



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LARISSA FORIM PEZENTI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE  
LINHAGENS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* RESISTENTES  
E SUSCETÍVEIS DESAFIADAS COM A CEPA HD-73 DE  
*BACILLUS THURINGIENSIS***

---

Londrina  
2017

LARISSA FORIM PEZENTI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE  
LINHAGENS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* RESISTENTES  
E SUSCETÍVEIS DESAFIADAS COM A CEPA HD-73 DE  
*BACILLUS THURINGIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Fernandes Souza

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pezenti, Larissa.

Análise transcricional comparativa entre linhagens de *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis desafiadas com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis* / Larissa Pezenti. - Londrina, 2017.  
75 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Coorientador: Rogério Fernandes Souza.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Resistência a Cry1Ac - Tese. 2. Transcriptoma - Tese. 3. RNA-seq - Tese. I. da Rosa, Renata. II. , Rogério Fernandes Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

LARISSA FORIM PEZENTI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE LINHAGENS  
DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS  
DESAFIADAS COM A CEPA HD-73 DE *BACILLUS THURINGIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Estadual de Londrina, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq, CAPES e EMBRAPA Soja pelo apoio financeiro.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, que contribuíram para a minha formação acadêmica, em especial a Profa. Dra. Ana Lúcia Dias e a Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano.

A banca examinadora, pela disposição em avaliar este trabalho e as importantes contribuições para sua melhoria.

A orientadora Profa. Dra. Renata da Rosa, por todas orientações e ensinamentos ao longo destes dois anos.

Ao coorientador Prof. Dr. Rogério Fernandes Souza por toda dedicação e empenho na realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Daniel Sosa-Gómez pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas- Bôas e Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas por todas as contribuições.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, a Profa. Sandra Regina Lepri e a todo pessoal do Laboratório de Genética Toxicológica pela contribuição para obtenção das amostras utilizadas neste trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de Citogenética Animal e do Laboratório de Bioinformática: Ana Beatriz Monteiro, Brenda Magalhães, Fábio Takagui, Jaqueline Fernanda Dionisio, Joana Baldissera, Kátia Brumatti Gonçalves, Lucyana Silva, Mariana Campaner, Mariana Terra, Matheus Rincão e Thaina Ferraz Lopes.

A minha família, em especial meus pais Elenice Forim Pezenti e Sérgio Pezenti, e também ao meu namorado Francisco Oliveira de Andrade, por todo amor e carinho, e por estarem sempre a meu lado.

Acima de tudo à Deus.

Meus sinceros agradecimentos.

PEZENTI, Larissa Forim. **Análise transcricional comparativa entre linhagens de *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis desafiadas com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis***. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, (Lepidoptera: Erebidæ) ou lagarta-da-soja, é um dos desfolhadores mais comum da soja no Brasil, sendo que as  $\delta$ -endotoxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (Bt) têm sido amplamente utilizadas como bioinseticida para o seu controle. O modo de ação destas toxinas é bem caracterizado em lepidópteros, no entanto existem muitas questões a respeito dos mecanismos de resistência às toxinas Bt. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo comparar o padrão de expressão gênica para a identificação de locos candidatos ao mecanismo de resistência à linhagem *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac em *A. gemmatalis*. Para tanto, o RNA total de linhagens suscetíveis e resistentes de *A. gemmatalis* desafiadas com essa bactéria foi extraído e sequenciado via Illumina® HiSeq 2500. Os 241.776.712 *reads paired-end* de 126 pb gerados foram montados em 25.757 transcritos. Desses, 17.900 apresentaram alinhamentos significativos com as proteínas do banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI. A análise de expressão diferencial entre as linhagens de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis à Bt HD-73 identificou 422 transcritos expressos diferencialmente ( $\log_2$  fold change  $\geq 2$  e padj  $< 0,1$ ), dos quais 195 foram regulados positivamente e 227 regulados negativamente nas lagartas resistentes. Os genes regulados negativamente nas linhagens resistentes estão relacionados principalmente a atividades proteolíticas, incluindo a tripsina, a quimotripsina e a carboxipeptidase, que participam do processo de ativação das protoxinas Cry de Bt. Por outro lado, os genes regulados positivamente são, em sua maioria, envolvidos com processos de desintoxicação, incluindo a esterase, genes que desencadeiam respostas imunes inatas, tal como a lectina do tipo C e a hemolin, bem como genes que regulam a defesa contra patógenos, como os inibidores de proteases, que podem atuar inibindo proteases endógenas ou fatores de virulência de patógenos. Este estudo apresenta as primeiras informações do transcriptoma de *Anticarsia gemmatalis* utilizando novas tecnologias de sequenciamento, e corrobora com a hipótese de uma base genética complexa das respostas fisiológicas e dos mecanismos de resistência selecionados mediante a utilização de Bt.

**Palavras-chave:** Lagarta-da-soja. Resistência a Cry1Ac. Transcriptoma. RNA-seq.

PEZENTI, Larissa Forim. **Comparative transcriptional analysis between resistant and susceptible *Anticarsia gemmatalis* strains challenged with the *Bacillus thuringiensis* HD-73 strain**. 2017. 75 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, (Lepidoptera: Erebididae) or velvetbean caterpillar, is one of the most common defoliants of soybeans in Brazil, and the  $\delta$ -endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (Bt) have been widely used as a bio-insecticide for their control. The mode of action of these toxins is well characterized in Lepidoptera, however there are many questions regarding the mechanisms of development of resistance to Bt toxins. Thus, the present work had as objective to compare the gene expression pattern for the identification of candidate genes for the resistance mechanism to the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 strain, which produces the bioinsecticidal Cry1Ac protein in *A. gemmatalis*. To that end, total RNA from susceptible and resistant *A. gemmatalis* strains challenged with this bacterium was extracted and sequenced by Illumina® HiSeq 2500. The 241,776,712 paired-end 126-bp reads generated were assembled into 25,757 transcripts. Of these, 17,900 showed significant alignments with the NCBI non-redundant protein database proteins. Differential expression analysis between resistant and susceptible strains of *A. gemmatalis* identified 422 differentially expressed transcripts ( $\log_2$  fold change  $\geq 2$  and  $p_{adj} < 0.1$ ), of which 195 were down-regulated and 227 down-regulated in resistant velvetbean caterpillars. The negatively regulated genes in the resistant strains are related to proteolytic activities, including trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase, which participate in the activation process Cry protoxins. On the other hand, positively regulated genes are involved in detoxification processes, including esterase, genes that trigger innate immune responses, such as type C lectin and hemolin, as well as genes that regulate defense against pathogens, such as protease inhibitors, which may act to inhibit endogenous proteases or pathogen virulence factors. This study presents the first information of the transcriptome of *Anticarsia gemmatalis* using new sequencing technologies and corroborates the hypothesis of a complex genetic basis of the physiological responses and mechanisms of resistance selected through the use of Bt.

**Keywords:** Velvetbean caterpillar. Cry1Ac Resistance. Transcriptome. RNA-seq.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1:</b> Lagarta-da-soja, <i>Anticarsia gemmatalis</i> . (a) e (b) lagarta (c) pupa.....	13
--	----

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Distribuição do tamanho dos transcritos do transcriptoma de referência de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	28
<b>Figura 2:</b> Espécies com maior quantidade de hits correspondentes aos 17.900 transcritos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> obtidos a partir da anotação funcional realizada com o software Blast2GO .....	29
<b>Figura 3:</b> Distribuição das sequências entre as categorias anotadas no <i>Gene Ontology</i> (GO) nas categorias processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares .....	30
<b>Figura 4:</b> <i>Heatmap</i> dos genes diferencialmente expressos entre <i>Anticarsia gemmatalis</i> suscetíveis e resistentes ( $\log_2 \text{fold change} \geq 2$ e $\text{padj} < 0,1$ ), candidatos aos mecanismos de resistência .....	32
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática dos mecanismos de resistência à <i>Bacillus thuringiensis</i> em <i>Anticarsia gemmatalis</i> selecionadas em laboratório. a) Grupo 1: genes envolvidos com atividades proteolíticas, a baixa expressão das proteases tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase nas lagartas resistentes pode prejudicar a ativação proteolítica das protoxinas de Bt (cruz vermelha). b) Grupo 2: Genes que regulam mecanismos de defesa contra patógenos, as serpinas e os inibidores com motivos Kazal atuam na proteção a infecção por patógenos, inibindo proteases endógenas ou patogênicas, não permitindo a formação da toxina Cry em seu estado ativo (cruz vermelha). c) Grupo 3: genes relacionados a mecanismos de desintoxicação, as esterases realizam a “sequestro” e desintoxicação de grande quantidade de Cry1Ac, o mecanismo de sequestro desempenhado pelas esterases são representadas por meio das setas vermelhas. d) Grupo 4: genes envolvidos em respostas imunes inatas, as proteínas hemolin e lectina do tipo-C atuam como receptores de reconhecimento de padrões, ligando-se a componentes microbianos e estimulando respostas imunes (seta tracejada) .....	34

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos resultados de montagem realizado com o software Trinity v2.1.1 para as bibliotecas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> suscetíveis e resistentes, desafiadas com a linhagem HD-73 de <i>Bacillus thuringiensis</i> , que codifica a proteína Cry1Ac .....	28
---	----

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1.	A cultura da soja [ <i>Glycine max</i> (L.) Merrill].....	12
2.2.	Insetos-praga da soja.....	12
2.3.	Controle de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	14
2.4.	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	14
2.5.	Resistência às proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
2.6.	Novas tecnologias de sequenciamento no estudo do transcriptoma .....	18
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
3.1.	Objetivo geral .....	21
3.2.	Objetivos específicos .....	21
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO I</b> .....	22
4.1.	Introdução .....	24
4.2.	Material e métodos .....	25
4.3.	Resultados.....	27
4.4.	Discussão .....	32
4.5.	Conclusões.....	37
4.6.	Referências .....	38
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	41
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	42
<b>7.</b>	<b>ANEXO</b> .....	52
	ANEXO A .....	52
	ANEXO B .....	53
	ANEXO C .....	54
	ANEXO D .....	55
	ANEXO E.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Fabaceae) é uma importante fonte de proteína vegetal, utilizada tanto para alimentação humana quanto animal. Ela possui alto teor de óleo, sendo utilizada para diversos fins associados a alimentação e a produção de biocombustíveis. Atualmente, a soja é um dos mais importantes produtos agrícolas da economia mundial e o Brasil possui participação significativa dentro deste cenário, sendo o segundo maior produtor (HIRAKURI & LAZZAROTTO, 2011; MASUDA & GOLDSMITH, 2009).

A produtividade da soja pode ser negativamente afetada por uma série de fatores bióticos e abióticos. Dentre os estresses bióticos, o ataque de insetos pode causar consideráveis perdas de produtividade dos grãos. No Brasil, destaca-se a presença da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, devido sua abundância e frequente ocorrência em todas as regiões onde existe o seu cultivo (MOSCARDI et al., 2012).

Durante os primeiros ínstaes na fase larval, a lagarta-da-soja apresenta coloração verde, já as lagartas maiores podem apresentar coloração escura, possuindo três linhas longitudinais brancas no dorso. Os adultos são mariposas de coloração que varia entre o cinza e o marrom e uma linha transversal escura ao longo das asas. As fêmeas depositam seus ovos principalmente na parte inferior das folhas durante o período da noite, sendo que a eclosão das lagartas ocorre em aproximadamente três dias. Embora o consumo foliar das lagartas nos três primeiros ínstaes seja baixo, do quarto ao sexto ínstar este passa a ser de 100 a 120 cm<sup>2</sup> por lagarta. Assim, quando não controladas, populações de *A. gemmatalis* podem provocar grandes desfolhas, causando perdas significativas na produtividade da soja (SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

O controle de *Anticarsia gemmatalis* pode ser realizado por meio da aplicação de inseticidas químicos e, mais recentemente, mediante o uso da soja geneticamente modificada, que expressa as proteínas bioinseticidas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, Intacta RR2 PRO, desenvolvida pela Monsanto (St Louis, MO) e registrada para uso comercial em 2011 no Brasil, fornecendo altos níveis de controle contra *A. gemmatalis* (BERNARDI et al., 2011).

A produção das proteínas bioinseticidas Cry ocorre por meio da atividade entomopatogênica desenvolvida pela bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, que é caracterizada pela produção de inclusões cristalinas parasporais durante a fase de esporulação. Essas inclusões são compostas de uma ou mais proteínas Cry ( $\delta$ -endotoxinas), codificadas por genes *cry*. Diferentes estirpes de *B. thuringiensis* produzem diversos tipos de protoxinas, que

apresentam atividade inseticida específica contra insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera (BRAVO, et al., 2007; MAAGD, et al., 2001).

O *B. thuringiensis* vem sendo extensivamente utilizado como inseticida biológico a partir de diferentes manipulações biotecnológicas, devido ao fato de não oferecer risco à saúde humana e não afetar organismos não-alvos. Contudo, sua utilização a longo prazo pode levar à seleção de insetos apresentando mecanismos de resistência, principalmente devido a utilização de plantas transgênicas (TABASHNIK et al., 2013).

Em lepidópteros, a resistência às proteínas de Bt é normalmente relacionada com modificações nos sítios receptores das toxinas no intestino médio dos insetos, como mutações em genes que codificam os receptores caderina, aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. No entanto, eventos de resistência também podem ocorrer em decorrência de falhas no processo de ativação da toxina por proteases digestivas, sequestro das toxinas por esterases ou glicolipídios, mecanismos de desintoxicação e respostas imunes, ou seja, a resistência às toxinas Cry apresenta base genética extremamente complexa (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

A evolução da resistência a diferentes inseticidas ameaça a eficiência de controle dos insetos, podendo comprometer os programas de manejo de pragas. O aumento no número de insetos-pragas resistentes a diferentes inseticidas e os avanços na área de genômica funcional vem estimulando o desenvolvimento de pesquisas visando a identificação de genes de resistência. Dentro deste contexto, os estudos que avaliam os padrões de expressão gênica obtidos a partir do estudo dos transcriptomas têm fornecido informações relevantes a respeito das bases genéticas associadas com a resistência de insetos às proteínas bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis* (FABRICK, et al., 2014; MUNSTER, et al., 2007; NAGAMATSU, et al., 1998).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo comparar o padrão de expressão gênica entre *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis à linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis*, produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac, visando a compreensão dos mecanismos de resistência nessa espécie.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]

A soja é uma leguminosa da família Fabaceae, também conhecida como feijão-soja ou feijão-chinês, que vem sendo extensivamente utilizada na agroindústria de alimentos devido ao seu alto teor de óleo e proteína. O farelo da soja é utilizado principalmente na indústria de rações e o óleo serve como matéria-prima para produção de óleo refinado e gorduras hidrogenadas, entre outros. Este também tem sido amplamente utilizado na indústria de tintas, lubrificantes, solventes e, mais recentemente, se transformou na principal matéria-prima para produção de biodiesel (PÍPOLO et al., 2015).

O complexo da soja apresenta papel extremamente importante para o agronegócio global. Segundo a *United States Department of Agriculture* (USDA) (2016) a sua produção mundial está projetada em 336,1 milhões de toneladas para a safra 2016/2017. O Brasil possui participação significativa dentro do cenário mundial de cultivo da soja, sendo o segundo maior produtor. Dessa forma, o complexo da soja desempenha papel fundamental para o produto interno bruto (PIB) brasileiro (HIRAKURI & LAZZAROTTO, 2011). Conforme o 3º Levantamento de safra 2016/2017 - Acompanhamento da safra brasileira de grãos, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), existe uma projeção de crescimento de 7,3%, com a expectativa de produção de 102,4 milhões de toneladas, cultivada em 33,9 milhões de hectares do território nacional. O cultivo da soja no Brasil concentra-se nas regiões Sul e Centro-Oeste do país, e os maiores produtores são os estados de Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

### 2.2 Insetos-praga da soja

Perdas significativas de produtividade e diminuição da qualidade de grãos e/ou sementes ocorrem devido ao ataque de diferentes insetos em várias fases do desenvolvimento da cultura da soja. No Brasil, os dois principais grupos de insetos-pragas que causam prejuízos no cultivo da soja são: os percevejos sugadores da família Pentatomidae, *Euschistus heros* Fabricius, 1798, *Piezodorus guildinii* Westwood, 1837 e *Nezara viridula* Linnaeus, 1758; e as lagartas desfolhadoras da ordem Lepidoptera, *Chrysodeixis includens* Walker, 1858, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805

(MOSCARDI et al., 2012; PANIZZI, et al, 2012; SPECHT, et al, 2013).

*Anticarsia gemmatalis* também conhecida como lagarta-da-soja, destaca-se por sua abundância e frequente ocorrência em todas regiões do país onde existe o cultivo da soja (MOSCARDI et al., 2012). Os adultos são mariposas que apresentam aproximadamente cinco cm de envergadura, com uma coloração que varia entre cinza, marrom ou bege e normalmente apresentam uma linha transversal escura ao longo das asas. Na face inferior do segundo par de asas, exibem pequenos círculos brancos próximos à margem externa. As fêmeas depositam seus ovos na parte inferior das folhas, caules ou ramos, preferencialmente no final da tarde e durante a noite. Os ovos apresentam aproximadamente 0,6 mm de diâmetro e coloração verde clara assim que depositados, tornando-se marrom próximo à eclosão das lagartas, o que ocorre em aproximadamente três dias após a deposição (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; MOREIRA & ARAGÃO, 2009; MOSCARDI et al., 2012; SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

A fase larval tem duração de 12-15 dias, passando normalmente por seis ínstaes (Figura 1A e B). Nos primeiros ínstaes, as lagartas possuem de 3-9 mm e se locomovem medindo palmos, devido as pernas abdominais não terem se desenvolvido completamente, sendo por isso confundidas com a lagarta falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). Estas apresentam inicialmente coloração verde com estrias longitudinais brancas no dorso, porém, as maiores, também podem apresentar coloração escura. Nos últimos ínstaes possuem quatro pares de propernas abdominais e um par terminal, podendo atingir 40 mm de comprimento. Inicialmente, as lagartas raspam pequenas áreas das folhas e, quando maiores, podem provocar desfolhas de mais de 30%, quando não controladas. Dependendo do estágio de desenvolvimento, alimentando-se inclusive das nervuras das folhas, pecíolos e hastes (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; MOSCARDI et al., 2012; SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

As lagartas se transformam em pupas após os seis ínstaes larvais (Figura 1C). A pupa recém-formada tem coloração verde-clara e, posteriormente, torna-se marrom escura e brilhante, sendo normalmente encontrada no solo. A fase de pupa dura cerca dez dias, quando emergem as mariposas (MOSCARDI et al., 2012).



**Figura 1:** Lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. (a) e (b) lagarta (c) pupa.

### 2.3 Controle de *Anticarsia gemmatalis*

O controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, tem se baseado na utilização de inseticidas químicos, o que traz um grande risco à saúde humana e aos ecossistemas. O seu uso frequente e indiscriminado pode provocar a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, prejudicar insetos benéficos e organismos não-alvos, além de desencadear uma série de doenças agudas ou crônicas nos seres humanos (DEVINE & FURLONG, 2007; GUEDES et al, 2012; TRAVISI et al., 2006).

No Brasil, a partir da década de 1960, com a identificação desses riscos, foram desenvolvidas grandes mudanças nas práticas de controle de pragas. Esses programas, denominados Manejo Integrado de Pragas (MIP), visam o seu controle efetivo por meio de técnicas de combate selecionadas com base em parâmetros econômicos, ecológicos e sociais, procurando interferir minimamente no agroecossistema. O MIP integra táticas de reconhecimento das pragas e de seus inimigos naturais, o monitoramento dos insetos e os níveis de ação, para que sejam tomadas as decisões na condução da lavoura (BUENO et al., 2012). Uma das práticas adotadas no MIP é a adoção do controle biológico, principalmente com o desenvolvimento de diversos inseticidas biológicos. Estes consistem em uma ampla gama de pesticidas microbianos ou bioquímicos obtidos de fontes naturais, e que são extremamente eficientes contra diversas pragas em diferentes culturas (CHANDLER et al., 2011; GUPTA & DIKSHIT, 2010).

Segundo Chandler et al., (2011), diversas bactérias, fungos, vírus e protozoários são usados para o controle biológico de insetos, patógenos e ervas daninhas. O biopesticida microbiano mais utilizado e também mais bem-sucedido é obtido a partir da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) (SANAHUJA et al, 2011).

### 2.4 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta atividade entomopatogênica, caracterizada pela produção de inclusões cristalinas parasporais durante a fase de esporulação. Essas inclusões são compostas de uma ou mais proteínas Cry ( $\delta$ -endotoxinas), codificados por genes *cry*. Diferentes estirpes de *B. thuringiensis* produzem diversos tipos de protoxinas, que apresentam atividade inseticida contra insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera, também apresentando atividade contra alguns nematoides (BRAVO, et al., 2007; MAAGD et al., 2001).

As proteínas Cry constituem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*. Segundo a base de dados “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” (CRICKMORE et al., 2016), atualmente existem mais de 700 sequências de genes *cry* descritos, classificados em 74 grupos (*cry1- cry74*), de acordo com a homologia das sequências de aminoácidos, apresentando terminologia específica formulada por números e letras dependendo de sua filogenia (Cry1Aa, Cry15a, Cry6B, Cry4Ba, entre várias outras) (CRICKMORE et al., 1998).

Em relação a especificidade, inicialmente foi proposto que as toxinas do grupo I (hoje Cry1) apresentavam atividade restrita a insetos da ordem Lepidoptera, o grupo III (hoje Cry3) específico para ordem Coleoptera, o grupo IV (hoje Cry4) específico para ordem Diptera e, as toxinas do grupo II (hoje Cry2), as únicas conhecidas por apresentarem atividade contra a ordem Lepidoptera e Diptera (HÖFTE & WHITELEY, 1989). No entanto, o número de proteínas Cry testadas em inúmeros bioensaios têm aumentado consideravelmente e, sabe-se hoje que inúmeras toxinas apresentam atividade cruzada entre as ordens de insetos. A toxina Cry1Ac já foi descrita por apresentar atividade contra mais de 50 espécies da ordem Lepidoptera, principalmente as das famílias Noctuidae, Pyralidae, Plutellidae, Tortricidae, Sphingidae, Lymantridae, Gelechidae e Bombycidae, bem como também foi relatado sua atividade contra um representante da ordem Diptera (*Glossina mortisans*) (FRANKENHUYZEN, 2009).

As proteínas Cry apresentam normalmente 27 a 140 kDa. Essas protoxinas são clivadas por diferentes proteases digestivas, produzindo fragmentos de toxinas ativas com cerca de 60 kDa (HÖFTE & WHITELEY, 1989). A estrutura terciária de diferentes proteínas Cry já foram determinadas (XU, et al., 2014), sendo que, o seu centro tóxico ativo possui três domínios globulares estruturais. O domínio I, localizado no sentido N-Terminal, consiste em sete  $\alpha$ -hélices (seis hélices anfipáticas e uma hidrofóbica central) envolvidas na inserção na membrana, possível oligomerização da toxina e na formação dos poros. Um domínio II,  $\beta$ -prisma, possui três folhas- $\beta$  antiparalelas envolvidas no reconhecimento do receptor. E o domínio III, C-terminal, apresenta duas folhas- $\beta$  antiparalelas também relacionadas ao reconhecimento do receptor, via interações específicas no intestino dos insetos (MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2011; SCHNEPF, et al., 1998).

Diferentes modos de ação das toxinas Cry têm sido propostos, principalmente em lepidópteros. Segundo Vachon, et al., (2012) existem três modelos que tentam explicar o modo de ação das toxinas Cry nesses insetos: o modelo clássico, o modelo da ligação sequencial e o modelo via de sinalização. O modelo clássico propõe que, quando as

protoxinas são ingeridas, estas são inicialmente solubilizadas em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando protoxinas solúveis que são então clivadas por diferentes proteases digestivas para se tornarem ativas. Em seguida, a toxina ativa liga-se a receptores específicos na membrana das células epiteliais do intestino médio, conduzindo a formação de poros permeáveis a pequenas moléculas (íons, aminoácidos e açúcares) nas microvilosidades apicais das membranas. A presença destes poros provoca um desequilíbrio iônico intracelular, o que resulta em lise celular. Com isso, ocorre a ruptura da integridade intestinal, e os insetos conseqüentemente morrem devido a septicemia (SCHNEPF, et al., 1998; VACHON, et al., 2012).

O segundo modelo, ou modelo de ligação sequencial, propõem que, após a ativação das toxinas via clivagem por proteases intestinais, estas se ligam ao receptor caderina. Essa ligação favorece clivagens adicionais na exterminidade N-terminal das toxinas, eliminando a  $\alpha$ -hélice 1 do domínio I da toxina, permitindo a sua oligomerização. Os oligômeros formados ligam-se a receptores como a aminopeptidase e a fosfatase alcalina, favorecendo a inserção da estrutura pré-poro na membrana. A formação de poros na membrana apical das células intestinais leva a um choque osmótico, conduzindo o inseto à morte devido ao processo de septicemia (SOBERÓN, et al., 2009; VACHON, et al., 2012).

O terceiro modelo recentemente descrito, ou modelo de ação de via de sinalização, propõem que a citotoxicidade das proteínas bioinseticidas de Bt é mediada pela ligação destas com receptores caderina. Esta ligação ativa uma cascata de sinalização dependente de  $Mg^{2+}$  e uma via de sinalização estimulada pela proteína G e a adenilil-ciclase. Isso promove um incremento na produção intracelular de AMP cíclico (AMPC) que ativa a proteína kinase A, conduzindo a uma via metabólica que leva à morte celular (VACHON, et al., 2012; ZHANG, et al., 2006).

Dessa forma, o *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de grande interesse agrônômico e científico, e vêm sendo extensivamente utilizada como inseticida biológico pelo fato de não oferecer riscos à saúde humana, não afetar organismos não-alvos, além de reduzir a necessidade de aplicação de inseticidas convencionais e de ser completamente biodegradável (BETZ et al., 2000; GUPTA & DIKSHIT, 2010). Diversas formulações comerciais baseadas em Bt são produzidas no mundo inteiro, apresentando um longo histórico de utilização bem sucedida. Dentre estas, destacam-se: Acrobe, Dipel, Delfin e Javelin (KAUR, 2000).

As plantas geneticamente modificadas que expressam os genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* (Bt), são uma alternativa ainda mais eficaz para o controle de diferentes pragas agrícolas. É o que acontece com a cultivar de soja Intacta RR2 PRO desenvolvida pela

Monsanto (St Louis, MO) e registrada para uso comercial no Brasil em 2011. Esta expressa o gene *cryIAc* de *Bt*, que confere resistência a vários lepidópteros, fornecendo altos níveis de controle de *A. gemmatilis* (BERNARDI et al, 2011; YU et al, 2012). Em plantas transgênicas, as proteínas Cry são expressas continuamente nos tecidos das plantas, fornecendo proteção durante todo período vegetativo (BRAVO et al, 2011).

## 2.5 Resistência às proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*

A evolução da resistência das pragas aos inseticidas e às plantas transgênicas têm se tornado um dos grandes empecilhos aos programas de controle de pragas. Os mecanismos de resistência possuem base hereditária e devem-se, principalmente, à evolução de respostas adaptativas que ocorrem pelo efeito da seleção natural sobre a variação genética das populações (DENHOLM & ROWLAND, 1992).

Em Lepidópteros, a resistência as proteínas *Bt* é normalmente relacionada com modificações nos sítios receptores das toxinas no intestino médio dos insetos. Além destas, outros mecanismos podem bloquear a sequência de fatores que possibilitam a ação das proteínas Cry, tais como: falhas na dissolução do cristal, no processamento da protoxina, na formação do poro ou na sua lise osmótica (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

Diversos trabalhos têm demonstrado eventos de resistência às toxinas Cry em decorrência de alterações na sua ativação por proteases digestivas (FORTIER, et al., 2007; OPPERT, et al., 1997; PEREIRA, et al., 2010), sequestro das toxinas por esterases ou glicolipídios (GRIFFITTS, et al., 2005; GUNNING, et al., 2005; MA, et al., 2012), desintoxicação e respostas imunes (MUNSTER, et al., 2007) e, principalmente, devido a mutações em genes de receptores das toxinas Cry (HARA, et al., 2003; GAHAN, et al., 2001; XU, et al., 2005).

Mutações nos genes que codificam receptores caderina estão associadas a elevados níveis de resistência a *Bt* em diferentes insetos da ordem Lepidoptera: *Diatraea saccharalis* (YANG, et al., 2011), *Chloridea virescens* (GAHAN, et al., 2001), *Pectinophora gossypiella* (MORIN, et al., 2003) e *Helicoverpa armigera* (XU, et al., 2005). Essas mutações afetam a expressão das proteínas no intestino médio larval, removendo os alvos de ligações das toxinas.

Mutações em outros receptores como a aminopeptidase-N (APN) e a fosfatase alcalina (ALP) também estão relacionados com diferentes níveis de resistência em lepidópteros. Em *Manduca sexta* (SANGADALA, et al., 1994), *Spodoptera exigua* (HERRERO, et al., 2005) e

*Trichoplusia ni* (TIEWSIRI & WANG, 2011), alterações na expressão de genes das aminopeptidases foram associados ao aumento da suscetibilidade às proteínas Cry. Do mesmo modo, mutações nos genes da fosfatase alcalina (ALP) foram descritas para as espécies *Chloridea virescens*, *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda*, ocasionando diferentes níveis de resistência (JURAT-FUENTES, et al., 2011).

Mutações em genes que codificam membros da família de transportadores ABC (proteínas transmembranas), ABCC2, também foram relatadas como estando associadas com a resistência em insetos às proteínas inseticidas de Bt, tendo isso sido observado em *Bombyx mori* (ATSUMI, et al., 2011) e *C. virescens* (GAHAN, et al., 2010).

Embora em diferentes espécies as bases genéticas da resistência às proteínas Cry tenham sido estudadas, em *Anticarsia gemmatalis* as pesquisas envolvendo genômica funcional visando a detecção dos mecanismos de resistência a essas proteínas são escassas ou inexistentes. Além de permitir descobrir o papel de diferentes genes no mecanismo de resistência de *A. gemmatalis*, esse tipo de estudo pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias futuras de controle desse inseto-praga.

## 2.6 Novas tecnologias de sequenciamento no estudo do transcriptoma

Os padrões de expressão gênica obtidos a partir do estudo dos transcriptomas têm fornecido informações relevantes a respeito das bases genéticas associadas com a resistência de insetos às proteínas bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis* (FABRICK, et al., 2014; MUNSTER, et al., 2007; NAGAMATSU, et al., 1998).

O transcriptoma é o conjunto de transcritos de uma célula, tecido ou organismo em um período específico do desenvolvimento ou condição fisiológica. Assim, os principais objetivos da transcriptômica são: catalogar todos transcritos (mRNAs, RNAs não codificantes e pequenos RNAs), determinar a estrutura transcricional dos genes, identificar padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais ou quantificar os níveis de expressão de cada transcrito sob diferentes condições. A compreensão do transcriptoma é fundamental para interpretar os elementos funcionais do genoma e assim, compreender o desenvolvimento de determinadas doenças, mecanismos de resistência, interação hospedeiro-patógeno, ente outros (WANG et al, 2009; WESTERMANN et al, 2012).

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para a análise de transcriptomas, entre elas a abordagem RNA-seq, que permite analisar os perfis dos transcriptomas utilizando novas tecnologias de sequenciamento (NGS – *New Generation Sequencing*) (MOROZOVA et al,

2009). Existem atualmente diversas tecnologias disponíveis para o sequenciamento em larga escala, como as plataformas Solexa/Illumina, SOLiD System da Applied Biosystems, Ion Torrent da Life Technologies e a PacBio da Pacific Biosciences. Essas plataformas diferem entre si principalmente quanto ao mecanismo químico empregado, tamanho e quantidade de *reads* gerados. No entanto, todas estas plataformas são capazes de produzir um enorme volume de dados associado a um menor custo, por meio do sequenciamento de milhões de pares de bases em uma única corrida (DIJK et al., 2014; METZKER, 2010).

O RNA-seq permite analisar os perfis dos transcriptomas, identificar a estrutura transcricional dos genes, identificar novos genes e isoformas expressas (provenientes de *splicing* alternativo ou outras modificações pós-traducionais), além de quantificar os níveis de mudanças de expressão de cada transcrito sob condições diferentes. Para a realização deste tipo de abordagem é necessária a criação de uma biblioteca de cDNAs. Para tanto, o RNA é fragmentado e transformado em cDNA por uma transcriptase reversa, sendo adicionados adaptadores a uma ou a ambas extremidades para não se perder a direcionalidade do transcrito. Cada molécula de cDNA (amplificada ou não) é sequenciada com um método de alto rendimento visando obter sequências curtas de um dos lados (*single-end*) ou de ambos os lados (*paired-end*). Os *reads* compreendem em até 10 kb, dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada (MARTIN & WANG, 2011; QUAIL, et al. 2012; WANG, et al. 2009).

Após o sequenciamento, os *reads* gerados devem ser processados para a eliminação de artefatos de sequenciamento, como a eliminação das sequências adaptadoras adicionadas durante o processo, remoção de sequências curtas e de baixa qualidade, bem como a eliminação de sequências contaminantes. O processo de limpeza das sequências pode ser realizado por softwares como o SeqTrim (FALGUERAS, et al., 2010), PRINSEQ (SCHMIEDER & EDWARDS, 2011) e Trimmomatic (BOLGER, et al., 2014), entre outros.

As análises de dados de RNA-seq exigem que os *reads* sejam montados, este processo pode ser guiado por um genoma ou transcriptoma de referência. Neste tipo de montagem os *reads* são alinhados/mapeados contra a referência, por meio de *softwares* como o Bowtie (LANGMEAD, et al., 2009), CuffLinks (TRAPNELL, et., 2012) e TopHat (TRAPNELL, et al., 2009). Para organismos não-modelos, como *Anticarsia gemmatalis*, diferentes algoritmos de montagem *de novo* como o Trinity (GRABHERR, et al., 2011) e o Oases (SCHULZ, et al., 2012) podem facilitar a reconstrução do transcriptoma, mesmo sem se ter um genoma de referência. Estes algoritmos trabalham baseados na redundância dos *reads* para criar sobreposições e montar os transcritos.

Para comparar a expressão diferencial entre diferentes condições é necessário transformar os milhões de *reads* em uma quantificação de expressão, por isso é realizado o mapeamento dos *reads* contra uma referência. A aplicação de estatísticas sobre essas contagens alinhadas/mapeadas, a fim de inferir a expressão diferencial em determinadas condições pode ser realizada a partir de programas como o DESeq2 (LOVE, et al., 2014) e o EdgeR (ROBINSON, et al., 2010).

Após a detecção das sequências diferencialmente expressas, estas devem ser identificadas e anotadas. Ou seja, deve-se atribuir a elas um significado biológico, a fim de se obter informações importantes do genoma, genes e seus produtos, além de suas funcionalidades e vias metabólicas envolvidas. Diferentes algoritmos facilitam o processo de anotação funcional nas suas várias etapas. O Blast2GO permite a anotação funcional automática, sendo uma abordagem efetiva para análise de dados em larga escala. A anotação funcional baseada na ontologia gênica realiza a categorização de genes em classes funcionais. O sistema de ontologias utilizadas pelo Blast2GO provém do *Gene Ontology Consortium* (GO) (<http://geneontology.org/>) e os termos GO podem descrever funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares (CONESA et al., 2005).

O aumento no número de espécies de insetos-pragas resistentes a diferentes inseticidas e os avanços e facilidades atualmente encontrados na área de genômica funcional vem estimulando o desenvolvimento de diversas pesquisas visando a identificação de genes de resistência. Os estudos sobre os perfis de expressão gênica, têm fornecido importantes informações sobre a regulação e os mecanismos moleculares envolvidos na evolução da resistência nessas espécies. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como proposta utilizar as ferramentas de sequenciamento de nova geração e de bioinformática a fim de descobrir genes candidatos envolvidos com os mecanismos genéticos associados com resistência à linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis*, produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo comparar o padrão de expressão gênica entre *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis à linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis* produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac, visando a compreensão dos mecanismos de resistência nessa espécie.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar, por meio da técnica de RNA-seq, o perfil transcricional de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis após serem desafiadas com a linhagem Bt HD-73.
- Identificar genes diferencialmente expressos a fim de associá-los a mecanismos de resistência à linhagem Bt HD-73 e relacioná-los com os dados obtidos em literatura.

#### 4. CAPÍTULO I

Artigo científico

**Análise do transcriptoma revela múltiplos mecanismos moleculares da resistência de *Anticarsia gemmatalis* à toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis***

Este artigo será submetido ao periódico Cellular and Molecular Life Sciences

## **Análise do transcriptoma revela múltiplos mecanismos moleculares da resistência de *Anticarsia gemmatalis* à toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis***

Larissa Forim Pezenti<sup>1</sup>; Daniel Ricardo Sosa-Gómez<sup>2</sup>; Rogério Fernandes de Souza<sup>1</sup>; Laurival Antônio Vilas-Bôas<sup>1</sup>; Kátia Brumatti Gonçalves<sup>1</sup>; Carlos Roberto Maximiano da Silva<sup>1</sup>; Gislayne Trindade Vilas-Bôas<sup>1</sup>; Adrivanio Baranoski<sup>1</sup>; Renata da Rosa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Embrapa Soja Londrina, Londrina-PR

### **Resumo**

*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae) é uma das principais pragas desfolhadoras da soja no Brasil. Uma das formas de controle desse inseto é a utilização das  $\delta$ -endotoxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* (Bt). O modo de ação destas toxinas no intestino médio é bem caracterizado em lepidópteros, no entanto existem muitas questões a respeito dos mecanismos de resistência às toxinas Bt. Neste trabalho analisamos as diferenças transcricionais, via RNA-seq, entre os estágios larvais de linhagens resistentes e suscetíveis de *A. gemmatalis* desafiadas com a linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis*, produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac. O transcriptoma de referência montado a partir de 241.776.712 reads paired-end de 126 pb gerou 25.757 transcritos com tamanho médio de 1.270 pb. Destes, 17.900 sequências apresentaram alinhamentos significativos com proteínas do banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI, evidenciando elevados níveis de similaridade com outros lepidópteros. Foram identificados 422 transcritos expressos diferencialmente ( $\log_2$  fold change  $\geq 2$  e padj  $< 0,1$ ), dos quais 195 regulados positivamente e 227 negativamente nas lagartas resistentes. Vários genes regulados negativamente estão relacionados, principalmente, com atividades proteolíticas (tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase), participando do processo de ativação das protoxinas Cry de Bt. Por outro lado, os genes regulados positivamente estão, em sua maioria, envolvidos com processos de desintoxicação (esterase), com o desencadeamento de respostas imunes inatas (lectina do tipo C e hemolin), bem como com a regulação da defesa contra patógenos (inibidores de proteases). Este é o primeiro estudo a investigar os mecanismos de resistência a Cry1Ac em *Anticarsia gemmatalis* utilizando tecnologias de sequenciamento em larga escala. Nossos dados corroboram a hipótese da base genética complexa das respostas fisiológicas e também dos mecanismos de resistência selecionados mediante a utilização de Bt. Além disso, os resultados trazem luz sobre os mecanismos moleculares e celulares de resposta à utilização de Cry1Ac que poderão ser utilizados em estratégias futuras para o controle de pragas agrícolas.

**Palavras-chave:** Lagarta-da-soja, toxinas Cry, resistência a Cry1Ac, RNA-seq, expressão gênica.

#### 4.1. Introdução

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, (Lepidoptera: Erebidae) é uma das principais pragas desfolhadoras da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Fabaceae: Phaseoleae) no Brasil. A principal medida para o controle desse e de outros insetos-praga na soja é realizada por meio da aplicação de inseticidas químicos, que trazem sérios prejuízos à saúde humana e ao ambiente. Diversas estratégias que visam a diminuição desses prejuízos têm sido desenvolvidas, dentre elas, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* (Bt) [1,2]. O *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) é uma bactéria Gram-positiva que produz inclusões cristalinas parasporais compostas de uma ou mais proteínas Cry ( $\delta$ -endotoxinas), que apresentam atividade inseticida específica contra os estágios larvais de insetos de diferentes ordens [3,4]. A cultivar de soja Intacta RR2 PRO, desenvolvida pela Monsanto (St Louis, MO) e registrada para uso comercial em 2011 no Brasil, expressa o gene *cry1Ac* de Bt. Este confere resistência a vários lepidópteros e fornece altos níveis de controle contra *A. gemmatalis* [1,2].

O modo de ação das toxinas Cry em lepidópteros envolve a interação sequencial com diferentes proteínas do intestino médio larval. Quando ingeridas pelo inseto suscetível, as protoxinas Cry são inicialmente solubilizadas em pH alcalino no intestino médio. As protoxinas solúveis liberadas são clivadas por diferentes proteases, resultando em fragmentos tóxicos ativos compostos por três domínios estruturais, com aproximadamente 60-70 kDa. Em seguida, as toxinas ativas se ligam a diferentes receptores nas microvilosidades apicais das membranas do intestino médio, ocorrendo a inserção das toxinas nas membranas e conduzindo a formação de poros permeáveis a pequenas moléculas. A presença destes poros provoca um desequilíbrio iônico, resultando em lise celular. Com a ruptura da integridade intestinal, o inseto morre devido a um processo de septicemia. Alternativamente, também é proposto que a ligação das proteínas Cry aos receptores caderina ativa uma via de sinalização dependente de  $Mg^{2+}$ , bem como outras vias que estimulam a proteína G e a adenilil ciclase. Isso resulta no aumento dos níveis de cAMP e na ativação da proteína quinase A, o que conduz à morte celular necrótica [3-6].

O *B. thuringiensis* vêm sendo extensivamente utilizado como inseticida biológico, tanto a partir de formulações pulverizáveis como pela expressão de genes *cry* em plantas transgênicas. Isso se deve ao fato deste não oferecer riscos à saúde humana, não afetar organismos não-alvos, além de reduzir a necessidade de aplicação de inseticidas

convencionais. No entanto, sua utilização a longo prazo pode levar à seleção de insetos resistentes [7,8].

Diferentes mecanismos de resistência às proteínas de Bt já foram relatados para diversos lepidópteros selecionados em condições de laboratório, como *Pectinophora gossypiella* [9], *Diatraea saccharalis* [10] e *Helicoverpa armigera* [11]. Nestas espécies, os mecanismos de resistência estão normalmente relacionados com modificações nos sítios receptores das toxinas no intestino médio dos insetos, tais como mutações em genes que codificam os receptores caderina, aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. Porém, eventos de resistência também podem ocorrer em decorrência de falhas no processo de ativação da toxina por proteases digestivas, sequestro das toxinas por esterases ou glicolipídios, elevação da resposta imune, entre outros. Isso indica que a resistência às toxinas Cry apresenta base genética complexa [7].

Embora a base molecular da resistência as toxinas Cry tenha sido estudada em várias espécies, não existem informações sobre os mecanismos associados à resistência de *Anticarsia gemmatalis* às proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Neste estudo analisamos a diferença transcricional entre os estágios larvais de duas linhagens de *A. gemmatalis* (resistentes e suscetíveis) desafiadas com a linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis* produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac, visando compreender os mecanismos celulares e moleculares associados com a resistência a essa proteína.

## 4.2. Material e métodos

### *Seleção das amostras e bioensaios*

Colônias de *Anticarsia gemmatalis* foram estabelecidas com indivíduos coletados no município de Sertanópolis-PR, Brasil em 2011. Os insetos foram submetidos a uma pressão de seleção por meio da incorporação da bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* linhagem HD-73 na dieta de Greene et al. 1976 [12] durante 56 gerações. A dieta foi disponibilizada aos insetos durante 48 horas e, posteriormente, as lagartas sobreviventes foram transferidas para uma dieta sem a presença da bactéria, a fim de completarem o seu ciclo de vida. Paralelamente, foi mantida uma população suscetível, proveniente da mesma colônia, a qual foi utilizada como referência para estabelecer as razões de resistência que, ao final das 56 gerações (aproximadamente 5 anos), se situavam entre 90-95 vezes.

Os bioensaios foram conduzidos a partir da seleção de indivíduos resistentes e suscetíveis de *Anticarsia gemmatalis* de terceiro ínstar, expostos a bactéria linhagem HD-73

de *Bacillus thuringiensis* incorporada à dieta artificial na concentração de 300 µg/ml durante 24 horas. Após este período, os insetos foram congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

#### *Extração de RNA e sequenciamento*

Três lagartas de cada grupo foram selecionadas para a extração de RNA e sequenciamento. Os indivíduos pertencentes ao grupo suscetível, desafiados com Bt HD-73, foram identificados como S-1189, S-1196 e S-1197, e, os resistentes, como R-1205, R-1206 e R-1209.

O RNA total de cada uma das seis amostras foi isolado usando um protocolo adaptado com o TRIzol® Reagent (Invitrogen) e o SV Total RNA Isolation System – Promega Z3100. As lagartas foram maceradas em 600 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen) e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo então incubados durante cinco minutos à temperatura ambiente. Para a extração orgânica, adicionou-se 120 µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Depois de incubadas durante 3 minutos à temperatura ambiente, estas foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior incolor, contendo RNA foi transferida para um novo tubo.

Para a purificação do RNA, adicionou-se 200 µL de etanol 95% e homogeneizou-se delicadamente. O conteúdo foi transferido para a coluna de rotação do SV Total RNA Isolation System – Promega Z3100 e centrifugado a 12.000 x g durante um minuto. Em seguida, adicionou-se 600 µL do *RNA Wash Solution* e centrifugou-se a 12.000 x g durante um minuto. Após a centrifugação, a solução do fundo foi descartada, adicionou-se 50 µL da solução *DNA incubation mix* (40 µL *Yellow core buffer*, 5 µL  $MnCl_2$  0.09M e 5 µL DNase I) e incubou-se as amostras durante cinco minutos à temperatura ambiente. A ação da DNase foi interrompida com a adição de 200 µL de *DNA Stop Solution* seguida por centrifugação a 12.000 x g durante um minuto. Então, adicionou-se 600 µL de *RNA Wash Solution* e centrifugou-se a 12.000 x g durante um minuto. Este processo foi repetido adicionando-se 250 µL de *RNA Wash Solution*. Finalmente, a coluna de rotação foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga, e foram adicionados 100 µL de água ultrapura livre de nucleases, sendo novamente centrifugado a 12.000 x g durante um minuto para a obtenção do RNA. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

A qualidade do RNA isolado foi avaliada utilizando o BioDrop™ (Isogen Life Science) e o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). As bibliotecas de cDNA foram construídas utilizando o Illumina® TruSeq Stranded mRNA Library Prep de acordo

com as instruções fornecidas pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina® HiSeq 2500 com leituras *paired-end* de 125 pb em meia *lane* pelo Centro de Genômica Funcional – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), em Piracicaba – SP.

#### *Análises de bioinformática*

A qualidade das bibliotecas obtidas a partir do sequenciamento foram analisadas utilizando-se a ferramenta FastQC v0.11.3 [13]. Em seguida, utilizando o Prinseq v0.20.4 [14], foram removidas as sequências adaptadoras, bem como os *reads* com tamanho inferior a 40 pb e com qualidade inferior a 20 na escala *Phred*. A montagem do transcriptoma de referência de *Anticarsia gemmatalis* foi realizada utilizando a estratégia *de novo*, pois não existem genomas de referência descritos para esta espécie. Os transcriptomas de cada uma das seis bibliotecas sequenciadas foram montados na plataforma Trinity v2.1.1 [15]. A fim de reduzir a redundância dos transcritos, os conjuntos resultantes foram processados pelo software CD-HIT-EST com nível de similaridade de 90% [16]. Somente transcritos com mais de 700 pb foram mantidos nas análises subsequentes. O mapeamento e a contagem dos *reads* no transcriptoma de referência foi realizado com o *software* Bowtie2 v2.2.0 [17]. A análise de expressão gênica diferencial entre ambos os grupos de *A. gemmatalis* foi avaliada com o pacote DESeq2 [18], implementados no programa RStudio em linguagem R. Por fim, esses transcritos foram anotados utilizando a ferramenta Blast2GO v3.3.5 [19].

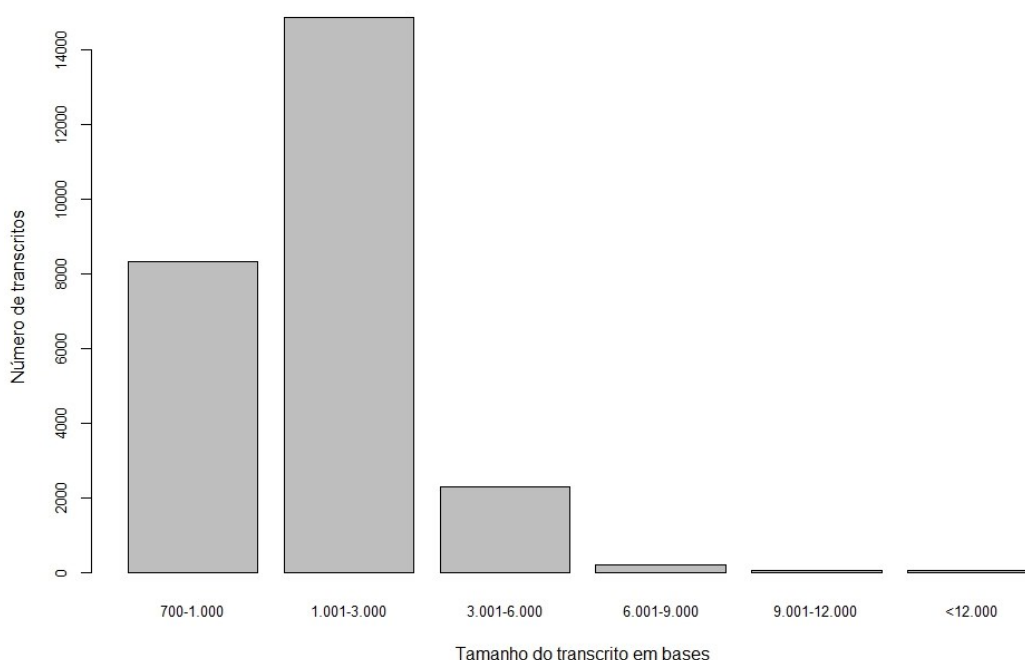
### **4.3. Resultados**

#### *Montagem de novo do transcriptoma de referência de Anticarsia gemmatalis*

O sequenciamento das seis bibliotecas de cDNA geraram 241.776.712 *reads paired-end* de aproximadamente 126 pb. Estas apresentaram boa qualidade, de tal forma que poucos *reads* foram eliminados durante a sua limpeza (Anexo A e B). A montagem gerou, em média, 60.450 transcritos e 47.593 unigenes por biblioteca, e o N50 variou entre 1.146 e 1.520 pb (Tabela 1). Após a união dos *contigs* e a remoção das sequências redundantes, a montagem do transcriptoma de referência de *Anticarsia gemmatalis* resultou em 25.757 transcritos, com tamanho médio de 1.270 pb (Figura 1).

**Tabela 1:** Resumo dos resultados de montagem realizado com o software Trinity v2.1.1 para as bibliotecas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes, desafiadas com a linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis*, que codifica a proteína Cry1Ac.

Estatística	S-1189	S-1196	S-1197	R-1205	R-1206	R-1209
Reads totais	41.078.346	42.440.182	40.496.448	41.266.852	36.791.722	39.703.162
Reads filtrados por qualidade	41.078.331	42.440.169	40.496.434	41.266.852	36.791.707	39.703.144
Total transcritos	59.901	64.502	60.322	59.728	60.393	57.854
Total “genes”	46.583	49.129	46.832	47.919	48.613	46.487
N50	1.339	1.152	1.146	1.520	1.340	1.180
Total de bases montadas	48.879.313	47.816.313	44.575.613	53.408.227	49.652.368	43.664.378

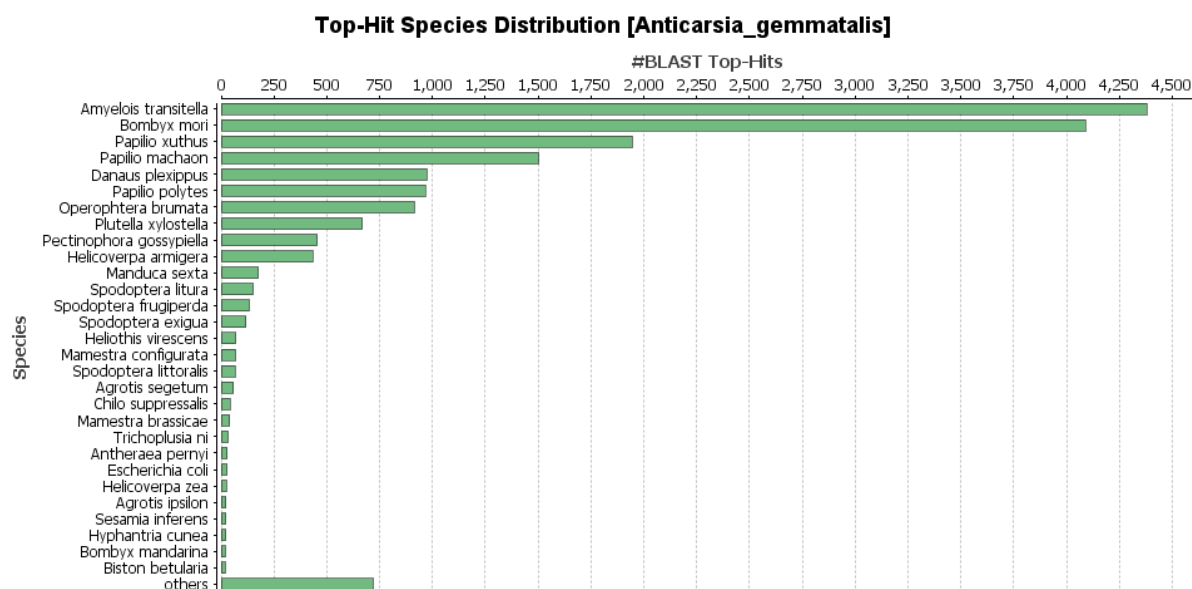


**Figura 1:** Distribuição do tamanho dos transcritos do transcriptoma de referência de *Anticarsia gemmatalis*.

### Anotação funcional

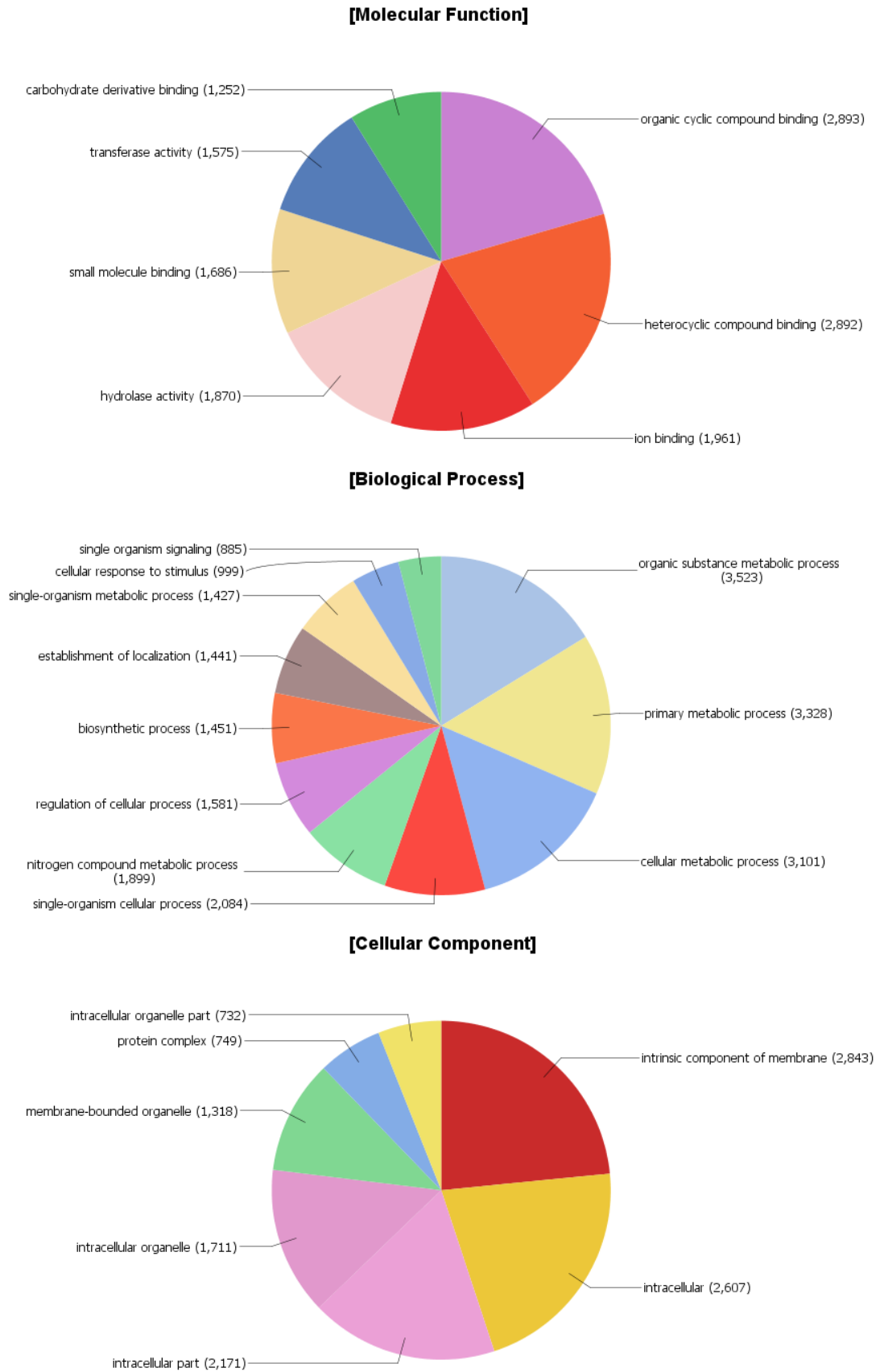
Os 25.757 transcritos obtidos foram alinhados contra as sequências do banco de dados de proteínas não-redundantes (NR) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) com o auxílio do algoritmo BLASTx. Usando um *e-value* de corte de  $10^{-3}$ , um total de 17.900 transcritos apresentaram correspondência com as sequências disponíveis no banco de dados, predominantemente para Lepidoptera. Embora tenhamos usado um limiar de *e-value* de  $10^{-3}$ , os alinhamentos apresentaram *e-values* superiores a  $10^{-50}$  em aproximadamente 48,30% das sequências analisadas, com altos níveis similaridade às proteínas disponíveis no banco de

dados. Os lepidópteros *Amyelois transitella* Walker, 1863 (Lepidoptera:Pyralidae), *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) e *Papilio xuthus* Linnaeus, 1767 (Lepidoptera: Papilionidae) apresentaram-se no topo dos hits de similaridade com os dados analisados (Figura 2). Apenas alguns hits apresentaram correspondência com *E. coli*, o que pode ser devido à contaminação durante o processo de extração do RNA total.



**Figura 2:** Espécies com maior quantidade de hits correspondentes aos 17.900 transcritos de *Anticarsia gemmatalis* obtidos a partir da anotação funcional realizada com o software Blast2GO.

Usando a plataforma Blast2GO [19], 10.682 sequências foram anotadas funcionalmente com os termos do *Gene Ontology* (GO), várias destas em mais de uma categoria. Dentre as três categorias do *Gene Ontology*, 8.287 sequências foram anotadas na categoria “Função molecular” (38,28%), distribuídas em sete grupos funcionais; 7.426 sequências foram anotadas para a categoria “Processos biológicos” (34,30%) e 5.938 sequências para a categoria “Componente celular” (27,42%), distribuídas em 11 e 7 grupos funcionais, respectivamente (Figura 3).



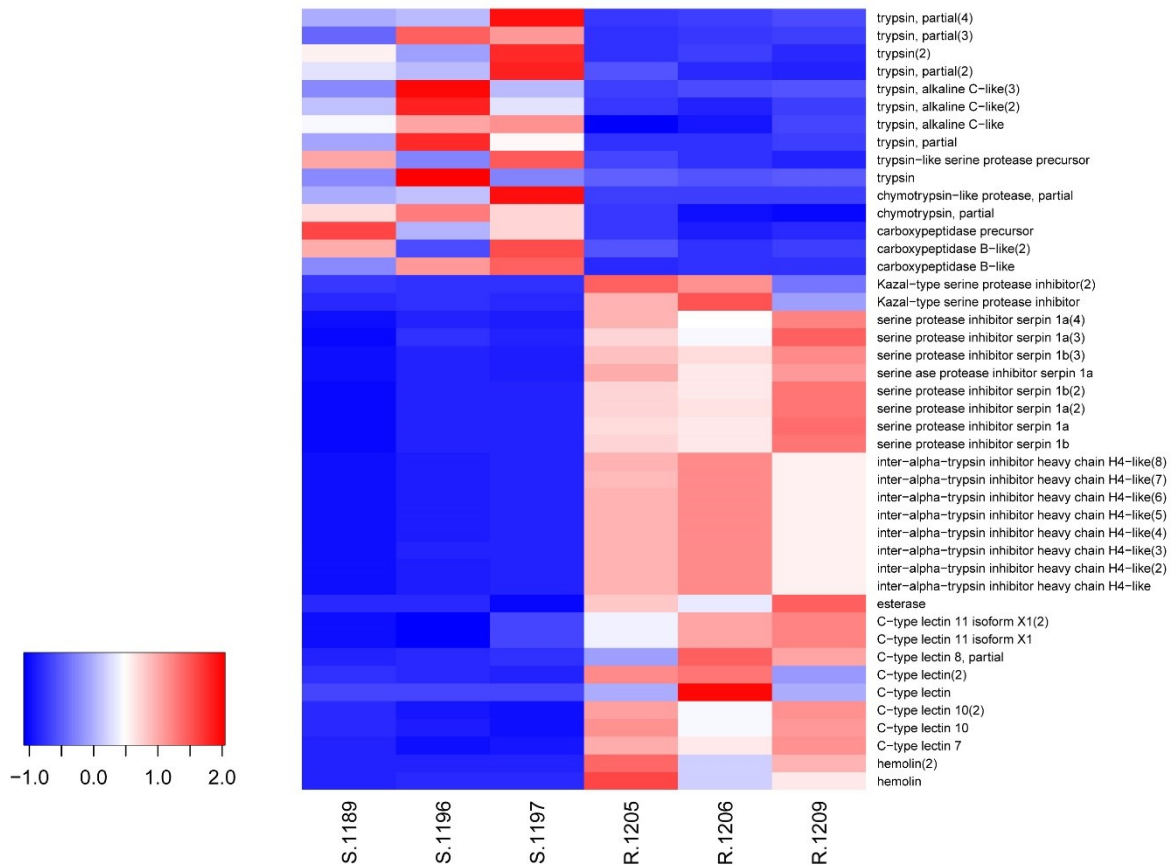
**Figura 3:** Distribuição das sequências entre as categorias anotadas no *Gene Ontology* (GO) nas categorias processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

### *Análise da expressão diferencial*

A análise transcricional comparativa, entre *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis revelou 5.504 locos diferencialmente expressos ( $p_{adj} < 0,1$ ), dos 25.757 avaliados. Destes, 422 apresentaram uma elevada modificação na sua taxa de expressão ( $\log_2 \text{fold change} \geq 2$ ) (Anexo C), sendo 195 regulados positivamente e 227 negativamente nas lagartas resistentes. Os resultados obtidos para a análise de expressão diferencial e as descrições das sequências com os melhores alinhamentos no BLASTx para esses dois grupos de locos são reportados nos Anexos D e E, respectivamente.

A anotação funcional das sequências diferencialmente expressas revelou genes envolvidos com atividades catalíticas do tipo hidrolase/peptidase, bem como processos metabólicos de macromoléculas e proteólise. Além disso, dentro da categoria componente celular, várias sequências foram anotadas principalmente com termos associados à membrana celular (Anexo D e E).

A partir destes resultados, foram elencados quatro grupos de genes candidatos ao mecanismo de resistência de *Anticarsia gemmatalis* à Bt: (i) genes envolvidos com atividades proteolíticas; (ii) genes que regulam mecanismos de defesa contra patógenos; (iii) genes relacionados a mecanismos de desintoxicação e (iv) genes envolvidos em respostas imunes. Dos 15 genes diferencialmente expressos envolvidos com atividades proteolíticas, 10 foram anotados como tripsina, dois como quimotripsina e três como carboxipeptidase. 18 sequências foram anotadas como inibidores de serino proteases, incluindo as serpinas, e dois inibidores com motivos Kazal, que são potencialmente envolvidos em mecanismos de defesa contra patógenos. Dentre os genes envolvidos com mecanismos de desintoxicação, identificamos apenas uma sequência que codifica a esterase. Para os oito genes diferencialmente expressos envolvidos em respostas imunes, seis foram anotadas como lectina do tipo-C e duas como hemolin (Figura 4).



**Figura 4:** Heatmap dos genes diferencialmente expressos entre *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ( $\log_2 \text{fold change} \geq 2$  e  $\text{padj} < 0,1$ ), candidatos aos mecanismos de resistência.

#### 4.4. Discussão

Neste estudo, avaliamos o padrão de expressão gênica entre linhagens de *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis à *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* linhagem HD-73, que codifica a proteína bioinseticida Cry1Ac. A abordagem de RNA-seq revelou uma série de genes diferencialmente expressos, entre eles potenciais candidatos ao mecanismo de resistência de Cry1Ac em *A. gemmatalis*, uma vez que essa linhagem produz apenas essa toxina [20].

A ação das toxinas Cry de Bt em lepidópteros envolve diversas etapas como: ingestão e solubilização das protoxinas no intestino médio do inseto; ativação proteolítica das toxinas; ligação das toxinas com diferentes receptores; interação e a inserção das toxinas na membrana; e a formação de poros que provocam um desequilíbrio osmótico e a lise celular, conduzindo o inseto à morte por septicemia. Dessa forma, a alteração em qualquer um desses alvos pode levar a seleção de mecanismos de resistência [21].

Vellichirammal et al. (2015) [22], utilizando uma abordagem semelhante com o

lepidóptero *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) resistente a Cry1F, identificaram transcritos que codificam os receptores caderina e fosfatase alcalina, bem como as serino proteases tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase, todos regulados negativamente nos indivíduos resistentes expostos à Cry1F. Embora, os mecanismos de resistência em lepidópteros tenham sido principalmente associados com modificações nos receptores das toxinas e alterações em proteases digestivas, em nosso estudo identificamos quatro grupos de genes envolvidos com mecanismos de resistência: genes relacionados com atividades proteolíticas, genes que regulam mecanismos de defesa contra patógenos, genes ligados a mecanismos de desintoxicação e genes envolvidos em respostas imunes inatas (Figura 5).

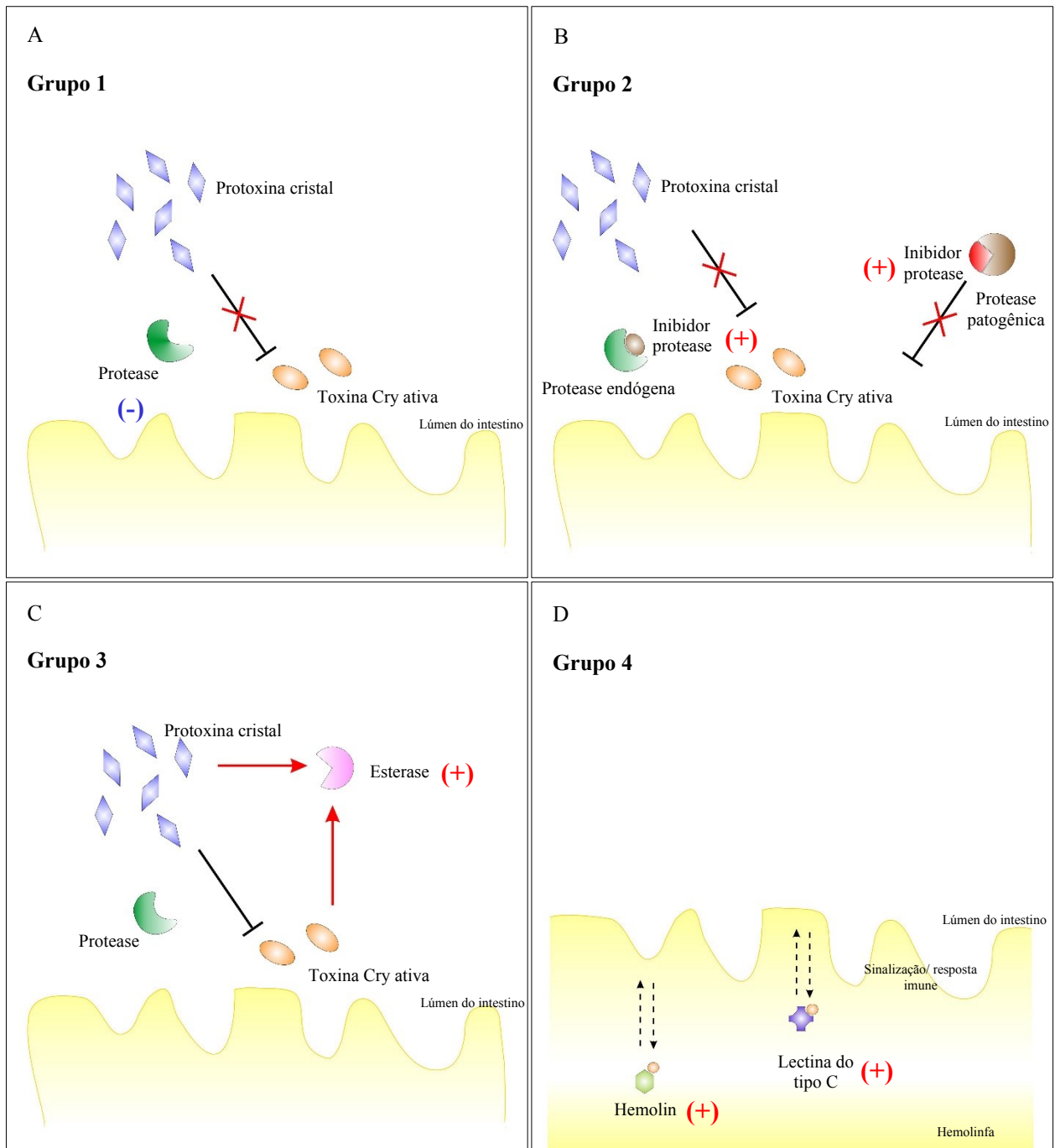
#### *Grupo 1 - Genes envolvidos com atividades proteolíticas (digestão)*

Os genes que codificam as serino proteases, tripsina e quimotripsina foram regulados negativamente nas linhagens resistentes de *A. gemmatilis* expostas à Bt HD-73. Essas proteínas são endopeptidases que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, reconhecendo aminoácidos específicos e clivando as ligações. A tripsina reconhece os aminoácidos básicos Lys ou Arg e cliva a ligação peptídica do aminoácido adjacente C-terminal, enquanto a quimotripsina reconhece e cliva as ligações peptídicas a partir dos aminoácidos Phe, Tyr e Trip [23].

A ativação proteolítica das  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* no intestino dos insetos envolve a remoção de alguns peptídeos em sua região N-terminal, bem como uma série de peptídeos na região C-terminal em algumas protoxinas, gerando toxinas ativas com cerca de 60 kDa [24]. As serino proteases, tripsina e quimotripsina são consideradas enzimas digestivas primárias em lepidópteros, estando envolvidas no processo de ativação proteolítica das protoxinas Cry de *B. thuringiensis*, apresentando papel fundamental no modo de ação destas toxinas [25].

Dessa forma, a diminuição do nível dessas proteinases pode prejudicar a ativação das protoxinas de Bt, estando assim associadas com a resistência e/ou com a diminuição da eficiência das toxinas nas linhagens resistentes. Recentemente, resultado semelhante também foi observado em pesquisas envolvendo RNA-seq no lepidóptero *Ostrinia nubilalis*, onde foi constatada a diminuição na expressão de genes de serino proteases nas linhagens resistentes e expostas à toxina Cry1F [22]. O mesmo foi observado por Li et al. (2004) [26], ao constatarem que a atividade de uma protease semelhante à tripsina em *Ostrinia nubilalis* resistente a Cry1Ab era reduzida à metade em relação àquela encontrada nos indivíduos suscetíveis. Outro estudo utilizando uma abordagem proteômica em *Plodia interpunctella*

(Lepdoptera: Pyralidae) resistente a Bt, também identificou uma diminuição na atividade de uma proteinase semelhante



**Figura 5:** Representação esquemática dos mecanismos de resistência à *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis* selecionadas em laboratório. a) Grupo 1: genes envolvidos com atividades proteolíticas, a baixa expressão das proteases tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase nas lagartas resistentes pode prejudicar a ativação proteolítica das protóxinas de Bt (cruz vermelha). b) Grupo 2: Genes que regulam mecanismos de defesa contra patógenos, as serpinas e os inibidores com motivos Kazal atuam na proteção a infecção por patógenos, inibindo proteases endógenas ou patogênicas, não permitindo a formação da toxina Cry em seu estado ativo (cruz vermelha). c) Grupo 3: genes relacionados a mecanismos de desintoxicação, as esterases realizam a “sequestro” e desintoxicação de grande quantidade de Cry1Ac, o mecanismo de sequestro desempenhado pelas esterases são representadas por meio das setas vermelhas. d) Grupo 4: genes envolvidos em respostas imunes inatas, as proteínas hemolin e lectina do tipo-C atuam como receptores de reconhecimento de padrões, ligando-se a componentes microbianos e estimulando respostas imunes (seta tracejada).

à quimotripsina no intestino médio [27]. E, segundo os autores, isso consequentemente resultaria numa diminuição da ativação da toxina Cry no intestino destes insetos. Assim, baixa expressão tanto da tripsina quanto da quimotripsina em *Anticarsia gemmatalis* podem estar impedindo a ação das toxinas Cry1Ac nos indivíduos resistente (Figura 5A).

Embora as endopeptidases participem primariamente do processo de hidrólise na digestão das proteínas, as exopeptidases como a aminopeptidase N e a carboxipeptidase participam secundariamente, degradando peptídeos maiores a partir da extremidade N-terminal ou C-terminal, respectivamente [28]. No presente estudo, o gene codificador da carboxipeptidase também foi regulado negativamente nas linhagens resistentes de *A. gemmatalis*. As carboxipeptidases são altamente reguladas durante o desenvolvimento e respondem rapidamente à composição da dieta, conforme demonstrado por Sparks, et al. (2013) [29], durante a análise do transcriptoma de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), em resposta a infecção por *Bacillus thuringiensis*. Neste estudo, os autores identificaram a expressão diferencial de genes envolvidos em processos digestivos, incluindo a  $\alpha$ -amilase, a lipase e a carboxipeptidase. Estes concluíram que tais exopeptidases podem servir para otimizar a utilização de produtos da digestão das endopeptidases nas lagartas sob estresse alimentar. Assim, as carboxipeptidases são potenciais candidatas ao mecanismo de resistência às proteínas bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis*.

#### *Grupo 2 - Genes que regulam mecanismos de defesa contra patógenos*

No presente estudo, inibidores de serino proteases do tipo Kazal e serpinas foram expressos diferencialmente, sendo ambos regulados positivamente nos indivíduos resistentes. Os inibidores de proteases desempenham papel fundamental na regulação de diferentes processos biológicos, atuando na inibição da atividade de diversas proteases, sejam elas enzimas digestivas, fatores de virulência de patógenos ou alvos específicos, como determinados componentes de cascatas de sinalização [30].

Os inibidores com motivos Kazal apresentam atividade inibitória sobre a tripsina, a quimotripsina, a trombina, a elastase, a proteinase K e a subtilisina em invertebrados. E a especificidade inibitória é orientada por resíduos de aminoácidos específicos do inibidor [31]. As serpinas funcionam como inibidores de substrato suicida, causando a inibição por deformação [32]. Como descrito por Kanost, (1999) [33] os inibidores de serino proteases atuam na proteção à infecção por patógenos ou parasitas, pois além inibirem proteases endógenas, também atuam inibindo proteases patogênicas. Dessa forma, a superexpressão

desses genes em *A. gemmatalis* poderia estar relacionada tanto com a inibição de proteases e, por conseguinte à não formação da toxina Cry1Ac em seu estado funcional, quanto com a inibição de fatores de virulência.

Zhao et al. (2012) [34] também relataram, por meio de ensaios de microarray e RT-PCR, a regulação positiva de alguns genes de inibidores de serino proteases em *Bombyx mori*, após a infecção oral com *Escherichia coli*, *Bacillus bombysepticus*, *Beauveria bassiana* e o vírus de poliedrose nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV). Estes autores sugeriram que tais inibidores podem estar envolvidos com a resistência a microrganismos patogênicos. Dessa forma, os inibidores de serinos proteases também são candidatos ao mecanismo de resistência em *A. gemmatalis*, pois desempenham importante papel na regulação de diferentes processos fisiológicos, podendo inibir proteases patogênicas (Figura 5b).

### Grupo 3 - Genes relacionados a mecanismos de desintoxicação

As esterases apresentaram expressão diferencial positiva nas linhagens resistentes de *A. gemmatalis*. Estas enzimas são hidrolases encontradas no intestino dos insetos que vêm sendo implicadas com mecanismos de resistência a inseticidas em inúmeras pragas, por sua habilidade de hidrolisar ligações éster e sequestrar xenobióticos. Altos níveis na expressão das esterases foram observados na lagarta do algodão, *Helicoverpa armigera*, resistente à toxina Cry1Ac presente no algodão transgênico (Ingard) [35]. O mecanismo de resistência nestes insetos foi associado aos altos níveis de esterases, baseado em estudos que demonstraram que as esterases ligam-se tanto a protoxina quanto a toxina ativa, ocorrendo o “sequestro” e a desintoxicação de grande quantidade de Cry1Ac. Logo, este processo de “sequestro” realizado por esterases pode estar ocorrendo na população de *A. gemmatalis* resistentes analisadas neste estudo (Figura 5c).

### Grupo 4 - Genes envolvidos em respostas imunes inatas

Nas linhagens resistentes de *A. gemmatalis* estudadas neste trabalho, genes relacionados a mecanismos de imunidade inata foram regulados positivamente. Isso também foi descrito por Song, et al. (2015) [36] em *Spodoptera litura*. Estas proteínas funcionam como receptores de reconhecimento de padrões, ligando-se a componentes microbianos e estimulando respostas imunes [37] (Figura 5d).

A hemolin é uma proteína de ligação a carboidratos de 47 kDa da família das imunoglobulinas, encontrada na hemolinfa dos lepidópteros. A síntese de hemolin aumenta após a exposição a patógenos, pois funcionam como proteínas de reconhecimento padrão na

imunidade inata. Por sua vez, as lectinas do tipo C são proteínas de ligação a carboidratos dependentes de cálcio, sendo que muitas delas apresentam ao menos um domínio de reconhecimento de carboidrato de 110-130 resíduos, que também desempenham papel no reconhecimento de padrões [37, 38].

Embora, essas proteínas sejam normalmente encontradas na hemolinfa dos insetos, é conhecido que o epitélio intestinal também funciona como uma importante barreira à invasão de patógenos. Alguns estudos têm relacionado a ativação de respostas imunes em lepidópteros após a ingestão de *Bacillus thuringiensis*, como Broderick, et al. (2010) [39] que descreveram a presença de uma modulação química da resposta imunológica inata em *Lymantria dispar* após a ingestão de *Bacillus thuringiensis*. No entanto, segundo os autores, ainda não está claro como os efetores desencadeiam a resposta imunológica.

Os dados observados em nosso estudo evidenciam uma diferença de expressão entre linhagens suscetíveis e resistentes e nos permitem classificar esses genes em quatro grupos diferentes. Alguns genes comumente observados por outros autores em insetos resistentes à Bt, como os genes de caderinas [9], não apresentaram uma diferença de expressão significativa em nosso trabalho. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que diferenças estruturais podem ocorrer nessas proteínas e ainda assim influenciar na resistência ao bioinseticida. Dessa forma, estudos futuros que envolvam a análise estrutural dessas proteínas podem auxiliar na compreensão de outros mecanismos envolvidos nesse processo.

#### **4.5. Conclusões**

Este estudo apresenta as primeiras informações do transcriptoma de *Anticarsia gemmatalis* utilizando novas tecnologias de sequenciamento. A análise transcricional comparativa entre *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis desafiadas com a linhagem HD-73 de *Bacillus thuringiensis* produtora da proteína bioinseticida Cry1Ac, corroboram a hipótese de uma base genética complexa das respostas fisiológicas. Este também evidencia alguns dos mecanismos de resistência selecionados mediante a utilização de Bt, identificando alguns dos possíveis genes envolvidos nesse processo. A identificação destes genes está de acordo com os observados em outros lepidópteros. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que resultem em tecnologias aplicadas para o aumento/melhora da cadeia produtora da soja no Brasil.

### Agradecimentos

Este estudo teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

#### 4.6 Referências

1. Bernardi, O; Malvestiti, GS; Dourado, PM; Oliveira, WS; Martinelli, S; Berger, GU; Head, GP; Omoto, C. (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Manag Sci* 68: 1083-1091.
2. Yu, H; Li, Y; Li, X; Romeis, J; Wu, K. (2013) Expression of Cry1Ac in transgenic *Bt* soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. *Pest Manag Sci* 69: 1326-1333.
3. Bravo, A; Likitvivatanavong, S; Gill, SS; Soberón, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 423-431.
4. Bravo, A; Gill, SS; Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4): 423-435.
5. Vachon, V; Laprade, R; Schwartz, Jean-Louis (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111:1-12.
6. Zhang, X; Candas, M; Griko, NB; Taussig, R; Bulla-Jr, LA. (2006). A mechanism of cell death involving and adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS* 103(26): 9897-9902.
7. Pardo-López, L; Soberón, M; Bravo, A. (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 37: 3-22.
8. Romeis, J; Meissle, M. Bigler, F. (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24(1): 63-71.
9. Fabrick, JA; Ponuraj, J; Singh, A; Tanwar, RK; Unnithan, GC; Yelich, AJ; Li, X; Carrière, Y; Tabashnik, BE. (2009) Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. *PLOS One* 9(5): e97900.
10. Yang, Y; Zhu, YC; Ottea, J; Husseneder, C; Leonard, BR; Abel, C; Luttrell, R; Huang, F. (2011) Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *PLOS One* 6(10): e25783.
11. Zhang, S; Cheng, H; Gao, Y; Wang, G; Liang, G; Wu, K. (2009) Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 421-429.
12. Greene, GL; Leppla, NC; Dickerson, WA. (1976) Velvetbean Caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69(4): 487-488.
13. Andrews, S. FastQC. <http://www.bioinformatics.bbsre.ac.uk/projects/fastqc/> (Acesso 12 de Janeiro de 2015).

14. Schmieder, R; Edwards, R. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6): 863-864.
15. Grabherr, MG; Haas, BJ; Yassour, M; Levin, JZ; Thompson, DA; Amit, I; Adiconis, X; Fan, L; Raychowdhury, R; Zeng, Q; Chen, Z; Mauceli, E; Hacohen, N; Gnirke, A; Rhind, N; Di Palma, F; Birren, BW; Nusbaum, C; Lindblad-oh, K; Friedman, N; Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29(7): 644-652.
16. Li, W; Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22(13): 1658-1659.
17. Langmead, B; Salzberg, SL. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4): 357-360.
18. Love, MI; Huber, W; Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15:550.
19. Conesa, A; Götz, S; García-Gómez, JM; Terol, J; Talón, M; Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18): 3674-3676.
20. Liu, G; Song, L; Shu, C; Wang, P; Deng, C; Peng, Q; Lereclus, D; Wang, X; Huang, D; Zhang, J; Song, F. (2013) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain HD73. *Genome Announcements* 1(2): 1-2.
21. Bravo, A & Soberón, M. (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Cell Press* 26(10): 573-579.
22. Vellichirammal, NN; Wang, H; Eyun, S; Moriyama, EN; Coates, BS; Miller, NJ; Siegfried, BD. (2015) Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin. *BMC Genomics* 16:558.
23. Srinivasan, A; Giri, AP; Gupta, VS. (2006) Structural and functional diversities in Lepidoptera serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11:132-154.
24. Höfte, H & Whiteley, HR. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53(2):242-255.
25. Yao, J; Buschmann, LL; Oppert, B; Khajuria, C; Ky, Z. (2012) Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. *PLOS One* 7(8).
26. Li, H; Oppert, B; Higgins, RA; Huang, F; Zhu, KY; Buschman, LL. (2004) Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:753-762.
27. Candas, M; Loseva, O; Oppert, B; Kosaraju, P; Bulla-JR, LA. (2003) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2:19-28.

28. Chougule, NP; Giri, AP; Sainani, MN; Gupta, VS. (2005) Genes expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:355-367.
29. Sparks, ME; Blackburn, MB; Kuhar, D; Gundersen-Rindal, DE. (2013) Transcriptome of the *Lymantria dispar* (Gypsy Moth) larval midgut in response to infection by *Bacillus thuringiensis*. *PLOS One* 8(5).
30. Gubb, D; Sanz-Parra, A; Barcena, L; Troxler, L; Fullaondo, A. (2010) Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie* 92:1749-1759.
31. Rimphanitchayakit, V. & Tassanakajon, A. (2010) Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology* 34:377-386.
32. Silverman, GA; Bird, PI; Carrel, RW; Church, FC; Coughlin, PB; Gettins, PGW; Irving, JA; Lomas, DA; Luke, CJ; Moyer, RW; Pemberton, PA; Remold-O'Donnell, E; Salvesen, GS; Travis, J; Whisstock, JC. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276(36): 33293-33296.
33. Kanost, MR. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23:291-301.
34. Zhao, P; Dong, Z; Duan, J; Wang, G; Wang, L; Li, Y; Xiang, Z; Xia, Q. (2012) Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLOS One* 7(2).
35. Gunning, RV; Dang, HT; Kemp, FC; Nicholson, IC; Moores, GD. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5):2558-2563.
36. Song, F; Chen, C; Wu, S; Shao, E; Li, M; Guan, X; Huang, Z. (2015) Transcriptional profiling analysis of *Spodoptera litura* larvae challenged with Vip3Aa toxin and possible involvement of trypsin in the toxin activation. *Scientific Reports* 6:23861.
37. Kanost, MR; Jiang, H; Yu, X. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* 198:97-105.
38. Wang, Y; Willott, E; Kanost, MR. (1995) Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology* 4(2):113-123.
39. Broderick, NA; Raffa, KF; Handelsman, J. (2006) Midgut bacterial required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS* 103(41):15196-15199.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A evolução da resistência ou a redução da eficiência das proteínas bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis* em pragas tem se tornado um dos grandes empecilhos em programas de controle de pragas. Nosso estudo revelou quatro diferentes mecanismos de resistência a Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* em linhagens de *Anticarsia gemmatalis* selecionadas em laboratório:

1. Diminuição no nível de expressão das proteases tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase, que podem impedir a ação das toxinas Cry1Ac nos indivíduos resistentes, pois participam no processo de ativação proteolítica das proteínas bioinseticidas de *B. thuringiensis*.
2. A alta expressão de inibidores de proteases, como as serpinas e os inibidores com motivos Kazal, que atuam na regulação de diferentes processos fisiológicos, podendo inibir as proteases endógenas, não permitindo a formação da toxina Cry1Ac em seu estado funcional, além de inibir proteases patogênicas.
3. A alta expressão de uma esterase relacionada a processos de desintoxicação, pois as esterases são capazes de hidrolisar ligações éster e sequestrar xernobióticos, permitindo desintoxicação de grande quantidade de Cry1Ac.
4. Respostas imunes inatas desenvolvidas pelas proteínas hemolin e lectina do tipo-C, que funcionam como receptores de reconhecimento de padrões, ligando-se a componentes microbianos e estimulando respostas imunes.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese da base genética complexa das respostas fisiológicas e também mecanismos de resistência selecionados mediante a utilização de Bt e trazem os genes envolvidos neste processo nessa espécie. Este resultado poderão ter importância para o desenvolvimento de estratégias que resultem em tecnologias aplicadas para o aumento/melhora da cadeia produtora da soja no Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, S. **FastQC**. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.bbsre.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 12 de jan de 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*. **PNAS**; 109(25), 2012.

BERNARDI, O; MALVESTITI, G. S; DOURADO, P. M; OLIVEIRA, W. S; MARTINELLI, S; BERGER, G. U; HEAD, G. P; OMOTO, C. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**; 68:1083-1091, 2012.

BETZ, F. S; HAMMOND, B. G; FUCHS, R. L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**; 32:156-173, 2000.

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

BRAVO, A & SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Cell Press**; 26(10): 573-579, 2008.

BRAVO, A; LIKITVIVATANAVONG, S; GILL, S. S; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol**; 41(7):423-431, 2011.

BRODERICK, N. A; RAFFA, K. F; HANDELSMAN, J. Midgut bacterial required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **PNAS**; 103(41):15196-15199, 2006.

BOLGER, A. M; LOHSE, M; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics Advance Access**; 1-7, 2014.

BUENO, A. F; PANIZZI, A. R; CORR. **Histórico e Evolução do Manejo Integrado de Pragas da Soja no Brasil**. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B; CORRÊA-FERREIRA, B. S; MOSCARDI, F. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, 2012. p.37-74.

CANDAS, M; LOSEVA, O; OPPERT, B; KOSARAJU, P; BULLA-JR, L. A. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Molecular & Cellular Proteomics**; 2:19-28, 2003.

CHANDLER, D; BAILEY, A. S; TATCHELL, G. M; DAVIDSON, G; GREAVES, J; GRANT, W. P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions of the Royal Society**; 366: 1987-1998, 2011.

CHOUGULE, N. P; GIRI, A. P; SAINANI, M. N; GUPTA, V. S. Genes expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 35:355-367, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 3º Levantamento de Grãos Safra 2016/2017**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_12\\_12\\_11\\_30\\_14\\_boletim\\_graos\\_dezembro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_12_11_30_14_boletim_graos_dezembro_2016.pdf)>. Acesso em: 13 dez. 2016.

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

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**; 62(3):807-813, 1998.

CRICKMORE, N; BAUM, J; BRAVO, A; LERECLUS, D; NARVA, K; SAMPSON, K., SCHNEPF, E., SUN, M; ZEIGLER, D.R. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 25 mai. 2015.

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

DEVINE, G. J. & FURLONG, M. J. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, 24:281-306, 2007.

DIJK, E. L; AUGER, H; JASZCZYSZYN, Y; THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Cell Press**; 30(9), 2014.

FABRICK, J. A; PONNURAJ, J; SINGH, A; TANWAR, R. K; UNNITHAN, G. C; YELICH, A. J; LI, X; CARRIÈRE, Y; TABASHNIK, B. E. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. **PLOS One**; 9(5), 2014.

FALGUERAS, J; LARA, A. J; FERNÁNDEZ-POZO, N; CANTÓN, F. R; PÉREZ-TRABADO, G; CLAROS, M. G. SeqTrim: a high-throughput pipeline for pre-processing any type of sequence read. **BMC Bioinformatics**; 11:38, 2010.

FRANKENHUYZEN, K. V. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**; 101:1-16, 2009.

FORTIER, M; VACHON, V; FRUTOS, R; SCHWARTZ, J; LAPRADE, R. Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**; 73(19):6208-6213, 2007.

GAHAN, L. J; GOULD, F; HECKEL, D. G. Identification of a Gene Associated with Bt Resistance in *Heliothis virescens*. **Science**; 293, 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**; 6(12), 2010.

GUEDES, J. V. C; FIORIN, R. A; STÜRMER, G. R; PRÁ, E. D; PERINI, C. R; BIGOLIN, M. Sistemas de aplicação e inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatalis* na soja. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**; 16(8):910-914, 2012.

GRABHERR, M. G; HAAS, B. J; YASSOUR, M; LEVIN, J. Z; THOMPSON, D. A; AMIT, I; ADICONIS, X; FAN, L; RAYCHOWDHURY, R; ZENG, Q; CHEN, Z; MAUCELI, E; HACOEN, N; GNIRKE, A; RHIND, N; PALMA, F; BIRREN, B. W; NUSBAUM, C; LINDBLAD-TOH, K; FRIEDMAN, N; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**; 29:7, 2011.

GREENE, G. L; LEPLA, N. C; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**; 69:4, 1976.

GRIFFITTS, J. S; HASLAM, S. M; YANG, T; GARCZYNSKI, S. F; MULLOY, B; MORRIS, H; CREMER, P. S; DELL, A; ADANG, M. J; AROIAN, R. V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**; 307, 2005.

GUBB, D; SANZ-PARRA, A; BARCENA, L; TROXLER, L; FULLAONDO, A. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. **Biochimie**; 92:1749-1759, 2010.  
 GUPTA, S & DIKSHIT, A. K. Biopesticides: Na ecofriendly approach for pest control. **Jornal of Biopesticides**; 3: 186-188, 2010.

GUNNING, R. V; DANG, H. T; KEMP, F. C; NICHOLSON, I. C; MOORES, G. D. New resistance rechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Enviromental Microbiology**; 71(5):2558-2563, 2005.

HARA, H; ATSUMI, S; YAOI, K; NAKANISHI, K; HIGURASHI, S; MIURA, N; TABUNOKI, H; SATO, R. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. **FEBS Letters**; 538:29-34, 2003.

HERRERO, S; GECHEV, T; BAKKER, P. L; MOAR, W. J. MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**; 6(96), 2005.

HIRAKURI, M.H & LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e Perspectivas de Desempenho Econômico Associados com a Produção de Soja nos Contextos Mundial e Brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 69p, 2011. (Documentos, 319).

HOFFMANN-CAMPO, C. B; MOSCARDI, F; CORRÊA-FERREIRA, B. S; OLIVEIRA, L. J; SOZA-GÓMEZ, D. R. PANIZZI, A. R; CORSO, I. C; GAZZONI, D. L; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado.** Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (Circular Técnica, 30).

HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**; 53(2):242-255, 1989.

JURAT-FUENTES, J. L; KARUMBIAIAH, L; JAKKA, S. R. K; NING, C; LIU, C; WU, K; JACKSON, J; GOULD, F; BLANCO, C; PORTILLA, M; PERERA, O; ANDAG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to Lepidoptera strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Plos One**; 6(3), 2011.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**; 23:291-301, 1999.

KANOST, M. R; JIANG, H; YU, X. Innate imune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**; 198:97-105, 2004.

KAUR, S. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**; 16:781-793, 2000.

LANGMEAD, B; TRAPNELL, C; POP, M; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**; 10:R25, 2009.

LANGMEAD, B; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**; 9:4, 2012.

LI, H; OPPERT, B; HIGGINS, R. A; HUANG, F; ZHU, K, Y; BUSCHMAN, L. L. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and –susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae); **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 34:753-762, 2004.

LI, W; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**; 22:13, 2006.

LOVE, M. I; HUBER, W; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**; 15:550, 2014.

MA, G; RAHMAN, M. M; GRANT, W; SCHMIDT, O; ASGARI, S. Insect tolerance to the crystal toxins Cry1Ac and Cry2Ab is mediated by the binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. **Developmental and Comparative Immunology**; 37:184-192, 2012.

MAAGD, R. A; BRAVO, A; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**; 17: 4, 2001.

MARTIN, J. A. & WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews**; 12:671-682, 2011.

MASUDA, T. & GOLDSMITH, P. D. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. **International Food and Agribusiness Management Review** 12 (4): 145-164, 2009.

METZKER, M. Sequencing technologies – the next generation. **Nature Reviews**; 11, 2010.

MOREIRA, H. J. C; ARAGÃO, F. D. **Manual de Pragas da Soja**. 1. ed. Campinas – SP. 2009.

MORIN, S; BIGGS, R. W; SISTERTON, M. S; SHRIVER, L; ELLERS-KIRK, C; HIGGINSON, D; HOLLEY, D; GAHAN, L. J; HECKEL, D. G; CARRIEERE, Y; DENNEHY, T. J; BROWN, J. K; TABASHNIK, B. E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **PNAS**; 100(9):5004-5009, 2003.

MOROZOVA, O; HIRST, M; MARRA, M. A. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**; 10:135-151, 2009.

MOSCARDI, F; BUENO, A. F; SOSA-GÓMEZ, D. R; ROGGIA, S; HOFFMAN-CAMPO, C. B; POMARI, A. F; CORSO, I. V; YANO, S. A. C. **Artrópodes que atacam as folhas da soja**. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B; CORRÊA-FERREIRA, B. S; MOSCARDI, F. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, 2012. p.213-334.

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**; 16(1):25-35, 2007.

NAGAMATSU, Y; TODA, S; KOIKE, T; MIYOSHI, Y; SHIGEMATSU, S; KOGURE, M. Cloning, Sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 62(4):727-734, 1998.

OPPERT, B; KRAMER, K. J; BEEMAN, R. W; JOHNSON, D; McGAUGHEY, H. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **The Journal of Biological Chemistry**; 272(38):23473-23476, 1997.

PANIZZI, A. R; BUENO, A. F; SILVA, F. A. C. **Insetos que atacam vagens e grãos**. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B; CORRÊA-FERREIRA, B. S; MOSCARDI, F. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, 2012. p.335-420.

PARDO-LÓPEZ, L; SOBERÓN, M; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **Microbiology Reviews**; 37: 3-22, 2013.

PEREIRA, E. J. G; SIQUEIRA, H. A. A; ZHUANG, M; STORES, N. P; SIEGFRIED, B. D. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**; 103:1-7, 2010.

PÍPOLO, A. E; HUNGRIA, M; FRANCHINI, J. C; BALBINOT-JR, A. A; DEBIASI, H; MANDARINO, J. M. G. Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 16 p. (Comunicado Técnico 86).

QUAIL, M. A; SMITH, M; COUPLAND, P; OTTTO, T. D; HARRIS, S. R; CONNOR, T. R; BERTONI, A; SWERDLOW, H. P; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**; 13:341, 2012.

RIMPHANITCHAYAKIT, V. & TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. **Developmental and Comparative Immunology**; 34:377-386, 2010.

ROBINSON, M. D; McCARTHY, D. J; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**; 26(1):139-140, 2010.

ROMEIS, J; MEISSLE, M. BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**; 24(1): 63-71, 2006.

SANAHUJA, G; BANAKAR, R; TWYMAN, R. M; CAPELL, T; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**; 9:282-300, 2011.

SANGADALA, S; WALTERS, F. S; ENGLISH, L. H; ADANG, M. J. A Mixture of *Manduca sexta* Aminopeptidase and Phosphatase Enhances *Bacillus thuringiensis* Insecticidal CryIA(c) Toxin Binding ands 6Rb<sup>+</sup>-KE<sup>+</sup> efflux *in Vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**; 269(13):10088-10092, 1994.

SCHMIEDER, R & EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**; 27(6):863-864, 2011.

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**; 62(3):775-806, 1998.

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

SILVERMAN, G. A; BIRD, P. I; CARREL, R. W; CHURCH, F. C; COUGHLIN, P. B; GETTINS, P. G. W; IRVING, J. A; LOMAS, D. A; LUKE, C. J; MOYER, R. W; PEMBERTON, P. A; REMOLD-O'DONNELL, E; SALVESEN, G. S; TRAVIS, J; WHISSTOCK, J. C. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. **The Journal of Biological Chemistry**; 276(36): 33293-33296, 2001.

SOBERÓN, M; GILL, S. S; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midguts cells? **Celular and Molecular Life Sciences**; 66:1337-1349, 2009.

SONG, F; CHEN, C; WU, S; SHAO, E; LI, M; GUAN, X; HUANG, Z. Transcriptional profiling analysis of *Spodoptera litura* larvae challenged with Vip3Aa toxin and possible involvement of trypsin in the toxin activation. **Scientific Reports**; 6:23861, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R; CORRÊA-FERREIRA, B. S; HOFFMANN-CAMPO, C. B; CORSO, I. C; OLIVEIRA, L. J; MOSCARDI, F; PANIZZI, A. R; BUENO, A. F; HIROSE, E; ROGGIA, S. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 102 p. (Documentos 269).

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**; 8(5), 2013.

SPECHT, A; SOSA-GÓMEZ, D. R; PAULA-MORAES, S. V; YANO, S. A. C. **Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.48, n.6, 2013.

SRINIVASAN, A; GIRI, A. P; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in Lepidoptera serine proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters**; 11:132-154, 2006.

TABASHNIK, B. E; BRÉVAULT, T; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**; 31(6): 510-521, 2013.

TRAPNELL, C; PACTER, L; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. **Bioinformatics**; 25(9):1105-1111, 2009.

TRAPNELL, C; ROBERTS, A; GOFF, L; PERTEA, G; KIM, D; KELLEY, D. R; PIMENTEL, H; SALZBERG, S. L; RINN, J. L; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**; 7:562-578, 2012.

TRAVISI, C. M; NIJKAMP, P; VINDIGNI, G. Pesticide risk valuation in empirical economics: a comparative approach. **Ecological Economics**; 56: 455-474, 2006.

TIEWSIRI, K. & WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **PNAS**; 108(34): 14037-14042, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Supply and Demand Estimates - 559**. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

VACHON, V; LAPRADE, R; SCHWARTZ, J. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of invertebrate pathology**; 111:1-12, 2012.

VELLICHIRAMMAL, N. N; WANG, H; EYUN, S; 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**; 16:558, 2015.

WANG, Y; WILLOTT, E; KANOST, M. R. Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. **Insect Molecular Biology**; 4(2):113-123, 1995.

WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-seq: a evolutionary tool for transcriptomics. **Nat. Rev. Genet**; 10(1): 57-63, 2009.

WESTERMANN, A. J; GORSKI, S. A; VOGEL, G. J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews**; 10:618-630, 2012.

XU, C; WANG, BI-CHENG; YU, Z; SUN, M. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Toxins**; 6:2732-2770, 2014.

XU, X; YU, L; WU, Y. Disruption of a Cadherin Gene Associated with Resistance to Cry1Ac  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied And Environmental Microbiology**; 71(2):948-954, 2005.

YANG, Y; ZHU, Y. C; OTTEA, J; HUSSENER, 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**; 6(10), 2011.

YAO, J; BUSCHMANN, L. L; OPPERT, B; KHAJURIA, C; KY, Z. Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. **PLOS One**; 7(8), 2012.

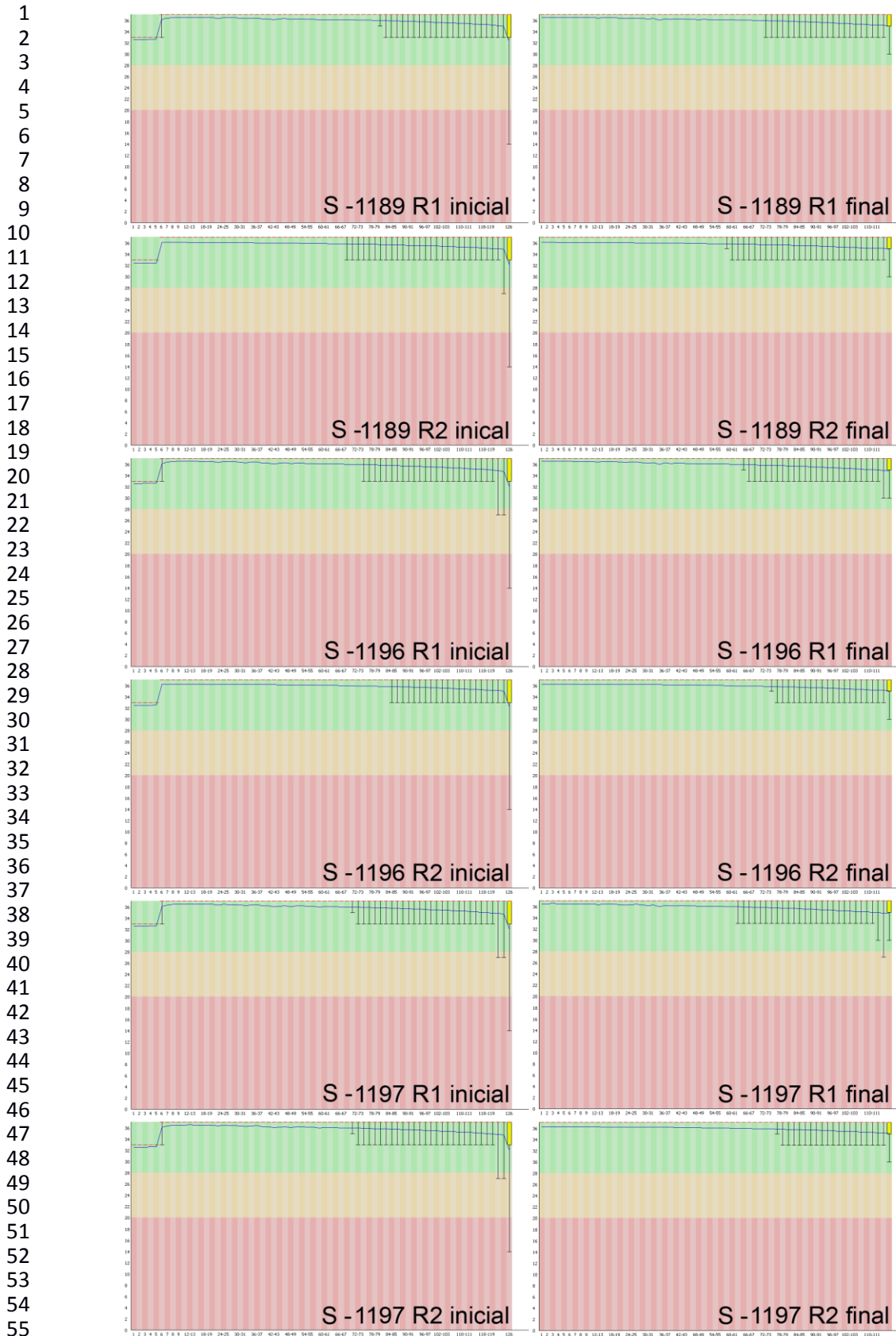
YU, H; LI, Y; LI, X; ROMEIS, J; WU, K. Expression of Cry1Ac in transgenic *Bt* soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. **Pest Manag Sci**; 69: 1326-1333, 2013.

ZHANG, S; CHENG, H; GAO, Y; WANG, G; LIANG, G; WU, K. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 39: 421-429, 2009.

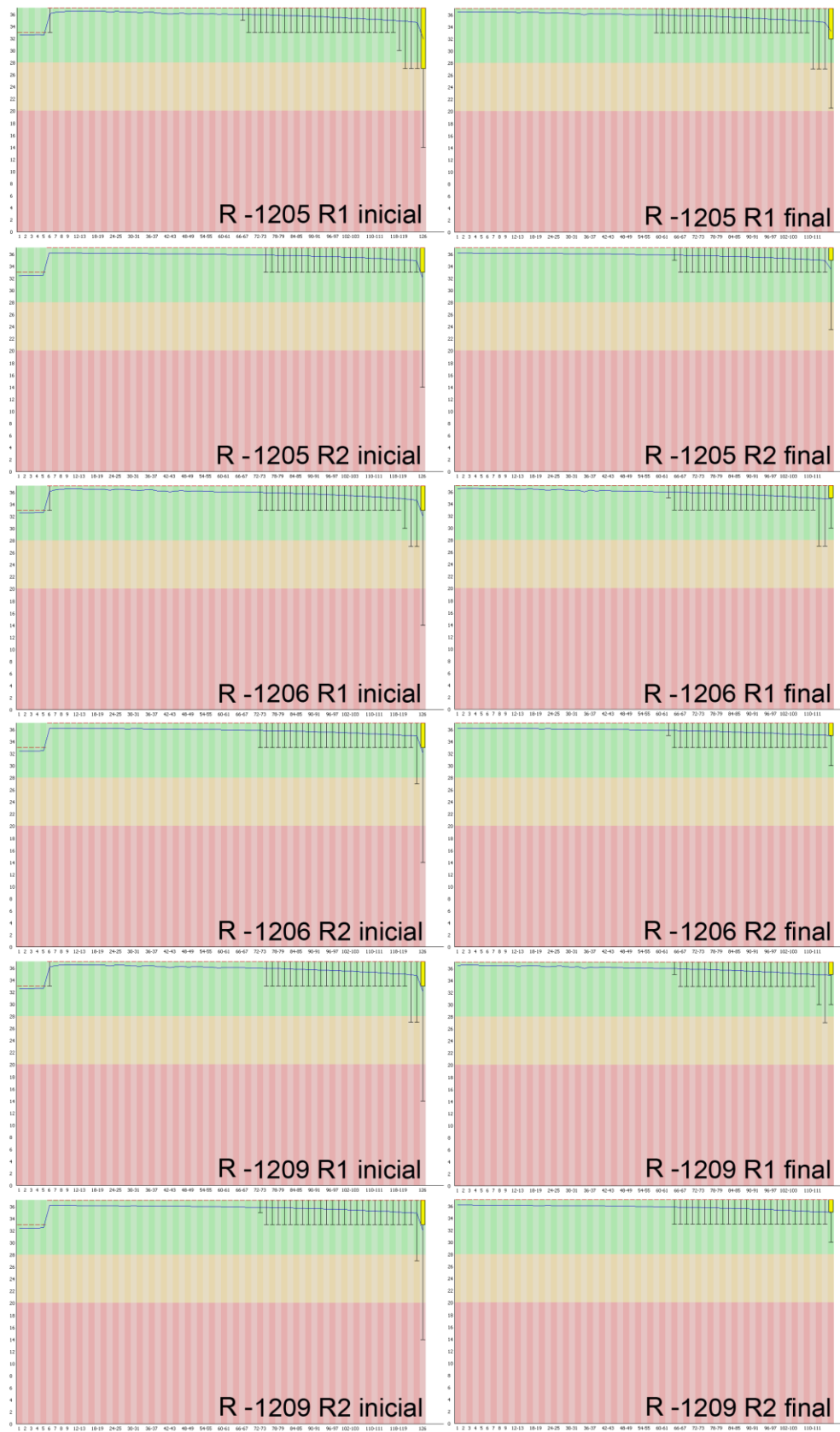
ZHANG, X; CANDAS, M; GRIKO, N. B; TAUSSIG, R; BULLA, JR, L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **PNAS**; 103(26):9897-9902, 2006.

## 7. ANEXO

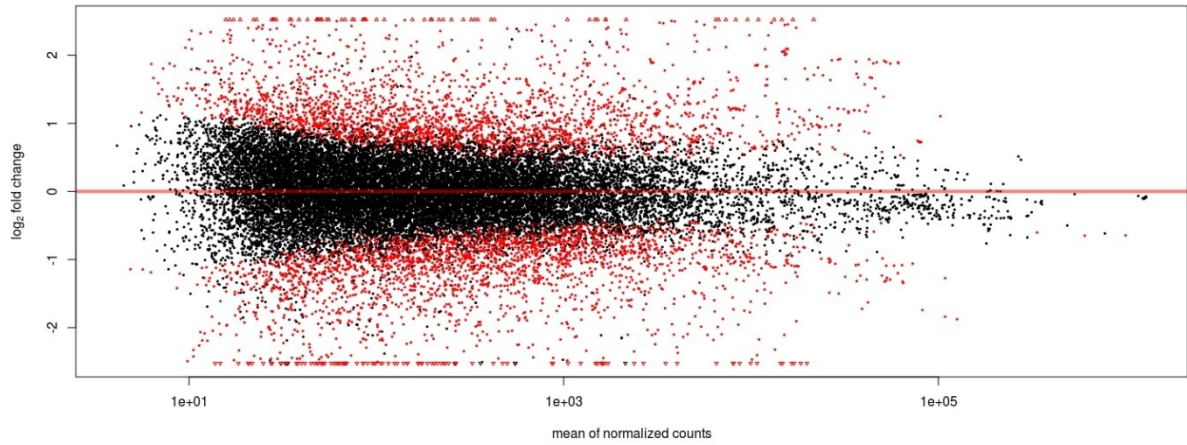
ANEXO A: Qualidade por base sequenciada das leituras R1 e R2 das bibliotecas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis antes e depois da limpeza. O eixo x do gráfico representa a posição de cada base no *read*, e o eixo y representa o *score* de qualidade.



**ANEXO B:** Qualidade por base sequenciada das leituras R1 e R2 das bibliotecas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes antes e depois da limpeza. O eixo x do gráfico representa a posição de cada base no *read*, e o eixo y representa o *score* de qualidade.



**ANEXO C:** MA-plot, diagrama da distribuição dos valores  $\log_2 \text{fold change}$  para as amostras resistentes e suscetíveis de *Anticarsia gemmatalis* plotadas contra a média de valores de expressão. O eixo x representa a expressão sobre a média de contagens normalizadas, e o eixo y mostra a diferença entre eles. Os genes diferencialmente expressos são representados por pontos vermelhos ( $\text{padj} < 0,1$ ), os genes diferencialmente expressos com  $\log_2 \text{fold change} \geq 2$  são plotados nas extremidades.



**ANEXO D:** Sequências de *Anticarsia gemmatalis* reguladas negativamente nos indivíduos resistentes, em relação aos indivíduos suscetíveis, ( $\log_2 \text{fold change} \geq 2$  e  $\text{padj} < 0,1$ ) obtidos a partir do pacote DESeq2. E descrição e anotação funcional das sequências com melhores alinhamentos no Blast2GO.

Sequência	Tamanho	Expressão diferencial - DESeq2			Descrição	Blast2GO	
		$\log_2 \text{fold change}$	$pvalue$	$padj$		$e-value$	GO
S-1189_dn10190_c0_g1_i1	1594	-2,41878E+14	1,33E+03	1,51E+05	NA	-	-
S-1189_dn10494_c0_g1_i1	1411	-2,10724E+14	5,33E+00	1,01E+03	gi 390627066 chymotrypsin, partial	8,76E-102	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
S-1189_dn10784_c0_g2_i1	1044	-2,01385E+14	1,42E+09	0,000332	NA	-	-
S-1189_dn11114_c0_g2_i1	909	-2,11134E+14	2,36E+08	7,46E+09	NA	-	-
S-1189_dn11210_c0_g1_i1	1481	-2,56717E+14	7,86E+03	6,47E+06	gi 930655999 Putative inorganic phosphate cotransporter	0,00E+00	P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1189_dn11815_c0_g1_i1	1560	-2,5895E+14	8,01E+03	7,91E+04	NA	-	-
S-1189_dn11855_c0_g1_i1	1603	-2,52442E+13	8,04E-01	1,45E+03	NA	-	-
S-1189_dn11899_c0_g1_i1	1356	-2,52598E+14	1,56E+02	2,10E+04	gi 49168687 carboxypeptidase precursor	0,00E+00	F:G-protein coupled receptor activity; F:zinc ion binding; P:G-protein coupled receptor signaling pathway; F:metallocarboxypeptidase activity; P:proteolysis; C:integral component of membrane
S-1189_dn12294_c1_g2_i1	1088	-2,05026E+12	8,26E+06	3,88E+08	NA	-	-
S-1189_dn12770_c0_g2_i2	894	-2,17452E+14	1,64E+06	9,31E+07	gi 927348092 trypsin-like serine protease precursor	3,79E-109	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
S-1189_dn12847_c0_g1_i1	2155	-3,18305E+14	5,49E-01	1,23E+02	gi 913325995 facilitated trehalose transporter Tret1-like	4,32E-155	F:transmembrane transporter activity; C:membrane; P:transport
S-1189_dn12990_c0_g1_i1	876	-2,45848E+14	2,66E+06	1,44E+08	NA	-	-
S-1189_dn12990_c0_g2_i1	856	-3,3478E+14	7,19E+00	1,33E+03	NA	-	-
S-1189_dn13207_c0_g2_i1	759	-2,885E+14	1,33E+01	2,31E+03	NA	-	-
S-1189_dn14238_c0_g1_i2	961	-2,52476E+13	2,50E+04	2,26E+06	NA	-	-
S-1189_dn14889_c0_g1_i5	783	-2,71865E+14	2,43E+01	3,90E+03	gi 354549513 larval cuticle protein 1	2,87E-34	F:structural constituent of cuticle
S-1189_dn15132_c0_g1_i1	875	-2,74231E+14	4,92E-04	1,57E-01	NA	-	-

S-1189_dn15404_c0_g5_i1	856	-2,6721E+14	1,09E+04	1,05E+06	gi 657941303 cytochrome P450 CYP340G1	7,47E-55	F:iron ion binding; F:metal ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:heme binding
S-1189_dn15463_c0_g1_i1	1693	-2,74254E+14	3,61E-06	1,63E-03	gi 914564127 putative cuticle protein	2,19E+179	F:structural constituent of cuticle
S-1189_dn15463_c0_g1_i2	1665	-2,72035E+14	5,04E-05	1,90E-02	gi 914564127 putative cuticle protein	4,1E+179	F:structural constituent of cuticle
S-1189_dn15599_c0_g2_i5	733	-2,25438E+13	2,33E+05	1,69E+07	gi 302347126 gloverin	2,93E-40	-
S-1189_dn15621_c0_g2_i3	1820	-2,08491E+14	5,55E+03	5,66E+05	NA	-	-
S-1189_dn15794_c0_g1_i10	3066	-2,11593E+14	6,60E+03	6,61E+05	NA	-	-
S-1189_dn15794_c0_g1_i5	3045	-2,16604E+14	3,21E+02	4,06E+04	NA	-	-
S-1189_dn16143_c0_g2_i1	1830	-2,18954E+14	3,19E+07	1,32E+09	gi 768418898 glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	1,2E-10	-
S-1189_dn16172_c0_g2_i1	1379	-3,05984E+14	6,63E-13	6,21E-10	gi 930672351 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	1,13E-76	F:oxidoreductase activity; P:metabolic process; C:membrane; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process
S-1189_dn16175_c0_g1_i1	841	-2,13266E+14	8,61E+07	3,11E+09	NA	-	-
S-1189_dn16585_c0_g1_i3	795	-2,48343E+14	5,87E+01	8,62E+03	gi 768441303 sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like	3,24E-95	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1189_dn16674_c0_g1_i1	1683	-2,07051E+14	1,17E+09	0,000285	gi 930666841 Sodium-independent sulfate anion transporter	0,00E+00	F:secondary active sulfate transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane; P:sulfate transmembrane transport
S-1189_dn16721_c0_g2_i1	1337	-2,19121E+14	7,32E+05	3,52E+08	gi 768428139 carbonyl reductase family member 4-like	2,59E-106	F:oxidoreductase activity; P:metabolic process; P:oxidation-reduction process
S-1189_dn16724_c3_g3_i1	885	-2,32239E+14	2,24E+03	2,45E+05	gi 914544492 putative cuticle protein CPH38	1,87E-9	-
S-1189_dn16848_c0_g1_i1	1213	-2,46586E+14	1,06E+06	6,28E+07	NA	-	-
S-1189_dn17221_c0_g1_i1	2165	-4,98946E+14	2,86E-19	4,82E-16	gi 512917574 glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	0,00E+00	F:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors; F:flavin adenine dinucleotide binding; P:oxidation-reduction process
S-1189_dn17485_c0_g1_i1	1402	-2,03477E+14	3,72E+08	0,00011	gi 512922127 ornithine aminotransferase, mitochondrial	0,00E+00	F:pyridoxal phosphate binding; F:transaminase activity; P:metabolic process
S-1189_dn17586_c0_g1_i4	1428	-4,53532E+14	3,08E-48	3,89E-44	NA	-	-

S-1189_dn17680_c0_g1_i1	801	-2,85376E+14	2,00E+02	2,65E+04	gi 293226 trypsin, partial	1,88E-89	F:serine-type peptidase activity; C:extracellular region
S-1189_dn17956_c0_g1_i2	1813	-2,04999E+14	5,36E+06	2,67E+08	gi 363896150 UDP-glucuronosyltransferase UGT340C2	0,00E+00	F:transferase activity, transferring hexosyl groups; C:membrane; P:metabolic process
S-1189_dn17980_c5_g3_i1	934	-2,0653E+13	1,97E+09	0,000434	NA	-	-
S-1189_dn18280_c0_g1_i2	1776	-3,69915E+14	9,65E-15	1,11E-11	gi 399108409 cytochrome CYP324A6, partial	0,00E+00	F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:heme binding
S-1189_dn18298_c2_g2_i1	1954	-2,05496E+14	5,38E+03	3,51E+07	gi 914562595 Organic cation transporter	0,00E+00	P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane
S-1189_dn18701_c0_g1_i2	2276	-2,54112E+14	2,06E+06	1,14E+06	gi 914568377 Organic cation transporter protein	0,00E+00	C:membrane; F:transporter activity
S-1189_dn18736_c0_g1_i2	1975	-3,57603E+14	6,34E-17	9,42E-14	gi 913334400 luciferin 4-monooxygenase-like	1,47E+11 9	F:catalytic activity; P:metabolic process
S-1189_dn18737_c0_g1_i2	3105	-2,30998E+14	2,23E+03	2,03E+06	gi 909574824 uncharacterized protein LOC106107008	2,87E-130	
S-1189_dn18841_c5_g4_i1	1796	-2,50565E+13	6,07E-07	3,07E-04	NA	-	-
S-1189_dn18843_c4_g2_i1	880	-4,84189E+14	8,08E-17	1,14E-13	NA	-	-
S-1189_dn18879_c5_g7_i1	1046	-2,8984E+14	4,66E-05	1,51E-01	NA	-	-
S-1189_dn19030_c0_g1_i3	3958	-2,13909E+14	8,76E+02	8,55E+05	gi 913326714 endoplasmic reticulum metalloproteinase 1-like isoform X1	0,00E+00	-
S-1189_dn19030_c0_g1_i5	4057	-2,12715E+14	1,53E+04	1,44E+06	gi 913326714 endoplasmic reticulum metalloproteinase 1-like isoform X1	0,00E+00	-
S-1189_dn19248_c2_g1_i2	1779	-2,14483E+13	6,24E-06	2,67E-03	gi 657941381 cytochrome P450 CYP9A14v2	0,00E+00	F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:heme binding
S-1189_dn19314_c0_g1_i1	2512	-3,86958E+14	1,66E-26	4,20E-23	gi 909576021 sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like	0,00E+00	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1189_dn19314_c0_g1_i5	862	-2,97289E+14	2,02E+02	2,66E+03	gi 909576021 sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like	7,23E-104	-
S-1189_dn19331_c0_g1_i3	1293	-2,71762E+14	5,50E+01	8,18E+03	NA	-	-

S-1189_dn19331_c0_g1_i4	1418	-2,53221E+14	3,69E+01	4,62E+04	NA	-	-
S-1189_dn19331_c0_g1_i8	1394	-2,66635E+14	5,16E+01	7,81E+03	NA	-	-
S-1189_dn19471_c1_g7_i5	1639	-2,34044E+14	1,50E+05	1,16E+07	gi 909558081 alpha-tocopherol transfer protein-like	1,51E-165	P:transport; C:intracellular; F:transporter activity
S-1189_dn19506_c0_g1_i1	878	-2,76232E+14	6,74E+04	5,68E+06	NA	-	-
S-1189_dn2473_c0_g1_i1	824	-3,47457E+14	6,33E-04	1,98E-01	NA	-	-
S-1189_dn26080_c0_g1_i1	888	-2,42401E+14	5,80E+07	2,22E+09	gi 768448044 uncharacterized protein LOC105395769, partial	1,98E-107	P:macromolecule metabolic process; P:primary metabolic process
S-1189_dn26289_c0_g1_i1	870	-3,22954E+14	1,30E+02	1,78E+04	gi 943936707 uncharacterized protein LOC106717627	1,49E-63	F:nucleic acid binding; P:DNA integration
S-1189_dn27587_c0_g1_i1	1560	-3,53585E+13	5,23E-09	3,07E-05	NA	-	-
S-1189_dn28309_c0_g1_i1	828	-2,73717E+14	1,48E+05	8,50E+07	gi 913306356 uncharacterized protein LOC106129555	3,76E-67	-
S-1189_dn3363_c0_g1_i1	1073	-2,41531E+14	3,42E+06	1,80E+08	NA	-	-
S-1189_dn34173_c0_g1_i1	1020	-2,05652E+14	5,48E+08	0,000151	NA	-	-
S-1189_dn35351_c0_g1_i1	907	-3,12727E+14	3,38E+03	3,54E+05	NA	-	-
S-1189_dn3631_c0_g2_i1	732	-2,3682E+14	9,92E+05	5,90E+07	NA	-	-
S-1189_dn4242_c0_g1_i1	709	-2,47864E+14	9,21E+06	4,30E+08	NA	-	-
S-1189_dn5015_c0_g2_i1	1351	-2,65E+14	4,16E+05	2,82E+07	gi 815808161 zinc finger BED domain-containing 4-like	3,05E-80	F:binding
S-1189_dn7026_c0_g1_i1	754	-2,04586E+14	1,97E+09	0,000435	NA	-	-
S-1189_dn7095_c0_g1_i1	732	-3,33001E+14	7,61E+01	1,09E+04	gi 943972746 E3 ubiquitin- ligase MARCH1-like	8,58E-114	F:zinc ion binding; C:integral component of membrane
S-1189_dn7273_c0_g1_i1	1233	-4,49071E+14	5,81E-22	1,33E-18	gi 641654081 RNA-directed DNA pol from mobile element jockey-like	3,06E-82	F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
S-1189_dn7670_c0_g1_i1	2376	-2,10955E+13	1,93E+08	6,29E+08	gi 512889065 multiple epidermal growth factor-like domains 10	0,00E+00	C:membrane; C:integral component of membrane
S-1189_dn7848_c0_g2_i1	1168	-2,16277E+14	3,95E+08	0,000115	NA	-	-
S-1189_dn7945_c0_g1_i1	935	-2,00464E+13	1,82E+09	0,000406	NA	-	-
S-1189_dn7986_c0_g1_i1	777	-3,38645E+14	7,62E+01	1,09E+04	gi 938243465 putative desaturases3	2,7E-107	F:oxidoreductase activity; F:metal ion binding; P:lipid metabolic process; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; F:heme binding

S-1189_dn8195_c0_g2_i1	1302	-4,5898E+14	3,53E-11	2,71E-08	gi 659495102 desaturase	0,00E+00	F:oxidoreductase activity; F:metal ion binding; P:lipid metabolic process; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; F:heme binding
S-1189_dn8369_c0_g3_i3	1268	-2,74725E+14	2,10E-03	6,17E-01	gi 768430699 pancreatic lipase-related 2-like	1,34E-136	P:metabolic process; C:extracellular region; F:carboxylic ester hydrolase activity
S-1189_dn9788_c0_g1_i1	961	-2,02086E+14	1,90E+07	8,36E+08	NA		
S-1196_dn10521_c0_g1_i1	852	-2,09668E+14	3,69E+08	0,000109	gi 827555375 trypsin, alkaline C-like	4,54E-58	F:hydrolase activity
S-1196_dn10611_c0_g2_i1	788	-2,90392E+14	1,51E+03	1,70E+05	NA	-	-
S-1196_dn11216_c0_g1_i1	769	-2,32809E+14	1,58E+08	5,30E+09	NA	-	-
S-1196_dn11413_c0_g1_i1	1033	-2,18466E+14	6,28E+08	0,000169	NA	-	-
S-1196_dn11479_c0_g2_i1	942	-2,10514E+14	7,58E+07	2,80E+08	NA	-	-
S-1196_dn11507_c0_g1_i1	882	-2,09799E+14	2,38E+08	7,49E+09	NA	-	-
S-1196_dn11611_c0_g1_i1	702	-2,49332E+14	2,68E+07	1,13E+09	NA	-	-
S-1196_dn11703_c0_g1_i1	731	-2,10671E+14	1,39E+08	0,000327	NA	-	-
S-1196_dn11895_c0_g1_i1	798	-2,4445E+14	2,38E+06	1,02E+09	NA	-	-
S-1196_dn11922_c0_g1_i1	1336	-4,67647E+14	1,31E-13	1,32E-10	gi 910313418 uncharacterized protein LOC106123499	1,25E-144	-
S-1196_dn12065_c0_g1_i1	839	-2,24278E+13	1,68E+08	5,56E+09	NA	-	-
S-1196_dn12390_c0_g1_i2	909	-2,2939E+13	9,74E+04	7,84E+06	gi 909556405 trypsin, alkaline C-like	3,71E-74	F:peptidase activity
S-1196_dn12496_c0_g1_i1	1221	-3,7505E+14	9,47E-02	2,26E+01	gi 659495102 desaturase	2,22E-85	F:oxidoreductase activity; F:metal ion binding; P:lipid metabolic process; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; F:heme binding
S-1196_dn12616_c0_g1_i2	1371	-2,81081E+14	1,74E+00	3,61E+00	NA	-	-
S-1196_dn12628_c0_g1_i1	844	-2,6093E+14	3,41E+05	2,37E+07	gi 909556411 trypsin, alkaline C-like	1,11E-72	F:peptidase activity
S-1196_dn12962_c0_g1_i1	1163	-2,10602E+14	3,30E+05	2,31E+06	NA	-	-
S-1196_dn13693_c0_g1_i1	738	-3,59653E+14	3,29E-07	1,51E-03	NA	-	-
S-1196_dn13814_c0_g1_i1	1704	-2,29221E+14	2,12E+05	1,17E+08	NA	-	-
S-1196_dn14113_c0_g1_i1	1178	-3,02127E+14	3,50E+03	3,66E+04	gi 57506586 reverse transcriptase, partial	4,14E-56	F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
S-1196_dn1466_c0_g2_i1	986	-4,12498E+14	4,37E-07	2,25E-04	gi 913334308 uncharacterized protein LOC106141768	6,49-E-8	-
S-1196_dn14957_c0_g1_i1	893	-2,45486E+14	2,02E+07	8,86E+08	NA	-	-
S-1196_dn15071_c0_g2_i2	787	-2,45731E+14	2,13E+05	1,59E+07	NA	-	-

S-1196_dn15799_c0_g1_i1	895	-2,23777E+14	6,94E+04	5,83E+06	NA	-	-
S-1196_dn16408_c0_g1_i2	938	-2,03122E+14	2,38E+08	7,49E+09	gi 943951486 peroxidase-like	1,03E-82	F:peroxidase activity; P:response to oxidative stress; P:cellular oxidant detoxification; P:oxidation-reduction process; F:heme binding
S-1196_dn16661_c0_g2_i1	1541	-2,10655E+14	4,10E+06	2,10E+07	NA	-	-
S-1196_dn17226_c1_g2_i1	1587	-2,5044E+14	2,12E+03	2,31E+05	NA	-	-
S-1196_dn17416_c0_g1_i2	833	-2,24227E+13	5,89E+07	2,25E+09	gi 553949483 hypothetical protein SHD_0280, partial	4,57E-4	-
S-1196_dn17690_c0_g1_i1	1490	-4,67947E+14	6,41E-48	5,41E-44	NA	-	-
S-1196_dn17690_c0_g2_i1	937	-4,03757E+14	2,48E-33	8,94E-30	NA	-	-
S-1196_dn17923_c0_g1_i1	971	-2,39202E+14	5,37E+04	3,51E+07	gi 512912791 fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing 2-like	1,3E-150	P:metabolic process; F:hydrolase activity
S-1196_dn18099_c0_g2_i1	711	-2,19339E+14	5,79E+06	0,000159	NA	-	-
S-1196_dn18935_c0_g1_i1	1302	-2,43234E+14	1,97E+05	1,48E+07	gi 512916219 general transcription factor 3C polypeptide 6	3,47E-54	-
S-1196_dn18935_c0_g1_i2	1340	-2,40277E+13	3,42E+05	2,37E+07	gi 512916219 general transcription factor 3C polypeptide 6	4,77E-54	-
S-1196_dn19038_c0_g1_i1	2703	-2,44623E+14	5,93E+02	7,17E+04	NA	-	-
S-1196_dn19213_c0_g1_i1	722	-2,92E+13	7,17E-02	1,76E+01	NA	-	-
S-1196_dn19231_c0_g1_i2	1720	-2,13284E+14	5,86E+05	3,76E+07	NA	-	-
S-1196_dn19247_c0_g1_i1	1635	-2,54484E+14	1,07E+06	6,31E+07	NA	-	-
S-1196_dn19311_c0_g1_i1	800	-2,28795E+14	1,34E+05	1,05E+06	gi 18698335 juvenile hormone diol kinase	6,71E-93	F:calcium ion binding; P:phosphorylation; F:kinase activity
S-1196_dn19333_c0_g1_i2	1040	-2,16789E+14	6,93E+02	8,30E+04	gi 223671135 putative cuticle protein	8,01E-64	F:structural constituent of cuticle
S-1196_dn19596_c0_g1_i1	1533	-2,01721E+14	2,07E+09	0,000454	NA	-	-
S-1196_dn19674_c0_g1_i1	2600	-2,5649E+14	7,03E+04	5,89E+06	gi 913307171 luciferin 4-monooxygenase-like	0,00E+00	F:catalytic activity; P:metabolic process
S-1196_dn19929_c1_g2_i1	1740	-4,02287E+14	8,99E-62	2,27E-57	gi 768441303 sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like	0,00E+00	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1196_dn20047_c0_g1_i1	1146	-2,29421E+13	7,65E+05	4,71E+07	gi 930661728 Cytochrome P450 4C1	5,7E-96	F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:oxidoreductase activity; F:metal ion binding; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:heme binding

S-1196_dn20165_c0_g1_i1	898	-3,92513E+14	9,53E-20	1,72E-16	gi 930679980 facilitated trehalose transporter Tret1	8,32E-42	C:membrane
S-1196_dn20194_c1_g1_i1	2308	-2,94207E+14	4,26E+01	5,28E+04	gi 1048008803 zinc finger BED domain-containing 4-like	0,00E+00	F:nucleic acid binding; F:DNA binding; F:protein dimerization activity
S-1196_dn20237_c1_g2_i1	744	-2,90624E+14	8,92E+02	1,04E+05	gi 914576778 Uncharacterized protein OBRU01_02090	5,43E-41	-
S-1196_dn20407_c1_g3_i1	901	-2,51876E+14	4,90E+05	3,24E+07	NA	-	-
S-1196_dn20407_c1_g3_i2	2163	-2,26733E+13	2,37E+01	3,82E+03	NA	-	-
S-1196_dn20539_c1_g1_i7	955	-2,18119E+14	1,27E+07	5,72E+08	gi 397910056 trypsin, partial	9E-110	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
S-1196_dn21164_c0_g4_i1	1338	-2,18348E+13	2,29E+05	1,25E+08	NA	-	-
S-1196_dn21261_c0_g1_i3	2175	-2,19044E+14	3,77E+04	2,60E+06	NA	-	-
S-1196_dn21321_c0_g1_i1	1140	-3,27446E+14	1,98E+00	4,04E+02	NA	-	-
S-1196_dn21321_c2_g13_i1	751	-2,41615E+13	1,90E+05	1,43E+07	NA	-	-
S-1196_dn21466_c1_g1_i1	4457	-2,44619E+14	3,24E-03	9,10E-01	NA	-	-
S-1196_dn21553_c5_g7_i1	1017	-2,16187E+14	5,33E+06	2,67E+08	NA	-	-
S-1196_dn21617_c1_g1_i1	943	-4,13095E+14	3,99E-07	2,10E-04	NA	-	-
S-1196_dn21771_c0_g1_i1	1383	-2,69137E+14	5,06E+01	7,71E+03	NA	-	-
S-1196_dn21771_c0_g1_i3	1405	-2,54726E+14	3,73E+02	4,64E+04	NA	-	-
S-1196_dn21882_c0_g1_i2	969	-2,25421E+14	1,04E+07	4,82E+07	NA	-	-
S-1196_dn22009_c5_g12_i1	1077	-3,64652E+14	2,85E-03	8,09E-01	NA	-	-
S-1196_dn22204_c1_g5_i6	1518	-2,29346E+14	1,69E+03	1,89E+05	NA	-	-
S-1196_dn22335_c7_g4_i1	1096	-2,35252E+14	4,63E+06	2,35E+08	NA	-	-
S-1196_dn23266_c0_g1_i1	777	-4,17315E+13	3,45E-12	2,81E-09	NA	-	-
S-1196_dn26446_c0_g1_i1	704	-2,08498E+14	1,05E+09	0,000261	NA	-	-
S-1196_dn28697_c0_g1_i1	1054	-3,70743E+14	7,43E-01	1,59E+01	NA	-	-
S-1196_dn32259_c0_g1_i1	1218	-2,29076E+14	1,57E+06	8,96E+07	NA	-	-
S-1196_dn32442_c0_g1_i1	1521	-3,55554E+14	2,47E+00	4,91E+02	gi 270017034 RNA-directed DNA polymerase from transposon BS-like Protein	3,99E-90	-
S-1196_dn32799_c0_g1_i1	1168	-2,61409E+14	2,56E+03	2,75E+04	NA	-	-
S-1196_dn32907_c0_g1_i1	709	-2,82104E+13	1,27E+03	1,46E+05	NA	-	-
S-1196_dn35049_c0_g1_i1	703	-2,1883E+14	6,11E+08	0,000165	gi 512888801 thioredoxin domain-containing protein 9	2,1E-9	C:cell; P:cell redox homeostasis
S-1196_dn36727_c0_g1_i1	777	-2,06685E+14	2,00E+09	0,000439	NA	-	-

S-1196_dn37175_c0_g1_i1	984	-2,00375E+14	1,43E+07	6,44E+08	NA	-	-
S-1196_dn5477_c0_g1_i1	834	-2,70724E+14	2,20E+06	1,21E+08	gi 914549610 putative reverse transcriptase	3,7E-31	F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
S-1196_dn5752_c0_g1_i1	836	-2,21393E+14	2,23E+04	1,65E+07	NA	-	-
S-1196_dn5857_c0_g1_i1	1679	-2,34699E+14	1,13E+04	1,08E+06	NA	-	-
S-1196_dn7860_c0_g1_i1	1000	-3,18077E+14	9,98E-03	2,36E+01	NA	-	-
S-1196_dn8500_c0_g1_i1	799	-2,45646E+14	5,28E+06	2,65E+08	NA	-	-
S-1196_dn898_c0_g2_i1	1254	-3,5039E+14	4,56E-01	1,04E+02	gi 659495102 desaturase	0,00E+00	F:oxidoreductase activity; F:metal ion binding; P:lipid metabolic process; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; F:heme binding
S-1196_dn9183_c0_g2_i1	1214	-2,85385E+14	8,45E-02	2,05E+01	NA	-	-
S-1197_dn10270_c0_g1_i2	750	-2,45737E+12	3,58E+07	1,46E+09	NA	-	-
S-1197_dn10973_c0_g1_i1	850	-2,18901E+14	2,54E-05	9,90E-05	gi 512922278 gamma-glutamylcyclotransferase-like	1,01E-105	P:glutathione biosynthetic process; F:gamma-glutamylcyclotransferase activity
S-1197_dn11981_c0_g1_i1	1831	-2,07964E+14	8,77E+04	7,11E+06	NA	-	-
S-1197_dn12789_c0_g3_i1	1364	-2,00244E+14	1,66E+09	0,000376	gi 909560695 carboxypeptidase B-like	0,00E+00	F:G-protein coupled receptor activity; F:zinc ion binding; P:G-protein coupled receptor signaling pathway; F:metallocarboxypeptidase activity; P:proteolysis; C:integral component of membrane
S-1197_dn13202_c0_g1_i1	1371	-2,63922E+14	3,12E+06	1,66E+08	gi 592962691 trypsin	1,56E-107	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
S-1197_dn13258_c0_g1_i1	915	-2,22709E+14	3,06E+06	1,63E+08	NA	-	-
S-1197_dn13353_c0_g1_i1	815	-2,85032E+14	3,34E-01	7,68E+01	gi 768408825 larval cuticle LCP-17-like	3,23E-25	C:extracellular space; F:structural constituent of cuticle
S-1197_dn13490_c0_g1_i4	1709	-2,78057E+14	4,55E-03	1,25E+00	gi 290563239 cuticular RR-1 motif 47 precursor	0,00E+00	F:structural constituent of cuticle
S-1197_dn13942_c0_g1_i1	2110	-3,06406E+14	5,57E-03	1,50E+00	NA	-	-
S-1197_dn13959_c0_g2_i1	702	-2,73409E+14	9,14E+03	8,89E+05	NA	-	-
S-1197_dn14839_c1_g1_i7	1437	-2,17545E+14	1,38E+04	1,31E+06	gi 909577330 antichymotrypsin-2-like isoform X2	2,69E-6	C:extracellular space
S-1197_dn15449_c0_g2_i1	1171	-2,1191E+14	1,93E+03	2,14E+05	NA	-	-
S-1197_dn15957_c0_g1_i1	1403	-2,10469E+13	2,54E+05	1,83E+07	gi 909552361 fructose-bisphosphate aldolase-like	0,00E+00	P:glycolytic process; F:fructose-bisphosphate aldolase activity

S-1197_dn16005_c0_g1_i2	1415	-2,37166E+14	6,10E+07	2,32E+09	NA	-	-
S-1197_dn16057_c0_g1_i1	1185	-2,13718E+13	2,20E+05	1,63E+07	NA	-	-
S-1197_dn16064_c1_g1_i1	893	-3,18523E+14	2,01E+03	2,21E+05	gi 2463078 chymotrypsin-like protease partial	6,71E-48	F:hydrolase activity
S-1197_dn16116_c0_g3_i1	2037	-2,63134E+14	2,85E+04	2,57E+05	gi 914543311 Organic cation transporter	0,00E+00	P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane
S-1197_dn16454_c0_g1_i1	1521	-2,05882E+14	2,29E+05	1,68E+07	gi 827548982 collagen alpha-2(I) chain-like	1,59E-60	-
S-1197_dn16590_c0_g1_i2	1579	-2,61459E+14	1,77E-02	4,62E+00	NA	-	-
S-1197_dn16923_c1_g1_i4	1194	-2,40466E+14	7,54E+02	8,95E+04	gi 653606837 lipase	2,43E-165	P:metabolic process; C:extracellular region; F:carboxylic ester hydrolase activity
S-1197_dn16988_c1_g2_i1	2236	-3,48684E+14	1,06E-02	2,82E+00	NA	-	-
S-1197_dn17875_c1_g7_i3	1239	-2,16058E+12	5,71E+06	2,82E+08	gi 910325249 myrosinase 1-like	4,04E-150	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
S-1197_dn18147_c0_g1_i5	1010	-2,74577E+14	1,33E+03	1,26E+06	gi 913328582 uncharacterized protein LOC106139021	9,31E-39	C:integral component of membrane
S-1197_dn18167_c0_g1_i4	858	-2,82883E+14	6,61E+03	6,61E+05	gi 293226 trypsin, partial	4,5E-88	F:serine-type peptidase activity; C:extracellular region
S-1197_dn18185_c0_g3_i1	792	-2,39997E+14	1,66E+06	9,41E+07	NA	-	-
S-1197_dn18217_c0_g1_i2	1604	-2,05857E+14	1,94E+07	8,52E+07	gi 114052048 epidermal retinal dehydrogenase	8,26E-174	F:oxidoreductase activity; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process
S-1197_dn18359_c1_g1_i1	841	-2,57832E+14	5,95E+05	3,80E+07	gi 293226 trypsin, partial	6,32E-74	F:peptidase activity
S-1197_dn18384_c0_g1_i1	1357	-3,07631E+14	1,73E+01	2,88E+03	gi 910329274 carboxypeptidase B-like	1,16E+176	F:zinc ion binding; F:metallocarboxypeptidase activity; P:proteolysis
S-1197_dn18414_c0_g1_i2	1562	-2,18009E+14	3,38E+06	1,79E+08	gi 913309385 synaptic vesicle glycoprotein 2C-like	0,00E+00	-
S-1197_dn18541_c1_g1_i1	1384	-2,24373E+14	1,18E+02	1,62E+03	gi 909566391 lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	2,33E-34	-
S-1197_dn18541_c1_g1_i3	1431	-2,03301E+14	3,99E+06	2,05E+08	gi 909566391 lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	2,93E-34	-
S-1197_dn18856_c0_g2_i2	882	-2,95202E+14	1,65E+03	1,84E+05	gi 913307284 uncharacterized protein LOC106129951	6,93E-4	-
S-1197_dn18867_c4_g10_i1	1147	-2,38343E+14	5,60E+05	3,62E+07	NA	-	-
S-1197_dn19043_c2_g18_i1	1052	-4,47843E+14	2,08E-09	1,42E-06	NA	-	-
S-1197_dn19181_c0_g1_i2	2022	-2,21833E+14	1,22E+07	5,54E+08	gi 768449748 facilitated trehalose transporter Tret1-like	8,51E-151	-

S-1197_dn19204_c0_g1_i1	1488	-2,61285E+14	2,67E+01	3,43E+04	NA	-	-
S-1197_dn19204_c0_g1_i3	1400	-2,70361E+14	6,48E+01	9,46E+03	NA	-	-
S-1197_dn19204_c0_g1_i4	1423	-2,61735E+14	2,19E+02	2,85E+04	NA	-	-
S-1197_dn19431_c1_g1_i4	2150	-2,24929E+14	3,81E+05	2,62E+07	gi 827546328 uncharacterized protein LOC101746561	0,00E+00	C:membrane; C:integral component of membrane
S-1197_dn19459_c3_g17_i1	1406	-2,09862E+14	7,33E+07	2,72E+09	NA	-	-
S-1197_dn19558_c0_g1_i3	1199	-2,45309E+14	2,56E-07	1,38E-04	gi 910349850 microtubule-associated protein 1A	3,33E-130	-
S-1197_dn19748_c0_g2_i7	1339	-2,70355E+14	5,33E+00	8,02E+01	gi 768408839 larval cuticle protein 1-like	5,57E-34	F:structural constituent of cuticle
S-1197_dn19871_c0_g1_i1	2243	-2,04546E+14	7,50E+06	3,59E+07	gi 1033933782 UDP-glucosyltransferase 40F3	0,00E+00	F:transferase activity, transferring hexosyl groups; C:membrane
S-1197_dn19913_c0_g6_i1	959	-3,73444E+14	2,65E-10	1,86E-07	gi 1081430049 hypothetical protein SAMN05192588_2398	5,58E-5	F:ATP binding
S-1197_dn20001_c0_g1_i1	2589	-2,10286E+14	8,34E+05	5,07E+07	gi 913309395 nose resistant to fluoxetine 6-like	0,00E+00	F:transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups; P:metabolic process; C:membrane; C:integral component of membrane
S-1197_dn20168_c0_g2_i1	2576	-3,82411E+14	2,23E-21	4,71E-18	gi 909576021 sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like	0,00E+00	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1197_dn20168_c0_g2_i7	1923	-2,88326E+14	5,19E-02	1,30E+01	gi 930667037 Sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1	0,00E+00	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
S-1197_dn20185_c0_g2_i1	4470	-2,05597E+14	2,30E+05	1,68E+07	NA	-	-
S-1197_dn20194_c0_g1_i2	1963	-2,25198E+14	1,22E+08	4,21E+09	NA	-	-
S-1197_dn20283_c1_g11_i1	799	-2,03279E+14	1,41E+09	0,000331	NA	-	-
S-1197_dn20286_c0_g7_i2	1349	-3,93568E+13	4,51E-30	1,42E-26	NA	-	-
S-1197_dn22931_c0_g1_i1	834	-2,33488E+14	1,80E+07	7,92E+08	gi 913333046 metabotropic glutamate receptor- like	2,35E-96	F:G-protein coupled receptor activity; P:G-protein coupled receptor signaling pathway; C:integral component of membrane
S-1197_dn27605_c0_g1_i1	725	-2,09965E+13	6,07E+08	0,000165	gi 930662445 Myosinase 1	2,21E-96	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
S-1197_dn27799_c0_g1_i1	1062	-2,89281E+14	1,15E+05	9,10E+06	gi 512934358 UPF0704 protein C6orf165 homolog	5,21E-134	-

S-1197_dn30928_c0_g1_i1	911	-2,26281E+14	3,02E+08	9,30E+09	gi 795011901  uncharacterized protein LOC105565991	1,71E-107	F:nucleic acid binding
S-1197_dn6230_c0_g1_i1	704	-3,26653E+14	2,81E+01	4,47E+03	gi 914571480 putative cuticle protein	8,35E-26	-
S-1197_dn8125_c0_g1_i1	1127	-2,4097E+14	3,72E+06	1,93E+08	NA	-	-
S-1197_dn9003_c0_g1_i1	1936	-2,94262E+14	7,33E+02	8,74E+04	gi 827546841 phosphatidylinositide phosphatase SAC1	0,00E+00	C:membrane
S-1197_dn9027_c0_g2_i1	1124	-2,09237E+14	3,92E+07	1,58E+09	gi 357631731 myo-inositol oxygenase	0,00E+00	F:inositol oxygenase activity; C:cytoplasm; F:iron ion binding; P:inositol catabolic process; P:oxidation- reduction process
S-1197_dn9220_c0_g1_i1	925	-2,4343E+14	6,05E+05	3,84E+07	NA	-	-
S-1197_dn9317_c0_g1_i1	801	-2,08172E+14	3,53E+08	0,000105	NA	-	-
R-1205_dn14872_c0_g1_i2	2979	-2,60524E+14	6,98E-15	8,40E-12	NA	-	-
R-1205_dn14872_c0_g1_i5	3416	-2,47057E+14	1,55E-12	1,31E-09	NA	-	-
R-1205_dn16260_c0_g1_i4	2066	-2,9613E+14	2,47E-03	7,19E-01	gi 930667037 Sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1	0,00E+00	P:neurotransmitter transport; F:neurotransmitter:sodium symporter activity; P:transmembrane transport; C:integral component of membrane
R-1206_dn15149_c0_g1_i2	878	-2,10723E+14	3,85E+08	0,000113	gi 532085 trypsin	4,86E-70	F:peptidase activity
R-1206_dn16186_c0_g1_i2	1309	-2,09766E+14	2,76E-11	2,18E-08	NA	-	-
R-1206_dn17395_c2_g4_i2	944	-2,43673E+14	7,31E+04	6,08E+05	gi 909558081 alpha-tocopherol transfer protein-like	2,38E-111	P:transport; C:intracellular; F:transporter activity
R-1206_dn17404_c0_g2_i1	1313	-2,01698E+13	5,90E+05	3,77E+07	NA	-	-
R-1206_dn5689_c0_g1_i1	722	-2,3503E+14	2,31E+05	1,68E+07	gi 700588692 larval cuticle protein	2,62E-61	F:structural constituent of cuticle
R-1209_dn123_c0_g1_i1	736	-2,10404E+13	7,67E+04	6,35E+06	gi 379698980 UDP-glycosyltransferase UGT340C1 precursor	2,65E-64	F:glucuronosyltransferase activity; P:metabolic process; C:integral component of membrane
R-1209_dn15446_c0_g2_i1	1156	-3,04356E+14	5,16E-29	1,45E-25	NA	-	-

**ANEXO E:** Sequências de *Anticarsia gemmatalis* reguladas positivamente nos indivíduos resistentes, em relação aos indivíduos suscetíveis, ( $\log_2 \text{fold change} \geq 2$  e  $\text{padj} < 0,1$ ) obtidos a partir do pacote DESeq2. E descrição e anotação funcional das sequências com melhores alinhamentos no Blast2GO.

Sequência	Tamanho	Expressão diferencial - DESeq 2			Descrição	Blast2GO	
		$\log_2 \text{fold change}$	<i>pvalue</i>	<i>padj</i>		<i>e-value</i>	GO
S-1189_dn15136_c0_g1_i1	916	2,122E+14	1,21E+07	4,20E+09	gi 808182128 alcohol dehydrogenase 6, partial	1.72E-151	-
S-1189_dn18528_c0_g1_i2	1245	2,30838E+14	2,92E-04	9,85E-02	gi 56418417 hemolymph proteinase 18	3,64E-63	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; F:serine-type endopeptidase activity; F:peptidase activity; F:hydrolase activity
S-1189_dn18825_c0_g4_i10	1335	2,29201E+14	7,51E-08	4,31E-05	gi 25140425 serine protease inhibitor serpin 1a	4,91E-136	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
S-1196_dn20893_c0_g4_i8	803	2,49637E+14	1,21E-10	8,98E-08	gi 25140427 serine protease inhibitor serpin 1b	3,92E-46	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
S-1196_dn21601_c1_g3_i5	717	2,12092E+14	1,06E+02	1,49E+04	gi 25140425 serine protease inhibitor serpin 1a	6,98E-70	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
S-1196_dn22103_c0_g1_i9	876	2,04929E+14	6,50E-01	1,43E+02	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	1,76E-101	-
S-1197_dn17139_c0_g1_i2	740	2,20434E+14	4,93E-01	1,11E+02	gi 512894212 insecticyanin-A-like	4,91E-36	F:pigment binding
S-1197_dn19092_c0_g1_i7	764	2,44894E+14	1,13E-12	9,88E-10	gi 25140425 serine ase protease inhibitor serpin 1a	8,41E-73	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1205_dn10141_c0_g1_i1	1106	2,70209E+13	4,84E+02	5,97E+04	NA	-	-
R-1205_dn10379_c0_g2_i1	731	4,21145E+14	2,31E-09	1,46E-05	gi 613447133 Kazal-type serine protease inhibitor	3,24E-16	P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1205_dn10379_c0_g3_i1	1026	3,5677E+14	3,99E+00	7,71E+02	gi 613447133 Kazal-type serine protease inhibitor	4,85E-19	P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1205_dn10384_c0_g3_i1	830	2,24086E+14	5,69E+06	2,19E+09	NA	-	-
R-1205_dn11134_c0_g1_i1	2004	4,08486E+14	1,30E-08	8,64E-06	gi 827552290 uncharacterized protein LOC105842017	5,13E-115	F:nucleic acid binding; F:RNA-directed DNA polymerase activity; F:zinc ion binding; F:metal ion binding; P:DNA integration; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
R-1205_dn12144_c2_g1_i1	825	2,13367E+14	2,22E+04	2,03E+06	NA	-	-
R-1205_dn12448_c0_g1_i2	2056	5,03452E+14	3,04E-38	1,92E-34	gi 186703383 hemolin	1,58E-22	C:extracellular region; P:immune system process
R-1205_dn1271_c0_g1_i1	852	3,48083E+14	9,31E+00	1,65E+03	gi 357626536 endonuclease-reverse transcriptase	1,23E-77	P:nucleic acid metabolic process; F:catalytic activity
R-1205_dn13366_c0_g1_i1	981	2,09118E+14	1,55E+07	6,91E+08	NA	-	-
R-1205_dn13384_c0_g1_i2	1786	2,6713E+14	9,87E+03	9,54E+05	NA	-	-

R-1205_dn14097_c0_g1_i2	1201	2,18487E+14	1,97E+06	1,10E+08	gi 909562045 uncharacterized protein LOC106101483	1,3E-19	C:membrane; C:integral component of membrane
R-1205_dn14451_c0_g1_i1	1317	3,30953E+14	2,32E+00	4,66E+02	NA	-	-
R-1205_dn14710_c0_g1_i1	2747	2,29103E+14	2,30E+05	1,68E+07	gi 930656523 adenosine deaminase CECR1	0,00E+00	C:extracellular space; P:metabolic process; F:deaminase activity
R-1205_dn14870_c0_g1_i3	1308	2,54776E+14	3,42E+06	1,80E+08	NA	-	-
R-1205_dn15022_c2_g4_i2	980	2,23744E+13	8,57E+07	3,10E+09	NA	-	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i1	3723	2,09587E+14	2,18E-07	1,20E-04	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i11	3651	2,05182E+14	4,84E-06	2,11E-03	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i13	6206	2,00665E+14	8,74E-06	3,62E-03	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i14	3414	2,065E+14	8,84E-07	4,38E-04	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i7	4501	2,04363E+14	2,99E-06	1,40E-03	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15433_c0_g1_i8	5742	2,01875E+14	4,09E-06	1,82E-03	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1205_dn15552_c1_g1_i1	1722	2,3876E+14	8,68E+05	5,23E+07	gi 930662444 Myosinase 1	9,9E-126	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
R-1205_dn15761_c0_g1_i4	1515	2,37674E+14	3,64E-03	1,01E+00	gi 56418417 hemolymph proteinase 18	1,52E-53	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; F:serine- type endopeptidase activity; F:peptidase activity; F:hydrolase activity
R-1205_dn15761_c0_g1_i6	1406	2,14701E+14	5,56E-03	1,50E+00	gi 56418417 hemolymph proteinase 18	3,67E-50	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity; F:serine-type peptidase activity; F:peptidase activity; F:hydrolase activity
R-1205_dn15886_c3_g1_i1	884	2,29359E+14	3,20E+01	4,06E+04	NA	-	-
R-1205_dn15886_c6_g7_i1	2158	2,3558E+14	1,25E+00	2,17E+03	NA	-	-
R-1205_dn16105_c1_g1_i1	1052	2,80548E+14	8,38E+04	6,88E+06	gi 914570401 Retrovirus-related Pol polyprotein	9,2E-10	-

R-1205_dn16154_c2_g9_i1	1739	2,50609E+14	7,83E+00	1,11E+04	gi 913322139 uncharacterized protein LOC106136311	1,65E-7	C:membrane; C:integral component of membrane
R-1205_dn16154_c2_g9_i2	1075	2,49804E+14	1,13E+02	1,57E+04	gi 913322139 uncharacterized protein LOC106136311	2,69E-15	C:membrane; C:integral component of membrane
R-1205_dn16330_c0_g3_i1	1475	2,44482E+14	8,99E-04	2,77E-01	gi 25140427 serine protease inhibitor serpin 1b	6,4E-96	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1205_dn16342_c0_g2_i2	9928	2,31654E+14	1,73E-05	7,07E-03	NA		
R-1205_dn16395_c0_g11_i1	1909	2,0899E+13	1,66E-10	1,20E-07	gi 385202653 C-type lectin 7	5,06E-20	F:carbohydrate binding
R-1205_dn16395_c0_g11_i8	2032	2,0525E+14	1,21E-04	4,36E-02	gi  283139164 C-type lectin 10	8,78E-7	F:carbohydrate binding
R-1205_dn16395_c0_g11_i9	1262	2,08217E+14	4,99E-05	1,90E-02	gi  283139164 C-type lectin 10	3,55E-15	F:carbohydrate binding
R-1205_dn16460_c0_g1_i2	5852	2,41024E+14	2,44E+07	1,04E+09	NA	-	-
R-1205_dn16723_c3_g5_i1	700	3,86872E+14	5,36E-13	5,21E-10	NA	-	-
R-1205_dn16768_c4_g8_i3	730	2,36819E+14	7,55E+00	1,38E+03	NA	-	-
R-1205_dn16892_c1_g2_i1	1096	2,84296E+14	5,10E-04	1,61E-01	NA	-	-
R-1205_dn16892_c1_g2_i10	739	2,82561E+14	1,01E-03	3,08E-01	NA	-	-
R-1205_dn16941_c0_g1_i2	1155	2,213E+14	3,64E+07	1,48E+09	gi 914564991 Cytadhesion	8,83E-90	-
R-1205_dn16941_c1_g1_i2	5273	2,37061E+14	6,52E+05	4,09E+07	gi 943951293 uncharacterized protein LOC106710892	0,00E+00	F:nucleotidyltransferase activity; P:DNA metabolic process
R-1205_dn16996_c0_g1_i2	3133	2,18795E+14	1,24E+08	4,29E+09	gi 914572908 Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17,6	1,19E-141	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
R-1205_dn16996_c0_g2_i1	2158	2,60428E+14	6,38E+04	5,43E+06	gi 913300085 uncharacterized protein LOC106141703	0,00E+00	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding; P:DNA integration
R-1205_dn17013_c2_g1_i1	1178	2,29449E+14	2,73E-03	7,85E-01	gi 768418526 insecticyanin-A-like	7,83E-83	F:pigment binding

R-1205_dn17013_c2_g1_i3	1176	2,29466E+14	1,17E-04	3,53E-01	gi 768418526 insecticyanin-A-like	8,37E-44	F:pigment binding
R-1205_dn1733_c0_g1_i1	868	2,00368E+14	3,96E+06	2,04E+08	NA	-	-
R-1205_dn17331_c0_g1_i1	1880	3,52817E+14	7,89E+00	1,44E+03	NA	-	-
R-1205_dn1798_c0_g2_i1	994	2,14987E+14	2,23E+07	9,60E+07	gi 512902531 cationic amino acid transporter 3-like	6,75E-53	C:integral component of membrane;F:amino acid transmembrane transporter activity; P:amino acid transmembrane transport
R-1205_dn19483_c0_g1_i1	780	2,18714E+14	2,52E+08	7,90E+09	NA	-	-
R-1205_dn1955_c0_g1_i1	806	3,16512E+14	2,63E+02	2,82E+04	NA	-	-
R-1205_dn19910_c0_g1_i1	787	4,1746E+14	1,71E-06	8,15E-04	NA	-	-
R-1205_dn23953_c0_g1_i1	860	2,80615E+14	3,98E+05	2,71E+07	NA	-	-
R-1205_dn2510_c0_g1_i1	852	2,21293E+13	1,18E+08	4,08E+09	NA	-	-
R-1205_dn2665_c0_g1_i1	791	2,21758E+14	6,51E+06	3,17E+08	gi 512914480 uncharacterized protein LOC101744658	3,22E-66	C:membrane
R-1205_dn2720_c0_g1_i1	1141	2,59656E+14	5,08E+00	6,24E+04	NA	-	-
R-1205_dn27409_c0_g1_i1	790	2,28883E+14	5,02E+07	1,95E+09	NA	-	-
R-1205_dn27614_c0_g1_i1	895	2,13947E+14	4,29E+07	1,71E+09	gi 913305553 uncharacterized protein LOC106129217	4,62E-26	-
R-1205_dn280_c0_g1_i1	1207	3,19517E+13	2,26E+00	3,69E+03	gi 768421339 glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	6,02E-148	F:oxidoreductase activity
R-1205_dn3011_c0_g1_i1	742	2,00771E+13	5,66E+08	0,000155	NA	-	-
R-1205_dn3171_c0_g1_i1	1056	2,16915E+14	8,45E+05	5,12E+07	NA	-	-
R-1205_dn31855_c0_g1_i1	711	2,73565E+13	7,91E+02	7,84E+05	NA	-	-
R-1205_dn35237_c0_g1_i1	795	2,84693E+13	1,99E+05	1,49E+07	NA	-	-
R-1205_dn35563_c0_g1_i1	890	2,38943E+14	1,57E+06	7,00E+08	NA	-	-
R-1205_dn36088_c0_g1_i1	789	2,34179E+14	8,17E+06	2,96E+08	NA	-	-
R-1205_dn5223_c0_g1_i1	888	2,03E+14	1,07E+07	4,94E+08	gi 913330079 uncharacterized protein LOC106139611	1,17E-9	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding; F:metal ion binding
R-1205_dn628_c0_g1_i1	1032	2,31903E+14	1,65E+08	5,51E+09	gi 913328900 uncharacterized protein LOC106139148	8,15E-34	-

R-1205_dn6776_c0_g1_i1	759	2,50209E+14	4,82E+03	4,96E+05	NA	-	-
R-1205_dn7141_c0_g1_i1	1953	2,84338E+14	2,19E+05	1,63E+07	gi 768438358 uncharacterized protein LOC105391048	0,00E+00	P:macromolecule metabolic process; P:primary metabolic process
R-1205_dn7778_c0_g1_i1	1562	2,24254E+14	1,70E+05	1,31E+07	NA	-	-
R-1205_dn8205_c0_g1_i1	801	2,53955E+13	4,66E+02	4,82E+05	gi 930651830 hypothetical protein RR46_06623	1,63E-8	-
R-1205_dn9059_c0_g2_i1	2652	2,14119E+14	5,73E+04	4,97E+06	gi 914556905 Uncharacterized protein OBRU01_22385, partial	0,00E+00	F:nucleic acid binding
R-1205_dn9211_c0_g1_i1	1035	2,09039E+14	1,08E+07	3,78E+09	NA	-	-
R-1205_dn9265_c1_g1_i1	885	2,99015E+14	1,06E+02	1,49E+04	NA	-	-
R-1205_dn9689_c0_g1_i1	917	2,26339E+14	3,39E+06	1,79E+08	gi 914569231 Sugar transport protein	7,23E-6	C:membrane; C:integral component of membrane; P:carbohydrate transport
R-1205_dn9719_c0_g3_i1	726	2,09486E+14	8,38E+08	0,000216	NA	-	-
R-1206_dn10728_c0_g1_i1	1722	2,80513E+14	1,83E-02	4,72E+00	gi 827563730 synaptic vesicle glycoprotein 2c-like, partial	4,59E-151	C:membrane
R-1206_dn11024_c0_g1_i1	1660	2,05844E+14	1,91E+06	1,07E+08	NA	-	-
R-1206_dn11116_c0_g1_i1	1050	3,36763E+14	1,52E+02	2,06E+04	gi 106897087 C-type lectin	4,27E-83	F:carbohydrate binding
R-1206_dn11403_c0_g1_i1	1076	3,28841E+14	4,42E+00	6,86E+03	gi 106897087 C-type lectin	2,54E-89	F:carbohydrate binding
R-1206_dn11486_c0_g4_i1	958	2,16814E+13	2,10E+08	6,74E+09	NA	-	-
R-1206_dn1222_c0_g1_i1	785	2,35961E+14	1,14E+08	3,97E+09	NA	-	-
R-1206_dn1232_c0_g1_i1	860	2,95115E+14	1,44E+03	1,62E+05	NA	-	-
R-1206_dn12431_c0_g1_i1	789	2,22589E+14	4,03E+08	0,000117	gi 194277475 takeout-like protein 2	2,86E-97	-
R-1206_dn12873_c0_g1_i1	748	2,09301E+14	1,60E+09	0,000366	gi 354620211 acyl-CoA Z9 desaturase	4,15E-96	F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water; C:integral component of membrane; P:oxidation-reduction process; P:fatty acid biosynthetic process
R-1206_dn13694_c0_g2_i1	2905	2,42831E+14	6,14E+04	5,28E+06	gi 930656523 adenosine deaminase CECR1	0,00E+00	C:extracellular space; P:metabolic process; F:deaminase activity
R-1206_dn14103_c0_g3_i1	791	2,21924E+14	8,08E+07	2,94E+09	gi 930676978 Glycine N-methyltransferase	1,48E-5	F:glycine N-methyltransferase activity; F:methyltransferase activity; F:transferase activity; P:methylation

R-1206_dn14499_c0_g1_i1	3827	5,83074E+14	7,87E-37	3,32E-33	gi 298204367 endonuclease-reverse transcriptase	0,00E+00	P:nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis; F:RNA-directed DNA polymerase activity; F:endonuclease activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
R-1206_dn14936_c0_g1_i1	1679	3,45589E+14	2,29E-02	5,86E+00	NA	-	-
R-1206_dn15065_c0_g1_i2	1075	2,12416E+14	3,72E+08	0,00011	gi 357605925 hypothetical protein KGM_05702	1,34E-76	P:neurogenesis
R-1206_dn15390_c0_g1_i3	3435	2,05458E+14	1,66E-06	8,07E-04	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1206_dn15390_c0_g1_i6	3507	2,09094E+14	1,33E-07	7,45E-05	gi 913323627 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like	0,00E+00	-
R-1206_dn15624_c0_g1_i1	1551	2,22741E+14	2,36E+06	1,29E+08	gi 827562644 dynein intermediate chain 2, ciliary	0,00E+00	-
R-1206_dn15785_c0_g2_i1	918	2,03595E+14	3,32E+08	9,97E+08	NA	-	-
R-1206_dn16030_c0_g3_i2	901	2,11809E+14	7,38E-06	3,11E-03	NA	-	-
R-1206_dn16236_c0_g1_i3	2618	2,74901E+14	6,97E-01	1,51E+02	gi 385202655 C-type lectin 8, partial	2,55E-66	F:carbohydrate binding
R-1206_dn1640_c0_g1_i1	735	2,11178E+14	1,29E+09	0,00031	gi 298204347 endonuclease-reverse transcriptase	5,86E-102	F:hydrolase activity, acting on ester bonds; P:nucleic acid metabolic process
R-1206_dn16594_c5_g9_i1	704	2,98948E+14	1,13E+00	2,36E+02	NA	-	-
R-1206_dn16672_c0_g2_i1	4287	3,70352E+14	4,56E-02	1,15E+00	gi 238915967 hemicentin-like protein	3,27E-160	F:nucleic acid binding; F:metal ion binding; P:metabolic process; F:hydrolase activity
R-1206_dn16746_c0_g3_i11	759	2,14133E+14	6,92E-05	2,57E-02	gi 909551618 tetraspanin-15-like	8,09E-10	-
R-1206_dn16746_c0_g3_i6	1056	2,20468E+12	7,02E-05	2,57E-02	gi 943973563 tetraspanin-15-like	7,71E-9	-
R-1206_dn16746_c0_g3_i7	1182	2,04163E+14	2,35E+01	3,80E+03	gi 909551618 tetraspanin-15-like	2,3E-11	C:integral component of plasma membrane; C:membrane; C:integral component of membrane; P:cell surface receptor signaling pathway
R-1206_dn16755_c6_g3_i1	877	2,05444E+13	2,28E+06	1,25E+08	NA	-	-
R-1206_dn1688_c0_g1_i1	1019	2,29277E+14	2,51E+07	1,06E+09	NA	-	-
R-1206_dn17043_c0_g1_i1	1713	2,82842E+14	1,06E+00	2,24E+02	NA	-	-
R-1206_dn17043_c0_g1_i2	1820	2,75089E+14	1,38E+01	2,38E+03	NA	-	-
R-1206_dn17066_c0_g2_i3	2284	2,06968E+14	4,53E+08	0,000129	gi 913297589 pancreatic lipase-related protein 2-like	0,00E+00	P:lipid metabolic process; F:triglyceride lipase activity; C:extracellular region
R-1206_dn1707_c0_g1_i1	959	2,1804E+14	3,73E+05	2,57E+07	NA	-	-
R-1206_dn17079_c0_g1_i1	1652	2,11207E+14	3,22E+03	3,39E+05	gi 110826028 esterase	0,00E+00	P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity; F:hydrolase activity
R-1206_dn17084_c2_g6_i3	1192	2,39123E+14	3,05E+02	3,89E+04	NA	-	-

R-1206_dn17202_c1_g3_i1	1658	2,45434E+14	1,84E-04	6,38E-02	gi 25140427 serine protease inhibitor serpin 1b	2,11E-119	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1206_dn17202_c1_g3_i3	2050	2,40528E+14	1,11E-02	2,93E-01	gi 25140425 serine protease inhibitor serpin 1a	1,04E-138	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1206_dn17202_c1_g3_i4	1144	2,47751E+14	3,92E-04	1,29E-01	gi 25140425 serine protease inhibitor serpin 1a	2,05E-107	C:extracellular space; P:proteolysis; F:peptidase activity
R-1206_dn17258_c2_g2_i1	973	2,00883E+14	5,85E+05	3,76E+07	NA	-	-
R-1206_dn17263_c4_g13_i2	1732	2,35261E+14	3,47E+00	6,75E+02	NA	-	-
R-1206_dn17263_c4_g20_i1	781	2,72079E+14	5,68E+03	5,76E+05	NA	-	-
R-1206_dn17269_c2_g3_i1	2146	2,2222E+14	4,39E+06	2,25E+08	gi 914571298 putative Chondroitin sulfate proteoglycan 4	4,95E-41	C:membrane; C:integral component of membrane
R-1206_dn17277_c3_g2_i1	2003	3,18878E+14	6,63E-02	1,64E+01	NA	-	-
R-1206_dn17277_c3_g2_i2	1801	2,89697E+14	6,05E-17	9,42E-14	NA	-	-
R-1206_dn17277_c3_g5_i1	859	3,02297E+14	7,10E-13	6,41E-10	gi 909561389 insecticyanin-A-like	6,09E-53	F:pigment binding
R-1206_dn17277_c3_g5_i2	1024	3,09712E+14	3,74E-16	4,98E-13	gi 909561389 insecticyanin-A-like	4,79E-71	F:pigment binding
R-1206_dn17277_c3_g5_i4	1222	3,06713E+14	1,20E-13	1,26E-11	gi 909561389 insecticyanin-A-like	3,87E-111	F:pigment binding
R-1206_dn17381_c1_g13_i1	1065	2,22618E+14	7,84E+04	6,47E+06	NA	-	-
R-1206_dn17381_c1_g13_i2	1029	2,90845E+14	1,88E-01	4,37E+01	NA	-	-
R-1206_dn17406_c3_g2_i3	994	2,03868E+14	8,35E+02	9,82E+04	gi 357608652 hypothetical protein KGM_19855	1,38E-8	C:membrane
R-1206_dn17416_c1_g2_i3	998	2,73543E+14	1,02E+00	2,16E+02	gi 56418417 hemolymph proteinase 18	6,84E-39	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity; F:serine-type peptidase activity; F:peptidase activity; F:hydrolase activity
R-1206_dn17416_c1_g2_i6	1245	2,7351E+13	2,23E+01	3,67E+03	gi 56418417 hemolymph proteinase 18	8,98E-44	C:membrane; P:proteolysis; C:integral component of membrane; F:serine-type peptidase activity; F:serine-type endopeptidase activity; F:peptidase activity; F:hydrolase activity
R-1206_dn17465_c0_g2_i3	3114	2,16038E+14	1,80E+08	5,94E+09	gi 914553719 Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17,6	8,23E-106	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
R-1206_dn17485_c2_g2_i1	1100	2,20776E+14	1,33E+08	4,55E+09	NA	-	-
R-1206_dn2027_c0_g1_i1	1113	2,71034E+14	2,18E+06	1,20E+08	NA	-	-

R-1206_dn20805_c0_g1_i1	1105	2,23397E+14	2,18E+07	9,46E+08	NA	-	-
R-1206_dn2492_c0_g1_i1	940	2,37716E+14	3,39E+07	1,39E+09	NA	-	-
R-1206_dn25984_c0_g1_i1	1046	2,36925E+13	1,03E+08	3,64E+09	gi 987919304 uncharacterized protein LOC107191251	4,37E-95	F:nucleic acid binding; F:aspartic-type endopeptidase activity; P:proteolysis; P:DNA integration
R-1206_dn30531_c0_g1_i1	1388	2,06185E+14	1,58E+09	0,000363	gi 913309824 RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey-like	2,35E-158	F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:RNA- dependent DNA biosynthetic process
R-1206_dn31327_c0_g1_i1	752	2,23163E+14	4,19E+08	0,000121	gi 298204347 endonuclease-reverse transcriptase	1,18E-135	P:nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis; F:RNA- directed DNA polymerase activity; F:endonuclease activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
R-1206_dn3234_c0_g2_i1	1643	3,07846E+14	1,50E+04	1,42E+06	gi 585866231 vitellogenin receptor	0,00E+00	F:calcium ion binding; C:integral component of membrane
R-1206_dn36420_c0_g1_i1	788	2,63902E+14	3,00E+06	1,61E+07	NA	-	-
R-1206_dn4884_c0_g1_i1	1581	3,91654E+14	3,92E-04	1,29E-01	gi 943958095 uncharacterized protein LOC106713474	4,95E-44	-
R-1206_dn5093_c0_g2_i1	1492	3,22592E+14	1,98E+02	2,63E+04	gi 585866231 vitellogenin receptor	0,00E+00	F:calcium ion binding; C:mitochondrion; C:integral component of membrane
R-1206_dn6318_c0_g1_i1	997	2,18684E+14	1,33E+07	6,01E+08	NA	-	-
R-1206_dn7272_c0_g2_i1	738	2,05445E+14	1,05E+07	3,68E+09	NA	-	-
R-1206_dn7588_c0_g2_i1	856	2,45067E+14	6,08E+06	2,98E+08	gi 914555714 alcohol dehydrogenase	3,74E-126	-
R-1206_dn8174_c0_g1_i1	1154	2,45192E+14	1,10E+06	5,04E+08	NA	-	-
R-1206_dn9309_c0_g2_i1	842	2,25364E+14	1,56E+07	6,96E+08	NA	-	-
R-1206_dn9449_c0_g1_i1	1494	3,79723E+14	1,27E-04	4,47E-02	gi 827545097 transposable element Tcb1 transposase	4,1E-85	F:DNA binding; P:DNA integration; P:transposition, DNA-mediated
R-1206_dn9938_c0_g3_i1	1650	2,80079E+14	7,87E+01	1,11E+04	gi 187281703 hemolymph protein	2,14E-25	C:extracellular space; C:extracellular region
R-1209_dn10342_c0_g1_i1	707	2,4301E+14	7,20E+06	3,47E+08	NA	-	-
R-1209_dn10513_c0_g1_i1	821	2,39209E+14	6,45E+06	3,15E+08	NA	-	-
R-1209_dn1078_c0_g1_i1	845	2,05591E+14	1,85E+05	1,41E+07	NA	-	-
R-1209_dn11371_c0_g1_i1	1380	2,29759E+14	1,09E+07	5,01E+08	gi 910331229 nose resistant to fluoxetine protein 6-like	5,89E-58	-
R-1209_dn11445_c0_g1_i1	2449	2,51715E+14	1,50E+01	2,54E+03	gi 914556905 Uncharacterized protein OBRU01_22385, partial	1,07E-54	F:nucleic acid binding
R-1209_dn12124_c0_g1_i1	1602	4,04462E+14	1,97E-05	7,89E-03	NA	-	-
R-1209_dn13235_c0_g1_i3	989	2,16515E+13	4,42E+07	1,75E+09	gi 913296027 uncharacterized protein LOC106129032	2,92E-59	-

R-1209_dn13682_c1_g1_i1	2357	3,63623E+14	2,36E-05	9,32E-03	NA	-	-
R-1209_dn13724_c0_g1_i1	1573	2,0529E+14	1,17E+05	9,30E+06	NA	-	-
R-1209_dn14343_c0_g1_i2	922	2,42817E+13	5,17E+05	3,39E+07	gi 768450361 uncharacterized protein LOC105397005	9,77E-30	-
R-1209_dn14396_c1_g1_i1	1969	2,12632E+14	3,33E+05	2,33E+07	gi 827555929 C-type lectin 11 isoform X1	1,02E-82	F:ATP binding; F:protein kinase activity; F:carbohydrate binding; P:protein phosphorylation
R-1209_dn14396_c1_g1_i2	1517	2,08325E+11	7,87E+05	4,79E+07	gi 827555929 C-type lectin 11 isoform X1	1,84E-111	F:binding
R-1209_dn14510_c0_g2_i1	3400	2,76771E+14	6,83E-01	1,49E+02	gi 657941375 Cytochrome P450 CYP6B43	5,92E-153	F:oxidoreductase activity; F:binding
R-1209_dn14658_c0_g2_i3	1989	2,147E+14	8,17E+08	0,000211	gi 512887536 glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	0,00E+00	F:oxidoreductase activity
R-1209_dn14894_c0_g1_i1	1412	2,0714E+14	6,74E+04	5,68E+06	gi 943940845 uncharacterized protein LOC106721455	2,12E-121	F:nucleic acid binding; F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:DNA integration; P:RNA- dependent DNA biosynthetic process
R-1209_dn15275_c0_g2_i3	820	2,65824E+14	2,88E-08	1,78E-05	gi 512894212 insecticyanin-A-like	1,42E-103	F:pigment binding
R-1209_dn15855_c0_g1_i2	978	2,41191E+14	6,88E+05	4,29E+07	gi 297340768 chymotrypsin	2,33E-127	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
R-1209_dn16198_c5_g1_i5	1373	2,0058E+14	2,57E+08	8,02E+09	NA	-	-
R-1209_dn16289_c0_g1_i1	1345	2,43654E+14	1,43E+01	2,44E+03	gi 914571298 putative chondroitin sulfate proteoglycan 4	7,76E-14	-
R-1209_dn16620_c0_g1_i1	1410	5,04703E+14	2,72E-37	1,38E-33	gi 186703381 hemolin	0,00E+00	C:extracellular space; P:innate immune response; C:extracellular region; P:immune system process
R-1209_dn16865_c0_g1_i1	1926	3,15527E+14	9,02E-02	2,17E-01	NA	-	-
R-1209_dn16865_c0_g3_i2	954	3,08734E+14	4,36E-14	4,79E-11	gi 1018646436 insecticyanin A-like protein	1,52E-4	-
R-1209_dn16865_c0_g3_i5	1038	3,39695E+14	7,75E-21	1,51E-17	gi 909561389 insecticyanin A-like protein	1,2E-55	F:pigment binding
R-1209_dn16865_c0_g3_i6	1261	3,21822E+14	6,65E-15	8,40E-12	gi 909561389 insecticyanin A-like protein	4,69E-96	F:pigment binding
R-1209_dn16874_c6_g3_i1	2781	3,19873E+14	3,99E-08	2,40E-05	NA	2,79E-65	F:carbohydrate binding
R-1209_dn1734_c0_g1_i1	726	2,40041E+14	3,12E+07	1,29E+09	NA	-	-
R-1209_dn17370_c0_g3_i2	1457	2,12664E+14	1,55E+08	5,19E+09	NA	-	-
R-1209_dn17513_c3_g5_i1	1228	2,22881E+12	2,21E+06	1,22E+08	NA	-	-

R-1209_dn17631_c2_g11_i1	2016	2,47881E+14	1,14E+02	1,57E+03	NA	-	-
R-1209_dn17631_c2_g11_i2	1352	2,47097E+14	1,69E+02	2,28E+04	NA	-	-
R-1209_dn17647_c0_g1_i1	3127	2,19122E+14	1,20E+08	4,15E+08	gi 914544870 Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17,6	1,22E-85	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
R-1209_dn17655_c0_g1_i2	6095	3,37407E+14	1,58E-09	1,02E-05	gi 913323480 uncharacterized protein LOC106136891	0,00E+00	F:nucleic acid binding; P:DNA integration
R-1209_dn17671_c11_g1_i1	945	2,39423E+14	1,30E+06	7,55E+07	NA	-	-
R-1209_dn17688_c0_g2_i2	1448	2,02826E+14	2,08E+08	6,70E+09	NA	-	-
R-1209_dn25369_c0_g1_i1	1081	2,37648E+14	9,84E+04	7,89E+06	NA	-	-
R-1209_dn25643_c0_g1_i1	994	2,58747E+14	4,57E+06	2,33E+08	gi 1073547113 hypothetical protein g,17671	8,97E-36	-
R-1209_dn29560_c0_g1_i1	1147	2,1644E+14	3,21E+08	9,74E+09	NA	-	-
R-1209_dn30910_c0_g1_i1	1015	2,30927E+14	1,92E+07	6,29E+09	NA	-	-
R-1209_dn3784_c0_g1_i1	775	2,44255E+14	1,17E+07	5,33E+08	NA	-	-
R-1209_dn4575_c0_g2_i1	959	2,13376E+14	5,63E+06	2,79E+08	NA	-	-
R-1209_dn5240_c0_g1_i1	702	2,41834E+14	1,51E+07	6,76E+08	NA	-	-
R-1209_dn8501_c0_g1_i1	1179	2,2005E+14	2,40E+03	2,60E+05	gi 512906327 myrosinase 1-like	1,96E-162	-