

**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

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 esforços 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 Cavichioli 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, Maurinha, Anne, Paulinha, Binho, Adauto, Murilo, Clá, Mau, Keila, Paulão, Carol, Doney, Ana, Drape, Jazz, Jordão, Aline, Tato, Jaque, Bob, Tales, Julia, Zé Maria, Karina, Rafa, Biguete, Vivian, Michel, Jaque, Tete, Jura, Peter, Joanna, Denise, Rob, Sandra, Maria, 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

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 lepidópteros-praga, 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 transcrito dessas linhagens. Estudos de expressão gênica diferencial comparativa também foram realizados pela análise do transcrito 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 transcrito 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 transcrito 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 transcrito 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-S-transferases and carboxylcholinesterases in the RES strain, while no differences in the expression of Cry receptors, such aminopeptidase 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. Down-regulation 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-generation sequencing

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 agrônomo 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 Gram-positiva, 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 Mg^{2+} . 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, conseqüentemente, 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 pragas-alvo, 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 entendimento 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**. Disponível 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 microdomains. **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, 1º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2015/2016. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/1o-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, Disponível 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, Disponível em: <doi.org/10.1371/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 field-evolved resistance 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. Disponível 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. Disponível 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 resistance 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 field-evolved 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 Genomics**, 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. Field-evolved 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-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 toxin activity. **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.

TABASHNIK, B.E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, 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.; CARRIÈRE, 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.

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 transcrito 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 transcrito 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, glutathione-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 oligomerization 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

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* suscetível (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 transcriptoma *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 decorrente 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 field 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 constitutively. 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. Our data provides new insights on the mechanisms 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

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 C-terminal 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, conseqüentemente, 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 frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) revealed a predicted protein containing three domains, one ectodomain formed by 11 cadherin-repeated domains (RC), followed by a membrane-proximal 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

