	G R T	D/G	G R T						
559	Ι	ATC	Ι	ATA	K/I	AWA						
572	L	CTG	L	CT R	L	CTR						
577	E	GAG	D	GAT	E	GAG						
602	L	СТА	L	CT R	L	CT R						
618	L	CTC	L	CTC	L	CTY						

 Tabela 5.2 - Diferenças dos aminoácidos das linhagens de S. frugiperda suscetível e resistente à toxina Cry1F nos diferentes domínios de caderina

 (continua)

		CIIC		(continuaçã RESiso						
	1	303		KES	K	LESISU				
Resíduo	aa	códon	aa	códon	aa	Códon				
627	Ν	AAC	Ν	AAC	Ν	AAY				
635	Р	CCA	P/R	CSA	Р	CCA				
660	Р	CCW	Р	CCW	Р	CCW				
695	G	GGA	Е	GAA	GAA G					
696	Ι	ATC	Ι	ATY	Ι	ATC				
731	V	GTG	V	GTG	E/V	GWG				
756	V	GTG	L/V	STG	V	GTG				
806	R	CGC	R	CGM	R	CGC				
811	Р	CCS	Р	CCC	Р	CCC				
834	G	GGS	G	GGC	G	GGC				
855	D	GAC	D	GAY	D	GAC				
902	K/E	RAG	K/E	RAG	E	GAG				
908	T/A	RCA	Т	ACA	А	GCA				
949	V	GTG	V	GTG	V	GT S				
958	V	GTM	V	GTA	V	GTA				
960	Y/F	TWC	F	TTC	Y/F	TWC				
982	V	GTY	V	GTC	V	GTC				
1035	Р	CCR	Р	CCA	Р	CCG				
1058	R	CGA	R	MGA	R	CGA				
1121	F	TTY	F	$TT\mathbf{Y}$	F	TTY				
1124	Y	TAY	Y	TAY	Y	TAY				
1207	G	GGT	G	GGW	G	GGT				
1210	S	TCA	Т	ACT	S	TCA				
1218	А	GCW	А	GCT	А	GCT				
1222	G	GGM	G	GGA	G	GGA				
1249	Т	ACT	Т	ACT	Т	ACY				
1262	D	GAC	D/Y	KAC	D	GAC				
1288	D	GAY	D	GAC	D	GAT				
1298	С	TGY	С	TGC	С	TGC				

Tabela 5.2 - Diferenças dos aminoácidos das linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente à toxina Cry1F nos diferentes domínios de caderina.

		SUS	I	RES	R	ESiso
Resíduo	aa ¹	códon	aa ¹	códon	aa ¹	Códon
1311	G	GGY	G	GGT	G	GGY
1337	Y	TAC	Y	TAY	Y	TAC
1339	V	GT R	V	GTG	V	GAT
1347	Р	CCW	Р	CCT	Р	CCT
1361	Т	ACC	Т	ACY	Т	AAC
1363	G	GGC	G	GGY	S/G	RGC
1389	Н	CAY	Н	CAC	Н	CAC
1395	L	CTG	L	CTG	L	CTS
1563	Е	GAG	D/E	GAS	E	GAG
1578	G	GGA	G	GGA	G	GGW
1585	G	GGY	G	GGC	G	GGC
1615	Ι	ATT	Ι	ATT	Ι	ATY
1639	S	AGC	Ν	AAC	Ν	AAC
1650	Κ	AAA	Κ	AAR	Κ	AAG
1658	Р	CCT	Р	CCY	Р	CCC
1675	V	GTA	V	GTA	V	GT R
1700	Е	GAG	E	GAR	Е	GAG
1722	Р	CCC	Р	CCY	Р	CCC
1723	Р	CCC	S	TCC	S	TCC

Tabela 5.2 - Diferenças dos aminoácidos das linhagens de S. frugiperda suscetível e resistente
à toxina Cry1F nos diferentes domínios de caderina.(conclusão)

¹Código universal de uma letra para abreviação de aminoácidos.

5.3.2 Análise da expressão gênica diferencial do transcrito da caderina de *S. frugiperda* suscetível, resistente e resistente isogênica

A análise da expressão diferencial do gene caderina de linhagens suscetível e resistentes de *S. frugiperda* à toxina Cry1F demonstrou que a expressão do gene caderina na linhagem resistente isogênica (RESiso) foi a menor, cerca de 0,4 vezes que a expressão obtida na linhagem suscetível. No entanto, os níveis de transcrição do gene caderina na linhagem resistente (RES) foi cerca de 6,5 vezes maior do que o da linhagem suscetível (Figura 5.5).


Figura 5.5 - Análise da expressão relativa do gene da caderina de indivíduos de linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistentes à toxina Cry1F. SUS - suscetível de referência, RESiso - resistente isogênica, RES - resistente

5.4 Discussão

Caderina tem sido relacionada à resistência de várias espécies de lepidópteros às toxinas Cry (GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001; XIE et al., 2005; ZHAO et al., 2010; FABRICK et al., 2011; ZHANG et al., 2012; JIN et al., 2014; GUO et al., 2015; PARK; HERRERO; KIM, 2015). No presente trabalho demonstramos que o transcrito de caderina das linhagens suscetível e resistentes à toxina Cry1F é similar ao de outras espécies de lepidópteros (BEL; ESCRICHE, 2006; RAHMAN et al., 2012), compartilhando alta similaridade nucleotídica, proteica e estrutural. As sequências da caderina de *S. frugiperda* compartilharam apenas 76% de similaridade com as de *S. exigua* (ADV1766.2) e *S. litura* (AFJ04291.1). A estrutura proposta da caderina em *S. frugiperda* demonstrou ser muito similar àquelas de outros lepidópteros. Também foi possível identificar regiões altamente conservadas nos domínios repetidos caderina (CR) entre as linhagens suscetível e resistentes à toxina Cry1F, os quais são relatados como sítios de ligação às toxinas Cry1A (COATES et al., 2005; XIE et al, 2005).

A caracterização dos transcritos de caderina de linhagens suscetível e resistentes de *S*. *frugiperda* à toxina Cry1F permitiu a identificação de mutações não-sinônimas na linhagem resistente que foram mantidas na linhagem isogênica produzida por introgressão do genótipo

resistente no suscetível, aliada ao processo de seleção direcionada pela exposição contínua da linhagem à toxina Cry1F. As mutações não-sinônimas que permaneceram associadas à linhagem isogênica foram localizadas no domínio C-terminal da caderina, nos resíduos 1639 e 1723. Também demonstramos a elevada razão de expressão do gene da caderina em indivíduos da linhagem resistente quando comparada à suscetível e linhagem resistente isogênica.

As regiões do CR7 878EIAIAITDTNNN888, CR11 1352TLSSSLLTVTI1363 e DMP 1435GVISLNFQ1442 das linhagens SUS, RES e RESiso de S. frugiperda foram idênticas às observadas em S. exigua, regiões essas descritas como sendo os sítios de ligação da toxina Cry1Ac (CHEN et al., 2014). Ensaios de competição por sítios de ligação demonstraram que várias toxinas Cry1A, incluindo Cry1Ac, competem com a toxina Cry1F por sítios de ligação na membrana do epitélio do intestino médio (HERNANDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013, DAVALOS, et al., 2015; MONNERAT et al., 2015), indicando que essas regiões dos domínios CR7, CR11 e DMP também poderiam servir como sítios de ligação para toxinas Cry1F. Porém, a região exata da caderina que se liga à toxina Cry1F permanece desconhecida. Há indicações de que a porção da caderina que se estende da região do CR10 ao DMP representaria o sítio de ligação à toxina Cry1F, visto a afinidade do peptídeo sintético de 311 aminoácidos que representa a região CR10-DMP da caderina em indivíduos de S. frugiperda resistentes à toxina Cry1F (RAHMAN et al., 2012). Uma única mutação na região do CR10 foi identificada na sequência proteica na região da caderina das linhagens SUS, RES e RESiso de S. frugiperda analisadas correspondente a esse peptídeo (CR10-DMP). Porém, essa mutação mantém características químicas semelhantes (aminoácidos polares) ao da sequência de referência (SUS). Além disso, essa mutação não foi fixada na linhgem resistente isogênica. Assim, a se considerar as evidências de literatura para os sítios ligantes da caderina à toxina Cry1F, verificamos que não há qualquer evidência de que a resistência da linhagem de S. frugiperda analisada seja decorrente de mutações existentes nos domínios ligantes da caderina sugeridos para a toxina Cry1F.

Das hipóteses voltadas a explicar o modo de ação das toxinas Cry, uma é baseada na formação de poros na membrana do epitélio intestinal (BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015), enquanto a outra na transdução de sinal intracelular e ativação do processo de morte celular programada (ZHANG et al., 2006). Em ambos os modelos, a proteína caderina é essencial para ação das toxinas Cry, sendo ela o ponto de ligação da toxina à membrana das células epiteliais para o desencadeamento das alterações que levarão a célula à morte (ZHANG et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008; BRAVO et al., 2015). No modelo que prevê a formação de poros, os domínios de repetição caderina são os locais de interação com as toxinas Cry, e alterações nessas regiões levariam à perda de afinidade à toxina Cry, comprometendo a produção de oligômeros e, consequentemente, sua toxicidade ao inseto (BRAVO et al., 2007; SOBERÓN et al., 2009; PARDO-LÓPEZ et al., 2012). Mutações/deleções nas regiões CRs da caderina foram associadas à resistência a toxinas Cry em diversas espécies de insetos (FERRÉ; VAN RIE, 2002; MORIN et al., 2003; XU et al., 2005; YANG et al., 2006; HECKEL et al., 2007; FABRICK et al., 2011). Há também indicações de que o domínio de membrana proximal (resíduos 1422 a 1440), estudado em populações de *C. virescens*, também sirva de sítio de ligação de toxinas Cry, visto que mutações nesta região resultaram na perda da ligação das toxinas Cry1Ab e Cry1Ac à caderina (GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001). Assim, a ocorrência de mutações nessas regiões como mecanismos de resistência a toxinas Cry não explicam a resistência observada de *S. frugiperda* a toxina Cry1F, visto a inexistência de mutações não-sinônimas nas regiões de CRs e do domínio de membrana proximal da linhagem resistente de *S. frugiperda*, indicando haver outro mecanismo envolvido na resistência a essa toxina.

A ausência de mutações nos CRs da caderina também foi observada em *P. xylostella* resistente à toxina Cry1Ac (GUO et al., 2015). Nesse caso, a diferença na proteína caderina de insetos suscetíveis e resistentes foi devido à deleção de dois aminoácidos na região transmembrana da caderina de *P. xylostella* resistente à toxina Cry1Ac (GUO et al., 2015). A importância de regiões da caderina que não interagem diretamente com toxinas Cry no processo de resistência de insetos a essas toxinas também foi demonstrado pela deleção de um aminoácido no domino intracelular de caderina de *H. armigera* para a toxina Cry1Ac (ZHANG et al., 2012). Assim, as bases moleculares da resistência não estão limitadas a falhas na ligação das toxinas Cry com caderina causadas por mutação nos domínios de ligação (CR), e as bases genéticas da resistência são mais diversas do que se pensava anteriormente. Sendo assim, nossos dados não suportam o modelo que propõe a ligação das toxinas Cry à caderina como sendo essencial à formação de poros, visto que nenhuma mutação nas regiões de interação Cry-caderina foi detectada nas linhagens de *S. frugiperda* resistentes.

O efeito de mutações na região intracelular da caderina (ZHANG et al., 2012) demonstram que a alteração na resposta às toxinas Cry podem ser decorrentes de mutações em regiões que não interagem diretamente com a toxina, que estariam controlando eventos de sinalização pós-ligação da toxina. Alterações no processo de toxicidade da toxina por mutações nessas regiões são sustentadas pelo modelo de transdução de sinal proposto por Zhang et al. (2006), visto que essas mutações poderiam ainda interferir na produção do sinal

intracelular. As mutações encontradas nos resíduos 1639 e 1723 da região C-terminal da caderina de *S. frugiperda* resistentes à toxina Cry1F e sua manutenção após processo de introgressão sob seleção direcionada, poderiam interferir com a produção do sinal intracelular necessário ao desencadeamento das modificações celulares em resposta à intoxicação com toxinas Cry. Essas mutações afetariam a transdução de sinal da ligação da toxina Cry1F com caderina evitando a ativação da proteína G e, como consequência, a cascata desencadeada pela ativação da adenil-ciclase. A ativação da adenil-ciclase resulta na maior produção de mensageiro secundário, o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), no interior da célula. A presença de altos níveis de cAMP no espaço intracelular ativa a proteína quinase A (PKA), resultando na desestabilização do citoesqueleto e dos canais da membrana da célula, levando à indução do processo de morte celular, manifestada pela formação de bolhas na membrana e pelo inchaço celular seguido da lise celular (ZHANG et al., 2006). Nesse caso, as mutações encontradas no C-terminal da caderina não desencadeariam a transdução do sinal intracelular em resposta à ligação da toxina Cry à caderina, assim como preconizado por Zhang et al. (2006).

Apesar da existência de relatos de que a resistência a toxinas Cry possa ocorrer pela baixa expressão de genes caderina (YANG, et al., 2011, JIN et al., 2014), os resultados apresentados para os níveis de expressão do gene caderina nas linhagens suscetível e resistentes de *S. frugiperda* à toxina Cry1F foram contraditórios. Enquanto a linhagem RESiso apresentou redução de 30% na expressão do gene caderina se comparado à expressão obtida na linhagem SUS, a expressão desse gene na linhagem RES foi cerca 6 vezes aquela das linhagens SUS e RESiso. Esses resultados não permitem relacionar a resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry ao controle da expressão do gene caderina. Ainda, taxas aumentadas de expressão de caderina também podem ocorrer em resposta à ingestão de Cry1Ab (XU et al., 2015).

5.5 Conclusões

• A proteína predita de caderina de *S. frugiperda* apresenta composição estrutural semelhante a de outras espécies de lepidópteros;

 As regiões descritas como locais de ligações para diferentes toxinas Cry1A e sirvam como possíveis sítios de ligação a Cry1F são altamente conservadas e idênticas nas três linhagens estudadas; • A caderina da linhagem resistente de *S. frugiperda* à toxina Cry1F carrega cinco mutações não-sinônimas distribuídas nos domínios de repetição caderina e na região intracelular;

• Apenas as mutações da região intracelular permaneceram associadas à linhagem RESiso produzida por introgressão;

• A expressão da caderina na linhagem RES é constitutivamente maior que da linhagem SUS;

• A resistência de *S. frugiperda* a toxina Cry1F pode ser dada pelas mutações na região Cterminal da caderina que interfeririam no mecanismo de sinalização pós-ligação da toxina, na transdução do sinal intracelular.

Referências

ANGST, B.D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A.I. The cadherin superfamily. **Journal of Cell Science**, Cambrige, v. 114, p. 625–626, 2001.

BEL, Y.; ESCRICHE, B. Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. **Gene**, Amsterdam, v. 381, p. 71-80, 2006.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Kidlington, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 41, p. 423-431, 2011a.

BRAVO, A.; DEL RINCON-CASTRO, M.C.; IBARRA, J.E.; SOBERÓN, M. Towards a healthy control of insect pest: potential use of microbial insecticides. In: LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. (Ed.). Green trends in insect control. Royal Society of Chemistry, Cambrige, 2011b. p. 266-299.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Different models of the mode of action of Bt 3d-Cry toxins. http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2015/20153137249.pdf 2015.

CAMPAGNE, P.; KRUGER, M.; PASQUET, R.; LE, R.U.B.; VAN DEN BERG, J. Dominant inheritance of field-evolved resistance to Bt corn in *Busseola fusca*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: < doi:10.1371/journal.pone.0069675>.

CANTON, P.E.; CANCINO-RODEZNO, A.; GILL, S.S.; SOBRÓN, M.; BRAVO, A. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1042, 2015, Disponível em: < doi 10.1186/s12864-015-2240-7>. CHEN, RR.; REN, XL.; HEN, ZJ.; MU, LL.; LI, GQ. A cadherin-like protein from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) is a putative Cry1Ac receptor. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 86, n. 1, p. 58-71, 2014.

COATES, B.S.; SUMERFORD, D.V.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. Sequence variation in the cadherin gene *Ostrinia nubilalis*: a tool for field monitoring. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 35, n. 2, p. 129-139, 2005.

DAVALOS, C.C.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; CRIALESI-LEGORI, P.C.B.; DESIDÉRIO, J.A.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; LEMOS, MV. F. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cambidae). Journal of Invertebrate Pathology, Maryland Heights, v. 127, p. 32-34, 2015.

FABRICK, J.A.; MATHEW, L.G.; TABASHNIK, B.E.; LI, X. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 20, p. 651-665, 2011.

FABRICK, J.A.; OPPERT, C.; LORENZEN, M.D.; MORRIS, K.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J.L. Anovel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland Heights, v. 284, p. 18401-18410, 2009.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; dos DANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 150-158, 2014.

FERNANDEZ-LUNA MT, LANZ-MENDOZA H, GILL SS, BRAVO A, SOBERON M, MIRANDA-RIOS J. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 12, n. 3, p. 746–57, 2010.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 501-543, 2002.

GAHAN, J.L.; 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.

GOMÉZ, I.I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α-1 in domain I and oligomer prepore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, Chichester, v. 513, n. 2/3, p. 242-246, 2002.

GOMÉZ, I.I.; SÁNCHEZ J.; MUÑOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, SS.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pore are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, London, v. 459, n. 2, p. 383-396, 2014.

GUO, Z.; KANG, S.; ZHU, X.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. The midgut cadherin-like gene is not associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* (L.). **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 126, p. 21-30, 2015.

HECKEL, D.G.; GAHAN, L.J.; BAXTER, S.W.; ZHAO, J.Z.; SHELTON, A.M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B.E. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 95, p. 192-197. 2007.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, cry1Ab, Cry1Ac and Cry1F proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2013, Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pone.0068164>.

HORIKOSHI, R.; BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; OKUMA, D.M.; FARIAS, J.R.; MIRALDO, L.L.; AMARAL, F.S.; OMOTO, C. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 108, n. 6, 2015. Disponível em: < doi.org/10.1093/jee/tov387>.

JIN, T.; CHANG, X.; GATEHOUSE, A.M.R.; WANG, Z.; EDWARDS, M.G.; HE, K. Downregulation and mutation of a cadherin gene associated with Cry1Ac resistance in the Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Toxins**, Basel, v, 6, p. 2676-2693, 2014.

JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. Characterization of a Cry1Acreceptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European **Journal of Biochemistry**, New Delhi, v. 271, n. 15, p. 3127–3135, 2004.

_____. A proteomic approach to study resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 95, n. 3, p. 187–191, 2007.

KASTER JR., P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P.Dados biologicos 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.

LIKITVIVATANAVONG S, CHEN J, EVANS AM, BRAVO A, SOBERÓN M, GILL SS. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 7, p. 2829–2838. 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ method. **Methods**, Maryland Heights, v. 25, p. 402-408, 2001.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; SOARES, M.S.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Evidence of fieldevolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLOS ONE**, San Francisco, v 10, n 4, 2015. Disponível em: < doi: 10.1371/journal.pone.0119544>. MORIN, S.; BIGGS, R.W.; SISTERSON, M.S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.100, n. 9, p. 5004-5009, 2003.

NOLLET, F., KOOLS, P., VAN ROY, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **Journal of Molecular Biology**, London, v.299, p.551–572, 2000.

OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P. Fieldevolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Chichester, v. 72, n. 1, 2016. Disponível em: < doi: 10.1002/ps.4201>.

OPPERT B.; DOWD, S.E.; BOUFFARD, P.;, LI, L.; CONESA, A. LORENZEN, M.D.; TOUTGES, M.; MARSHALL, J.; HUESTIS, D.L.; FABRICK, J.; OPPERT, C.; JURAT-FUENTES, J. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012. Disponível em:< doi:10.1371/journal.pone.0034624>.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2012.

PARDO-LÓPEZ, L.; GOMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBEÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, Colombus, v. 45, n. 34, p. 10329–10336, 2006.

PARK, Y.; HERRERO, S.; KIM, Y. A single type of cadherin is involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity in *Plutella xylostella*. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 20, n. 6, p. 624-633, 2015.

RAHMAM, K.; ABDULLAH, M.A.F.; AMBATI, S.; TAYLOR, M.D.; ADANG, M.J. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 354-362, 2012.

SOBERÓN, M.; GILL, S.S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GOMEZ, I.; TABASHNIK, B.E.; BRAVO, A. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. **Science**, Washington, v. 318, p. 1640-1642, 2007.

SOUZA, T.P. **Efeitos dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de** *Spodoptera frugiperda.* 2013. 85p. (Tese Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SPARKS M.E.; BLACKBURN, M.B.; KUHAR, D.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Transcriptome of the *Lymantria dispar* (gypsy moth) larval midgut in response to infection by *Bacillus thuringiensis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, 2013. Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0061190>.

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAY, W.T.; MAHON, R.J.; HECKEL, D.G.; WALSH, T.K.; DOWNES, S.; JAMES, W.J.; GORDON, K. H. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 11, n. 11, 2015. Disponíel em: <doi.org/10.1371/journal.pgen.1005534>.

TIEWSIRI, K.; WANG, P.D. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 34, p. 14037-14042, 2011.

VADLAMUDI, R.K.; WEBER, E.; JI, I.; JI, T.H.; BULLA, L.S.JR. Cloning and expression of receptor for an insecticidal toxin of *bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 5490-5494, 1995.

WU, Y. Detection and mechanisms of resistance evolved in insects to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Advances in Insect Physiology, Maryland Heights, v. 47, p. 297–342, 2004.

XIAO, Y.; ZHANG, T.; LIU, C.; HECKEL, D.G.; LI, X.; TABASHNIK, B.E.; WU, K. Missplicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. **Scientific reports**, London, v. 4, n. 6184, 2014. Disponível em: < doi: 10.1038/srep06184>.

XIE, R.; ZHUANG, M.; ROSS, L.S.; GOMES, I.; OLTEAN, D.I.; BRAVO, M.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 280, n. 9, p. 8416-8425, 2005.

XU, LN.; WANG, YQ.; HU, BJ.; LING, YH.; HE, KL. Transcriptome differences between Cry1Ab resistant and susceptible strains of Asian corn borer. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, 2015, Disponível em: < doi: 10.1186/s12864-015-1362-2>.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Acendotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 948–954, 2005. YANG, Y.; CHEN, H.; WU, S.; XU, X.; WU, Y. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 36, p. 735-740, 2006.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENEDER, C.; LEONARD, B.R.; ABEL, C.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: < doi.org/10.1371/journal.pone.0025783>.

ZHANG, H.; WU, S.; YANG, Y.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by na intracellular cadherin mutation in field-selected population of cotton bollworm. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, 2012. Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0053418>.

ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, Y. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Doetinchem, v. 40, p. 113-118, 2010.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR., L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.