

JENNY DIMELZA GÓMEZ ARRIETA

**PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DA SOJA: MECANISMOS
MOLECULARES DA RESISTÊNCIA À *Anticarsia gemmatalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G633p
2018

Gómez Arrieta, Jenny Dimelza, 1982-
Proteômica e metabolômica da soja : mecanismos
moleculares da resistência à *Anticarsia gemmatalis* / Jenny
Dimelza Gómez Arrieta. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 184 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Resistência a doenças e pragas. 2. Lagarta-da-soja.
3. Compostos bioativos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 633.3497

JENNY DIMELZA GÓMEZ ARRIETA

**PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DA SOJA: MECANISMOS
MOLECULARES DA RESISTÊNCIA À *Anticarsia gemmatalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018

Adriana Maria Patarroyo Vargas

Pedro Marcus Pereira Vidigal

Camilo Elber Vital

Humberto Josue de Oliveira Ramos
(Coorientador)

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

DEDICATORIA
A Alana, mi razón de existir.

EPÍGRAFE

“Cuando llegas a cero, cuando llegas a la nada, en ese momento hay una vibración.”

Bapak Muhammad Subuh Sumohadiwidjojo

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a força e acompanhar-me na consecução de esta vitória.

Aos meus pais Rocío e Alvaro, por sempre me apoiar em cada coisa que decidi na minha vida, e aos meus irmãos Latif e Rafael pelo animo e o amor incondicional.

A Juan Vicente por todo o seu apoio, amor e paciência, por estar incondicionalmente e apesar de tudo aí.

À Universidade Federal de Viçosa, e o programa de Bioquímica Aplicada por me aceitar e dar a oportunidade de me formar como doutora.

À professora Dra. Maria Goreti por me receber no seu laboratório e me dar a oportunidade de aprender tanto, e além disso fornecer todo o apoio técnico para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Dr. Humberto Ramos, toda minha admiração pela sua inteligência e qualidade humana, e obrigada pela paciência, não poderia ter escolhido uma melhor orientação.

Ao professor Dr. André Lourenção por ter fornecido o material vegetal do qual foi objeto esta pesquisa

Aos meus mais queridos amigos Yaremis, Roberta, Juan Diego, Verônica e Manuel, que ademais de ser colegas do Laboratorio de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e peptídeos. Fizemos uma amizade que vai além da distância, obrigada pelo carinho, confiança, paciência e o apoio em qualquer situação.

À Dona Amelia pelo apoio, o ânimo e a paciência.

Aos meus estagiários Mariana e João pela ajuda, pelo animo e sua disponibilidade na realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratorio de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e peptídeos por tanta colaboração, especialmente a Glauca pela grande disponibilidade para sempre colaborar e pelas conversas.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa por proveer as facilidades para o desenvolvimentos dos experimentos, especialmente ao pessoal do Núcleo de Biomoléculas, Camilo, Edvaldo e Nívea, por ser tão prestativos e pelas assessorias indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos professores Serrão e Felipe, ao Silvério, Paulo e as pessoas de outros laboratórios que abriram as portas dos seus laboratórios e me receberam e ensinaram como se fosse uma colega mais.

A todas as pessoas que direta e indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPEMIG, FINEP, SisNANO/MCTI e Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP) pelo apoio financeiro na realização da pesquisa.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

JENNY DIMELZA GÓMEZ ARRIETA, filha de Alvaro Gómez Mendoza e Deisy Rocío Arrieta de Oro, nasceu o dia 16 de outubro na cidade de Pamplona, Norte de Santander, Colômbia.

No ano de 2004 se formou como Microbiologista na modalidade de Bachalerado e no ano de 2009 se formou como Magister em Bioquímica, da *Universidad de Pamplona*. Em 2010 foi mãe da Alana Romero Gómez.

Trabalhou como estagiária na Corporação para Investigaciones Biológicas, Joven Investigador na Universidade de Pamplona, Investigador Asociado em Cenicafé e Docente Universitário na Universidade Tecnológica de Pereira e na Universidade Rural e Agropecuária de Colômbia até antes de voltar à faculdade para fazer os estudos de doutorado. Em 2014 ingressou no programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada no nível de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

RESUMO

GÓMEZ-ARRIETA, Jenny Dimelza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Proteômica e metabolômica da soja: mecanismos moleculares da resistência à *Anticarsia gemmatalis*.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Gláucia Cordeiro, Edvaldo Barros e Carolina Rocha da Silva.

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes para a economia do Brasil sendo o segundo maior produtor e exportador mundial. As grandes lavouras de soja, porém, encontram-se expostas a estresses bióticos como o desfolhamento ocasionado por insetos-praga como *Anticarsia gemmatalis*, que diminuem a produtividade. O manejo integrado de pragas no Brasil, inclui o uso de pesticidas que podem afetar o equilíbrio dos ecossistemas, controle biológico e melhoramento genético para produção de plantas resistentes, mas pouco se conhece sobre as características moleculares de resistência delas. O objetivo deste trabalho foi aprofundar no conhecimento sobre os mecanismos moleculares de defesa da soja em plantas susceptíveis e resistentes a insetos praga, e aplicá-lo para determinar o efeito na biologia de *A. gemmatalis*. Neste trabalho foram aplicadas várias estratégias metodológicas, em busca de escolher a variedade com melhor resistência, como as análises de sobrevivência durante a fase larval de *A. gemmatalis* em plantas de soja UFV TN 105 AP e “IAC PL1” (susceptíveis) e IAC 17, “IAC 19” e IAC 24 (resistentes). Para avaliar o efeito dos compostos produzidos pelas plantas na sobrevivência dos insetos, prepararam-se extratos metanólicos, os quais foram liofilizados, se adicionaram às dietas dos insetos para fazer análises de sobrevivência, e se analisaram os flavonoides por LC-MS. As respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas foram comparadas entre genótipos. Para isso foram feitas análises de fito-hormônios, metabolômica e proteômica nos extratos das plantas. Os resultados mostraram que o genótipo IAC 17 teve as melhores características de resistência. Os extratos das plantas tem efeito negativo no desenvolvimento das lagartas, afetam as enzimas intestinais e ocasionam dano neste tipo de células. As análises dos flavonoides mostraram que os genótipos têm diferenças em alguns flavonoides como a genisteína, a quercetina, o kaempferol e seus conjugados. A proteômica mostrou que houve diferenças no proteoma quando as plantas foram expostas à infestação. O proteoma no geral foi muito semelhante entre variedades. Algumas das mudanças no proteoma em

esposta ao inseto entre os genótipos foram as mesmas, mas a grande maioria das proteínas que tiveram abundância diferencial foram únicas para cada genótipo. A resposta fito-hormonal das plantas à presença da lagarta não variou muito durante os diferentes tempos avaliados, mas entre as variedades existem diferenças nas concentrações dos fito-hormônios avaliados. Fito-hormônios como o ácido salicílico tiveram concentrações maiores nos genótipos resistentes e o ácido jasmônico nas susceptíveis, mostrando que não todas as respostas de resistência estão relacionadas ao ácido jasmônico. As análises de metabolômica mostraram um aumento dos metabólitos como o eriodictiol e secologanina, relacionados com defesa depois de 24h de infestação, e mudanças no metabolismo primário. A análise de PCA mostrou uma distribuição diferenciada dos dados às 24h de infestação. As plantas de soja podem ser fontes viáveis para o controle de pragas porque contêm compostos com características de bioativos. A defesa de plantas de soja se compõe de uma rede complexa de vias, este estudo mostrou que as características obedecem a defesa constitutiva, que pode conduzir a antibiose e tolerância da soja às pragas. O genótipo IAC 17 tem as melhores características de resistência à herbívoría, seguido do IAC 24, mostrando ter características de antibiose e tolerância. As plantas caracterizadas como susceptíveis e usadas neste estudo também apresentam respostas à herbívoría, mas não o suficiente para causar dano significativo à lagarta-da-soja.

ABSTRACT

GÓMEZ-ARRIETA, Jenny Dimelza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Proteomic and metabolomics of soybean: molecular mechanisms of resistance *Anticarsia gemmatalis***. Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisors: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Glaucia Cordeiro, Edvaldo Barros and Carolina Rocha da Silva.

The soybean crop (*Glycine max* (L.) Merrill) is very important for the economy of Brazil being the second largest producer and exporter in the world. However, large soybean crops are exposed to biotic stresses such as defoliation caused by insect pests such as *Anticarsia gemmatalis*, which decrease productivity. Integrated pest management in Brazil includes the use of pesticides that can affect ecosystem balance, biological control and genetic improvement for the production of resistant plants, but the knowledge about the molecular resistance characteristics of these plants is minimal. The aim of this work was to delve into the knowledge on the molecular mechanisms of soybean defense in plants susceptible and resistant to insect pests, and applied it to determine the effect on the biology of *A. gemmatalis*. In this work several methodological strategies were applied in order to select the best resistant variety, such as survival analyzes during the larval phase of *A. gemmatalis* in soybean plants UFV TN 105 AP and “IAC PL1” (susceptible) and IAC 17, “IAC 19” and IAC 24 (resistant). To evaluate the effect of the compounds produced by plants on insect survival, methanolic extracts were prepared, lyophilized and added to the caterpillar diets and the insect survival analyzed, and flavonoids analyzed by LC-MS. The physiological and biochemical responses of the plants compared between genotypes. For this, phytohormones, metabolic and proteomic analyzes were performed on plant extracts. The results showed that the genotype IAC 17 had the best resistance characteristics. Plant extracts have a negative effect on the development of caterpillars, affect intestinal enzymes and cause damage in this cells. The flavonoid analyzes showed that the genotypes have differences in some flavonoids like genistein, quercetin, kaempferol and their conjugates. Proteomics showed that there were differences in the proteome when the plants exposed to infestation. The proteoma was very similar between varieties. Some changes in proteome response to insect between genotypes were the same, but the great majority of the proteins that had differential abundance were unique for each genotype. The phytohormonal response of the plants to the presence of the caterpillar did

not vary much in the different times evaluated, but between the varieties, there are differences in the concentrations of phytohormones evaluated. Phytohormones like salicylic acid had higher concentrations in the resistant and the jasmonic acid in the susceptible genotypes, showing that not all resistance responses are related to jasmonic acid. Metabolomics analyzes showed an increase in defense-related metabolites like eriodyctiol and secologannin after 24 hours of infestation, and some changes in primary metabolism. PCA analysis showed a differentiated distribution of data at 24 h of infestation. Soybean plants can be viable sources of pest control because they contain compounds with bioactive characteristics. The defense of soybean plants is composed of a complex network of pathways; this study showed that the characteristics obey the constitutive defense, which can lead to antibiosis and tolerance of soybean to pests. Genotype IAC 17 has the best characteristics of resistance to herbivory, followed by IAC 24, showing to have characteristics of antibiosis and tolerance. The plants characterized like susceptible and used in this study also present responses to the herbivory, but not enough to cause significant damage to the soybean caterpillar.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
HIPÓTESE.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
Parte I: Abordagem metabômica e proteômica da interação entre variedades de soja susceptíveis e resistentes e <i>A. gemmatalis</i>	17
1. Capítulo 1: Resposta Fitohormonal de Genótipos Contrastantes à Resistência à Herbivoria por <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	18
Resumo	18
Abstract	19
1.1 Introdução.....	20
1.2. Materiais e métodos.....	22
1.2.1 Cultura da soja	22
1.2.2 Avaliação da sobrevivência de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	23
1.2.3 Preparação dos extratos	23
1.2.4 Análises de fito-hormônios.....	24
1.2.5 Análises estatísticas	25
1.3 Resultados	25
1.3.1 Sobrevivência de lagartas <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas com as variedades de soja “IAC PL1” e “IAC 19”	25
1.3.2 Análise da resposta fito-hormonal	26
1.4 Discussão	31
1.5 Conclusões.....	32
1.6 Referencias	33
2. Soybean flavonoids harm the midgut morphology and reduce survival of <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars	39
Acknowledgments	39
Abstract	39
2.1 Introduction	41
2.2 Material and methods	42

2.2.1 Local	42
2.2.2 Caterpillar rearing	42
2.2.3 Preparing artificial diet	43
2.2.4 Soybean varieties	43
2.2.5 Flavonoids identification and quantification	44
2.2.6 <i>Anticarsia gemmatalis</i> caterpillar mortality and development	45
2.2.7 <i>Anticarsia gemmatalis</i> caterpillar's midgut histology	45
2.2.8 Statistics	46
2.3 Results	46
2.3.1 Flavonoid concentrations of soybean varieties	46
2.3.2 Caterpillar survival.	47
2.3.3 Caterpillar development.....	48
2.3.4 Morphology changes in caterpillar midgut by diet consumption.	50
2.4 Discussion	52
2.5 Compliance with Ethical Standards:	54
2.6 References	55
Capítulo 3: Respostas metabólicas de variedades de soja contrastantes para resistência e susceptibilidade à <i>Anticarsia gemmatalis</i>	62
Resumo	62
3.1 Introdução.....	64
3.2 Materiais e metodos.....	66
3.2.1 Crescimento das plantas e estresse biótico	66
3.2.2 Análises de fito-hormônios.....	66
3.2.3 Extração de metabólitos e derivatização química para análises de GC/MS ...	68
3.2.4 Proteômica	69
3.3 Resultados e discussão	73
3.3.1 Análises da resposta fito-hormonal das variedades de soja.....	73
3.3.2 Caracterização metabólica da resposta à herbivoria dos genótipos de soja à <i>A. gemmatalis</i>	84
3.2.3 Fracionamento das proteínas com PEG 4000 e detecção de fosfoproteínas...	96
3.3.4 Análises do proteoma diferencial em resposta à infestação	97
3.3.5 Caracterização funcional das proteínas.....	104
3.4 Referencias	107

Parte II: Efeito biológico da suplementação de extratos metanólicos de soja na performance da <i>A. gemmatalis</i>	116
Capítulo 4. Extratos de folhas de soja resistente a infestação afetam a capacidade digestiva de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	117
Resumo	117
Abstract	118
4.1 Introdução	119
4.2 Materiais e métodos	120
4.2.1 Material biológico	120
4.2.2 Preparação dos extratos	120
4.2.3 Preparação das dietas e avaliação da sobrevivência de <i>A. gemmatalis</i>	121
4.2.4 Atividade proteolítica no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	121
4.2.5 Análises de inibição in vitro	122
4.2.6 Determinação da concentração de proteína	123
4.2.7 Análises histológicas do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	123
4.3 Resultados	123
4.3.1 Análise de sobrevivência	123
4.3.2 Atividade proteolítica no intestino de <i>A. gemmatalis</i>	126
4.3.4 Análises histológicas do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	128
4.4 Discussão	130
4.5 Conclusões	133
4.6 Referências	133
Capítulo 5 .Broad Range Flavonoid Profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	140
5.1 Introduction	141
5.2.1 Chemicals and reagents	142
5.2.2 Plant growth and soybean genotypes	143
5.2.3 Insects	143
5.2.4 Evaluation of <i>A. gemmatalis</i> survival	143
5.2.5 Caterpillar infestation assays	144
5.2.6 Leaves extracts preparation	144
5.2.7 Flavonoids profile analysis by LC/MS	144
5.2.8 Metabolic pathways and statistical analysis of the flavonoid profiles.....	147
5.3 Results	148

5.3.1 <i>Anticarsia gemmatalis</i> survival on soybean genotypes	148
5.3.2 Quantification of target compounds in soybean leaves	148
5.3.3 Profiling of the non-target flavonoids in soybean leaves	149
5.3.4 Determination of the glyconjugate compounds by LC/MS precursor ion scan analysis.....	157
5.3.5 Global analysis of the flavonoid profiles.....	159
1.4 Discussion	165
5.5 Concluding Remarks	169
5.6 Acknowledgments:	169
5.7 References	169
CONCLUSÕES GERAIS	184

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas, economicamente mais importantes para o Brasil. A estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), determinou que a produção para a safra mundial de soja em grãos 2017/18 foi liderada pelos EUA (33,60%), seguido do Brasil (31,01%) e Argentina (16,52%), sendo os países responsáveis por 81,12% de toda a produção mundial (AMAZONAS, 2017). Além disso, a importância dessa cultura radica também no seu alto valor nutricional (aproximadamente 20% de óleo e 40% de proteína) e por ser matéria prima para produção de óleo e outros derivados (AGRAWAL et al., 2008).

Fatores bióticos e abióticos podem afetar o desenvolvimento da soja, o que pode levar a perdas econômicas consideráveis (LANTMANN, 2016). Uma ampla variedade de insetos-praga é responsável pelas perdas na safra de soja. Destacam-se os insetos desfolhadores das ordens Orthoptera, Coleoptera, Isoptera, Hymenoptera e Lepidoptera, sugadores de floema da ordem Hemiptera e sugadores de sementes da ordem Diptera (MOREIRA e ARAGÃO, 2009; SINGH, 2010; LANTMANN, 2016). O ataque às lavouras de soja pode acontecer em qualquer etapa do ciclo vegetativo-reprodutivo das plantas (SINCLAIR et al., 1997). Os insetos desfolhadores podem conduzir a redução da superfície foliar e conseqüentemente diminuição da produtividade das plantas (SINGH, 2010).

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) (lagarta-da-soja) é uma das pragas principais da soja no hemisfério Ocidental, incluindo o Brasil (EMBRAPA-SOJA, 2013). A lagarta-da-soja é uma praga desfolhadora, consome folhas durante todos os seus instares larvais, levando à desfolhação completa das plantas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000) e diminuindo assim sua produtividade.

A população geral de insetos-pragas pode ser controlada por predadores, parasitoides e doenças, mas diferentes fatores ambientais podem desencadear uma elevação excessiva da população dos herbívoros (EMBRAPA SOJA, 2004). Nesses casos, o Brasil tem desenvolvido tecnologias para o manejo de pragas nas lavouras com objetivo de serem econômica e ambientalmente sustentáveis (BUENO et al., 2012), sendo assim fundamental a identificação das pragas envolvidas na herbivoria para implementar

eficientemente o sistema de controle (SINGH, 2010). Para isso, diferentes estratégias de manejo para controle de pragas podem ser aplicadas. As práticas convencionais recomendadas pela EMBRAPA SOJA, são as primeiras medidas a serem tomadas (BUENO *et al.*, 2012). O controle biológico é uma opção para evitar o uso de produtos químicos que podem afetar o equilíbrio do ecossistema, mas na maioria das vezes não é a primeira medida a tomar, porque não tem ampla aplicação (BUENO *et al.*, 2012; EMBRAPA SOJA, 2014).

No entanto, as plantas possuem mecanismos de defesa. Plantas e insetos têm coexistido junto por mais de 350 anos. Em co-evolução ambos têm desenvolvido estratégias para se adaptar às mudanças ambientais e pressões bióticas para sobreviver (FUTUYMA e AGRAWAL, 2009; HOLDEN, 1993). Como resultado da evolução têm sido desenvolvidos elegantes sistemas de defesa em plantas, os quais lhes permitem reconhecer moléculas estranhas ou sinais de células feridas, desencadeando respostas de imunidade nelas contra herbívoros e patógenos (HOWE e JANDER, 2008; HARE, 2011; VERHAGE, 2010). Para encarar a presença de herbívoros, as plantas podem se defender de forma direta e indireta (DUDAREVA *et al.*, 2006; HOWE e JANDER, 2008; ARIMURA *et al.*, 2009).

As defesas diretas são mediadas pelas características próprias das plantas que afetam a biologia do herbívoro, (como pelos, tricomas, espinhas e folhas grossas) (DUDAREVA *et al.*, 2006; HOWE e JANDER, 2008; ARIMURA *et al.*, 2009), e/ou produção de aleloquímicos (compostos tóxicos) como metabolitos secundários e proteínas (peptídeos, inibidores de enzimas digestivas, terpenoides, alcaloides, antocianinas, fenóis e quinonas). Estes compostos podem ter efeito tóxico, repelente e/ou efeitos antinutricionais nos herbívoros (WAR *et al.*, 2012), e retardar seu desenvolvimento e até causar-lhes a morte (USHA e JYOTHSNA, 2010; WAR *et al.*, 2011a; 2011b). As defesas indiretas contra os insetos funcionam de forma que são liberadas uma mistura de compostos voláteis pela planta atacada que pode atrair aos inimigos naturais dos herbívoros. Assim, a planta pode prover alimentos para dar abrigo a estes inimigos naturais, de forma que eles possam permanecer por mais tempo nela, e melhorar a efetividade da defesa da planta (ARIMURA *et al.*, 2009).

As categorias de resistência das plantas podem ser de três tipos, a antibiose, a antixenose e a tolerância (SMITH e CLEMENT, 2012). A antibiose ocorre quando os

insetos usam a planta como seu hospedeiro e fonte de alimento, de maneira que compostos químicos produzidos por elas afetam a sobrevivência, desenvolvimento ou fecundidade do herbívoro. A antixenose é caracterizada pela presença de fatores morfológicos ou químicos que afetam negativamente o comportamento do inseto, fazendo com que este rejeite a planta. Já a tolerância é a habilidade que a planta tem para resistir ou se recuperar do dano causado na presença do herbívoro (SMITH e CLEMENT, 2012).

A resposta da planta à presença do inseto é controlada por hormônios, possibilitando à planta se adaptar às condições de estresse (WALLING, 2000; KALOSHIAN E WALLING, 2005; SHINOZAKI et al., 2007). A resposta fito-hormonal, envolve múltiplas vias de transdução de sinais, as quais são mediadas por uma complexa rede de fito-hormônios (WAR et al., 2012). Os ácidos jasmônico (AJ), o salicílico (AS) e o etileno (ET) (GILL et al., 2010; SHIVAJI, 2010) são os hormônios que medeiam a resposta de defesa nas plantas. Estes podem agir de maneira individual, sinérgica ou antagonicamente, dependendo do tipo de ataque, o que proporciona à planta a regulação e a pronta adaptação aos estímulos ambientais (VERHAGE et al., 2010). Hormônios de desenvolvimento como o ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas e brassinosteroides também têm emergido como possíveis alternativas para o entendimento da bioquímica na defesa das plantas e aplicação ao controle de pragas. Estes hormônios podem agir sinérgicamente com o AS, AJ, e ET, redirecionando o sistema de sinalização de defesa das plantas (WANG et al., 2007; HOWE e JANDER, 2008; VLEESSCHAUWER et al., 2010).

O AJ é o fito-hormônio mais importante relacionado com a defesa das plantas contra os herbívoros, ele ativa a expressão das vias de defesa diretas e indiretas (USHA et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; WAR et al., 2011a). O JA é derivado do ácido linoleico através da via octadecanoica e se acumula no tecido afetado pela herbivoria (ZHANG et al., 2008). Algumas das vias de defesa induzidas pelos jasmonatos incluem, enzimas antioxidativas, inibidores de proteases (IPs), compostos voláteis, produção de alcaloides formação de tricomas e secreção de néctar extra floral, todos com efeito nocivo para os insetos (DICKENS, 2006; MAO et al., 2007; PAUWELS et al., 2009). Importantes genes de defesa são regulados pelo AJ, a concentração de indol glucosinolato na célula, (WAR et al., 2012), a alteração dos níveis de cálcio intracelular são dois exemplos (WALTER et al., 2007).

O AS, derivado do ácido benzoico, é também um dos fito-hormônios principais envolvidos na regulação da defesa de plantas (WAR *et al.*, 2011c). O AS é um importante regulador endógeno do crescimento das plantas (WALLING, 2000; KALOSHIAN e WALLING, 2005). Ele gera uma grande variedade de respostas fisiológicas e metabólicas nas plantas relacionadas com defesa e desenvolvimento (RIVAS-SAN VICENTE e PLASENCIA, 2011). O AS está envolvido na regulação da atividade de várias enzimas como peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia liase (PAL), entre outras, as quais fazem parte dos componentes da defesa induzida na planta (WAR *et al.*, 2011a; WAR *et al.*, 2011c; ZHAO, 2010). Além disso a molécula sinalizadora está envolvida com a indução da resposta de resistência sistêmica e está estreitamente relacionado com a produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e indução do H₂O₂, compostos que são altamente nocivos para o sistema digestivo de insetos e conduz a retardo do desenvolvimento e crescimento (MAFFEI *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2004). Adicionalmente o sinal do AS pode levar a liberação de compostos voláteis que atraem os inimigos naturais das pragas (BOER *et al.*, 2004).

No caso da antibiose, as vias de defesa são ativadas por uma cascata de sinalização em resposta à presença do agente agressor, em que os fito-hormônios e outros compostos induzem a expressão ou o aumento dos níveis de expressão dos genes envolvidos nas vias de defesa (MCDOWELL e DANGL, 2000; GLAZEBROOK, 2005). As vias principais envolvidas na defesa por antibiose são a via de resistência sistêmica adquirida (SAR) e a via de resistência sistêmica induzida (SIR) (ZHAO *et al.*, 2013). As duas vias envolvem o aumento ou a diminuição da expressão de proteínas e a síntese de diversos metabólitos que podem levar desde problemas no desenvolvimento até a morte, por diferentes causas, do agente patogênico ou da praga (SHAH e ZEIER, 2013).

Em resposta às necessidades de controle de patógenos e pragas, além de deficiências hídricas e melhora das qualidades nutricionais das plantas, têm sido aplicadas técnicas de melhoramento genético convencional e desenvolvimento de plantas transgênicas ao longo do tempo (AUCLAIR, 1989). Para a cultura da soja, tem sido desenvolvidas variedades de plantas com diferentes níveis de resistência no Brasil. Alguns institutos e universidades têm tido participação importante no melhoramento genético dessa cultura. Alguns exemplos são o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), EMBRAPA SOJA e Universidade Federal de Viçosa, entre outras. Como resultado,

alguns dos cultivares de soja obtidos nos experimentos de melhoramento genético convencional, apresentam resistência a múltiplas pragas (LOURENÇÃO et al., 1989; MIRANDA et al., 2003a; 2003b). Alguns exemplos de genótipos resistentes a pragas desenvolvidos são IAC 100 (ROSSETTO et al., 1987), IAC 17 e “IAC 19” (VALLE e LOURENÇÃO, 2002), e IAC 23 e IAC 24 (MIRANDA et al., 2003a, 2003b).

Alguns dos mecanismos bioquímicos da resistência da soja têm sido caracterizados. Em experimentos feitos por PAIXÃO et al. (2013), foi avaliada a resposta pela via das lipoxigenases (LOX) em presença da *A. gemmatilis*. A via das LOXs leva a produção do hormônio ácido jasmônico (AJ) como um dos seus intermediários. O AJ é reconhecido como um dos hormônios fundamentais na defesa das plantas agindo na ativação de diferentes genes (HATANAKA, 1993; DUDAREVA et al., 2006; PICKETT et al., 2007; PAIXÃO et al., 2013). Alguns dos genes mais importantes são os que codificam a produção de inibidores de proteases (IPs). Os IPs protegem as plantas contra herbívoros e patógenos, correspondem a 6% do total de proteínas da soja (HILDEBRAND, 1989) e obtêm efeito negativo para a biologia dos insetos. PAIXÃO et al., 2013, avaliaram a via da LOX em diferentes cultivares de soja, e concluíram que a resposta das LOX era ativada em todos os cultivares, onde se apresentava uma concentração maior dos IPs nos cultivares resistentes.

Além disso, têm sido descritos outros mecanismos de resistência à pragas em plantas, que envolvem metabólitos secundários produzidos nas vias metabólicas em resposta a herbivoria, como os flavonoides e as isoflavonas. Esses compostos são sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e protegem a planta do estresse oxidativo que pode ser ocasionado por patógenos, pragas e fatores abióticos (DAKORA e PHILLIPS, 1996); e têm sido caracterizados entre os grandes grupos dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas (SAITO et al., 2013).

Embora os flavonoides e isoflavonas podem ser tanto favoráveis (importantes para a síntese de hormônios necessários para a sobrevivência do inseto) quanto desfavoráveis para o desenvolvimento dos insetos (RUUHOLA et al., 2001; SALEEM et al., 2001; SIMMONDS e STEVENSON, 2001; YU et al., 2003), pesquisas desenvolvidas previamente (SHARMA e NORRIS, 1991; SHARMA e NORRIS, 1994; PIUBELLI et al., 2005) caracterizaram alguns deles, os quais podem afetar negativamente a biologia dos insetos (O'NEILL et al., 2013; SILVA, 2015).

Outros exemplos de metabólitos especializados em plantas são os glucosinolatos, caracterizados nas plantas da ordem *Brassicaceae* (LÜTHY e MATILE, 1984); os alcalóides em *Nicotiana attenuata* (STEPPUHN et al., 2004); as saponinas glicocalcalóides em tomateiro (CHAN e TAM, 1985); as pirrolizidina alcalóides em *Chrysanthemum* (MACEL et al., 2005) e os terpenos (BLEEKER et al., 2011; PHILLIPS e CROTEAU, 1999; SZCZEPANIK et al., 2005). O efeito destes compostos sobre o desenvolvimento dos insetos envolve a danificação do tecido intestinal (MARTINEZ, 2002; KNAAK et al. 2010; KNAAK et al., 2012) e a diminuição do tamanho e peso (PIUBELLI et al., 2005; MACEDO et al., 2010; FREITAS et al., 2014; THANIGAIVEL et al., 2017), até a morte.

A variedade de compostos relatados demonstra alguns dos exemplos mais representativos de compostos químicos das vias metabólicas envolvidos na defesa. No entanto, podem existir uma grande variedade de outros compostos que podem também estar envolvidos, os quais ainda não foram descritos.

Embora, o uso de pesticidas para o controle de herbívoros tenha grande potencial danoso ao meio ambiente e a saúde humana, em muitos casos é uma das primeiras medidas a serem tomadas no manejo de pragas pelos agricultores no Brasil. Porém, o uso excessivo desses pode conduzir ao desenvolvimento de pragas resistentes, e ao desequilíbrio do ecossistema (BUENO et al., 2012; BORGES et al., 2011). Diante disso, a pesquisa sobre compostos naturais como alternativa aos pesticidas sintéticos torna-se cada vez mais importante, por ser moléculas orgânicas e parte da defesa natural da planta, reduziram os danos ambientais (BUENO et al., 2012; BORGES et al., 2011; O'NEILL et al., 2013). Os flavonoides, isoflavonas, glusinolatos, alcaloides, terpenoides e demais, previamente descritos e que afetam a biologia das pragas, podem representar alternativas no manejo integrado de pragas viáveis para o ambiente.

O objetivo deste estudo foi aprofundar nas repostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de soja expostas à herbívoros. Para isso, se escolherem plantas susceptíveis e resistentes à *A. gemmatilis*, e se expuseram à mastigação pelo inseto. Assim, as repostas foram analisadas por meio de técnicas de proteômica e espectrometria de massa e comparadas estatisticamente para definir as diferenças, contribuindo ao conhecimento dos determinantes genéticos da resistência a estresses bióticos.

O conhecimento colheitado neste estudo, poderá ser de grande utilidade nas áreas de melhoramento genético clássico da soja e a engenharia genética de plantas aplicado especificamente à soja, já que, essas duas áreas correspondem às principais ferramentas para obtenção de genótipos de plantas com características aprimoradas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Determinar as respostas bioquímicas e fisiológicas de genótipos soja em resposta a herbivoria por *Anticarsia gemmatalis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar os níveis de resistência à *Anticarsia gemmatalis* entre genótipos de soja e sua relação com as respostas bioquímicas e fisiológicas.
- Caracterizar a resposta fito-hormonal das diferentes variedades de soja expostas à herbivoria por *A. gemmatalis*.
- Comparar a resposta metabólica dos cultivares de soja suscetíveis e resistentes durante a interação com a *A. gemmatalis*.
- Identificar e caracterizar as proteínas das diferentes variedades de soja envolvidas na resposta ao estresse ocasionado por *A. gemmatalis*.
- Procurar compostos bioativos nas plantas de soja que possam ter efeito negativo na biologia da *A. gemmatalis*.

HIPÓTESE

Diferentes níveis de susceptibilidade e resistência à herbivoria são determinados pela abundância de compostos com efeito inibitório no desenvolvimento dos insetos, os quais são sintetizados em respostas a cascatas de sinalização fito-hormonal, controlando a expressão de determinantes genéticos. O contraste entre os perfis metabólicos e proteômicos pode revelar diferenças genéticas entre estes genótipos potenciais para o melhoramento genético clássico, seleção assistida por marcadores e manipulação por engenharia genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, G.K., HAJDUCH, M., GRAHAM, K., THELEN, J.J. **In-Depth Investigation of the Soybean Seed-Filling Proteome and Comparison with a Parallel Study of Rapeseed.** *Plant. Physiol.* 2008. 148: 504–518.
- AMAZONAS, L. **Perspectivas para a agropecuária, Soja.** *Perspec. Agropec. Brasília.* 2017. 5:95-111.
- AUCLAIR, J.L. **Host plant resistance.** In: Minks AK, Harrewijn P (eds) **Aphids-their biology, natural enemies and control.** Elsevier, Amsterdam, 1989, pp 225-265
- ARIMURA, G.I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. **Chemical and Molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions.** *Plant. Cell. Physiol.* 2009. 50, 911-923.
- BLEEKER, P. M., DIERGAARDE, P. J., AMENT, K., SCHÜTZ, S., JOHNE, B., DIJKINK, J., HIEMSTRA, H., GELDER, R., BOTH, M.T., SABELIS, M.W., HARING, M.A., SCHUURINK, R.C. **Tomato-produced 7-epizingiberene and R-curcumene act as repellents to whiteflies.** *Phytochemistry.* 2011. 72, 68-73.
doi: 10.1016/j.phytochem.201010.014
- BOER, J.G.; DICKE, M. **Information use by the predatory Phytoseiulus persimilis (Acari:Phytoseiidae), a specialised natural enemy of herbivorous spider mites.** *App. Ent. Zool.* 2005, 40: 1-12.
- BORGES, M., MORAIS, M.C.B., LAUMANN, R.A., PAREJA, M., SILVA, C.C., MICHEREFF, M.F.F., PAULA, D.P. **Chemical Ecology Studies in Soybean Crop in Brazil and Their Application to Pest Management.** ISBN 978-953-307-219-7. 2011. DOI: 10.5772/15795.
- BUENO, A.F., CORRÊA-FERREIRA, B. S., HOFFMANN-CAMPO, C. B., SOSA-GOMEZ, D. R., HIROSE, E., ROGGIA, S. **MIP SOJA.** EMBRAPA, SOJA. 2013. <http://www.cnpso.embrapa.br/helicopterpa/folder-mip.pdf>
- CHAN, H.T., TAM, S.Y.T. **Toxicity of -tomatine to larvae of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae).** *J. Econ. Entomol.* 1985. 78, 305–307.
doi: 10.1653/024.095.0110
- DAKORA, F. D., PHILLIPS, D. A. **Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins.** *Physiol. Mol. Plant. Path.* 1996. 49: 1–20.
- DICKENS, J.C. **Plant volatiles moderate response to aggregation to pheromone in Colorado potato beetle.** *J. Appl. Entomol.* 2006. 130: 26-31.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.01014.x>.

DUDAREVA, N., NEGRE, F., NAGEGOWDA, D.A., ORLOVA, I. **Plant volatiles: Recent Advances and Future Perspectives.** *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2006. 25: 417-440.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. 2004.** 2004. Sistema de Produção, No 1.
<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2014.** – Londrina: 2013. 265p., . – (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN 2176-2902, n.16). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/975595>

FREITAS, A.F., PEREIRA, F.F., FORMAGIO, A.S.N. LUCCHETTA, J.T., VIEIRA, M.C., MUSSURY, R.M. **Effects of Methanolic Extracts of Annona Species on the Development and Reproduction of Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Neotrop. Entomol.* 2014. 43: 446-52. doi: 10.1007/s13744-014-0225-x. Epub 2014 Jul 4.

FUTUYMA, D.J.; AGRAWAL, A.A. **Macroevolution and the biology diversity of plants and herbivores.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009 106:18054–61

KALOSHIAN, I., WALLING, L.L. **Hemipterans as plant pathogens.** *Ann. Rev. Phytopat.* 2005. 43: 491-521.

GILL, R.S., GUPTA, K., TAGGAR, G.K., TAGGAR, M.S. **Role of oxidative enzymes in plant defenses against herbivory.** *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 2010. 45: 277-90. <http://dx.doi.org/10.1556/APhyt.45.2010.2.4>.

GLAZEBROOK, J. **Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.** *Annu Rev Phytopathol.* 2005. 43:205–227

HARE, J.D. **Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects.** *Annu. Rev. Entomol.* 2011. 56: 161-80.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144753>.

HATANAKA, A. **The biogenesis of green odour by green leaves.** *Phytochemistry,* 1993. 34: 1201-1218.

HOFFMANN-CAMPO, C. B., MOSCARDI, F., CORRÊA-FERREIRA, B. S., OLIVEIRA, L. J., SOSA-GOMEZ, 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. 70p. (Circular Técnica, 30).

HOLDEN, J.; PEACOCK, J.; WILLIAMS, T. **Genes, Crops and the Environment.** Cambridge/New York: Cambridge Univ. Press. 1993. 162 pp.

HOWE, G.A.; JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores.** *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2008; 59: 41-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

LANTMANN, A. **Projeto Soja Brasil, safra 2015/2016.** Relatório técnico. <http://www.projetosojabrasil.com.br/veja-o-relatorio-tecnico-do-projeto-soja-brasil-na-safra-1516/>. 2016

LOURENÇÃO, A.L., COSTA, A S., MIRANDA, M.A.C. **Sources of resistance to Insect pests and virus vector in the soybean gemplasm tested at Instituto Agronomico, SP, Brasil.** In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4. 1989, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Editora S.R.L., 1989. p. 1578-1581.

LÜTHY, B., MATILE, P. **The mustard oil bomb: rectified analysis of the subcellular organization of the myrosinase system.** *Biochem. Physiol. Pflanz.* 1984. 179: 5-12. doi: 10.1016/S0015-3796(84)80059-1

KALOSHIAN, I.; WALLING, L.L. **Hemipterans as plant pathogens.** *Ann. Rev. Phytopat.* 2005. 43: 491-521.

KNAAK, N., TAGLIARI, M.S., FIUZA, L.M. **Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, 2010. 77: 83-89.

KNAAK, N., BERLITZ D.L., FIUZA, L.M. **Toxicology of the Bioinsecticides Used in Agricultural Food Production.** *Histopathology - Reviews and Recent Advances.* Dr. Enrique Poblet (Ed.). InTech. 2012. ISBN 978-953-51-0866-5. DOI: 10.5772/52070

HOWE, G.A.; JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores.** *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2008; 59: 41-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

MACEDO, M.L.R., KUBO, C.E.G., FREIRE, M.G.M., JÚNIOR, R.T.A., PARRA, J.R. P. **Entomocidal Effects of Beech Apricot, *Labramia bojeri*, Seed Extract on a Soybean Pest, the Velvetbean Moth, *Anticarsia gemmatalis*, and Its Enzymatic Activity.** *J. Insect Sci.* 2014. 14; 27. <http://doi.org/10.1673/031.014.27>

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. **Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release.** *Phytochemistry.* 2007. 68:2946-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J. HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. **Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol.** *Nat. Biotechnol.* 2007. 25:1307-13. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1352>

MARTINEZ, S.S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina, Instituto Agrônomo do Paraná, 2002. 142p.

MCDOWELL, J.M., DANGL, J.L. **Signal transduction in the plant immune response.** *Trends. Biochem. Sci.* 2000. 25: 79–82.

MIRANDA, M.A.C, BRAGA, N.R, LOURENÇÃO, A.L., MIRANDA, F.T.S, UNÊDAII, S.H., FUMIKO M. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos.** *Bragantia.* 2003a. 62: 19-27

MACEL, M., BRUINSMA, M., DIJKSTRA, S., OOIJENDIJK, T., NIEMEYER, H., KLINKHAMER, P. L. **Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species.** *J. Chem. Ecol.* 2005. 31, 1493–1508.
doi: 10.1007/s10886-005-5793-0

MIRANDA, M.A.C., BRAGA, N.R., LOURENÇÃO, A.L., MIRANDA, F.T.S., UNÊDA, S. H., ITO, M. F. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos.** *Bragantia.* Campinas. 2003b. 62: 29-37.

MOREIRA, H.J.C., ARAGÃO, F.D., **Manual de Pragas da Soja.** Campinas-SP. 2009.

O'NEILL, B.F., ZANGERL, A.R., DERMODY, O., BILGIN, D.D., CASTEEL, C.L., ZAVALA, J.A., DELUCIA, E.H., BERENBAUM, M.R. **Impact of elevated levels of atmospheric CO₂ and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus).** *J. Chem. Ecol.* 2010. 36: 35-45. doi: 10.1007/s10886-009-9727-0.

PAIXÃO, G.P., LOURENÇÃO, A.L., SILVA, C.R., MENDONÇA, E.G., SILVA, P.L., OLIVEIRA, J.A., ZANUNCIO, J.C., OLIVEIRA, M.G. **Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil.** *J. Agric. Food Chem.* 2013. 61:8034-8.
doi: 10.1021/jf4027603. Epub 2013 Aug 19.

PAUWELS, L.; INZÉ, D.; GOOSSENS, A. **Jasmonate-inducible gene: What does it mean?.** *Trends. Plant. Sci.* 2009. 14: 87- 91.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.005>.

PENG, J.; DENG, X.; HUANG, J.; JIA, S.; MIAO, X.; HUANG, Y. **Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner.** *Z. Naturforsch C.* 2004. 59: 856-62.

PICKETT, J.A., BIRKETT, M.A., BLASSIOLI MORAES, M.C., BRUCE, T.J.A., CHAMBERLAIN, K., GORDON-WEEKS, R., MATTHES, M.C., NAPIER, J.A., PINHEIRO, P., BEREMAN, M.S., BURD, J., PALS, M., ARMSTRONG, S., HOWE, K.J., THANNHAUSER, T.W., MACCOSS, M.J., GRAY, S.M., CILIA, M. **Evidence of the biochemical basis of host virulence in the greenbug aphid, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae).** *J. Proteome Res.* 2014. 13: 2094-108. doi: 10.1021/pr4012415. Epub 2014 Mar 18.

- PIUBELLI, G.C., HOFFMANN-CAMPO, C.B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S.H., DE OLIVEIRA, M.C. **Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?** *J. Chem. Ecol.* 2005. 31:1509-25.
- PHILLIPS, M. A., CROTEAU, R.B. **Resin-based defenses in conifers.** *Trends. Plant. Sci.* 1999. 4, 184-190. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01401-6
- RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. **Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development.** *J. Exp. Bot.* 2011. 62: 3321-38.
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err031>.
- ROSSETTO, C. J., TISSELI FILHO, O., CIONE, J., GALLO, P. B., RAZERA, L. F., TEIXEIRA, J. P. F. **Cultivar de soja IAC 100.** Campinas, 1987.
- RUUHOLA, T., TIKKANEN, O., TAHVANAINEN, J. **Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species.** *J. Chem. Ecol.* 2001. 27: 1595–1615.
- SAITO, K., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., NAKABAYASHI, R., HIGASHI, Y., YAMAZAKI, M., TOHGE, T., FERNIE, A.R. **The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity.** *Plant Physiol. Biochem.* 2013. 72: 21-34. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.001. Epub 2013 Feb 16. Review.
- SALEEM, A., LOPONEN, J., PIHLAJA, K., OKSANEN, E. **Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth).** 2001. *J. Chem. Ecol.* 27: 1049–1062.
- SHAH, J., ZEIER, J. **Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance.** *Front. Plant. Sci.* 2013. 4:30.
 doi: 10.3389/fpls.2013.00030. eCollection 2013
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Gene networks involved in drought response and tolerance.** *J. Exp. Bot.* 2007. 58: 221-227.
- SIMMONDS, M.S.J., STEVENSON, P. C. **Effects of isoflavonoids from *Cicer* on larvae of *Helicoverpa armigera*.** *J. Chem. Ecol.* 2001. 27: 965–977.
- SINCLAIR, J.B., KOGAN, M., MCGLAMERY, M.D. **Guidelines for the Integrated Management of Soybean Pests.** National Soybean Research Laboratory Publication No. 2, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.1997. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA.
- SINGH, G. **The Soybean Botany, Production and Uses.** 1a ed. 2010. ISBN 978-1-84593-644-0. CAB International.
- SHARMA, H.C., NORRIS, D.M. **Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*.** *J. Sci. Food Agric.* 1991. 55: 353-364.

SHARMA, H. C., NORRIS, D.M. **Biochemical mechanisms of resistance to insects in soybean: extraction and fractionation of antifeedants.** *Insect Sci. Appl.* 1994. 15: 31-38.

SHIVAJI. R., CAMAS, A., ANKALA, A., ENGELBERTH, J., TUMLINSON, J.H., WILLIAMS, W.P., WILKINSON, P.R., LUTHE, D.S. **Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize.** *J. Chem. Ecol.* 2010. 36: 179-91.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9752-z>.

SMITH, C.M., CLEMENT, S.L. **Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods.** *Annu. Rev. Entomol.* 2012. 57: 309–28.

STEPPUHN, A., GASE, K., KROCK, B., HALITSCHKE, R., BALDWIN, I. T. **Nicotine's defensive function in nature.** *PLoS Biol.* 2004. 2:e217.
doi: 10.1371/journal.pbio.0020217

SZCZEPANIK, M., DAMS, I., WAWRZENCZYK, C. **Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with the p-menthane system against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae).** *Environ. Entomol.* 2005. 34, 1433-1440.
doi: 10.1603/0046-225X-34.6.1433

THANIGAIVEL, A., SENTHIL-NATHAN, S., VASANTHA-SRINIVASAN, P., EDWIN, E.S., PONSANKAR, A., SELIN-RANI, S., PRADEEPA, V., CHELLAPPANDIAN, M., KALAIVANI, K., ABDEL-MEGEED, A., NARAYANAN, R., MURUGAN, K. **Chemicals isolated from Justicia adhatoda Linn reduce fitness of the mosquito, Aedes aegypti L.** *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2017. 94. doi: 10.1002/arch.21384. Epub 2017 Mar 7.

USHA, R.P.; JYOTHSNA, Y. **Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense.** *Acta. Physiol. Plant.* 2010. 32: 695-701.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0449-2>.

VALLE, G. E., LOURENÇÃO, A. L. **Resistência de genótipos de soja a Bemisia tabaci (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae).** *Neotrop. Entomol.* Londrina. 2002. 31: 285-295.

VERHAGE, A., VAN WEES, S.C.M., PIETERSE, C.M.J. **Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?.** *Plant. Physiol.* 2010; 154: 536-40
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.161570>.

VLEESSCHAUWER, D., YANG, Y., CRUZ, C.V., HÖFFE, M. **Abscisic acid induced resistance against the brown spot pathogen Cochliobolus miyabeanus in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling.** *Plant. Physiol.* 2010. 152: 2036–2052.

WALLING, L.L. **The myriad plant responses to herbivores.** *Journal of Plant Growth Regulation*. 2000. 19: 195-216.

WALTER, A.; MAZARS, C.; MAITREJEAN, M.; HOPKE, J.; RANJEVA, R.; BOLAND, W.; MITHÖFER, A. **Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of Ca²⁺ signals in the nucleus and the cytosol of plant cells.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007. 46: 4783-5.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200604989>.

WANG, D., PAJEROWSKA-MUKHTAR, K., HENDRICKSON, C.A., DONG, X. **Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway.** *Curr. Biol.* 2007. 17: 1784–1790.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).** *J. Plant. Growth. Regul.* 2011a; 30:512-23; <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-011-9213-0>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Plant. Signal. Behav.* 2011b. 6: 1769-77.
<http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17323>.

WAR, A.R., PAULRAJ, M.G., AHMAD, T., BUHROO, A.A., HUSSAIN, B., IGNACIMUTHU, S., SHARMA, H.C. **Mechanisms of plant defense against insect herbivores.** *Plant. Signal. Behav.* 2012. 7: 1306-20. doi: 10.4161/psb.21663.

YU, O., SHI, J., HESSION, A. O., MAXWELL, C. A., MCGONIGLE, B., ODELL, J. T. **Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed.** *Phytochemistry*. 2003. 63: 753–763.

ZHANG, S.Z.; HAU, B.Z.; ZHANG, F. **Induction of the activities of antioxidative enzymes and the levels of malondialdehyde in cucumber seedlings as a consequence of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation.** *Arthropod-Plant Interact.* 2008. 2: 209-13
<http://dx.doi.org/10.1007/s11829-008-9044-5>.

ZHAO, J., ZHANG, Y., BIAN, X., LEI, J., SUN, J., GUO, N., GAI, J., XING, H. **A comparative proteomics analysis of soybean leaves under biotic and abiotic treatments.** *Mol. Biol. Rep.* 2013. 40: 1553-62.
doi: 10.1007/s11033-012-2203-x. Epub 2012 Oct 26.

**Parte I: Abordagem metabômica e proteômica
da interação entre variedades de soja susceptíveis
e resistentes e *A. gemmatalis***

1. Capítulo 1: Resposta Fitohormonal de Genótipos Contrastantes à Resistência à Herbivoria por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo

As plantas de soja estão constantemente submetidas a desfolhamento por insetos como *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), o que diminui a produção dessa cultura. Estudos fisiológicos e bioquímicos da interação planta-praga são importantes para entender os mecanismos de defesa em diferentes variedades de soja, visando o desenvolvimento de genótipos resistentes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo comparar a sobrevivência de lagartas de *A. gemmatalis* infestando dois genótipos de soja e correlacionar com resposta fito-hormonal. Lagartas de *A. gemmatalis* foram alimentadas diariamente com folhas dos cultivares “IAC PL1” susceptível á insetos e “IAC 19” resistente a insetos. A sobrevivência foi avaliada diariamente durante toda a fase larval e estimada pelo método de Kaplan Meyer. As curvas foram comparadas estatisticamente com o método de Log-Rank. A expressão dos fitohormônios foi determinada em folíolos dos cultivares expostos ao ataque das lagartas durante 12h sendo as plantas sem injurias os controles. Extratos metanolicos foram preparados a partir destes folíolos, e analisados por cromatografia liquida de alta performance acoplada a espectrômetro de massas. Os fitohormônios Zeatina, Etileno-ACC, ABA, SA, JA, AIA e GA4 foram quantificados. Ao contrário do esperado, as lagartas alimentadas com as variedades “IAC PL1” e “IAC 19” tiveram taxas de sobrevivência de 32% e 61%, respectivamente, e as curvas de sobrevivência foram estatisticamente diferentes. Foram observados níveis mais elevados de ácido jasmônico no genótipo com menor sobrevivência, “IAC PL1”. Entretanto, no genótipo “IAC 19”, foram observados níveis mais elevados do ácido salicílico que é um antagonista das cascatas de defesas dependentes do ácido Jasmônico. Os níveis de ABA foram mais elevados no genótipo com maior susceptibilidade a *A. gemmatalis*. Apesar do genótipo de soja “IAC PL1” ser considerado na literatura como susceptível a herbivoria por *A. gemmatalis*, quando comparamos com o genótipo “IAC 19”, que é considerado resistente a outros insetos pragas, os resultados obtidos neste estudo para “IAC PL1” demonstram que pode ser considerado como resistente. Entretanto as análises dos perfis hormonais entre estes genótipos estão de acordo com os diferentes níveis de

resistência a herbivoria. Neste estudo foi demonstrada a susceptibilidade do cultivar “IAC 19” a *A. gemmatalis*, mas o fato de ser resistente a outros insetos praga e a maior produção em campo com relação à variedade IAC PL1 permite propor que o cultivar “IAC 19” seja uma variedade tolerante ao ataque da lagarta.

Palavras chave: Cultivares, defesa, plantas, resistência, sobrevivência, tolerância.

Abstract

Soybean plants are constantly subject to insect defoliation as *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) which reduces the production of this crop. Physiological and biochemical studies of plant-pest interaction are important to understand the defense mechanisms in different soybean varieties, aiming the development of resistant genotypes. Thus this work proposed to compare *A. gemmatalis* caterpillars' survival in two soybean genotypes and correlate to phytohormonal response. *Anticarsia gemmatalis* caterpillars fed daily with leaves of cultivars “IAC PL1” and “IAC 19”. Survival was assessed daily throughout the larval phase and estimated by the Kaplan Meyer method. Curves compared statistically with the Log-Rank method. The phytohormones expression was determined in leaflets of the cultivars exposed to caterpillar damage for 12 hours, and in plants without damages as controls. Methanoic extracts were prepared from these leaflets and analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer. Phytohormones Zeatina, Ethylene-ACC, ABA, SA, JA, AIA and GA4 were quantify. Contrary to expected, caterpillar feed on varieties “IAC PL1” and “IAC 19” had survival rates of 32% and 61%, respectively, and the survival curves were statistically different. Higher levels of jasmonic acid were observed in the genotype with minor survival, “IAC PL1”. However, in the susceptible genotype “IAC 19” had higher levels of salicylic acid, which is an antagonist of defense cascades dependent of jasmonic acid. ABA levels were higher in the genotype with greater susceptibility to herbivory. Although in the literature “IAC PL1” soybean genotype is considered as susceptible to herbivory by *A. gemmatalis*, when compared to genotype “IAC 19” that was considered as resistant, even that “IAC 19” is resistant to another insect pests, the results in this study demonstrated that “IAC PL1” could be considered resistant. However the analyzes of the hormonal profiles between these

genotypes are in agreement with the different levels of resistance to herbivory. This study demonstrated the susceptibility of the cultivar "IAC 19" to *A. gemmatalis* but the fact that it is resistant to other pest insects and the greater field production in relation to the variety "IAC PL1" allows propose that the cultivar "IAC 19" is a tolerant variety to the caterpillar attack.

Keywords: Cultivars, defenses, plants, resistance, survival, tolerance

1.1 Introdução

No Brasil, a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes para a economia do país. A estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), determinou que a produção para a safra mundial de soja em grãos 2017/18 encabeçou com EUA (33,60%), seguido do Brasil (31,01%) e Argentina (16,52%), sendo os países responsáveis por 81,12% de toda a produção mundial (AMAZONAS, 2017). A cultura da soja além de apresentar um alto valor nutricional (aproximadamente 20% de óleo e 40% de proteína), é matéria prima para a produção de óleo e outros derivados (AGRAWAL, et al., 2008). Porém, fatores bióticos e abióticos podem afetar o desenvolvimento desta cultura, o que pode levar a perdas econômicas consideráveis (LANTMANN, 2016). Alguns insetos-praga são responsáveis pelas perdas na safra da soja. Insetos das ordens Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera (desfolhadores), Hemiptera (sugadores de floema) e Diptera (sugadores de sementes) são os mais destacados (SINGH, 2010; LANTMANN, 2016). *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das pragas principais da soja no hemisfério Ocidental, incluindo o Brasil (EMBRAPA SOJA, 2004).

As lagartas desta espécie podem ocasionar desfolhação completa nas plantas porque consomem folhas durante todos os seus estádios larvais (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000) e em qualquer etapa do ciclo vegetativo-reprodutivo das plantas (SINCLAIR et al., 1997). Como consequência diminui a produtividade da cultura (SINGH, 2010). As populações de *A. gemmatalis* podem ser controladas por inimigos naturais como predadores, parasitoides e patógenos; mas diferentes fatores ambientais como diminuição da umidade e o aumento da temperatura, podem desencadear grandes surtos desta praga (MOSCARDI, 2012).

As plantas possuem mecanismos de defesa direta e indireta que podem ser usados como uma via alternativa no controle de pragas. A resposta inicial da planta ao ataque do inseto é hormonal, possibilitando à planta se adaptar às condições de estresse (SHINOZAKI *et al.*, 2007; WALLING, 2000; KALOSHIAN e WALLING, 2005). Nesta resposta se envolvem múltiplas vias de transdução de sinais, as quais são mediadas por uma complexa rede de fito-hormônios (WAR *et al.*, 2012). Os ácidos jasmônico (AJ), salicílico (AS) e etileno (ET) (GILL *et al.*, 2010; SHIVAJI, 2010) são os principais hormônios que mediam a resposta de defesa nas plantas. Estes podem agir individual, sinérgica ou antagonicamente, dependendo do tipo de ataque, o que proporciona à planta regulação e pronta adaptação aos estímulos ambientais (VERHAGE *et al.*, 2010). Hormônios de desenvolvimento como o ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas e brassinosteroides também têm emergido como possíveis alternativas para o entendimento da bioquímica na defesa das plantas e aplicação ao controle de pragas. Toda a rede fito-hormonal da resposta às injúrias por herbívoros, está associada à uma complexa expressão de vias metabólicas, que levam à síntese de compostos químicos de defesa. Estes compostos têm efeitos negativos na biologia dos insetos, que podem ser usados como alternativas no controle de pragas (USHA *et al.*, 2010; SHIVAJI *et al.*, 2010; WAR *et al.*, 2011a).

No Brasil, têm sido desenvolvidas tecnologias para o manejo integrado de pragas, baseada na amostragem de pragas e no monitoramento nas lavouras orientadas à toma de decisão com relação ao controle, com a finalidade de ser econômica e ambientalmente sustentáveis (BUENO *et al.*, 2013). Entretanto o desenvolvimento de plantas resistentes às pragas por meio do melhoramento genético da soja tem sido o foco mais importante. Variedades de soja com diferentes níveis de resistência a pragas tem sido desenvolvidas por meio de melhoramento genético convencional (LOURENÇÃO *et al.*, 1989; MIRANDA *et al.*, 2003a; 2003b). Alguns exemplos de genótipos resistentes são, “IAC 100” (ROSSETTO *et al.*, 1987), “IAC 17”, “IAC 19” (VALLE e LOURENÇÃO, 2002), “IAC 23” e “IAC 24” (MIRANDA *et al.*, 2003a, 2003b), como alternativas no manejo integrado de pragas desta cultura.

Ainda não são conhecidos os mecanismos bioquímicos das características de resistência desses cultivares, avaliações da resposta fito-hormonal podem proporcionar algumas bases para entender as diferenças entre estas variedades. Existem poucos estudos

que evidenciem a resposta fito-hormonal da soja a insetos mastigadores, como *A. gemmatalis*. Algumas pesquisas gerais de resposta fito-hormonal na interação planta-inseto, especificamente com afídeos da soja foram focalizadas nas respostas ao nível de expressão gênica foram desenvolvidas (STUDHAM e MACINTOSH, 2012; 2013). Mas esses estudos analisam só o efeito das cascatas de sinalização sobre a expressão gênica, entretanto não caracterizam os produtos dessas respostas iniciais, como por exemplo a biossíntese de fito-hormônios. Por outro lado, produtos intermediários das vias de defesa sintetizados por respostas fito-hormonais, podem ser tóxicos para os insetos (WAR et al., 2011b). As propriedades destes compostos são principalmente anti-nutricionais pelo qual são altamente nocivos para o sistema digestivo dos insetos (WAR et al., 2012; DICKENS, 2006; MAO et al., 2007; PAUWELS et al., 2009); e são de alta toxicidade, ocasionando o retardo no desenvolvimento e crescimento, diminuição do tempo de vida, até a mortalidade (MAFFEI et al., 2007; PENG et al., 2004; USHA et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a sobrevivência de *A. gemmatalis* alimentadas com dois cultivares de soja “IAC PL1” e “IAC 19” e relacioná-lo com a resposta fito-hormonal das plantas à mastigação.

1.2. Materiais e métodos

1.2.1 Cultura da soja

Os cultivares de soja foram disponibilizados pelo Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brasil. O cultivar “IAC PL1”, é uma variedade de ciclo médio (LOURENÇÃO et al., 2002) que apresenta uma produtividade de $578 \pm 34 \text{ kg.ha}^{-1}$ (LOURENÇÃO et al., 2010). De genealogia não bem conhecida é produto de uma introdução japonesa (VALLE e LOURENÇÃO, 2002; SOUZA et al., 2013), foi inicialmente considerado como genótipo susceptível pelos reportes na literatura (LOURENÇÃO et al., 2002; LOURENÇÃO et al., 2010, e LOURENÇÃO; SOUZA et al., 2013). O cultivar “IAC 19”, é uma variedade de ciclo médio e de crescimento determinado, originado a partir dos cruzamentos D 72-9601-1 x ‘IAC 8’. Os índices de produtividade deste cultivar estão ao redor de 4107 kg.ha^{-1} (SILVA et al., 2010, e tem

resistência à *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) (SOUZA et al., 2015). As sementes de cada variedade foram pré-germinadas e transplantadas em vasos de 2 Kg com solo previamente fertilizado. As plantas de soja foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil, isoladas em gaiolas para evitar o ataque de pragas e sem aplicação de agrotóxicos. As plantas foram irrigadas diariamente e mantidas a $28,6 \pm 6,5$ °C e $70 \pm 10\%$ UR até a execução dos experimentos. O plantio foi escalonado para ter disponibilidade de plantas nos estádios vegetativos requeridos.

1.2.2 Avaliação da sobrevivência de *Anticarsia gemmatalis*

Larvas de *A. gemmatalis*, recém-eclodidas foram colocadas em folhas das variedades “IAC PL1” e “IAC 19”. As lagartas foram mantidas em recipientes isolados e higienizados. Depois de serem retiradas, as folhas das plantas eram umedecidas com algodão para evitar a secagem e manter a turgidez. O experimento foi conduzido no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV a 25 ± 5 °C e $52 \pm 5\%$ UR. A sobrevivência foi monitorada diariamente durante toda a fase larval.

1.2.3 Preparação dos extratos

Plantas de soja das variedades “IAC PL1” e “IAC 19” foram plantadas e mantidas em casa de vegetação até chegar aos estádios entre V4 e V6. Posteriormente, foram submetidas a desfolhação por larvas de quarto e quinto instar de *A. gemmatalis* durante 12h. Logo, as folhas injuriadas de cada variedade foram coletadas e armazenadas a -80°C. Os controles foram plantas de cada variedade sem infestar. Para a preparação dos extratos, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e o tecido pesado. Por cada 100 mg do tecido foliar foram adicionados 200 µl da solução extratora (metanol 20% / Isopropanol 79% / ácido acético 1%), submetidos a ultrassom por 30 min e centrifugados a 14.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e o procedimento repetido. Os extratos metanólicos foram armazenados a -80°C até a análise no LC-MS do tipo UHPLC QqQ.

1.2.4 Análises de fito-hormônios

Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em *vials* e 5,0 µL dos extratos foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se uma coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min acoplada *online* a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). Os fito-hormônios analisados foram Ácido absícico (ABA), ACC-etileno, Ácido Indol Acético (AIA), Ácido Jasmônico (AJ), Metil-Jasmonato (Me-JÁ), Ácido salicílico (AS), Zeatina. O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada hormônio e monitorou a amostra no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) para permitir a detecção dos hormônios (Tabela S1).

Tabela S1. Lista de transição dos íons monitorados para análises de quantificação dos fito-hormônios de folhas de soja por MRM. O modo scan, a massa molecular do íon e dos respectivos fragmentos dos íons são indicados

FITO-HORMONES	MS1	MS2	SCAN MODE
Zeatina	220	202	Positivo
ACC	106	56	Positivo
AIA	176	130	Positivo
ABA	263	153	Negativo
AS	137	93	Negativo
GA4	331	213	Negativo
JA	209	59	Negativo

Os ensaios foram realizados com três réplicas biológicas de cada tratamento. Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o *software MassHunter* para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada hormônio. Uma curva padrão de cada hormônio, variando concentrações de 0,1 a 300 ng/mL, foi utilizada para converter os valores de área dos metabólitos identificados em valores de concentração expressados em ng de hormônio/g de tecido vegetal.

As tabelas que contém os resultados dos fito-hormônios identificados e sus intensidades foram normalizadas pela massa do tecido fresco e os dados analisados na plataforma MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

1.2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas de sobrevivência foram feitas com o pacote “*survival*” (THERNEAU, 1999), no software R (R CORE TEAM, 2017). A função de sobrevivência foi estimada pelo método de Kaplan-Meier (GOEL et al., 2010), o qual é usado para calcular a função de sobrevivência de uma variável no tempo. O método permite corrigir a morte dos indivíduos quando acontece por causas diferentes aos tratamentos. A curva de sobrevivência mostra uma representação da função nas populações alvo (POCHÉ, 2015). O efeito dos extratos na sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis*, foi comparado com o Test Log-Rank ($p\text{-valor} < 0.001$).

As análises estatísticas dos fito-hormônios analisados entre os tratamentos foram feitas na plataforma analítica Metaboanalyst (XIA, 2015). Os dados foram normalizados pela mediana e foi aplicado o test *t* ($p\text{-valor} < 0.05$), foi feita a análise de componentes principais (PCA) e o Heatmap.

1.3 Resultados

1.3.1 Sobrevivência de lagartas *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com as variedades de soja “IAC PL1” e “IAC 19”

A sobrevivência da fase larval indicou que as lagartas alimentadas com o cultivar “IAC PL1” tiveram uma porcentagem de sobrevivência menor (32 ± 5.3), em comparação com a variedade “IAC 19” (61.1 ± 5.7), apresentando diferenças significativas pelo teste de Log-Rank ($p\text{-valor} = 3.72 \times 10^{-5}$ $\chi^2 = 17$ em 1 grau de liberdade) (Figura 1). As lagartas na variedade “IAC PL1” apresentaram maiores quedas na taxa de sobrevivência aos três dias após do início das avaliações, correspondendo ao segundo instar larval (de 89.3% para 60%), e aos doze dias (de 46.7% para 33.3%) durante o quinto instar larval. No entanto, as lagartas na variedade “IAC 19” tiveram quedas constantes durante toda a fase larval.

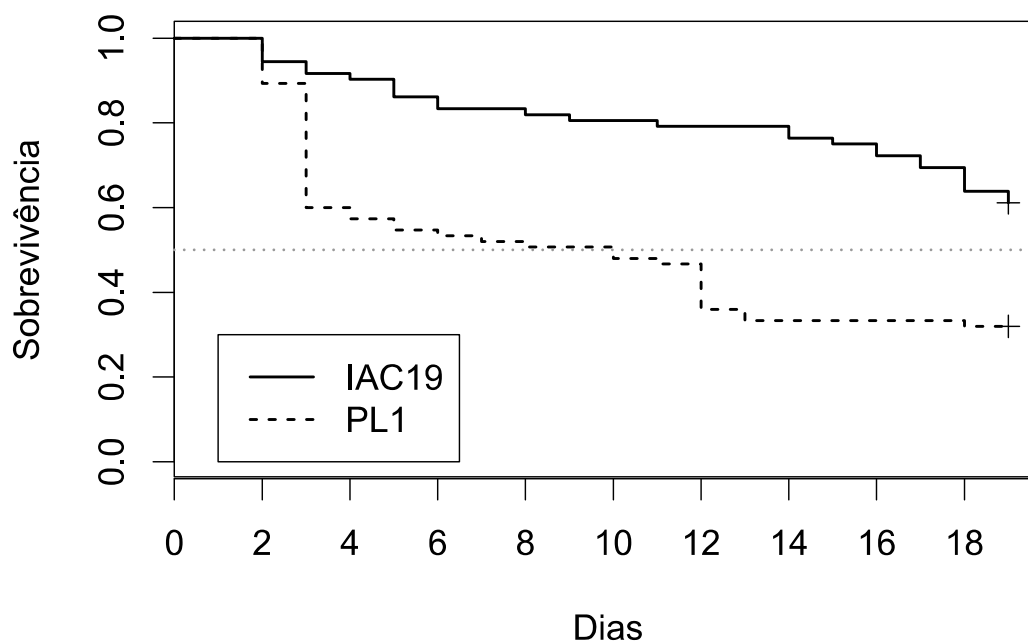


Figura 1. Curva de sobrevivência da fase larval de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas das variedades PL1: “IAC PL1” e IAC 19: “IAC 19”. As curvas foram diferentes estatisticamente conforme análise feita pelo teste de Log-Rank (p -valor < 0.005).

1.3.2 Análise da resposta fito-hormonal

Para o cultivar “IAC 19”, os níveis basais dos fito-hormônios ABA e GA4 foram maiores que na “IAC PL1” (Figura 2 e Tabela S2). Na variedade “IAC 19” o perfil do ABA (Figura 2A) não mostrou diferença pelas injúrias de *A. gemmatalis*, seja nos tratamentos sem infestar (SI): 16569.1 ± 1911.2 ; Infestada (I): 16380.4 ± 879.9 , mas na variedade “IAC PL1” houve diminuição da concentração. Já para G4 (Figura 2B) no cultivar “IAC PL1” teve um aumento nas plantas injuriadas, contrário do observado para a variedade “IAC 19” na qual diminuiu.

Tabela S2. Concentrações de fito-hormônios expressas em ng de fitohormônio / g de massa fresca de tecido nos tratamentos \pm SD. S: Sadia; I: Infestada

Fito-hormônio	“IAC PL 1” S	“IAC PL 1” I	“IAC 19” S	“IAC 19” I
ABA	7129.5 \pm 144.2	5053.9 \pm 36.1	16569.1 \pm 1911.2	16380.4 \pm 879.9
GA4	21594 \pm 3281.8	27685.4 \pm 4512.4	50746 \pm 18665.1	44654.5 \pm 3076.7
Zeatina	16660.4 \pm 621.8	18185.2 \pm 185.2	19017.7 \pm 1891.8	20084.2 \pm 727.6
AJ	9303.5 \pm 2643.5	12493.7 \pm 2925.4	6013.7 \pm 2079.5	7234.9 \pm 2044.3
AS	364641.8 \pm 851.9	338670.4 \pm 5348.8	1952248.6 \pm 523565.6	1660775.8 \pm 55554.6
ACC etileno	7031.2 \pm 21.8	8296.9 \pm 397.0	3138.6 \pm 324.8	4191.8 \pm 246.9
AIA	1527 \pm 631.2	1589.7 \pm 941.3	2474.5 \pm 22.1	1738.5 \pm 177.2

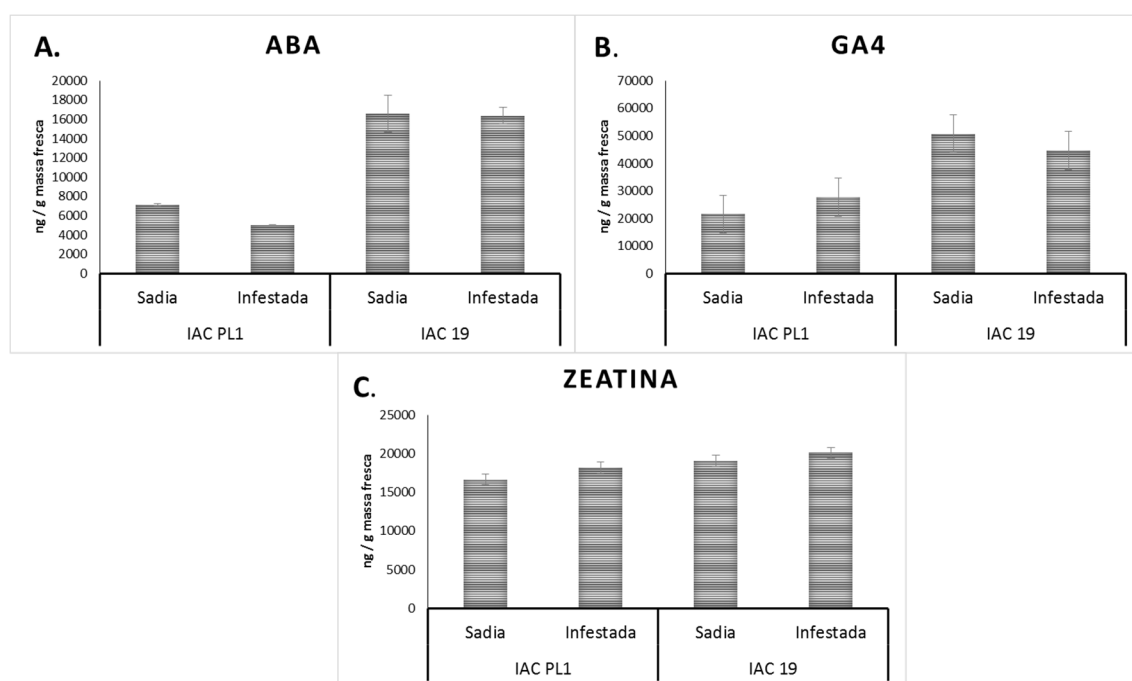


Figura 2. Quantificação dos fito-hormônios de desenvolvimento das variedades de soja “IAC PL1” e “IAC 19”, em ausência (Sadia) e presença (Infestada) da *A. gemmatalis*. As quantidades dos fito-hormônios em cada tratamento estão expressas em ng de fitohormônio/g de massa seca de tecido. A. Ácido Abscísico (ABA); B. Giberelina 4 (GA4) e C. Zeatina

Em relação a Zeatina (Figura 2C), a concentração basal foi semelhante entre os cultivares sem injúrias, e não mudou nas plantas injúriadas pelas lagartas (Tabela S1).

As concentrações dos fito-hormônios considerados como os principais envolvidos na defesa AJ, AS e ACC-etileno apresentaram mudanças de concentração quando as plantas foram injuriadas por lagartas *A. gemmatalis*, com exceção do AIA para a variedade “IAC PL1”, que permaneceu constante nas plantas controle (Figura 3 e Tabela S2). O AJ teve uma maior concentração em plantas da variedade “IAC PL1” (Figura 3A), tanto no nível basal, quanto em plantas infestadas com *A. gemmatalis*. O mesmo padrão foi observado para o ACC, precursor do etileno. De modo antagônico o AS apresentou maiores concentrações nas folhas da variedade “IAC 19” (Figura 3B), mas diminuiu em plantas infestadas com *A. gemmatalis*. Finalmente para o IAA foi observado maiores concentrações também para o genótipo IAC 19, entretanto foi reduzido com a infestação pelas lagartas.

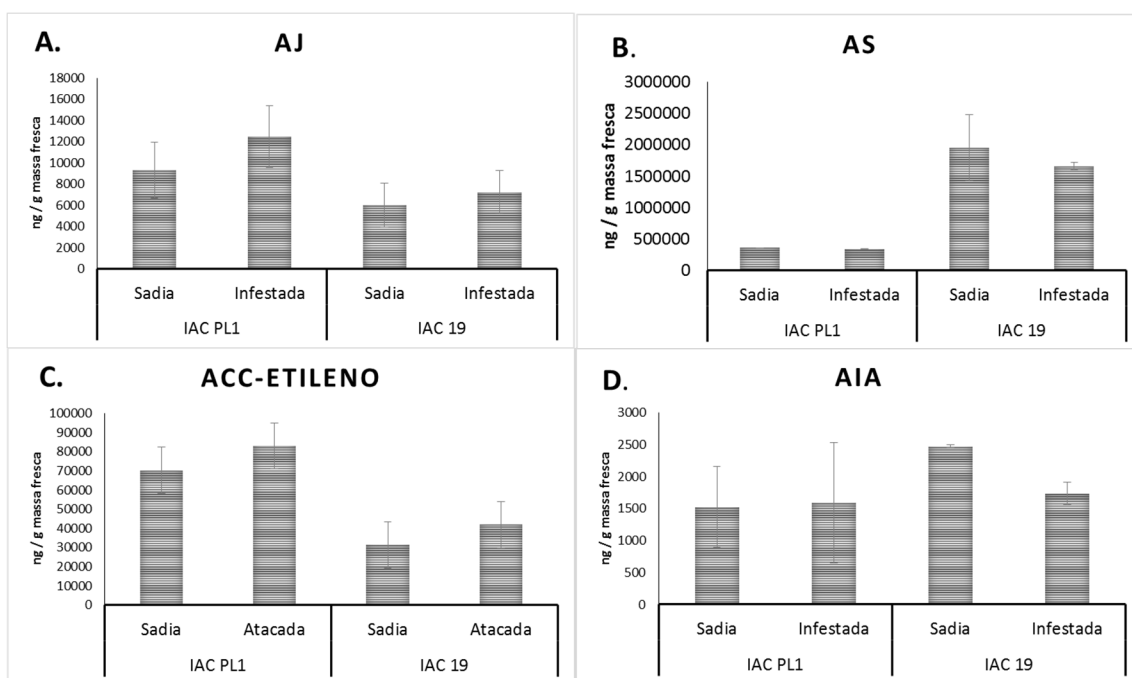


Figura 3. Quantificação dos fito-hormônios de defesa das variedades de soja “IAC PL1” e “IAC 19”, em ausência (Sadia) e presença (Infestada) da *A. gemmatalis*. As quantidades dos fito-hormônios em cada tratamento estão expressas em ng de fitohormônio/g de massa seca de tecido. A. Ácido jasmônico (AJ); B. ácido salicílico (AS), C. ácido 1-aminociclopropane-1-carboxílico-etileno (ACC-etileno); C. ácido indol acético (AIA)

Os fito-hormônios que apresentaram diferenças significativas entre as variedades de soja pelo teste *t* foram: ABA (p -valor= $2,6 \times 10^{-2}$), AS (p -valor= $1,7 \times 10^{-4}$); ACC-etileno ($1,4 \times 10^{-3}$); AJ (p -valor= $3,75 \times 10^{-5}$), (figura 4).

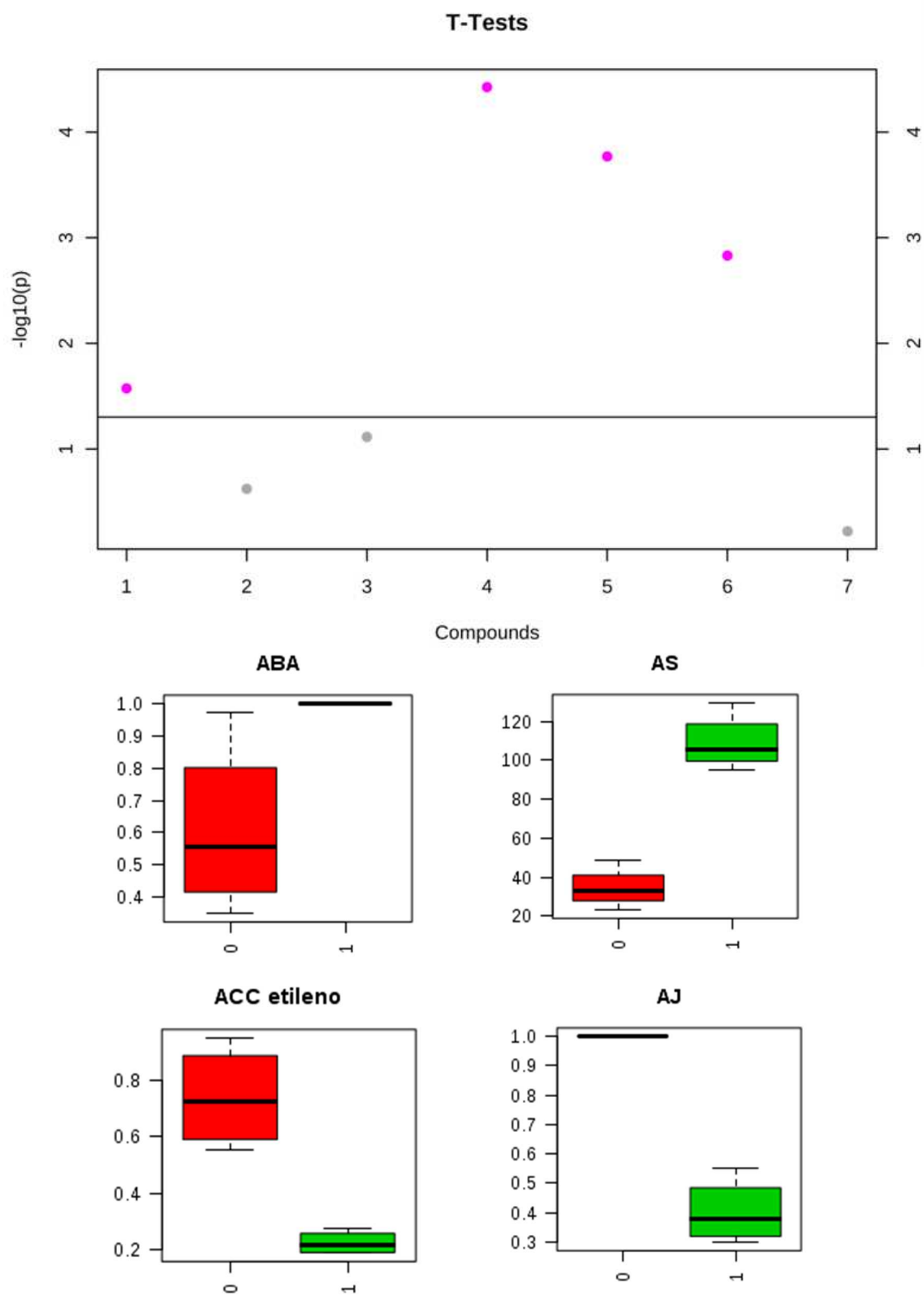


Figura 4. Análises estatísticas dos genótipos de soja “IAC PL 1” e “IAC 19”. A). Fitohormônios estatisticamente significativos no test *t*, os pontos rosa indicam os compostos

diferentes entre as duas variedades. B). *Box plot* comparação dos fito-hormônios diferentes entre as variedades, 0= “IAC PL1” e 1= “IAC 19”.

A análise de componentes principais agrupou as variedades de soja em função das concentrações dos fito-hormônios determinados, sendo que cada variedade teve um comportamento de dados específico independentemente da presença ou ausência da lagarta (Figura 5).

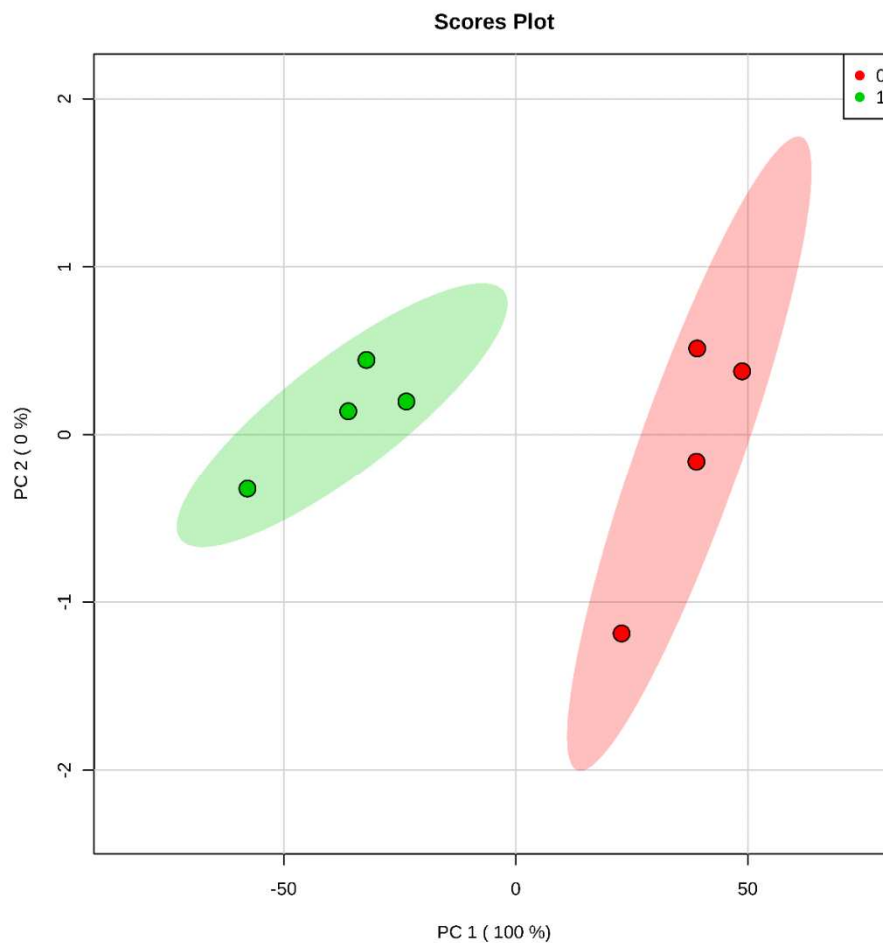


Figura 5. PCA comparativo entre as amostras estudadas. 0= “IAC PL1” e 1= “IAC 19”.

O heatmap (Figura 6), que relaciona os dendrogramas para os fito-hormônios e as variedades, indicou que as concentrações dos fito-hormônios ABA, G4, AS, AIA, são maiores na variedade “IAC 19”, porém ACC-etileno, AJ e Zeatina são maiores na variedade “IAC PL1”.

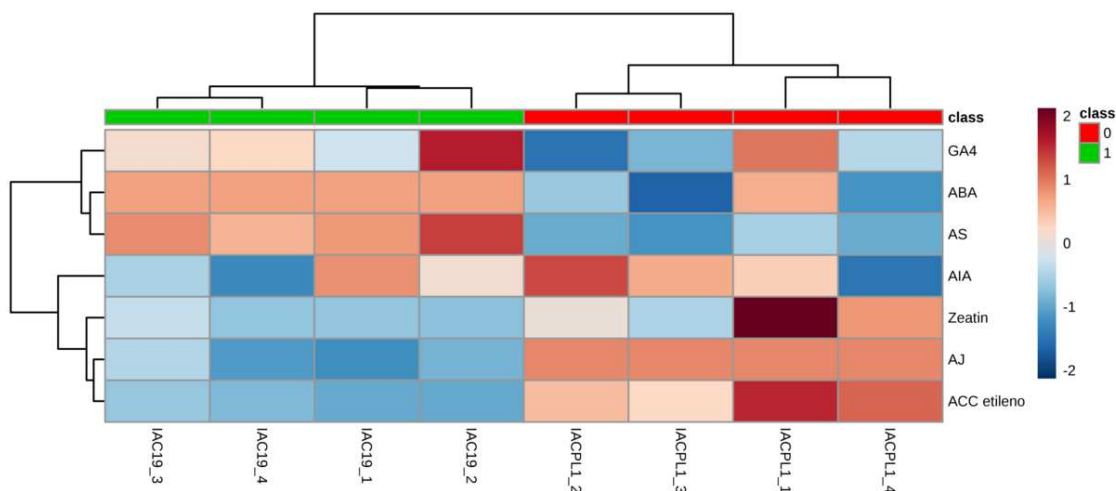


Figura 6. Heatmap, relacionando o dendrograma gerado para os tratamentos e o gerado para os fito-hormônios. 0= “IAC PL1” e 1= “IAC 19”.

1.4 Discussão

A resistência e susceptibilidades de genótipos de soja tem sido avaliada pelas taxas de sobrevivência das lagartas infestando as folhas (PIUBELLI et al., 2004), entretanto não tem sido correlacionada com a variação no perfil hormonal das plantas. Pelos testes de sobrevivência o cultivar “IAC 19”, no qual tem sido descrita resistência por antibiose a outros insetos praga (SOUZA et al., 2015, SOUZA et al., 2017), apresentou uma susceptibilidade maior a *A. gemmatilis* do que a mostrada por “IAC PL1”, cultivar que tem sido classificado e usado experimentalmente como variedade controle de susceptibilidade (LOURENÇÃO et al., 1989; MIRANDA et al., 2003a; 2003b SOUZA et al., 2015). Portanto um genótipo que tenha resistência a outros insetos não necessariamente será a todo tipo de inseto praga, como por exemplo à *A. gemmatilis*. A taxa de sobrevivência observada, coincide com os estudos feitos por MACEDO et al. (2014) com o genótipo “IAC 19” como controle e veículo para análises do efeito de extratos de plantas no desenvolvimento de *A. gemmatilis*.

Alguns estudos descrevem as respostas das cascatas *downstream* à ativação pelos fito-hormônios em soja, como por exemplo em análises de transcriptômica (STUDHAM e MACINTOSH, 2012; 2013) avaliando a expressão dos genes ativados. Em adição em estudos sobre respostas de defesa pelas plantas, normalmente são utilizadas outras plantas

modelo, nas quais os mecanismos de defesa foram melhor elucidados (SMITH e CLEMENT, 2012; WAR et al., 2011c; WANG et al., 2007; HOWE e JANDER, 2008; VLEESSCHAUWER et al., 2010), mas com relação específica a soja não existem reportes que descrevam a resposta fito-hormonal das plantas à herbivoria.

O comportamento do perfil fito-hormonal permite inferir sobre o comportamento de diferentes genótipos em relação a herbivoria (WAR et al., 2011a; SMITH, et al., 2012). Foram observados níveis mais elevados de AJ no genótipo PL1, do qual proporcionou menores taxa de sobrevivência das lagartas. Portanto é um indicativo que as cascatas sinalizadoras para ativar as defesas nas folhas de soja podem estar mais ativas nesse genótipo (ERB et al., 2012). Em adição, os níveis de AS foram mais baixos neste genótipo. Efeitos produzidos pelos insetos ativam cascatas de aumento dos níveis de AS, o qual tem efeito antagônico a sinalização por AJ. AS e ET tem sido os hormônios mais caracterizados que alteram as respostas dependentes de JA (ERB et al., 2012). Ao contrário do AS, Etileno pode ter efeito positivo ou negativa na ação do JA. Os níveis tanto de AJ e ACC foram mais elevados no genótipo resistente PL1, indicando que a via de síntese de etileno está mais alta e pode estar modulando positivamente as respostas de defesa (VAN LOON et al., 2006).

Recentemente tem sido indicado que as respostas hormonais ao ataque de insetos também envolvem outros hormônios (VERMA et al., 2016). Zeatinas são hormônios de plantas envolvidos em várias respostas a estresses bióticos e um aumento na sua concentração é normalmente observado durante o ataque, culminado na modificação do metabolismo da planta para permitir a infestação (GIRON et al., 2013). ABA também é importante na resistência das plantas contra insetos herbívoros por meio da modulação das respostas dependentes de JA (GIRON et al., 2013; ERB et al., 2012; DINH et al., 2013) e também pode agir de modo antagônico a citocininas (SCHÄFER et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Porém os níveis de ABA foram mais altos no genótipo sensível “IAC 19”, com um comportamento inverso ao observado para AJ. Também os níveis de zeatin foram ligeiramente mais altos no genótipo susceptível “IAC 19”.

1.5 Conclusões

Apesar do genótipo de soja “IAC PL1” ser considerado susceptível à herbivoria por *A. gemmatilis*, quando comparamos com o genótipo “IAC 19”, que é considerado

resistente a outros insetos pragas, foi considerado resistente. No entanto, as respostas fitohormonais da variedade “IAC 19” permitem determinar que a planta tem características de tolerância. A análise dos perfis hormonal entre estes genótipos está de acordo com os diferentes níveis de resistência a herbivoria.

1.6 Referencias

AGRAWAL, G.K.; HAJDUCH, M.; GRAHAM, K.; THELEN, J.J. **In-Depth Investigation of the Soybean Seed-Filling Proteome and Comparison with a Parallel Study of Rapeseed.** *Plant. Physiol.* 2008. 148: 504–518.

AMAZONAS, L. **Perspectivas para a agropecuária, Soja.** *Perspec. Agropec. Brasília.* 2017. 5:95-111.

ASSELBERGH, B., DE VLEESSCHAUWER, D., HOFTE, M. **Global switches and finetuning- ABA modulates plant pathogen defense.** *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2008, 21:709–719.

BOER, J.G.; POSTHUMUS, M.A.; DICKE, M. **Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite.** *J. Chem. Ecol.* 2004. 30: 2215-30.
<http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000048784.79031.5e>.

BUENO, A.F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SOSA-GOMEZ, D. R.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. **MIP SOJA.** EMBRAPA, SOJA. 2013.
<http://www.cnpso.embrapa.br/helicoverpa/folder-mip.pdf>

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária, Safra 2017/2018.** ISSN 2318-3241. *Perspec. agropec.* Brasília, v.5, p. 1-111, ago. 2017

DICKENS, J.C. **Plant volatiles moderate response to aggregation to pheromone in Colorado potato beetle.** *J. Appl. Entomol.* 2006. 130: 26-31.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.01014.x>.

DINH, S. T., BALDWIN, I. T., GALIS, I. **The HERBIVORE ELICITOR-REGULATED1 Gene Enhances Abscisic Acid Levels and Defenses against Herbivores in *Nicotiana attenuata* Plants.** *Plant Physiology.* 2013. 162: 2106–2124.
<http://doi.org/10.1104/pp.113.221150>

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. 2004.** 2004. Sistema de Produção, No 1.
<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>

ERB, M., MELDAU, S., HOWE, G.A. **Role of phytohormones in insect-specific plant reactions.** *Trends. Plant Sci.* 2012. 17(5):250-9. doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.003. Epub 2012 Feb 1. Review.

GILL, R.S.; GUPTA, K.; TAGGAR, G.K.; TAGGAR, M.S. **Role of oxidative enzymes in plant defenses against herbivory.** *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 2010. 45: 277-90. <http://dx.doi.org/10.1556/APhyt.45.2010.2.4>.

GIRON, D., GLEVAREC, G. **Cytokinin-induced phenotypes in plant insect interactions: Learning from the bacterial world.** *J. Chem. Ecol.* 2014. 40: 826–835.

GOLLDACK, D., LI, C., MOHAN, H., PROBST, N. **Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions.** *Plant. Cell. Rep.* 2013; 32:1007–16.

GOEL, M.K., KHANNA, P., KISHORE, J. **Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate.** *International Journal of Ayurveda Research.* 2010; 1:274-278. doi:10.4103/0974-7788.76794.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, 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. 70p. (Circular Técnica, 30).

HOWE, G.A.; JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores.** *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2008; 59: 41-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L.L. **Hemipterans as plant pathogens.** *Ann. Rev. Phytopat.* 2005. 43: 491-521.

KAMADA-NOBUSADA, T.; SAKAKIBARA, H. **Molecular basis for cytokinin biosynthesis.** *Phytochemistry.* 2009. 70: 444-9. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.02.007. Epub 2009 Mar 11. Review.

LANTMANN, A. **Projeto Soja Brasil, safra 2015/2016.** Relatório técnico. <http://www.projetosojabrasil.com.br/veja-o-relatorio-tecnico-do-projeto-soja-brasil-na-safra-1516/>. 2016.

LOURENÇÃO, A.L.; COSTA, A S.; MIRANDA, M.A.C. **Sources of resistance to Insect pests and virus vector in the soybean gemplasm tested at Instituto Agronomico, SP, Brasil.** In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4. 1989, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Editora S.R.L., 1989. p. 1578-1581.

LOURENÇÃO, A.L.; BRAGA, N.R.; COELHO DE MIRANDA, M.A.; VALLE, G.E. PEREIRA, J.; RECO, P.C. **Avaliação de Danos de Percevejos e de Desfolhadores em Genótipos de Soja de Ciclos Precoce, Semiprecoce e Médio.** *Neotrop. Entomol.* 2002. 31: 623-630.

LOURENÇÃO, A.L.; RECO, P.C.; BRAGA, N.R.; VALLE, J.G.E.; PINHEIRO, J.B. **Produtividade de genótipos de soja sob infestação da lagarta-da-soja e de percevejos.** *Neotrop. Entomol.* 2010. 39, 275-281

MACEDO, M.L.R., KUBO, C.E.G., FREIRE, M.G.M., JÚNIOR, R.T.A., PARRA, J.R. P. **Entomocidal Effects of Beech Apricot, *Labramia bojeri*, Seed Extract on a Soybean Pest, the Velvetbean Moth, *Anticarsia gemmatilis*, and Its Enzymatic Activity.** *J. Insect Sci.* 2014. 14; 27. <http://doi.org/10.1673/031.014.27>

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. **Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release.** *Phytochemistry.* 2007. 68:2946-59.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J. HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. **Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol.** *Nat. Biotechnol.* 2007. 25:1307-13. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1352>

MAUCH-MANI, B., MAUCH, F. **The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions.** *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2005, 8:409–414.

MIRANDA, M.A.C; BRAGA, N.R; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T.S; UNÊDAII, S.H.; FUMIKO M. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos.** *Bragantia.* 2003a. 62: 19-27

MIRANDA, M. A. C.; BRAGA, N. R.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, F. T. S.; UNÊDA, S. H.; ITO, M. F. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos.** *Bragantia.* Campinas. 2003b. 62: 29-37.

MOSCARDI, F.; BUENO, A.F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; FARHAT, A.; CORSO, I.C.; AKIMI, S. **Artrópodes que atacam as folhas da soja.** *Embrapa,* 2012;1:213-334.

PAUWELS, L.; INZÉ, D.; GOOSSENS, A. **Jasmonate-inducible gene: What does it mean?** *Trends. Plant. Sci.* 2009. 14: 87- 91.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.005>.

PENG, J.; DENG, X.; HUANG, J.; JIA, S.; MIAO, X.; HUANG, Y. **Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner.** *Z. Naturforsch C.* 2004. 59: 856-62.

PERILLI, S.; MOUBAYIDIN, L.; SABATINI, S. **The molecular basis of cytokinin function.** *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2010. 13: 21-6.
doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.018. Epub 2009 Oct 21. Review.

POCHÉ, R.M., BURRUSS, D., POLYAKOVA, L., POCHÉ, D.M., GARLAPATI, R.B. **Treatment of livestock with systemic insecticides for control of *Anopheles arabiensis* in western Kenya.** *Malar. J.* 2015; 14:351. doi: 10.1186/s12936-015-0883-0.

PIUBELLI, G.C., HOFFMANN-CAMPO, C.B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S.H., DE OLIVEIRA, M.C. **Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?** *J. Chem. Ecol.* 2005. 31:1509-25.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2017.

ROSSETTO, C. J.; TISSELI FILHO, O.; CIONE, J.; GALLO, P. B.; RAZERA, L. F.; TEIXEIRA, J. P. F. **Cultivar de soja IAC 100.** Campinas, 1987.

SCHÄFER, M., BRÜTTING, C., CANALES, I. M., GROBKINSKY, D. K., VANKOVA, R., BALDWIN, I. T., & MELDAU, S. **The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions.** *J. Exp. Bot.* 2015. 66: 4873–4884. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv214>

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Gene networks involved in drought response and tolerance.** *J. Exp. Bot.* 2007. 58: 221-227.

SHIVAJI. R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, P.R.; LUTHE, D.S. **Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize.** *J. Chem. Ecol.* 2010. 36: 179-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9752-z>.

SINCLAIR, J.B., KOGAN, M. and MCGLAMERY, M.D. **Guidelines for the Integrated Management of Soybean Pests.** National Soybean Research Laboratory Publication No. 2, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.1997. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

SINGH, G. **The Soybean Botany, Production and Uses.** 1a ed. 2010. ISBN 978-1-84593-644-0. CAB International.

SMITH, C.M.; CLEMENT, S.L. **Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods.** *Annu. Rev. Entomol.* 2012. 57: 309–28.

SILVA, P.L. **Resposta fitoquímica de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatilis* e desenvolvimento do inseto alimentado com cultivares resistentes e susceptíveis.** 2015. 68f. Tese (Doutorado em Bioquímica aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SILVA, J.B.; LAZARINI, E.; SILVA, A. M.; RECO, P. C. **Ensaio comparativo de cultivares de soja em época convencional em Selvíria, MS: características agronômicas e produtividade.** *Biosci. J.*, 2010. 26: 747-754, Uberlândia.

SOUZA, E.F.; BALDIN, E.L.L.; SILVA, J.P.G.F., LOURENÇAO, A.L. **Feeding preference of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and attractiveness of soybean genotypes.** *Chilean J. Agric. Res.* 2013, vol.73, pp. 351-357. ISSN 0718-5839. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000400004>.

SOUZA, E.S.; SILVA, J.P.; BALDIN, E.L.; PIEROZZI, C.G.; CUNHA, L.S.; CANASSA V.F.; PANNUTI, L.E.; LOURENÇÃO, A.L. **Response of Soybean Genotypes Challenged by a Stink Bug Complex (Hemiptera: Pentatomidae).** *J. Econ. Entomol.* 2015. pii: tov341. [Epub ahead of print]

SOUZA, E.S.; CANASSA, V.F.; BENTIVENHA, J.P.F.; BALDIN, E.L.L.; PIEROZZI, C.G.; LOURENÇÃO, A.L.; PANNUTI, L.E.R. **Variable Levels of Resistance of Soybean Genotypes on the Performance of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae).** *J. Econ. Entomol.* 2017. 110: 2672-2678. doi: 10.1093/jee/tox254.

STUDHAM, M.E.; MACINTOSH, G.C. **Phytohormone signaling pathway analysis method for comparing hormone responses in plant-pest interactions.** *BMC Res Notes.* 2012. 31: 5:392.

STUDHAM, M.E.; MACINTOSH, G.C. **Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants.** *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2013. 26: 116-29. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0124-FI.

THERNEAU, T.M. **A Package for Survival Analysis in S.** Mayo foundation. 1999.

USHA, R.P.; JYOTHSNA, Y. **Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense.** *Acta. Physiol. Plant.* 2010. 32: 695-701. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0449-2>.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L. **Resistência de génotipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae).** *Neotrop. Entomol.* Londrina. 2002. 31: 285-295.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. **Ethylene as a modulator of disease resistance in plants.** *Trends. Plant. Sci.* 2006. 11: 184-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.005>.

VERHAGE, A.; VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J. **Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?.** *Plant. Physiol.* 2010; 154: 536-40 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.161570>.

VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P.P. **Plant hormone-mediated regulation of stress responses.** *BMC Plant. Biol.* 2016. 16: 86. doi: 10.1186/s12870-016-0771-y.

VLEESSCHAUWER, D.; YANG, Y.; CRUZ, C.V.; HÖFFE, M. **Abscisic acid induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling.** *Plant. Physiol.* 2010. 152: 2036–2052.

WALLING, L.L. **The myriad plant responses to herbivores.** *Journal of Plant Growth Regulation.* 2000. 19: 195-216.

WANG, D.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; HENDRICKSON, C.A.; DONG, X. **Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway.** *Curr. Biol.* 2007. 17: 1784–1790.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).** *J. Plant. Growth. Regul.* 2011a; 30:512-23; <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-011-9213-0>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.).** *Plant. Signal. Behav.* 2011b. 6: 1787-92. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A., HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C. **Mechanisms of plant defense against insect herbivores.** *Plant. Signal. Behav.* 2012. 7: 1306-20. doi: 10.4161/psb.21663.

XIA, J., SINELNIKOV, I.V., HAN, B., WISHART, D.S. **MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful.** *Nucleic Acids Res.* 2015. 43: W251-7. doi: 10.1093/nar/gkv380. Epub 2015 Apr 20.

ZHANG, J., YI SHI, Y., ZHANG, X., DU, H., XU, B., HUANG, B. **Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.).** 2017. 138: 36-45

ZHU, J., AND PARK, K.-C. **Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*.** *J. Chem. Ecol.* 2005. 31:1733-1746.

2. Soybean flavonoids harm the midgut morphology and reduce survival of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars

Manuel A. Solís-Vargas^{1,4#}; Paulo L. da Silva^{2,4}; Juan D. Rios-Díez^{1,4}; Jenny D. Gomez-Arrieta^{2,4}; Juliana A. Martínez¹; Jose E. Serrão³; Jose C. Zanuncio^{1,4}; Maria G.A. Oliveira^{2,4*}

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ⁴BIOAGRO-Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

*Corresponding author: e-mail: malmeida@ufv.br; Tel. 55 3138993930; Fax 55 3138914012

#Orcid ID: 0000-0003-0046-9995

Acknowledgments

We would like to thank the following Brazilian agencies “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” and “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP)” for their financial support. Dr. Phillip John Villani (The University of Melbourne, Australia) revised and corrected the English language used in this manuscript.

Abstract

Morphological changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillar midgut, development and mortality feeding on soybean and artificial diets containing flavonoids were evaluated. Soybean flavonoid concentrations were measured and artificial diets prepared adding synthetic flavonoids at same soybean proportions.

Anticarsia gemmatalis caterpillars fed on susceptible and resistant soybean and artificial diets were submitted to histological analysis. Survival, development period and weight was accounted. Flavonoids daidzein, quercetin, and rutin were found in susceptible (IAC-PL1) and resistant (IAC-17, IAC-24) soybean. Only daidzein had high concentrations on resistant varieties. *Anticarsia gemmatalis* survival were lower feeding on resistant soybean and artificial diet containing the three flavonoids. Caterpillars got less mass growth feeding on resistant than susceptible soybean. Artificial diets added with flavonoids did not have these effects and any treatment affected *A. gemmatalis* developing periods. Midgut cells were damaged but not the peritrophic membrane and the muscular wall of the caterpillar midgut. The IAC-PL1 soybean deformed columnar cells and reduced the number of regenerative ones. The IAC-17 caused columnar cells rupturing and goblet cells deformation. The IAC-24 caused epithelium detachment from the muscular wall and increased vacuoles in the columnar cells cytoplasm. Artificial diets added with flavonoids caused similar changes in midgut morphology as those caused by resistant soybeans. Resistant soybean varieties damaged *A. gemmatalis* caterpillar's midgut, causing high mortality and decreased growth mass. Different daidzein, quercetin, and rutin concentrations, in these cultivars, may function synergistically against *A. gemmatalis* caterpillars as showed by the effects of artificial diet added with these three flavonoids.

Keywords Histopathology, midgut epithelium, peritrophic membrane, synergism

Key message

- *Anticarsia gemmatalis* caterpillar is the main soybean pest in the America continent attacking all crop stages deriving in important economical lost.
- Use of soybean resistant cultivars with different flavonoid concentrations could lead to improve integrated pest management techniques.
- Damage to caterpillar midgut cells and detachment of epithelium from muscular wall precluded food absorption generating mortality of *A. gemmatalis* caterpillars.
- Different flavonoid concentrations in soybean resistant cultivars, may function synergistically to cause damage and death to *A. gemmatalis* caterpillars.

Author contribution statement MA, PL, JDR and JDG conceived and designed research. MA, PL, JDR, JDG, JA and JE conducted experiments and analyzed data. JE, JC and MG oriented the research and analytical analyses. MA, PL and JC wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

2.1 Introduction

Brazil is the second soybean, *Glycine max* (L.) Merrill (Leguminosae: Papilionoidae) producer and exporter in the world with 95,633,900,000 tons in 2015/2016. (Conab 2016). The "velvetbean caterpillar" *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), is one of the main defoliating pests of this crop in America (Nascimento et al. 2003). This insect are in all regions were this plant is cultivated and its caterpillars damage from seedling to plants in the vegetative stage (Riffel et al. 2012; Pazzini 2013).

The high quantity and frequency of insecticide application may reduce natural enemies in soybean crops (Vianna et al. 2009). Soybean varieties with moderate insect resistance levels (Matos Neto et al. 2002; Piubelli et al. 2005; Kim et al. 2014) are used associated with viral (Levy et al. 2011; Brito et al. 2015) or botanical insecticides (Jesus et al. 2014; Ribeiro et al. 2015; Silva et al. 2016b). This can reduce or eliminate the use of pesticides and improve the ecological sustainability of agricultural systems.

Many wild or cultivated plants have some degree of insect resistance through secondary metabolites (Tavares et al. 2010; Zhou et al. 2011; Silva et al. 2013; Zavala et al. 2014). Flavonoids are found in different soybean parts (Magarelli et al. 2014; John et al. 2013; Kim et al. 2014) and are responsible for resistance against defoliating insects (Piubelli et al. 2005). The flavonoids daidzein, quercetin, and rutin cause disturbances in the cartepillar midgut affecting lepidopteran development and biology (Zhou et al. 2011; Jadhav et al. 2012; Smith et al. 2016b).

The *A. gemmatalis* midgut has a single layered columnar epithelium with digestive, goblet, and regenerative cells (Levy et al. 2008; Gomes et al. 2013) likely other Lepidoptera (Chiang et al. 1986; Binder and Bowers 1994). The peritrophic membrane

separates the food bolus from the midgut epithelium protecting it against mechanical damage, but it is permeable to digestive enzymes and nutrients (Eisemann and Binnington 1994; Terra 2001), as well as a barrier against pathogens (Levy et al. 2009; 2011; Silva et al. 2016a). Changes in caterpillar midgut morphology and mortality caused by flavonoids need to be better-studied (Vandock et al. 2012) and settle how these compounds affect the biology of lepidopteran (Gazzoni et al. 1997; Piubelli 2005; Silva et al. 2016b).

Therefore, the flavonoid effects of susceptible (IAC-PL1) and resistant (IAC-17, IAC-24) soybean were accessed by picturing alterations on larval midgut morphology, development and survival of *A. gemmatalis* caterpillars and pupae feeding on these cultivars and artificial diets added with synthetic flavonoids in equal proportions as found in soybean plants varieties.

2.2 Material and methods

2.2.1 Local

The experiments with artificial diets, biological assessments of *A. gemmatalis* caterpillars, and identification and quantification of flavonoids for the soybean varieties IAC-PL1, IAC17, and IAC24 were carried out at the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) in Viçosa, Minas Gerais state, Brazil. The *A. gemmatalis* caterpillar midgut histology was analysed in the Laboratory of Cell Biology, Molecular, and Microscopy Center of the General Biology Department of UFV.

2.2.2 Caterpillar rearing

Anticarsia gemmatalis adults were kept in cages (50 x 50 cm) with paper sheets for oviposition. Adults of this insect were fed on nutrient solution composed of honey (10.5 g), beer (350 mL), sucrose (60 g), ascorbic acid (1.05 g), nipagin (1.05 g), and water (1050 ml), embedded in cotton placed on the bottom of the cages in a Petri dish.

Anticarsia gemmatalis egg masses were collected every three days and transferred to 500 mL plastic cups with a 2 cm circular hole in the cover closed with tulle screen.

These cups were maintained at 25 ± 5 °C; 70 ± 10 % RH and 14:10 (d:n) hours photoperiod until hatching. The caterpillars were separated into groups of 20 individuals and placed in 500 mL plastic pots with about 10 g of artificial diet changed every three days. Pupae were placed in cages for adult to emerge and copulate.

2.2.3 Preparing artificial diet

The artificial diet was composed of beans (4.8 g), brewer yeast (2.4 g), wheat germ (3.8 g), soy protein (3.8 g), casein (1.9 g), agar (1.34 g), and water (80 mL/100 g) mixed in an industrial blender and autoclaved at 1.5 kgf/cm^2 for 15 minutes and transferred to a blender. Ascorbic acid (6 g), sorbic acid (3 g), nipagin (methyl paraben, 5 g), 40% formalin (6 mL) and vitamin solution (10 mL) (niacinamide 1 mg, calcium pantothenate 1 mg, thiamine 0.25 mg, riboflavin 0.50 mg, pyridoxine 0.25 mg, folic acid 0.25 mg, biotin 0.02 mg and inositol 20 mg) and 1 L water were added and mixed until a homogenous consistency was obtained.

At this point, for artificial diet used in experiments, a quantity of flavonoids previously weighted according to maximal concentrations found in resistant soybean cultivars were first diluted in 5 mL absolute ethanol (99.5%) and added to the mixture (diet used in control treatments were added with 5mL ethanol without flavonoids). Then the liquid diets were left to cool in germicidal chamber with ultraviolet light and stored at 4 °C.

2.2.4 Soybean varieties

Soybean seeds of the susceptible IAC-PL1 and resistant IAC-17 and IAC-24 varieties were obtained from the Agronomic Institute of Campinas (São Paulo, Brazil). Variety IAC-PL1 is the product of a Japanese introduction which the grain has high protein concentration but low productivity ($578 \pm 34 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Lourenção *et al.* 2010)) and has been demonstrated to be susceptible to pathogens and insects and used as control for scientific research (Silva *et al.* 2010; Souza *et al.* 2013). Varieties IAC-17 and IAC-24 are product of different crossings and present high productivity ($2953 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ for IAC-17 and $3480 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ for IAC-24 (Silva *et al.* 2010; Miranda *et al.* 2003)), resistant to pests and pathogens of high genotype and phenotype similarity (Souza *et al.* 2016, 2017).

Seeds of each variety were previously sprouted on a wet towel paper into germination chamber and then planted in pots containing 2 kg of fertilized substrate inside a greenhouse ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$, $70\% \pm 10\text{ RH}$) isolated in cages to avoid pests' damage, pesticides free and daily irrigated. The planting was staggered to have the required availability of plant vegetative stages. Nine plants per variety were selected to access flavonoid concentrations and the rest to feed *A. gemmatalis* caterpillars for experiments.

2.2.5 Flavonoids identification and quantification

Plants were exposed to damage by *A. gemmatalis* herbivory to access the highly flavonoid concentrations in plants. The third trifoliolate leaf from bottom to top of each plant in V3 stage were collected, wrapped in foil packages, frozen with liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for chemical compound analysis.

Flavonoids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in the Biodiversity Laboratory of the Biochemistry and Molecular Biology Department of UFV. The leaflets of the soybean plants of each variety were weighed (500 mg) and macerated with liquid nitrogen, and transferred to 15 mL plastic tubes containing 5.0 mL of 80% methanol. This solution was submitted to ultrasound for 20 minutes and centrifuged at 3,000 g for five minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The extracts were evaporated in speed vacuum and re-suspended in 2 mL of absolute methanol, filtered with PTFE filter $0.45\text{ }\mu\text{m}$ and stored vials.

The soybean leaf extracts were eluted with segmented gradient of acetic acid and 2% acetonitrile solution. An aliquot of $30\text{ }\mu\text{L}$ of leaf extracts from each soybean variety was placed into a chromatograph (Shimadzu Prominence LC pump 20 AD, detector SPD M 20 A, CTO oven 20 A, LabSolutions program) with a reverse phase column to detect secondary metabolites (C-18, 4.6 mm internal diameter, 150 mm length, $4.8\text{ }\mu\text{m}$ particle diameter). Chromatographic force of the mobile phase ranged from 0 to 4 min 5% acetonitrile; 4 to 15 min 20% acetonitrile; 15 to 20 min 35% acetonitrile; 20 to 30 min 90% acetonitrile; 30 to 40 minutes 5% acetonitrile; and the column temperature was $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CTO-20A). The solvent flow was 0.6 mL/min and absorption measured at 254 nm (DAD).

Flavonoids quantity was ascertained by comparison with standards kaempferol, daidzein, daidzin, genistein, genistin, rutin, and quercetin. Curves were calibrated by injection of daidzein (1.2; 2.4; 3.6; 4.8 µg), quercetin (0.8; 1.6; 2.4; 3.2 µg), and rutin (0.8; 1.6; 2.4; 3.2 µg) concentrations. Linear regression curves were derived from concentration peak area of these compounds and concentrations of these flavonoids in the samples calculated. A 3³ factorial design were applied for statistical analysis.

2.2.6 Anticarsia gemmatalis caterpillar mortality and development

Plant experiment

A mean of 155 *A. gemmatalis* caterpillars were used for each soybean cultivar. Ten first instar caterpillars from mass rearing were put in trifoliolate plant leaves at vegetative stages between V4 to V6. Leafs were covered with plastic cages of 150 mL closed with rubber bands. After three days every plastic cage were opened and cleaned for caterpillars to be accounted, weighted and instar determined. Then, repeated every two days until pupae formation. When necessary, each caterpillar group were put in a new leaf from same or different plant. Once the caterpillars reached the third instar were separated in groups of three to five individuals per cage.

Artificial diets experiment

Six different artificial diets treatments were prepared. Control consist of artificial diet without flavonoids, one diet containing only synthetic daidzein another quercetin and other rutin. A fifth diet containing quercetin with rutin and a sixth containing the three flavonoids. Every treatment had five blocks with twelve caterpillars each kept in 300 mL plastic cups with 10 g of diet changed every two days. Caterpillars were accounted, weighted and instar determined every two days until pupae formation. Experiments were conducted in laboratory at 25 ± 5 °C, 60 ± 10 % RH and 10:14 (L:D) hours photoperiod.

2.2.7 Anticarsia gemmatalis caterpillar's midgut histology

Eight *A. gemmatalis* caterpillars per plant and artificial diet treatment were dissected in 125 mM NaCl and four midgut per treatment were transferred to Zamboni

fixative solution. Then the samples were dehydrated in a graded ethanol series (70%, 80%, 90%, 95%) and embedded in JB-4 historesin. Stained sections 3 µm thick with haematoxylin and eosin were observed in a light microscope and pictures taken. Artificial diet without flavonoids performs as control for both, soybean and artificial diets with flavonoids treatments.

2.2.8 Statistics

Data normality was verified with Shapiro test and homogeneity of variances with Bartlett test. An analysis of variance (ANOVA) was applied to determine differences between flavonoid concentration found in soybean cultivars, caterpillars weight and larvae period. Means were compared by Tukey HSD test at 95% reliability. Caterpillar survival were estimated by the Kaplan-Meier method and curves were compared with Log-Rank Test at 95% reliability. Statistical analyses were performed using the statistical program R version 3.4.3 (R Core Team 2017).

2.3 Results

5.3.1 Flavonoid concentrations of soybean varieties.

Three flavonoid compounds, daidzein, quercetin and rutin were determined from nine plants of each of the three soybean varieties IAC-PL1, IAC-17 and IAC-24. A two-way ANOVA for a 3³ factorial design indicated an significant interaction between factors ($F_{4,72} = 40,57$; $P = 9,22 \times 10^{-18}$) showing differences between flavonoid concentrations and soybean varieties (Fig. 1). Daidzein had high concentrations in the three soybean varieties, mainly in the IAC-17 and IAC-24, while quercetin and rutin had low and similar concentrations in the three soybean varieties. The average values of these flavonoids in the susceptible variety IAC-PL1 were 0.423 mg/g daidzein; 0.087 mg/g quercetin; and 0.20 mg/g of rutin. The IAC-17 and IAC-24 resistant varieties had 2.07 and 2.40 mg/g of daidzein; 0.177 and 0.107 mg/g of quercetin; and 0.130 and 0.330 mg/g rutin, respectively

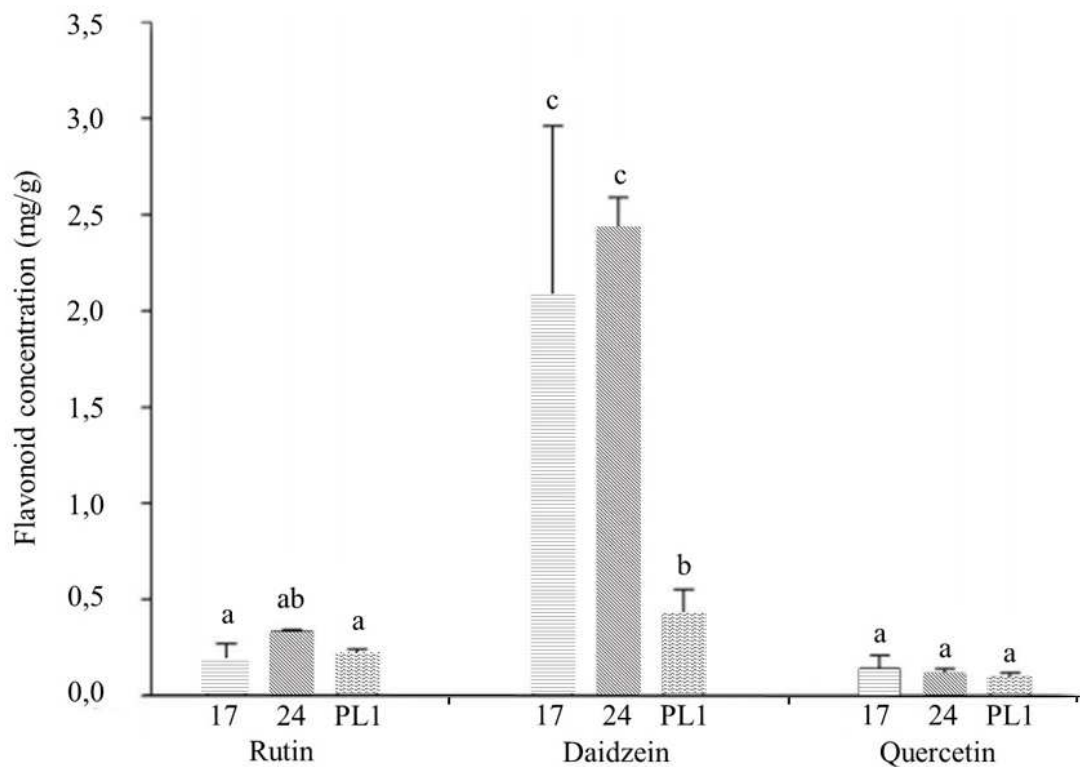


Fig. 1 Flavonoids concentration in soybean *Glycine max* (Leguminosae: Papilionoidae) resistant (IAC-17, IAC-24) and susceptible (IAC-PL1) to insects. Mean bars (\pm SEM; n= 9) with the same letter do not differ by Tukey HSD test ($P < 0.05$)

2.3.2 Caterpillar survival.

Kaplan-Meier method showed that the final percentage of caterpillar survival fed on soybean cultivar was 78% for IAC-PL1; 61% for IAC-17; and 66% for IAC-24. The highest death rates was observed during day 7 on IAC-PL1, day 7 and 15 on IAC-17 and day 15 for the IAC-24 (Fig 2a). Log-Rank test showed significant differences in survival caterpillars between soybean varieties ($X^2 = 11,9$; d.f.= 2; $p = 0,00756$), those being between susceptible variety IAC-PL1 and resistant IAC-17 and 24 ($X^2 = 10,2$; d.f.= 1; $p = 0,00138$ and $X^2 = 5,4$; d.f.= 1; $p = 0,0206$; respectively), but not between resistant ones ($X^2 = 0,7$; d.f.= 1; $p = 0,419$).

Experiment with flavonoids in artificial diets did not show differences between the total treatments ($X^2 = 6,4$; d.f.= 5; $p = 0,265$) and only the treatment which include the three flavonoids in the diet had significant difference with control diet ($X^2 = 3,9$; d.f.= 1;

$p= 0,0479$). Caterpillars fed on diet containing daidzein, quercetin and rutin had a final survival of 60,1% against 76,6% of control diet (Fig. 2b). The diet with only quercetin was the second to bring mortality to *A. gemmatalis* caterpillars with 66,6% survival, followed by diets with only daidzein (71,6%), with quercetin and rutin (76,6%) and only rutin (78,3%).

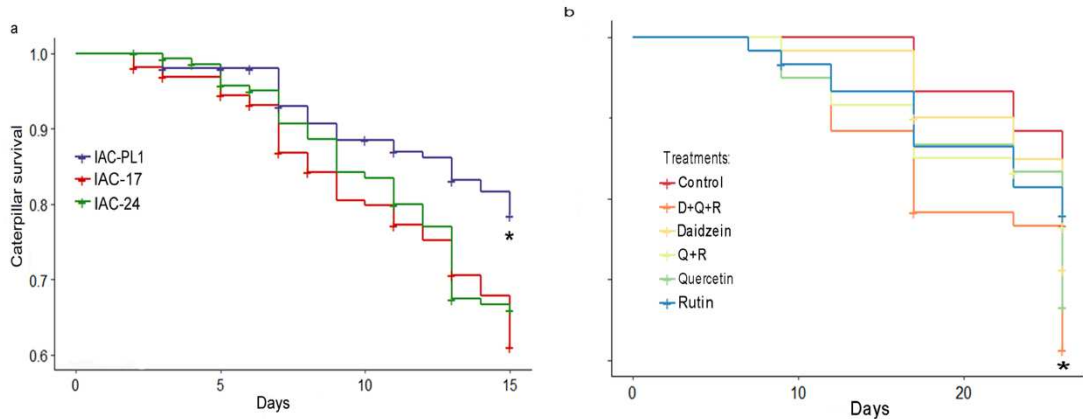


Fig. 2 Survival of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars and pupae by Kaplan-Meier method: (a) fed on leaves of susceptible (IAC-PL1) and resistant (IAC-17 and IAC-24) soybean (curve mark with asterisc “*” differ from others); (b) fed on artificial diets added with flavonoids (curves mark with asterisc “*” differ from control). Significance differences were determined by Log-Rank test at 95% confidence interval.

2.3.3 Caterpillar development.

Neither soybean varieties nor artificial diets had effects on caterpillar periods (data not show). Resistant soybean had negative effect on *A. gemmatalis* caterpillars’ weighth. Those fed on IAC-17 soybean got less mass growth on caterpillar instar fourth and fifth, follow by IAC-24 and compare to susceptible IAC-PL1, from which caterpillar gain more mass growth. Caterpillars’ weight fed on artificial diets show differences only at fourth instar between diets containing only quercetin and diets containing quercetin and rutin (Table 1).

Table 1 Weight (means and standard errors) of *A. gemmatalis* (Noctuidae: Lepidoptera) caterpillars and pupae feed on: susceptible (IAC-PL1) and resistant (IAC-17, IAC-24) soybean cultivars (d.f= 2;15); and on artificial diets (d.f.= 5;20). Control (without flavonoids); added with only Daidzein, Quercetin or Rutin; added with a mixture of Quercetin and Rutin (Q+R); and a mixture of Daidzein, Quercetin and Rutin (D+Q+R). Fisher values and p-values from ANOVA are showed; means indicated with the same letter do not differ between treatments by Tuckey HSD test at 0,05% significance .

	Caterpillar instars																Pupa			
	L2				L3				L4				L5				Mean	S.E.	F	p
	Mean	S.E.	F	p	Mean	S.E.	F	p	Mean	S.E.	F	p	Mean	S.E.	F	p				
Soybean variety																				
IAC-PL1	6,13 ^a	1,52	2,59	0,11	57,2 ^a	10,5	1,28	0,31	176,4 ^a	9,25	3,36	0,05	294,9 ^a	22,1	12,4	<0,01	175,1 ^a	23,9	0,02	0,98
IAC-17	6,34 ^a	0,87			38,3 ^a	9,9			133,8 ^b	12,3			180,9 ^b	14,6			172,0 ^a	2,83		
IAC-24	3,38 ^a	0,16			57,3 ^a	10,4			157,7 ^c	8,61			200,9 ^c	7,88			172,0 ^a	3,29		
Flavonoid treatments																				
Control	3,41 ^a	0,28	1,83	0,14	12,6 ^a	0,76	1,28	0,31	60,9 ^{ab}	4,66	2,48	0,05	261,7 ^a	13,4	0,59	0,70	225,4 ^a	4,84	0,67	0,65
Daizein	3,68 ^a	0,36			11,8 ^a	0,82			57,1 ^{ab}	4,04			271,5 ^a	9,61			222,9 ^a	4,14		
D+Q+R	4,42 ^a	0,59			14,9 ^a	1,94			62,6 ^{ab}	8,87			285,9 ^a	13,0			224,4 ^a	6,63		
Quercetin	3,32 ^a	0,25			13,8 ^a	1,10			67,6 ^b	2,53			276,9 ^a	14,6			221,3 ^a	5,80		
Q+R	3,32 ^a	0,25			10,8 ^a	1,28			43,8 ^a	4,89			260,1 ^a	15,7			229,6 ^a	10,2		
Rutin	3,11 ^a	0,1			12,5 ^a	1,16			53,4 ^{ab}	4,86			263,1 ^a	11,9			235,5 ^a	4,75		

2.3.4 Morphology changes in caterpillar midgut by diet consumption.

Anticarsia gemmatalis caterpillar midgut fed on an artificial diet without flavonoids had an intact muscle wall and peritrophic membrane and a simple columnar epithelium with striated border evident in the apical portion. Goblet cells were less numerous, with a central cavity and flattened nucleus. Regenerative cells were small round or oval (Fig. 3a). Digestive cells were numerous and columnar with basophilic finely granular cytoplasm, with an elongated nucleus in the cell apical third. The apical surface of digestive cells showed an acidophilic region, the striated border. Small cytoplasmic protrusions were released into the gut lumen (Fig. 3b).

The midgut of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars fed on leaves from the insect susceptible soybean IAC-PL1, showed changes in muscle layer, partial detachment of the intestinal epithelial cells, and a low regenerative cell count (Fig 3c; d). Caterpillars fed on leaves of the insect resistant soybean IAC-17 had a high number of regenerative cells (Fig. 3e), discontinuities in the epithelium and disruption of digestive cells due to number and growth of goblet cells, which cavities were dilated losing their calyx form turning shapeless and disorganized in appearance (Fig. 3f). The midgut of *A. gemmatalis* caterpillars fed on leaves of the insect resistant soybean IAC-24, showed epithelium detachment from the basement membrane including regenerative cells. Digestive cells had nuclei with predominance of condensed chromatin and a large number of vacuoles in the cytoplasm (Fig 3g; h). Soybean varieties did not affect the peritrophic membrane of *A. gemmatalis* caterpillars.

Flavonoids consumption through artificial diets generate important damages in *A. gemmatalis* midgut (Fig 3i-k). However, there are not specific damages caused for a flavonoid consumption in particular, so artificial diet with flavonoids treatments are describe in general. In the endoperitrophic space and the peritrophic membrane many cell fragments are dispersed, which indicate an important cell's death. The globet cells increase in size and were deformed. The digestive cells present high vacuolization in cytoplasm with dislocated and deformed nuclei.

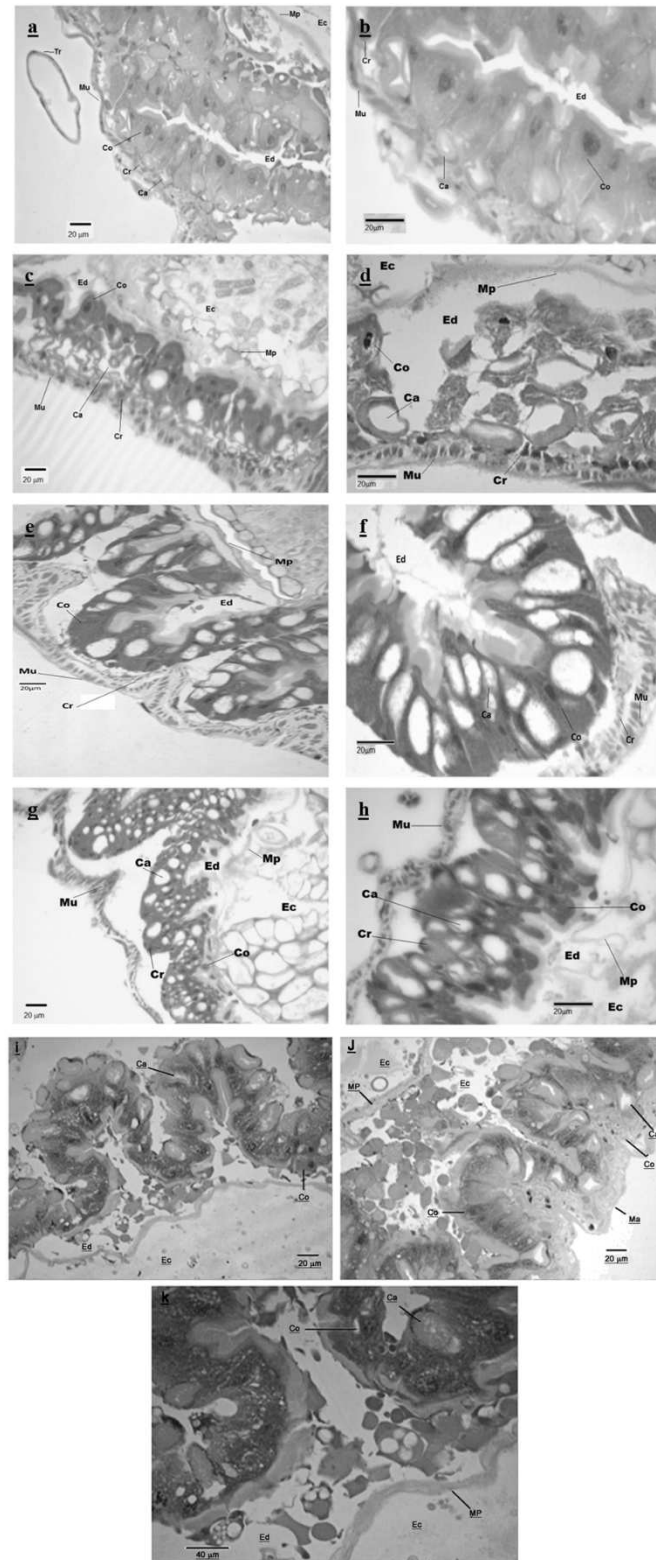


Fig. 3 Light micrographs of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillar fed on: artificial diet without flavonoids (a: 20x, b: 40x); susceptible “IAC PL1” (c: 20x d: 40x); and resistant IAC-17 (e: 20x, f: 40x), IAC-24 (g: 20x, h: 40x) soybean cultivars; artificial diets added with flavonoids (i-j: 20x, k: 40x).

Mu= muscle layer; Co= columnar cell; Cr= regenerative cell; Ca= goblet cell; Ed= endoperitrophic space; Ec= ectoperitrophic space; Mp= peritrophic membrane.

2.4 Discussion

Anticarsia gemmatalis caterpillars are important soybean pests. Secondary metabolites such as flavonoids, produced constitutively for defense against herbivores (Anshul et al. 2013; Nenaah 2012; Céspedes et al. 2014), are used to obtain insect resistant varieties. These compounds affect caterpillar midgut morphology, cell physiology (Vandock et al. 2012), and biology (Salvador et al. 2010; Silva et al. 2016b). Resistant soybean varieties affect the midgut morphology and survival of *A. gemmatalis* caterpillars.

The high concentrations of the daidzein in the resistant soybean varieties IAC-17 and IAC-24 may be responsible for their resistance to *A. gemmatalis* and also to *Piezodorus guildinii* (Westwood) and *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae) because this compound is an important antibiosis agent for insects (Silva et al. 2013). Similar concentrations of quercetin and rutin in the three soybean varieties support their common levels in leaves of this plant (Magarelli et al. 2014), whereas daidzein has been found in high concentrations in soybean seeds (John et al. 2013; Kim et al. 2014). These compounds are part of plant constitutive defences (Zavala et al. 2015) and function synergistically against herbivorous insects (Barbehenn and Kochmanski 2013; War et al. 2013).

Daidzein determined in the wild soybean *Glycine soja* (Sieb et Zucc.) (Leguminosae: Papilionoidae) inhibits growth of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars (Zhou et al. 2011). However, the development, fertility, and survival of *Lymantria dispar* (Linnaeus) (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars were not affected when fed on artificial diets with different daidzein concentrations. Which may be due to this herbivore being a generalist and naturally exposed to this flavonoid (Karowe and Radi 2011). Quercetin and rutin are generally better studied and were effective against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Brousalis et al. 2010), *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae), *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) (Wang et al. 2011) larvae and *S. litura*, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Jadhav et al. 2012; Pandey et al. 2012) and *A. gemmatalis* (Gazzoni et al. 1997) caterpillars.

The higher mortality of *A. gemmatalis* caterpillars fed on the resistant soybean varieties IAC-17 and IAC-24, than for those fed on the susceptible IAC-PL1 may be due to damage in the caterpillar midgut. Probably caused by deleterious effects of flavonoids acting synergistically, as it was confirmed in results of survival caterpillars fed on artificial diets containing these compounds. This high mortality of *A. gemmatalis* also agrees with similar results on the resistant soybean variety IAC-100 (Piubelli et al. 2005). Artificial diets with daidzein, quercetin and rutin also caused significant mortality of *A. gemmatalis* caterpillars as previously demonstrated in similar experiments combining quercetin and rutin (Gazzoni et al. 1997; Salvador et al. 2010). Also causing mortality on *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) larvae (Nenaah et al. 2013).

Consumption of resistant soybean varieties, especially IAC-17 negatively affect the mass growth of *A. gemmatalis* caterpillars in fourth and fifth instar. Artificial diets containing flavonoids had no effect on larval stage duration nor caterpillar and pupal weight, similar to that of *P. guildinii* adults fed on IAC-17 and IAC-24 varieties (Silva et al. 2013). Rutin has been demonstrated as a dangerous flavonoid for caterpillars because of its anti-nutritional effects (Tavares et al. 2015; Silva et al. 2016b), possibly more than daidzein. However, our results point to a synergistic effect of flavonoids combination and a major effect of daidzein due to higher concentrations in the soybean varieties tested. In spite of, artificial diets containing daidzein have no effect on survival and development of *L. dispar* caterpillars (Karowe and Radi 2011), although it may be a defense against phytophagous hemipterans (Piubelli et al. 2005). Rutin concentrations in the soybean varieties tested and artificial diet did not prolong the *A. gemmatalis* larval stage, contrary to that of this species, consuming 0.45, 0.91, and 1.82 mg/g of this compound in artificial diets (Salvador et al. 2010).

The midgut morphology of *A. gemmatalis* caterpillars fed on an artificial diet without flavonoids agrees with descriptions for this lepidopteran fed on similar diets without flavonoids or other compounds that may alter cell morphology (Salvador et al. 2010; Gomes et al. 2013). *Anticarsia gemmatalis* caterpillar midgut morphological alterations such as detachments of the epithelium, vacuolization, increase of goblet cell compartment, and tissue discontinuity for the resistant soybean varieties may be due to a synergistic action of daidzein, quercetin and rutin flavonoids, similar to that reported for

L. dispar (Barbehenn and Kochmanski 2013). This may be due to oxidative stress changing glutathione redox balance in the caterpillar midgut. Similar changes in the midgut morphology were also reported for *A. gemmatalis* (Knaak and Fiuza 2005) and *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars (Sousa et al. 2010) infected with *Bacillus thuringensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) and multiple nuclear polyhedrosis virus. In the same way, extracts seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. (Sapindales: Meliaceae) and leaf of *Clerodendrum infortunatum* and *Eupatorium odoratum* in artificial diets generated similar effects in the midgut of *A. gemmatalis* caterpillar (Almeida et al. 2014) and *Orthaga exvinacea* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) (Ranjini and Nambiar. 2015) respectively

Vacuolization of the columnar and goblet cell cytoplasm may be due to the increased ion flow, because these cells are responsible for the active transportation of potassium ions from hemolymph into the gut lumen (Gomes et al. 2013). These detoxification vacuoles (Sousa et al. 2010) neutralize the deleterious effects of flavonoids. The lack of damage to the peritrophic membrane by resistant cultivars may be explained by the presence of several layers (Levy et al. 2011) with more chitin and a thicker epithelium (Silva et al. 2016a) on *A. gemmatalis* caterpillars. The soybean caterpillar used in this study has a dark phenotype, dominant in dense populations, and is resistant to multiple nuclear polyhedrosis virus (Silva et al. 2016a).

The resistant soybean varieties IAC-17 and IAC-24 affected survivor, mass growth and the midgut morphology of *A. gemmatalis* caterpillars, mainly the digestive and goblet cells. Epithelium discontinuities, detachment of the muscle wall, and vacuolization of digestive cell cytoplasm show the toxic effects of daidzein, quercetin, and rutin flavonoids functioning synergistically and causing high *A. gemmatalis* caterpillars' mortality. Concentrations of these flavonoids in different combinations on artificial diets points and strength the flavonoids synergy hypothesis for development of soybean varieties and even botanical insecticides with increased resistance to herbivore insects.

2.5 Compliance with Ethical Standards:

This study was funded by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES)”, “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” and “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP)”. Authors declare no conflict or interests. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

2.6 References

Almeida GD De, Zanuncio JC, Pratisoli D, Polanczyk RA, Azevedo DO, Serrão JE (2014) Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebr Surviv J* 11:79–86.

Anshul N, Bhakuni RS, Gaur R, Singh D (2013) Isomeric flavonoids of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) as insect growth inhibitors against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomol* 96:897–903. doi: 10.1653/024.096.0325

Barbehenn RV, Kochmanski J (2013) Searching for synergism: effects of combinations of phenolic compounds and other toxins on oxidative stress in *Lymantria dispar* caterpillars. *Chemoecology* 23:219–231. doi: 10.1007/s00049-013-0136-z

Binder BF, Bowers WS (1994) Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last-instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 23:127–134. doi: 10.1016/0020-7322(94)90006-X

Brito AF, Braconi CT, Weidmann M, Dilcher M, Alves JMP, Gruber A, Zanotto PMA (2015) The pangenome of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Genome Biol Evol* 8:94–108. doi: 10.1093/gbe/evv231

Broussalis AM, Clemente S, Ferraro GE (2010) *Hybanthus parviflorus* (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant. *Crop Prot* 29:953–956. doi: 10.1016/j.cropro.2010.06.001

Céspedes CL, Salazar JR, Ariza-Castolo A, Yamaguchi L, Ávila JG, Aqueveque P, Kubo I, Alarcón J (2014) Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environ Res* 132:391–406. doi: 10.1016/j.envres.2014.04.003

- Chiang AS, Yen DF, Peng WK (1986) Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol 47:333–339. doi: 10.1016/0022-2011(86)90104-7
- Conab -Companhia Nacional de Abastecimento- (2016) Observatório Agrícola. Acompanhamento da Safra Agrícola; Grãos. V.3 Safra 2015/2016 N.9. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf. Accessed 19 September 2016
- Eisemann CH, Binnington KC (1994) The peritrophic membrane: Its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. Int J Parasitol 24:15–26. doi: 10.1016/0020-7519(94)90055-8
- Gazzoni, D.L., Hülsmeier, A., Hoffmann-Campo, C.B. 1997. Effect of diferente rates of quercetin and rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 32(7): 673-681.
- Gazzoni DL, Hülsmeier A, Hoffmann-Campo CB (1997) Effect of different rates of quercetin and rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis*. Pesqui Agropecu Bras 32:673–681.
- Gomes FM, Carvalho DB, Machado EA, Miranda K (2013) Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. Cell Tissue Res 352:313–326. doi: 10.1007/s00441-013-1563-4
- Jadhav DR, Mallikarjuna N, Rathore A, Pokle D (2012) Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). Asian J. Agric. Sci 4:298–307.
- Jesus FG, Boiça AL, Alves GCS, Zanuncio JC (2014) Behavior, development and predation of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed transgenic and conventional cotton cultivars. Ann Entomol Soc Am 107:601–606. doi: 10.1603/AN13100
- John KMM, Jung ES, Lee S, Kim JS, Lee CH (2013) Primary and secondary metabolites variation of soybean contaminated with *Aspergillus sojae*. Food Res Int 54:487–494. doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.045

- Karowe DN, Radi JK (2011) Are the phytoestrogens genistein and daidzein anti-herbivore defenses? A test using the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *J Chem Ecol* 37:830–837. doi: 10.1007/s10886-011-9986-4
- Kim JK, Kim EH, Park I, Yu BR, Lim JD, Lee JS, Lee JH, Kim SH, Chung IM (2014) Isoflavones profiling of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasms and their correlations with metabolic pathways. *Food Chem* 153:258–264. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.066
- Knaak, N., Fiuza, L.M. 2005. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with *Nucleopolyhedrovirus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. *Brazilian Journal of Microbiology* 36(2): 196-200.
- Knaak N, Fiuza LM (2005) Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with *Nucleopolyhedrovirus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. *Brazilian J Microbiol* 36:196–200. doi: 10.1590/S1517 83822005000200017
- Levy SM, Falleiros ÂMF, Moscardi F, Gregório EA (2011) The role of peritrophic membrane in the resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) during the infection by its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Arthropod Struct Dev* 40:429–434. doi: 10.1016/j.asd.2011.05.003
- Levy SM, Moscardi F, Falleiros ÂMF, Silva RJ, Gregório EA (2009) A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *J Invertebr Pathol* 101:17–22. doi: 10.1016/j.jip.2009.02.010
- Levy SM, Falleiros ÂMF, Moscardi F, Gregório EA, Toledo LA (2008) Ultramorphology of digestive tract of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) at final larval development. *Semin Agrar* 29:313–322.
- Lourenção AL, Reco PC, Braga NR, Valle JGE, Pinheiro JB (2010) Yield of soybean genotypes under infestation of the velvetbean caterpillar and stink bugs. *Neotrop. Entomol.* 39: 275–281.
- Magarelli G, Lima LHC, Silva JG, Souza JR, Castro CSP (2014) Rutin and total isoflavone determination in soybean at different growth stages by using voltammetric methods. *Microchem J* 117:149–155. doi: 10.1016/j.microc.2014.06.019

- Matos Neto FDC, Zanuncio JC, Picanço MC, Cruz I (2002) Reproductive characteristics of the predator *Podisus nigrispinus* fed with an insect resistant soybean variety. *Pesqui Agropecuária Bras* 37:917–924. doi: 10.1590/S0100-204X2002000700004
- Miranda MAC, Braga NR, Lourenção AL, Miranda FTS, Unêda SH, Ito MF (2003) Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos. *Bragantia* 62:29–37.
- Nascimento IR, Murata AT, Bortoli SA, Lopes LMX (2003) Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Pest Manag Sci* 60:413–416. doi: 10.1002/ps.805
- Nenaah GE (2013) Potential of using flavonoids, latex and extracts from *Calotropis procera* (Ait.) as grain protectants against two coleopteran pests of stored rice. *Ind Crops Prod* 45:327–334. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.12.043
- Pandey A, Misra P, Chandrashekar K, Trivedi PK (2012) Development of *AtMYB12*-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. *Plant Cell Rep* 31:1867–1876. doi: 10.1007/s00299-012-1300-6
- Panizzi AR (2013) History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop Entomol* 42:119–127. doi: 10.1007/s13744-013-0111-y
- Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, Oliveira MCN (2005) Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *J Chem Ecol* 31:1509–1525. doi: 10.1007/s10886-005-5794-z
- Ranjini KR, Nambiar Jagadeesh G. (2015) Histopathological effects of leaf extracts of *Clerodendrum infortunatum* and *Eupatorium odoratum* on the midgut tissue of sixth instar larvae of *Orthaga exvinacea* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Entomol. Zool. Stud.* 3: 296–301
- R Development Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ribeiro RC, Zanuncio TV, Ramalho FS, Silva CAD, Serrão JE, Zanuncio JC (2015) Feeding and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) with

sublethal concentrations of ten condiments essential oils. *Ind Crops Prod* 74:139–143. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.057

Riffel CT, Garcia MS, Santi AL, Basso CJ, Della Flora LP, Cherubin MR, Eitelwein MT (2012) Sample density applies to the georeferenced monitoring of defoliating caterpillars in soybean crop. *Cienc Rural* 42:2112–2119. doi: 10.1590/S0103-84782012005000116

Salvador MC, Boiça AL, Oliveira MCN, Graça JP, Silva DM, Hoffmann-Campo CB (2010) Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? *Neotrop Entomol* 39:774–83. doi: S1519-566X2010000500017

Silva FWS, Serrão JE, Elliot SL (2016a) Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. *Ecol Entomol* 41:451–458. doi: 10.1111/een.12315

Silva JB, Lazarini E, Silva AM, Reco PC (2010) Comparative study among different cultivars at conventional time in Selvíria, MS: agronomical characteristics and productivity *Biosci. J* 26: 747–754.

Silva JPGF, Baldin ELL, Souza ES, Canassa VF, Lourenção AL (2013) Characterization of antibiosis to the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean entries. *J Pest Sci* 86:649–657. doi: 10.1007/s10340-013-0527-5

Silva TRFB, Almeida ACS, Moura TL, Silva AR, Freitas SS, Jesus FG (2016b) Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Sci Agron* 38:165. doi: 10.4025/actasciagron.v38i2.27956

Sousa MEC, Santos FAB, Wanderley-Teixeira V, Teixeira ÁAC, Siqueira HÁA, Alves LC, Torres JB (2010) Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J Insect Physiol* 56:1913–1919. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.014

Souza ES, Baldin ELL, Silva JPGF, Lourenção AL (2013) Feeding preference of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and attractiveness of soybean genotypes. *Chilean J. Agric. Res.* 73:351–357. doi: 10.4067/S0718-58392013000400004

- Souza ES, Silva JP, Baldin EL, Pierozzi CG, Cunha LS, Canassa VF, Pannuti LE, Lourenção AL (2016) Response of soybean genotypes challenged by a stink bug complex (Hemiptera: Pentatomidae) J. Econ. Entomol. 2:898–906. doi: 10.1093/jee/tov341
- Souza ES, Canassa VF, Bentivenha JPF, Baldin ELL, Pierozzi CG, Lourenção AL, Pannuti LER (2017) Variable Levels of Resistance of Soybean Genotypes on the Performance of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) J. Econ. Entomol. 110: 2672–2678. doi: 10.1093/jee/tox254.
- Tavares WS, Pereira AI A, Freitas SS, Serrão JE, Zanuncio JC (2014) The chemical exploration of *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) in Brazil, with emphasis on insecticidal response: A review. J Sci Ind Res (India) 73:465–468.
- Terra WR (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch Insect Biochem Physiol 47:47–61. doi: 10.1002/arch.1036
- Vandock KP, Mitchell MJ, Fioravanti CF (2012) effects of plant flavonoids on *Manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. Arch Insect Biochem Physiol 80:15–25. doi: 10.1002/arch.21022
- Vianna UR, Pratisoli D, Zanuncio JC, Lima ER, Brunner J, Pereira FF, Serrão JE (2009) Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. Ecotoxicology 18:180–186. doi: 10.1007/s10646-008-0270-5
- Wang XG, Wei XY, Huang XY, Shen LT, Tian YQ, Xu HH (2011) Insecticidal constructure and bioactivities of compounds from *Ficus sarmentosa* var. *henryi*. Agric Sci China 10:1402–1409. doi: 10.1016/S1671-2927(11)60133-8
- War, A.R., Paulraj, M.G., Hussain, B., Buhroo, A.A., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C. 2013. Effect of plant secondary metabolites on legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. Journal of Pest Science 86(3): 399-408.
- War AR, Paulraj MG, Hussain B, Buhroo AA, Ignacimuthu S, Sharma HC (2013) Effect of plant secondary metabolites on legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. J Pest Sci (2004) 86:399–408. doi: 10.1007/s10340-013-0485-y
- Zavala JA, Mazza CA, Dillon FM, Chludil HD, Ballaré CL (2015) Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar

UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions. *Plant Cell Environ* 38:920–8. doi: 10.1111/pce.12368

Zhou Y-Y, Luo S-H, Yi T-S, Li C-H, Luo Q, Hua J, Liu Y, Li S-H (2011) Secondary metabolites from *Glycine soja* and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. *J Agric Food Chem* 59:6004–6010. doi: 10.1021/jf200821p

Capítulo 3: Respostas metabólicas de variedades de soja contrastantes para resistência e susceptibilidade à *Anticarsia gemmatalis*

Resumo

A cultura da soja é importante para a economia mundial e pela grande área cultivada está constantemente exposta ao ataque de insetos-praga o que vai em detrimento da produtividade do grão. Um exemplo de praga desfolhadora é a *A. gemmatalis*, considerada como uma das principais pragas da soja no hemisfério ocidental. O plano de manejo integrado de pragas no Brasil inclui o desenvolvimento de variedades resistentes e produtivas por melhoramento genético. Assim existem plantas desenvolvidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) com diferentes níveis de resistência a insetos-praga. A metabolômica e proteômica são duas poderosas ferramentas que oferecem a possibilidade de avaliação da resposta global das plantas a diferentes tipos de estresses, e podem ser aplicadas na interação planta-inseto. No entanto, não se conhecem os mecanismos da resistência nesses genótipos, portanto o objetivo deste trabalho foi determinar as respostas metabólicas e fisiológicas de variedades de soja contrastantes para resistência e susceptibilidade a lagarta-da-soja. Para isso, as plantas de soja susceptíveis e resistentes foram expostas a desfolhamento por *A. gemmatalis* e as respostas fito-hormonais e metabolômicas foram analisadas por técnicas de LC-MS e GC-MS respectivamente. Utilizando o mesmo modelo experimental, o proteoma das plantas foi avaliado por 2DE e as proteínas com a expressão diferencial foram identificadas. Os resultados mostraram diferenças na fisiologia (fito-hormônios) entre os genótipos susceptíveis e resistentes, sendo que os maiores níveis do ácido salicílico foram maiores nas resistentes e de ácido Jasmônico, na suscetível. As análises de metabólitos indicaram diferenças entre alguns compostos intermediários das vias de defesa e compostos dos quais tem sido relatados que tem efeito negativo na biologia de insetos. A proteômica mostrou mudanças consideráveis no proteoma em resposta à presença de insetos nas variedades, indicando que houve vias metabólicas afetadas pela herbivoria.

Palavras chave: Genótipos, defesa, metabolômica, proteômica

Abstract

Soybean culture is important to the world economy and the large area under cultivation is constantly exposed to insect-pest attack, which is detrimental to grain yield. An example of a defoliant pest is *A. gemmatalis*, considered as one of the main soybean pests in the Western Hemisphere. The integrated pest management plan in Brazil includes the development of resistant and productive varieties for genetic improvement. Thus there are plants developed by the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) resistant to insect pests. Metabolic and proteomics are two powerful tools that offer the possibility of deepening the global response of plants to different types of stresses and can be applied in plant-insect interaction. However, is not known the causes of resistance in this type of plants, so the objective of this work was to deepen the metabolic responses of contrasting soybean varieties for resistance and susceptibility to soybean caterpillar. For this, susceptible and resistant soybean plants were exposed to *A. gemmatalis* defoliation, and the phytohormonal and metabolic response was analyzed by LC-MS and GC-MS techniques respectively. Likewise, the proteome of the plants was isolated, analyzed and the different proteins sequenced. Likewise, the proteome of the plants was isolated, analyzed and the different proteins sequenced. The results showed differences in the physiology (phytohormones) between the susceptible and resistant genotypes, and the highest levels of salicylic acid were present in the resistant and Jasmonic acid in susceptible. Metabolite analyzes showed differences between some intermediate compounds of the defense pathways and compounds that to have a negative effect on insect biology. Proteomics showed changes in proteome response to insect presence in the varieties, indicating that there were metabolic pathways affected by herbivory.

Key words: Genotypes, defense, metabolic, proteomics

3.1 Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) corresponde a 6% da terra cultivada no mundo (HARTMAN et al., 2011), está entre as plantas mais importantes como fonte de alimentos em humanos, proteínas de alimentação animal, óleo de cozinha (RIBEIRO et al., 2011), fito-estrógenos (SHAHIDI, 2009) e biodiesel. Contribui substancialmente à economia do Brasil, por ser o produto de maior exportação nos últimos anos, sendo o segundo maior produtor mundial (AMAZONAS, 2017). As grandes lavouras desta cultura encontram-se expostas ao dano ocasionado por patógenos e insetos praga, pelo qual a soja é um candidato principal para melhoramento genético e desenvolvimento de variedades resistentes no Brasil (LOURENÇÃO et al., 1989; MIRANDA et al., 2003a; 2003b). Insetos desfolhadores como *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) constituem uma das pragas principais da soja no Brasil e levam à diminuição da produtividade (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; DA SILVA et al., 2012). Alguns exemplos de genótipos de soja resistentes a insetos praga desenvolvidos pelo Instituto Agronômico de Campinas são, IAC 100 (ROSSETTO et al., 1987), IAC 17 e “IAC 19” (VALLE e LOURENÇÃO, 2002), e IAC 23 e IAC 24 (MIRANDA et al., 2003a, 2003b), especificamente à *A. gemmatalis* são os cultivares IAC 17 e IAC 24.

Para contrapor a presença de herbívoros, as plantas podem se defender de forma direta e indireta (HOWE e JANDER, 2008; DUDAREVA et al., 2006; ARIMURA et al., 2009). As defesas diretas são mediadas pelas características próprias das plantas que afetam a biologia do herbívoro, (como pelos, tricomas, espinhas e folhas grossas) (HOWE e JANDER, et al. 2008; DUDAREVA et al., 2006; ARIMURA et al., 2009), e/ou produção de aleloquímicos (compostos tóxicos) como metabólitos secundários e proteínas (peptídeos, inibidores de enzimas digestivas), terpenoides, alcaloides, antocianinas, (fenóis e quinonas) (SMITH e CLEMENT, 2012). Estes compostos podem ter efeito tóxico, repelente e/ou efeitos antinutricionais nos herbívoros (WAR et al., 2012), e retardar seu desenvolvimento até causar-lhes a morte (USHA e JYOTHSNA, 2010; WAR et al., 2011a; 2011b). As defesas indiretas contra os insetos envolvem uma liberação de uma mistura de compostos voláteis pela planta atacada que pode atrair os inimigos naturais dos herbívoros. Assim, a planta pode prover alimentos para dar abrigo a estes, de forma que eles possam permanecer por mais tempo nela, e melhorar a efetividade da defesa da planta (ARIMURA et al., 2009).

A resistência de uma planta qualquer, pode ser classificada nas três seguintes categorias: Antibiose, antixenose e tolerância. A antibiose ocorre quando os insetos usam a planta normalmente como o seu hospedeiro, mas a planta afeta seu desenvolvimento, podendo até causar a morte do herbívoro ou seu fracasso reprodutivo (SMITH, 2005; WAR *et al.*, 2012). A antixenose é caracterizada pela presença de fatores morfológicos ou químicos que afetam negativamente o comportamento do inseto, de tal forma que ele não consegue colonizar a planta ou simplesmente a rejeita. A tolerância é a habilidade da planta para resistir ou se recuperar do dano causado pelo inseto sem afetar a biologia ou comportamento dele (SMITH e CLEMENT, 2012; WAR *et al.*, 2012). Os mecanismos de defesa das plantas podem incluir até as três categorias de resistência juntas, com o que a planta garante a resistência às pragas (SMITH e CLEMENT, 2012; WAR *et al.*, 2012).

A metabômica e a proteômica, em conjunto, são ferramentas bioanalíticas robustas para analisar e monitorar detalhadamente o metabolismo das plantas expostas a diferentes tipos de estresse (DE VOS *et al.*, 2007; NAKABAYASHI e SAITO, 2013; SCHAUER e FERNIE 2006). Proveem informação importante para a aplicação na biotecnologia de plantas, seleção assistida de biomarcadores e indústrias agroquímica e farmacêutica, podendo impulsionar à produção agrícola (ALIFERIS, K.A. e CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, 2011). Com relação a soja, a metabômica em conjunto com a proteômica, frequentemente, tem sido usada para melhorar o entendimento das respostas das plantas à diferentes tipos de estresse, especialmente à seca (DAS, *et al.*, 2017), salino (ZHANG, 2016), por excesso de água (KOMATSU, *et al.*, 2014) e para analisar a interação entre soja e organismos patógenos (ALIFERIS *et al.*, 2014). Cada uma dessas abordagens das ômicas podem fornecer informações úteis sobre interações entre plantas e insetos, de forma que os resultados possam ser integrados e estudar as respostas como um todo, não individualmente (BARAH e BONES, 2015).

Com tudo o que as análises de metabômica e proteômica podem oferecer sobre as vias metabólicas e regulatórias, o objetivo deste projeto foi, estudar o efeito desde o ponto de vista bioquímico e fisiológico, do dano ocasionado pela mastigação ocasionada pela *A. gemmatilis* em plantas suscetíveis e resistentes, e comparar as respostas à herbivoria entre os cultivares em estudo.

3.2 Materiais e metodos

3.2.1 Crescimento das plantas e estresse biótico

O cultivar UFV TN 105 AP, apresenta susceptibilidade a lagarta da soja, com padrão de crescimento tardio (VASCONCELOS, 2010). Não sintetiza algumas enzimas da família das LOXs, originado a partir de retrocruzamentos do cultivar monarca e o cultivar BARC-8 (NUNES, 2011, MORAES, 2006), foi fornecido pela UFV, Viçosa, Minas Gerais (Brasil). Os cultivares “IAC 17” foram os genótipos considerados como resistentes, de ciclo precoce e semiprecoce, de crescimento determinado, originados a partir dos cruzamentos D 72-9601-1 x ‘IAC 8’ e IAC80-1177 x IAC83-288, respectivamente, (MIRANDA *et al.*, 2003a, MIRANDA *et al.*, 2003b; LOURENÇÃO *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2013; VALLE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2013, VIEIRA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2015), foram fornecidos pelo Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, (Brasil). As larvas de *A. gemmatalis* foram tomadas da criação massal do laboratório de Enzimologia de proteínas e peptídeos da UFV.

As plantas de soja das variedades UFV TN 105 AP (105AP), “IAC 17” e “IAC 24” foram semeadas e mantidas em casa de vegetação a temperaturas entre 22,1 a 35,1°C, até chegar a estádios entre V4 e V6.

Para as análises de proteômica, 3 pool de 14 plantas das variedades de soja UFV TN 105 AP e “IAC 17” foram submetidas a desfolhamento por lagartas neonatas de *A. gemmatalis* por 90h.

Para as análises de metabolômica, três pool de três plantas UFV TN 105 AP, “IAC 17” e “IAC 24” foram submetidas a desfolhação pelas lagartas de terceiro instar de *A. gemmatalis* e avaliadas para os tempos de infestação de 12, 24 e 48h. Terminado cada tempo de infestação, para cada experimento, foram coletadas as folhas de cada variedade e armazenadas a -80°C. O controle para cada variedade foram as plantas sem infestar.

3.2.2 Analises de fito-hormônios

As amostras de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal. Em seguida adicionou-se 200 µL de solução extratora (metanol 20% - Isopropanol 79% - ácido acético 1%) a 100 mg de material vegetal e ultrassom por 30 min e 30 min e centrifugado 14.000 xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o procedimento repetido. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido

cuidadosamente para novos tubos. Um novo ciclo de extração foi realizado com o precipitado da extração anterior para maximizar a eficiência de extração. As amostras contendo os hormônios extraídos foram armazenadas a -80°C até o momento da análise por LC/MS do tipo UHPLC QqQ. Os fito-hormônios analisados foram Ácido absícico (ABA), ACC-etileno, Ácido Indol Acético (AIA), Ácido Jasmônico (AJ), Metil-Jasmonato (Me-JÁ), Ácido salicílico (AS), *trans*-Zeatin.

Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em *vials* e 5,0 µL dos extratos foram injetado no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se uma coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min acoplada *online* a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada hormônio e monitorou a amostra no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) para permitir a detecção dos hormônios (Tabela S1).

Tabela S1. Lista de transição dos íons monitorados para análises de quantificação dos fito-hormônios de folhas de soja por MRM. O modo scan, a massa molecular do íon e dos respectivos fragmentos dos íons são indicados.

FITO-HORMONES	MS1	MS2	SCAN MODE
Zeatina	220	202	Positivo
ACC	106	56	Positivo
AIA	176	130	Positivo
ABA	263	153	Negativo
AS	137	93	Negativo
MeJa	225	151	Negativo
JA	209	59	Negativo

Os ensaios foram realizados com três réplicas biológicas de cada tratamento. Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o *software MassHunter* para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada hormônio. Uma curva padrão de cada hormônio, variando concentrações de 0,1 a 300 ng/mL, foi utilizada para converter os valores de área dos metabólitos identificados em valores de concentração expressados em ng de hormônio/g de tecido vegetal.

As tabelas que contém os resultados dos fito-hormônios identificados e suas intensidades foram normalizadas pela massa do tecido fresco. Os dados foram analisados estatisticamente na plataforma MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

3.2.3 Extração de metabólitos e derivatização química para análises de GC/MS

As amostras de tecido de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente foram usados 50 mg do pó. Foram adicionados 1.5 ml da solução de extração água:metanol:clorofórmio. As amostras foram agitadas no termomixer por 30 min a 4 °C, centrifugadas a 14,000 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, foram adicionados 750µL de água e as amostras foram vortexadas e novamente centrifugadas a 14000 g por 5 min. Uma alíquota de sobrenadante foi transferida a um novo tubo e secada por centrifugação a vácuo. As amostras secas foram dissolvidas em *methoxyamine pyridine* (40µL de uma solução de 20 mg/mL), homogeneizadas em vortex por 30s e incubadas por 2h at 37 °C em agitação. Passado o tempo foram adicionados 70µL do reagente *N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide* (MSTFA), e a mistura foi incubada por 30 min a 37 °C (LISEC et al., 2006).

3.2.3.1 Análise de perfil metabólico por GC/MS

As amostras foram analisadas no sistema GC/MS Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 mm (MDN-35) operando de acordo com Lisec e colaboradores (2006). Amostras foram injetadas no modo *splitless* a 230°C e carregadas pelo fluxo de gás (fluxo contínuo de hélio) de 2 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80°C e, em seguida, aumentou-se 15°C/min até alcançar 330°C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min. O espectro de massa foi obtido pelo método de full-scan numa faixa entre 33 a 600 m/z. Neste processamento foi também gerado uma lista contendo os tempos de retenção cromatográfico dos padrões internos (*n*-alcanos) utilizados para cálculo dos índices de retenção de cada íon fragmentado.

3.2.3.2 Processamento de dados e identificação de metabólitos

Os espectros de GC/MS foram exportados, processados e convertidos a formato CDF usando o pacote ChromaTof v 5.0 e os perfis foram analisados automaticamente pelo programa *TargetSearch* (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009). Um *script* para identificação e quantificação de metabólitos foi gerado e posteriormente analisado no *software* R (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009) com parâmetros de processamento e alinhamento otimizados para a plataforma GC/TOF Agilent. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: *massRange* (faixa de massas) de 85-500 Da; *IntThreshold* (intensidade mínima) de 50; *TopMasses* (10 massas mais intensas) de 10; *r thresh* (correlação acima) de 0,05. Para a identificação dos metabólitos foi utilizada a biblioteca de fragmentação por impacto eletrônico (EI) e de índices de retenção (RI) *GMDB_FAMELib_TS_20110228_IS.txt*, geradas pela *GMD Mass Spectrum Reference Library* (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/download/>). As tabelas que contém os compostos identificados e sus intensidades foram normalizadas pela massa do tecido fresco, e os dados foram analisados estatisticamente na plataforma *MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

3.2.4 Proteômica

3.2.4.1 Extração de proteínas e fracionamento com PEG 15%

Para a extração das proteínas das folhas de soja foi utilizado o método de fracionamento/precipitação de proteínas abundantes descrita por Aryal et al. (2012) com algumas modificações. As folhas de soja foram previamente maceradas até pó com nitrogénio líquido. Alíquota de aproximadamente 3.0 g foram ressuspendidos em 10 ml do tampão de extração [Tris-HCl 0.5M (pH 8.0), MgCl₂ 20mM, Triton X-100 2% e β-mercaptoethanol 2%, protease inhibitor cocktail 0.2% (P-9599, Sigma Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail (P-0044, Sigma Aldrich) 1%]. As amostras foram posteriormente homogeneizadas por vórtex durante 30s, a solução foi filtrada e o filtrado coletado. Em seguida, 10mL do mesmo tampão de extração contendo polietilenoglicol PEG 4000 30% foram adicionados a 10 mL do filtrado. A solução foi homogeneizada de novo no vórtex por 30s, e mantida no gelo por 30 min e posteriormente centrifugada 3200 x g for 20 min a 4°C. O sobrenadante que continha as proteínas de baixa abundância foi recolhido e precipitado com um volume de ácido tricloroacético 20% em acetona, por 16

hs a -20° C. Posteriormente foi centrifugado a 6000 x g for 30 minutes a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido e lavado por dois ciclos com acetona 80% em gelo e centrifugado a 6000 x g for 10 minutes at 4° C. Finalmente foi lavado com etanol 70% e secado a temperatura ambiente. O extrato proteico foi solubilizado em tampão de solubilização que contem uréia 7M, thiouréia 2M e CHAPS 2%. A solução foi solubilizada usando o UltraSonic Processor (Model GE 50) por ciclos de 5 a 10 s até a completa solubilização do pellet. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.2.4.2 Separação de proteínas por eletroforese bidimensional de proteínas (2DE)

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em IPG strip pH 3-10 (GE Healthcare) de 24 cm. Inicialmente as fitas foram reidratadas por 14-20 h com 450 uL de tampão de reidratação (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 2%, bromophenol blue 0.002%, IPG-buffer 2%, DTT 0.2%) com a adição do reagente DeStreak 50% (GE Healthcare). Cada amostras continha 1,3 mg de proteínas. Os extratos proteicos foram separados na primeira dimensão usando o sistema de focalização IPGphor3 (GE Healthcare).

Depois da focalização, as fitas foram transferidas submetidas ao tampão de equilíbrio (urea 6 M, Tris-HCl 50 mM (pH 8.8), glycerol 30% e SDS 4%) inicialmente contendo DTT 1% (p/v) e iodoacetamida 2.5% (p/v) ambos durante 15 min a temperatura ambiente. As fitas IPG foram transferidas para o frente de um gel de poliacrilamida 12% e selado com agarose 0.5%. Os géis foram corridos no sistema EthanDalt Six (GE Healthcare) a 20 mA/gel for 10 h. Após as corridas os géis foram fixados por 16 hs em solução de etanol 40% e ácido acético 10%.

3.2.4.3 Detecção e quantificação de fosfoproteínas e proteínas totais nos géis 2DE

Para detectar as proteínas fosforiladas, os géis 2DE foram incubados com o colorantes Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain kit (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito por Agrawal e Thelen (2009). Depois da coloração com Pro Q Diamond, os géis foram digitalizados no scanner com um laser FLA 5100 usando filtros de 532/580nm para a excitação e filtragem, respectivamente. As imagens que contém os spots revelados para proteínas fosforiladas foram calibrados usando o software de imagens Gauge Analysis v 3.0 software (Fujifilm, Stamford, CT).

Os mesmos géis foram submersos em solução de Azul brilhante de Coomassie coloidal por 24-48h para detectar o total de proteínas, e lavados posteriormente com água ultrapura para eliminar o excesso de solução colorante. Os géis foram conservados em solução de ácido acético 5%. Finalmente os géis foram digitalizados com o ImageScanner III (GE Healthcare) e as imagens calibradas com o Labscan v 6.0 software (GE Healthcare). Os proteomas das duas variedades infestadas e não infestadas foram comparados com o software ImageMaster2D Platinum v 7.0 software (GE Healthcare) para a determinação de spots de proteínas com abundância diferencial. Os *spots* considerados por ter diferenças de abundância e expressos diferencialmente, foram os que tiveram valores de rádio acima de 1.0 para garantir a obtenção pelo volume do *spot*, e ANOVA com *p-valor* menor de 0.05. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada tratamento.

3.2.4.4 Digestão das proteínas em gel e espectrometria de massa para sua identificação

Os *spots* de proteínas foram cortados e descoloridos em solução de bicarbonato de amônia 50mM/metanol 50%, seguido de desidratação com acetonitrila. As proteínas foram reduzidas com solução de DTT 200mM preparada em bicarbonato de amônia 100mM por 30 min a 56°C. seguido de alquilação com solução de iodoacetamida 200mM em bicarbonato de amônia 100mM por 30 min a temperatura ambiente. Os spots foram lavados com solução de bicarbonato de amônia 100mM, desidratadas com acetonitrila e secadas por centrifugação a vácuo. Para digestão proteolítica, os spots foram reidratados com solução de digestão com tripsina 20ng/uL por 20h a 37°C. Os peptídeos digeridos foram extraídos por três ciclos utilizando o tampão de extração (Acetonitrila 50%, ácido fórmico 5%) e secadas por centrifugação a vácuo.

Para análise por MALDI-TOF Os peptídeos trópticos foram ressuspensos em solução de acetonitrila 50 % acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha) a uma concentração final de 10 mg/mL. Para calibração do espectrômetro massas foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, 1 μ L de amostra e 1 μ L de matriz foram aplicados e homogeneizados em cada spot da placa de aço apropriada para a espectrometria. Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo

Ultraflex III (Bruker Daltonics). Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z). Os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do software flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 convertida para o formato *mascot generic format* (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

As listas de massas foram confrontadas contra o Banco de Dados de proteínas da espécie *Glycine max*, depositadas no UNIPROT (download em 17/12/2017), usando o software MASCOT, (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2Da e para os fragmentos de 0,5Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo MASCOT como —Uncharacterized foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas —Uncharacterized.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo aplicativo SCAFFOLD v 1.4.2 (Proteome Software INC., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (KELLER et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSHKII et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90 % de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

3.2.4.5 Caracterização funcional das proteínas

A classificação funcional das proteínas identificadas e validadas foi realizada por meio da comparação das suas sequências com as proteínas ortólogas de eucariotos

disponíveis no banco de dados *EuKarioto Orthologous Groups* (KOG) (TATUSOV et al., 2003). Nessa classificação, um ID do KOG foi atribuído a cada proteína que alinhou significativamente ($E\text{-value} < 1e-4$) com aquelas depositadas nesse banco de dados, usando o Reverse Position Specific BLAST (RPS-BLAST) (MARCHLER-BAUER, 2002; SCHÄFFER et al., 1999).

As redes de interação entre as proteínas identificadas e validadas foram reconstruídas utilizando o aplicativo STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, versão 10.5, <http://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al., 2014). Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Glycine max* como organismo de referência para às buscas nas bases de dados por meio das estratégias de textmining, experiments, database e co-expression, dentro de um nível de confiança acima de 0.40 e no máximo 5 interações na primeira chamada. O gráfico da rede de interações foi gerado no modo *confidence view*, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Análises da resposta fito-hormonal das variedades de soja

As concentrações absolutas de oito fito-hormônios foram determinadas por LC-MS (Tabela 1), para os três genótipos de soja (UFV TN 105AP, chamado como 105AP, “IAC 17” chamado como IAC17 e “IAC 24” chamado como IAC24), expostos e não expostos à infestação com *A. gemmatilis* por 0, 12, 24 e 48h.

Tabela 1. Concentração absoluta dos fito-hormônios determinada em cada tratamento, monitorados por LC-MS dos genótipos 105 AP, IAC 17 e IAC 24. Valores de concentração expressos em ng de fito-hormônio/g de material vegetal desidratado.

105 AP								
Name	105 0 SI*	105 12 SI	105 24 SI	105 48 SI	105 0 IN**	105 12 IN	105 24 IN	105 48 IN
Jasmonic Acid	99.6514088	117.915688	167.489031	79.1186115	219.502256	406.075831	267.712267	369.474238
Abscisic Acid	4.51461881	20.6034953	23.6818815	3.62646302	22.4319047	23.9558692	5.29458185	7.02780592
Salicylic Acid	4971.22031	6079.25573	6722.38955	5685.0649	3514.58785	5855.78873	4292.06651	5151.84423
Indolacetic Acid	0.74054717	1.68077909	1.54862956	1.66268861	1.11108399	1.48271621	1.91891902	4.48534646
ACC	1393.86948	1437.40007	2063.17745	1096.86751	2089.89691	1933.02817	1079.46458	1160.78995
Zeatin 1	3.3843395	1.90013627	1.64431466	1.71273226	1.2813591	2.26443705	1.31717602	2.3563302
Zeatin 2	108.049916	193.470986	205.60715	138.974085	173.492598	175.81873	138.781817	162.538632
Methyl Jasmonate	27.8594475	28.1097343	22.3142438	21.2868432	33.2246874	25.1304731	25.7984222	18.7183156
IAC 17								
Name	IAC17 0 SI	IAC17 12 SI	IAC17 24 SI	IAC17 48 SI	IAC17 0 IN	IAC17 12 IN	IAC17 24 IN	IAC17 48 IN
Jasmonic Acid	84.6082317	267.878247	155.34306	204.789012	188.429354	516.832852	312.186163	321.438223
Abscisic Acid	16.7539766	30.3262106	16.3825218	8.80050406	28.0544809	36.2164436	13.9027229	9.41008624
Salicylic Acid	8336.68961	11995.8331	9662.48109	6066.3358	11209.9202	10501.591	10338.5848	10814.015
Indolacetic Acid	0.96748718	0.55940907	1.3156455	0.81357034	2.31398408	2.1127685	3.90775301	4.40881371
ACC	1088.79562	1609.71408	824.79997	1280.27366	1361.73082	1124.18541	1015.66957	1162.1661
Zeatin 1	1.25596118	1.55712732	1.09567731	1.62218904	2.10380441	1.1171325	1.71474217	0.82459292
Zeatin 2	163.42628	241.872335	202.249761	218.328521	222.70778	132.976432	171.393376	183.29042
Methyl Jasmonate	18.7170223	26.1527538	27.9065092	24.7728294	27.5197663	23.12629	22.1159038	13.7201779
IAC 24								
Name	IAC24 0 SI	IAC24 12 SI	IAC24 24 SI	IAC24 48 SI	IAC24 0 IN	IAC24 12 IN	IAC24 24 IN	IAC24 48 IN
Jasmonic Acid	68.8965806	227.209624	130.143568	175.553847	87.8211773	249.845236	222.884172	157.735306
Abscisic Acid	12.640186	31.8134719	13.046649	8.81762112	6.29258986	22.1923431	10.1452233	6.03293506
Salicylic Acid	17061.3827	18072.6504	17114.3629	13763.2102	5511.69459	14570.6908	13395.0001	11280.8376
Indolacetic Acid	1.8531686	5.43804039	0.82085795	1.31212194	0.54972269	1.73538046	3.18482306	3.12393473
ACC	1014.76791	1121.8001	796.623794	1031.95487	1009.69402	1026.73307	1128.26903	1446.53696
Zeatin 1	1.52979423	2.52393562	2.67789672	1.21571334	0.79205811	1.4107596	1.11408219	0.84438498
Zeatin 2	156.748352	439.633055	173.357564	265.506718	126.348767	165.631316	152.110905	148.352991
Methyl Jasmonate	24.0483996	23.2996428	22.9586459	30.5944165	23.0163272	29.6956199	20.5918952	18.5272079

*t SI: Tempo Planta sem infestação. **t IN: Tempo Planta infestada

As concentrações dos fito-hormônios foram organizadas em tabelas e analisadas pela plataforma Metaboanalyst. Foi efetuada a normalização pela soma e análises de variância por ANOVA one way. Os dados foram também analisados por tempo de infestação e entre as variedades sem infestar (A, C, E e G) e infestadas (B, D, F e H), e as diferenças entre os tratamentos foi determinada pelo test de Tukey. As análises de agrupamento dos dados foram realizadas por meio da análise de componentes principais

(PCA) na plataforma MetaboAnalyst. O resultado mostrou um comportamento diferenciado entre os dois genótipos resistentes em relação ao genótipo susceptível (Figura 1).

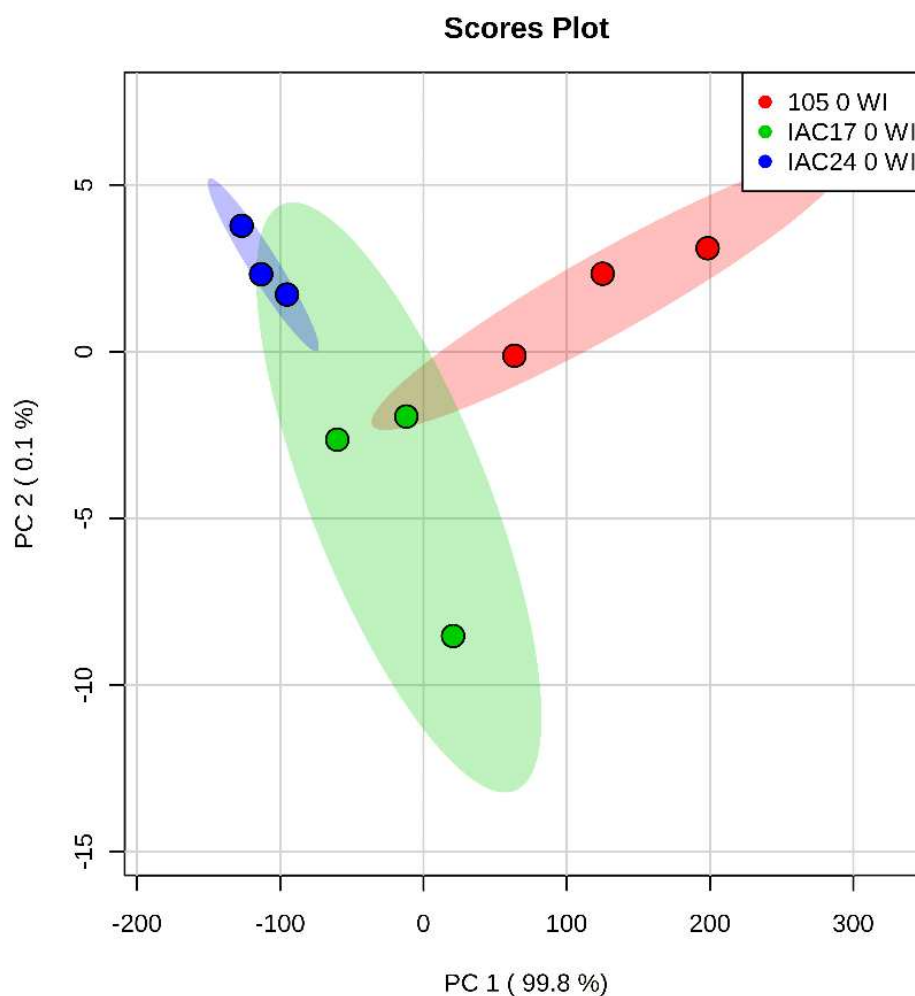


Figura 1. Análise de componentes principais para as 0h, início do experimento. 105 0 WI (105 AP sem infestar); IAC17 0 WI (IAC 17 sem infestar); IAC24 0 WI (IAC 24 sem infestar).

Ao analisar as concentrações dos fito-hormônios no tempo 0h, foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Os fito-hormônios que foram diferentes desde o início do experimento (tempo 0h) foram a ABA, ACC-etileno, AJ, AS e *trans*-Zeatina (Figura 2). Os níveis de AS foram maiores nos genótipos resistentes IAC17 e IAC24 em relação ao genótipo susceptível 105AP. Comportamento contrário foi observado para o AJ, ACC e Zeatin, sendo níveis mais elevados observados na 105AP.

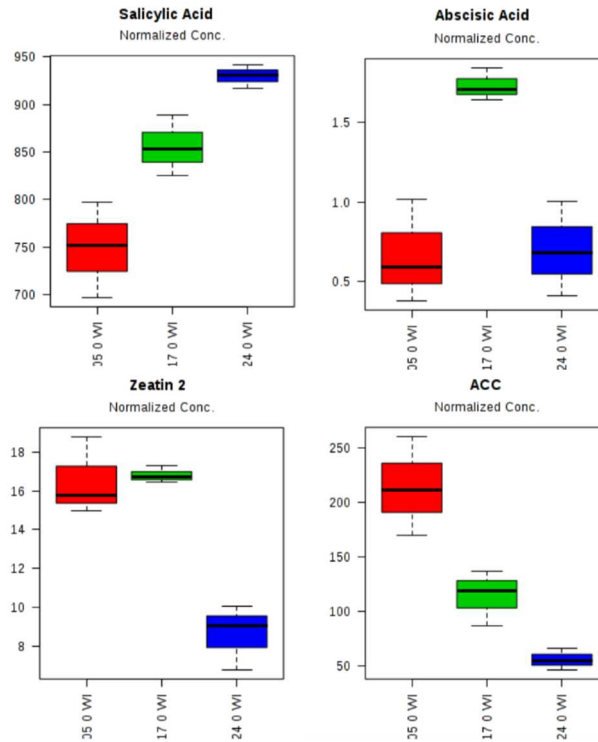


Figura 2. *Box plot* dos ito-hormônios com diferença estatisticamente no tempo inicial (0h). AB, ACC-etileno, AJ, AS, Zeatin (gráfico a esquerda). 105 0 WI (105 AP sem infestar); 17 0 WI (IAC 17 sem infestar); 24 0 WI (IAC 24 sem infestar)

A análise corresponde às 12 h de infestação apresentou diferenças estatisticamente significativas para os hormônios ACC-etileno, AJ, AS e Zeatina (Figura 3). O nível de AS continuou mais elevado nos genótipos resistentes. Já o AJ foi maior nas folhas infestadas dos genótipos 105AP e IAC24 indicando que a presença da lagarta pode ter disparado as vias de sinalização mediada por jasmonato, entretanto esse comportamento não foi observado para o genótipo IAC17 (Figura 3). Pode ser observado também uma redução dos níveis de Zeatina 2 nos tratamentos infestados, entretanto os níveis continuam mais baixos nos genótipos resistentes. Os níveis de ACC foram menores nos genótipos resistentes.

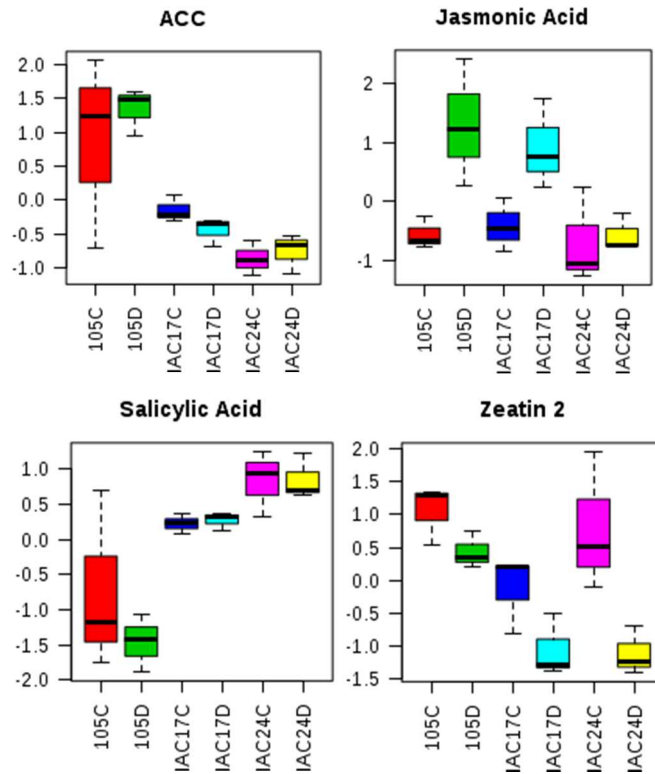


Figura 3. *Box plot* dos fito-hormônios com diferença estatística depois de 12h. ACC-etileno, AJ, AS, Zeatin. 105C (105 AP sem infestar); 105D (105 AP infestada); IAC17C (IAC 17 sem infestar); IAC17D (IAC 17 infestada); IAC24C (IAC 24 sem infestar); IAC24D (IAC 24 infestada).

A análise de agrupamento por PCA não permitiu uma boa separação dos tratamentos, entretanto também podemos observar um agrupamento dos genótipos resistentes sem uma clara distinção dos tratamentos infestados e não infestados (Figura 4), porque como pode ser observado na figura 3, alguns dos fito-hormônios não mudaram a concentração na presença do inseto nos cultivares.

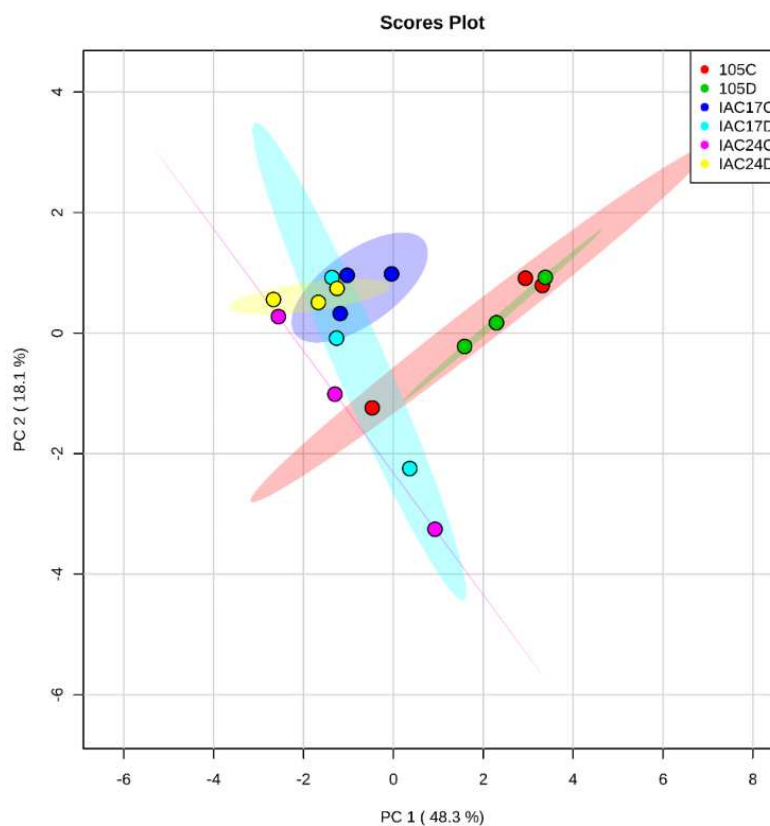


Figura 4. Análise de componentes principais após de 12 h do início do experimento. 105C (105 AP sem infestar); 105D (105 AP infestada); IAC17C (IAC 17 sem infestar); IAC17D (IAC 17 infestada); IAC24C (IAC 24 sem infestar); IAC24D (IAC 24 infestada).

De modo geral o perfil hormonal analisado após 24 horas de infestação foi muito semelhante ao observado para o tempo 12 h (Figura 5), apesar da análise por PCA não indicar um agrupamento específico (Figura 6). Podemos destacar neste tempo de exposição a infestação uma redução dos níveis de ABA no genótipo suscetível 105AP, acompanhado de menores níveis relativos nas resistentes. Também observamos respostas de aumento nos níveis de AIA para todos os genótipos, porém com pequenas diferenças entre os genótipos (Figura 5).

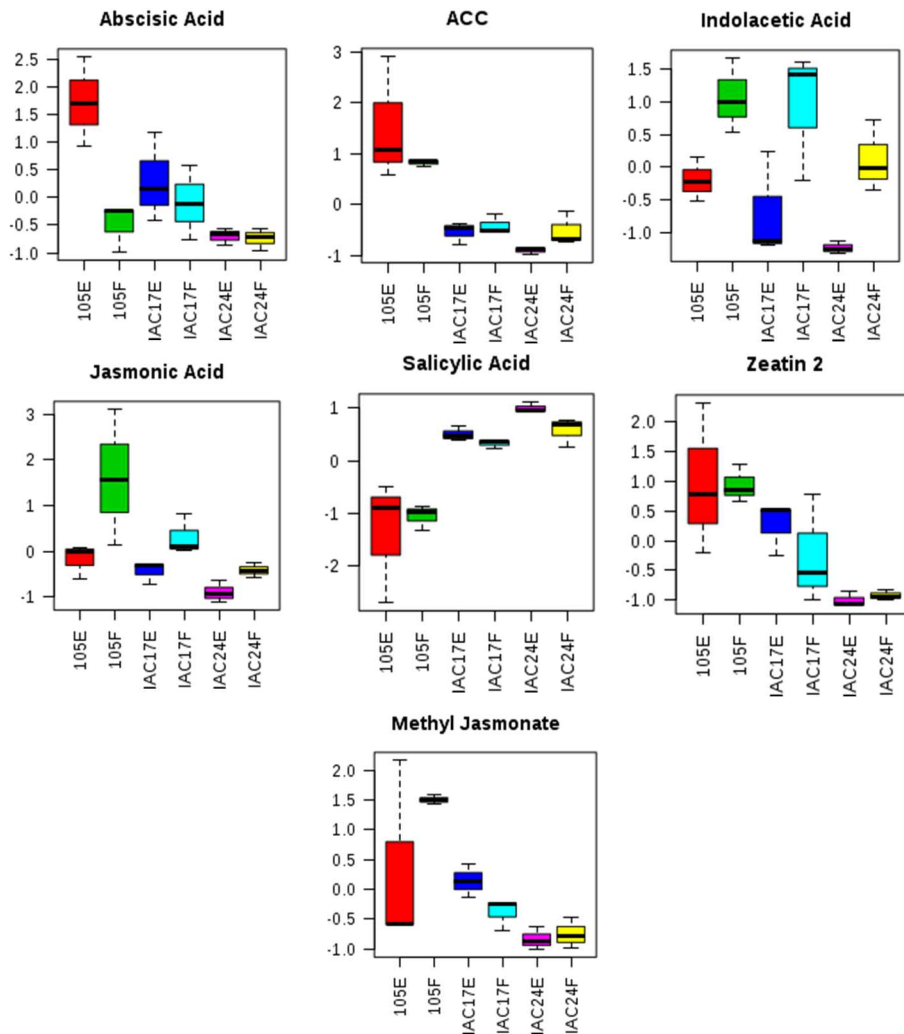


Figura 5. Box plot dos fito-hormônios com diferença estatística depois de 24h. ACC-etileno, AJ, AS, Zeatin. 105E (105 AP sem infestar); 105F (105 AP infestada); IAC17E (IAC 17 sem infestar); IAC17F (IAC 17 infestada); IAC24E (IAC 24 sem infestar); IAC24F (IAC 24 infestada).

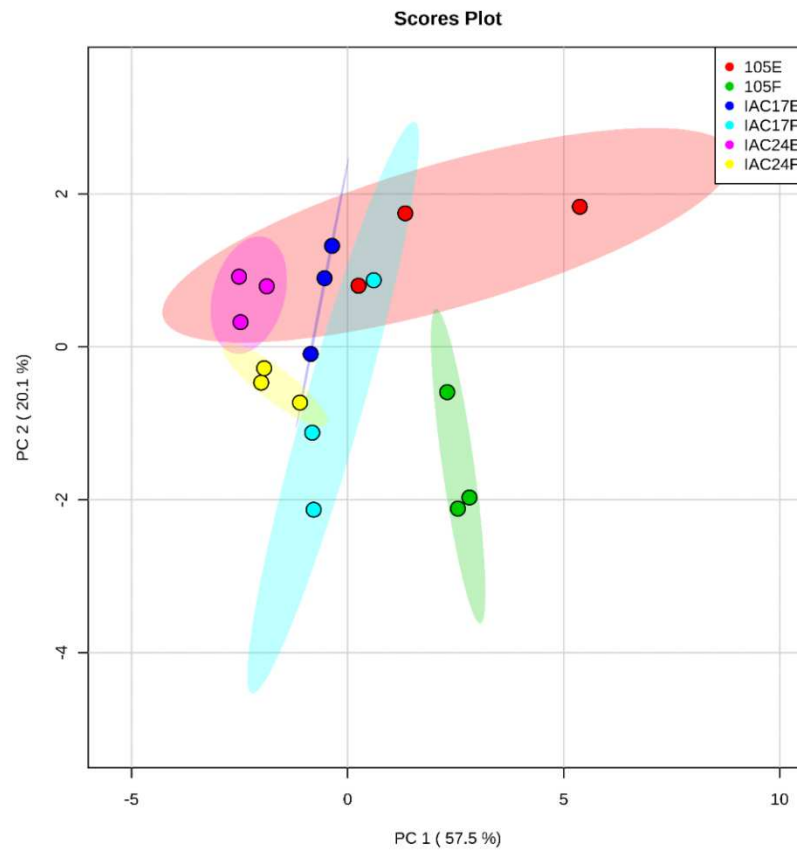


Figura 6. Análise de componentes principais após 24 h do início do experimento. 105E (105 AP sem infestar); 105F (105 AP infestada); IAC17E (IAC 17 sem infestar); IAC17F (IAC 17 infestada); IAC24E (IAC 24 sem infestar); IAC24F (IAC 24 infestada).

Após 48hs de infestação os níveis de AS continuaram mais elevados nos genótipos resistentes (Figura 7), porém com uma proporção um pouco reduzida. Já os níveis de JA continuaram maiores nos genótipos resistentes IAC17 e IAC24. Novamente destacamos uma alteração nos níveis de ABA, que depois de 48h de infestação sofreu uma redução no genótipo 105AP e IAC27, apresentando valores mais reduzidos no genótipo IAC24.

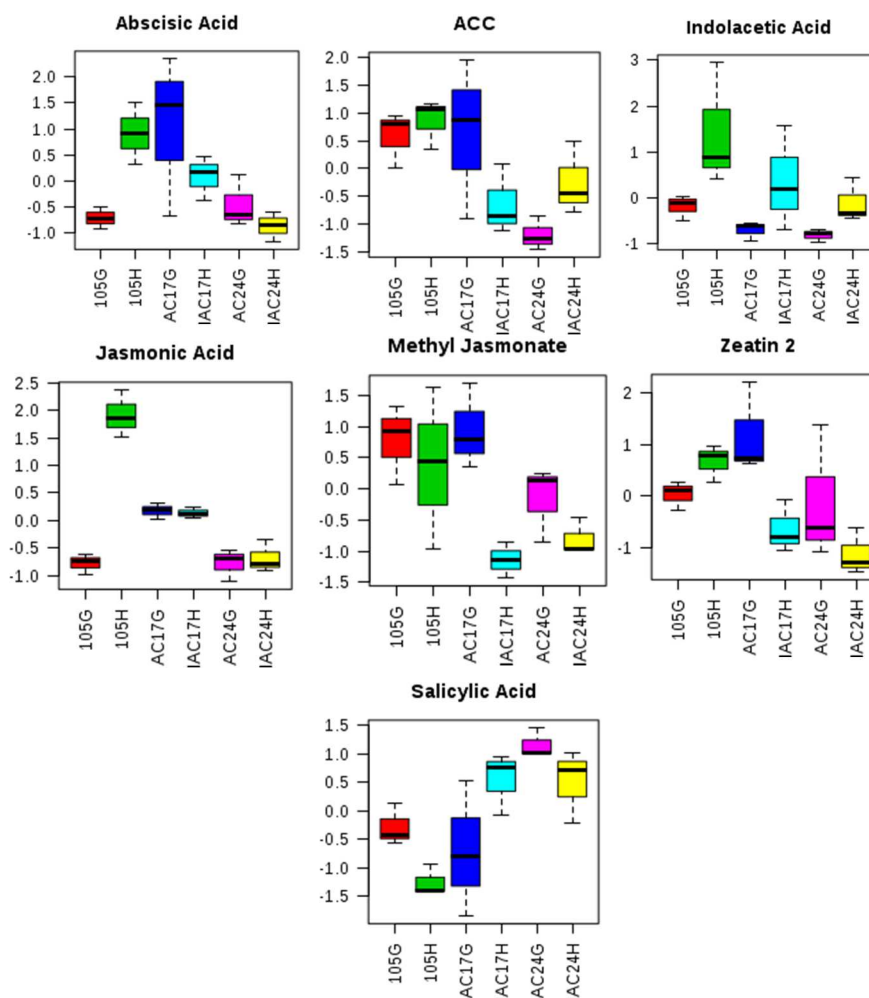


Figura 7. Box plot dos fito-hormônios com diferença estatística depois de 48h. ACC-etileno, AJ, AS, *trans*-Zeatin. 105G (105 AP sem infestar); 105H (105 AP infestada); IAC17G (IAC 17 sem infestar); IAC17H (IAC 17 infestada); IAC24G (IAC 24 sem infestar); IAC24H (IAC 24 infestada).

Novamente pela análise de PCA não foram formados grupos muito específicos porém podemos observar uma tendência de agrupamento dos tratamentos aonde as folhas de soja estavam com a infestação das lagartas (Figura 8), indicando que a variação hormonal foi pequena em relação aos tratamentos sem infestação.

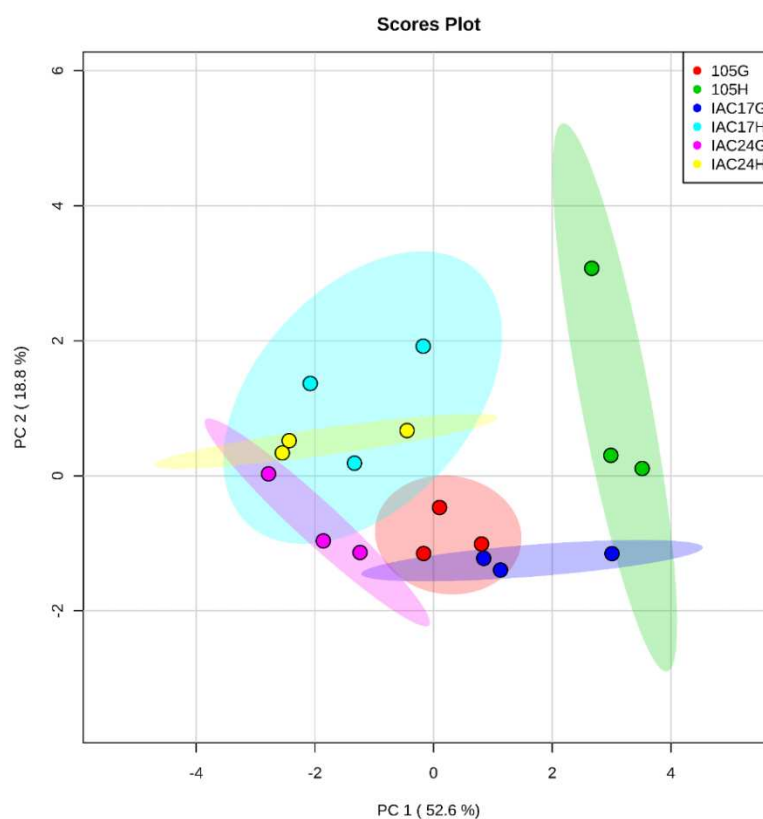


Figura 8. Análise de componentes principais após 48 h do início do experimento. 105G (105 AP sem infestar); 105H (105 AP infestada); IAC17G (IAC 17 sem infestar); IAC17H (IAC 17 infestada); IAC24G (IAC 24 sem infestar); IAC24H (IAC 24 infestada).

As mudanças nas concentrações dos fito-hormônios foram tabuladas para visualização das variações de cada hormônio entre os genótipos ao longo do tempo (Figura 9). Podemos observar ao longo dos períodos de infestação níveis mais elevados de SA nos genótipos resistentes e níveis mais altos de JA no genótipo suscetível 105AP.

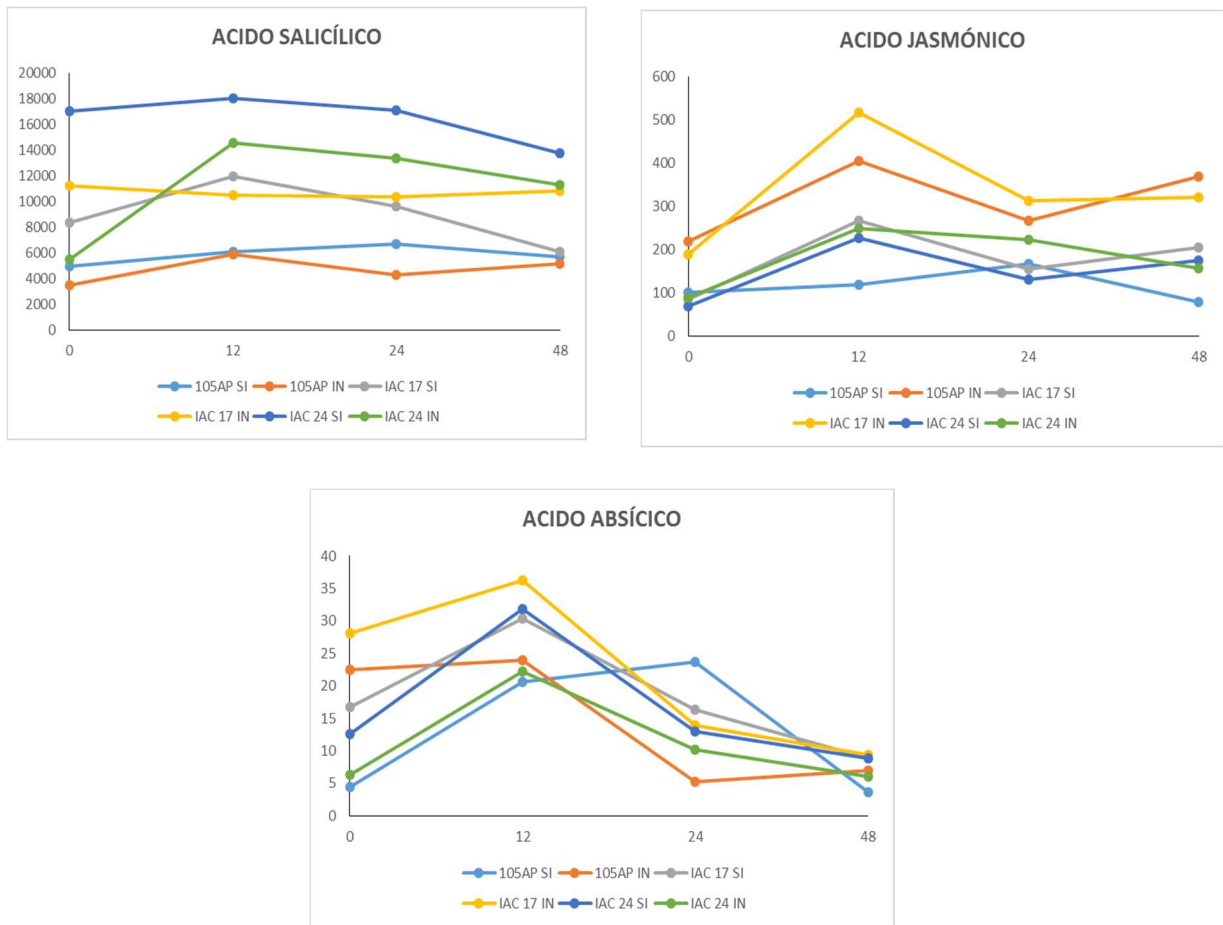


Figura 9. Curvas de concentração (ng de fito-hormônio/g de tecido fresco eixo Y) dos fito-hormônios Ácido Salicílico, Ácido Jasmónico e Ácido Abscísico ao longo do tempo para cada tratamento.. 105 AP SI (105 AP sem infestar); 105 AP IN (105 AP infestada); IAC 17 SI (IAC 17 sem infestar); IAC 17 IN (IAC 17 infestada); IAC 24 SI (IAC 24 sem infestar); IAC 24 IN (IAC 24 infestada).

Os fitohormônios mais frequentemente associados às respostas das plantas aos insetos são o JA, Etileno (E) e o AS (NGUYEN et al., 2016). Jasmonatos são reguladores fundamentais das respostas das plantas a patógenos necróticos e herbivoria de insetos, enquanto que o E modula a magnitude das defesas diretas e indiretas produzidas em resposta a jasmonatos (SCHULTZ et al., 2013; NGUYEN et al., 2016). Nós observamos variações nos níveis do AJ principalmente no genótipo susceptível, aonde os níveis foram relativamente mais elevados. Entretanto nem todas as respostas ao ataque de insetos é dependente do AJ (VERMA, et al., 2016).

O AS tem sido correlacionado negativamente com a acumulação de JA (NGUYEN et al., 2016), onde a acumulação de SA resulta em um feedback negativo que

reduz o acúmulo de JA. De acordo, Schwartzberg e Tumlinson (2014) tem observado com pulgões que tanto acúmulo de SA tem modulado as concentrações e efeitos do JA e concluem que tanto a alimentação do pulgão como a deposição exótica de carvão reprimem a acumulação de JA em resposta ao dano e que o pedido de carvão melhora a acumulação de SA no tecido vegetal. Os perfis hormonais indicam que nestes genótipos de soja resistentes a herbivoria por *A. gemmatalis* não é dependente de JA, pode estar relacionada a outras modulações, como por exemplo por SA, ABA e Zeatin.

Outros fitohormônios, como o ácido abscísico (ABA) e citoquininas (CKs) tem sido recentemente relacionados como importantes reguladores de defesa (SCHÄFER et al., 2015; NGUYEN et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Os perfis hormonais indicaram que estes podem também estar relacionados com os mecanismos de sinalização e resistência da soja ao ataque de herbívoros. Os níveis de ABA reduziram após 24hs de infestação no genótipo sensível e foi relativamente mais baixo nos genótipos resistentes. O ABA tem sido envolvido no processo de indução de respostas de sinalização de defesa dependentes de JA em tecidos sistêmicos (Nguyen et al., 2016).

Zeatinas são hormônios de plantas envolvidas em inúmeras interações da planta com organismos vivos e um aumento em suas concentrações é comumente observado após ataque de insetos ou patógenos, sugerindo que pode modificar o metabolismo da planta em respostas a infestação, ainda nos nossos experimentos houve uma diminuição (Giron et al., 2013; Zhang et al., 2017). De modo geral, os níveis de zeatin foram mais baixo nos genótipos resistentes. Portanto, citoquininas como Zeatin também podem estar envolvidas na regulação da resposta de soja à infestação por *A. gemmatalis*.

3.3.2 Caracterização metabólica da resposta à herbivoria dos genótipos de soja à *A. gemmatalis*

O mesmo procedimento foi adotado nas análises dos dados de GC/MS pela plataforma MetaboAnalyst. A determinação das diferenças de metabolitos entre os tratamentos foi efetuada pela análise de variancia ANOVA-one way, depois da normalização pelo massa das folhas e pela soma. Em adição os dados foram escalonados de modo automático. Finalmente os dados foram organizados em tempos de infestação para visualizar diferenças entre as variedades sem infestar (**A, C, E e G**) e infestadas (**B, D, F e H**). As diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de *Tukey*. A

as análises de agrupamento foi efetuada por médio da *Análise Discriminante dos Quadrados Mínimos Parciais (PLSDA)* na plataforma metaboanalyst.

A análise dos genótipos no tempo 0h de infestação por PLSDA apresentou uma separação entre os genótipos (Figura 10), entretanto a análise de variância não foi significativa ao nível de 5% de probabilidade.

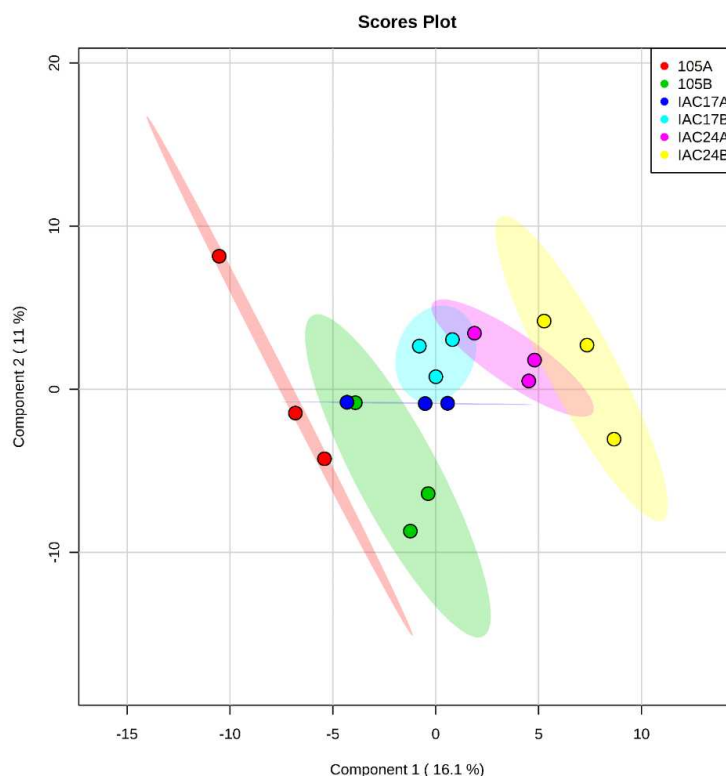


Figura 10. PLSDA para às 0h, início do experimento. 105A (105 AP sem infestar) 105B (105 AP infestada); IAC17A (IAC 17 sem infestar); IAC17B (IAC 17 infestada); IAC24A, (IAC 24 sem infestar); IAC24B (IAC 24 infestada).

Por outro lado, ao analisar os tratamentos após 12h de infestação, 4 metabólitos tiveram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de ANOVA (tabela 2). A análise por PLSDA para esse tempo também indicou uma separação entre os genótipos como observado anteriormente para o tempo 0h (Figura 11).

Tabela 2. Lista de metabólitos diferentes estatisticamente entre os tratamentos às 12h do início do experimento

Compound	p.value	FDR	Tukey's HSD
Secologanin	1.92E-05	0.0040603	IAC17C-105C; IAC17D-105C; IAC17C-105D; IAC17D-105D; IAC24C-IAC17C; IAC24D-IAC17C; IAC24C-IAC17D; IAC24D-IAC17D
Eriodictyol	0.0002167	0.016733	IAC24C-105C; IAC24D-105C; IAC24C-105D; IAC24C-IAC17C; IAC24D-IAC17C; IAC24C-IAC17D; IAC24D-IAC17D
beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose	0.00023679	0.016733	IAC24C-105C; IAC17C-105D; IAC17D-105D; IAC24C-105D; IAC24D-105D
3 beta, 17 beta-dihydroxy-Androst-5-ene	0.00078312	0.041506	IAC17C-105D; IAC17D-105D; IAC24C-IAC17C; IAC24D-IAC17C; IAC24C-IAC17D; IAC24D-IAC17D

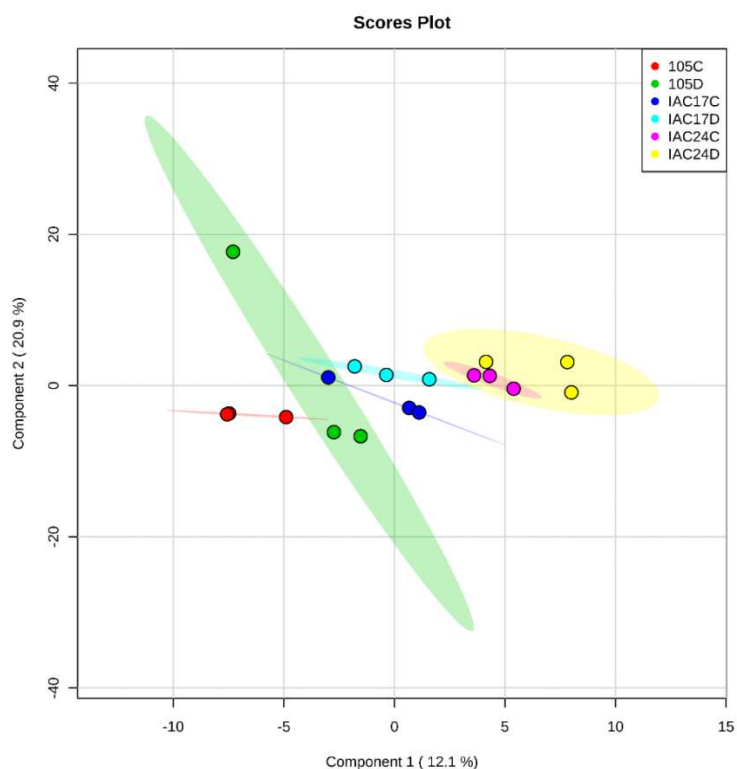


Figura 11. PLSDA após de 12 h do início do experimento. 105C (105 AP sem infestar); 105D (105 AP infestada); IAC17C (IAC 17 sem infestar); IAC17D (IAC 17 infestada); IAC24C (IAC 24 sem infestar); IAC24D (IAC 24 infestada).

De cada tempo analisado foi feita uma revisão bibliográfica dos compostos que foram diferentes, relacionando o tipo de composto e a função que apresenta nas plantas. Dois dos metabólitos que foram estatisticamente diferentes 12h após o início do experimento, a secologanina e o eriodictyol (JOHNSON et al., 2009; SINGH E SHARMA, 2015) estão envolvidos com função de defesa de plantas, os dois são compostos heterocíclicos, especificamente flavonoides (tabela 3), e estão presentes constitutivamente nos genótipos.

Tabela 3. Compostos diferentes com função biológica associada a plantas, 12h após o início do experimento.

Compostos	Tipo de composto	Função	Referencia
Eriodictyol	Heterocíclico; flavonoide	Regulador da expressão genica e envolve multiplas respostas de defesa ao dano oxidativo.	JOHNSON et al., 2009
Secologanina	Heterocíclico; flavonoide	Os genes envolvidos na biosíntese de secologanina são sobre regulados pela via do Me-JA. A via de síntese de secologanina tem um ramo que conduz a síntese de alcaloides como <i>vinblastine</i> , <i>vincristine</i> , que tem propriedades inseticidas	SINGH E SHARMA, 2015

No entanto, o eriodictiol foi maior no genótipo resistentes IAC 24, e a secologanina no IAC 17 (Figura 12). Outros autores têm descrito que os flavonoides fazem parte dos compostos de defesa das plantas às pragas (FALCONE FERREYRA et al., 2012; MUEMA et al., 2016), em conformidade com JOHNSON et al. (2009) e SINGH E SHARMA (2015) reforça a hipótese que a presença destes flavonoides podem está envolvida as características de resistencia destes genótipos à *A. gemmatilis*, ainda eles não foram induzidos pela presença do inseto.

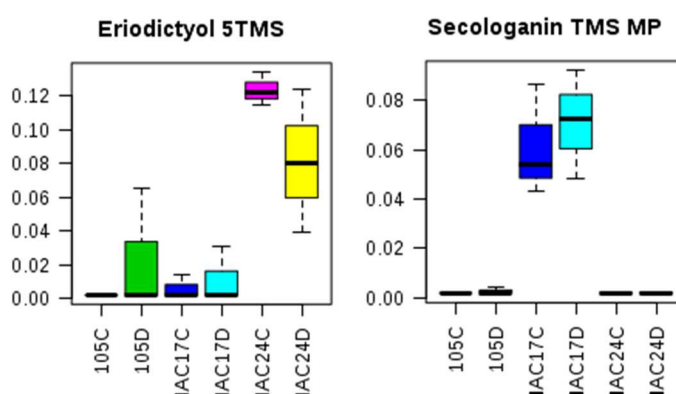


Figura 12. *Box plot* dos metabolitos eryodictyol e secologanin 12 h após o início do experimento. 105C (105 AP sem infestar); 105D (105 AP infestada); IAC17C (IAC 17 sem infestar); IAC17D (IAC 17 infestada); IAC24C (IAC 24 sem infestar); IAC24D (IAC 24 infestada).

Alterações mais pronunciadas nos perfis metabólicos foram observadas após 24h de infestação, sendo detectados 41 metabolitos com diferenças estatisticamente significativas pelo teste de ANOVA (tabela 4).

Tabela 4. Lista de metabolitos diferentes estatisticamente entre os tratamentos às 24h do início do experimento

Compound	<i>p.value</i>	<i>FDR</i>	<i>Tukey's HSD</i>
3-hydroxy-Butanoic acid	3.71E-07	8.15E-05	IAC17F-105E; IAC24F-105E; IAC17F-105F; IAC24F-105F; IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F; IAC24F-IAC24E
beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose	9.51E-07	1.05E-04	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F; IAC24E-105F; IAC24F-105F; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F; IAC24F-IAC24E
Eriodictyol	1.82E-06	0.00013373	IAC24F-105E; IAC24F-105F; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F; IAC24F-IAC24E
Lactulose	5.54E-06	0.00030463	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F; IAC24E-105F; IAC24F-105F; IAC24F-IAC17E
Galactonic acid	1.27E-05	0.00055796	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
alpha-D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-galactopyranoside	2.36E-05	0.00086609	105F-105E; IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F

Valine	0.00013986	0.0031904	IAC24F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC24E
2-amino-Butanoic acid	0.00014023	0.0031904	IAC17F-105E; IAC24F-105E; IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC24E
Secologanin	0.00014502	0.0031904	IAC17E-105E; IAC17E-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E
Lumichrome	0.00016928	0.0033856	IAC17E-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC17E-105F; IAC24E-105F; IAC24F-105F; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
3 beta, 17 beta-dihydroxy-Androst-5-ene Prostaglandin A2	0.00025212	0.0046223	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
Malonic acid	0.00048684	0.0076504	IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC24E-105F; IAC24F-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
Fructose-2,6-diphosphate	0.00067637	0.0099201	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24E-IAC17F
Secologanin	0.00094576	0.013004	105F-105E; IAC17E-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E
4-amino-Butanoic acid	0.0010099	0.013069	IAC17E-105E; IAC17E-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
1-methyl-Imidazole-4-acetic acid	0.0011751	0.013798	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E
Gluconic acid-6-phosphate	0.0011917	0.013798	IAC17E-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E; IAC24E-105F; IAC24F-105F
Erythrose	0.0013059	0.014364	105F-105E; IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105F; IAC24F-IAC17F
Glucuronic acid	0.0014528	0.015219	105F-105E; IAC17E-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E
3-amino-Isobutanoic acid	0.0016259	0.016259	IAC17F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
3-hydroxy-Tetradecanoic acid	0.0022643	0.020775	IAC24E-105E; IAC24E-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24E-IAC17F
seleno-Methionine	0.0022663	0.020775	IAC24F-105E; IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC24E
4-amino-Benzoic acid	0.0026438	0.021854	IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC24E
trans, trans-Muonic acid	0.0027166	0.021854	IAC17F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC24E
Malonic acid	0.0027452	0.021854	105F-105E; IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E
N,N'-Diacetylchitobiose	0.0027814	0.021854	IAC17F-105E; IAC17E-105F; IAC17F-105F
N-glycolyl-Neuraminic acid	0.0029725	0.02255	IAC17F-105F; IAC24E-IAC17E; IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
Myricetin	0.0031046	0.022767	IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F
Pyroglutamic acid	0.003618	0.025676	IAC24F-105F; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F
N-acetyl-Mannosamine	0.0037471	0.025761	IAC17E-105E; IAC24E-105E; IAC17E-105F; IAC24F-IAC17E
2-hydroxy-Glutaric acid	0.0040629	0.026897	IAC24E-105E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
Ergocalciferol	0.0041568	0.026897	IAC24F-105E; IAC24F-105F; IAC24F-IAC17E; IAC24F-IAC17F; IAC24F-IAC24E
Glucoheptose	0.0059529	0.037418	IAC24F-IAC17E; IAC24E-IAC17F; IAC24F-IAC17F
Gentiobiose	0.0062921	0.038449	105F-105E; IAC17F-105E; IAC24F-105E
Maltose	0.0064664	0.038449	IAC24E-105F; IAC24E-IAC17F
Sphingosine	0.0066704	0.038618	IAC17E-105E; IAC17F-105E
Piceatannol	0.0069905	0.038995	IAC17E-105E; IAC17F-105E; IAC24E-105E
Isoleucine	0.0070899	0.038995	IAC17F-105E; IAC17F-IAC17E; IAC24F-IAC17E
Fructose-2,6-diphosphate A	0.0078678	0.042217	IAC17F-105E; IAC24E-IAC17F
4-hydroxy trans-Cinnamic acid	0.0086728	0.045429	105F-105E; IAC24E-105E; IAC24F-105E

Em consequência, podemos observar uma melhor separação entre os tratamentos quando foi efetuada a análise por PLSDA, indicando um comportamento diferencial entre genótipos susceptível e resistente e também entre os genótipos considerados resistentes (Figura 13), por efeito do genótipo e do tratamento.

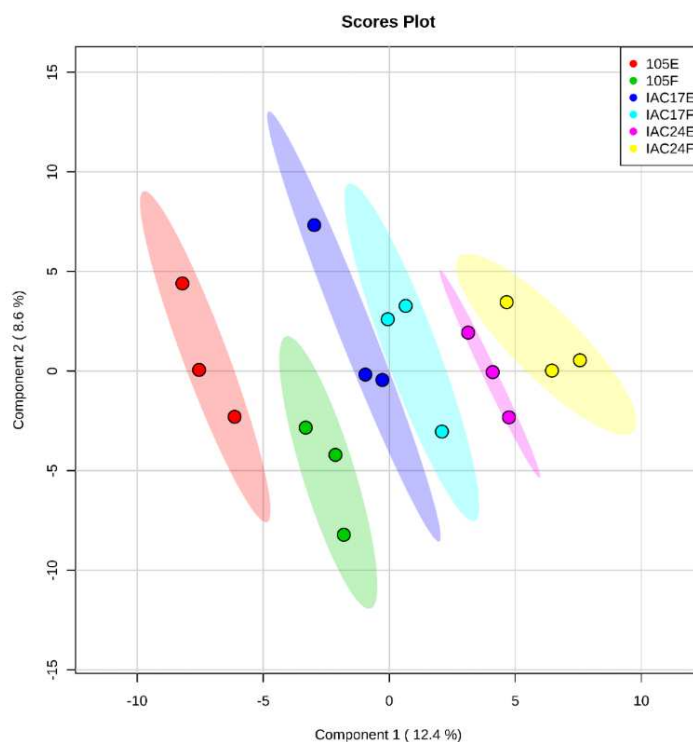


Figura 13. PLSDA depois de 24 h do início do experimento. 105E (105 AP sem infestar); 105F (105 AP infestada); IAC17E (IAC 17 sem infestar); IAC17F (IAC 17 infestada); IAC24E (IAC 24 sem infestar); IAC24F (IAC 24 infestada).

Tabela 4. Compostos diferentes com função biológica associada a plantas 24h após o início do experimento.

Compostos	Tipo de composto	Função	Referencia
γ-Aminobutyric acid (GABA)	Aminoacido não proteico	GABA age como metabolito de defesa e molecula sinalizadora nas plantas.	SCHOLZ et al., 2015; SCHOLZ et al., 2017
Piceatannol ou (Z)-Resveratrol	Polifenol	Antifungico; mesma via de PAL de sintese de flavonoides	GONZALEZ et al., 2003
4-Hydroxy cinnamic acid	ácido carboxilico	Regulador fito-hormonal, produto do metabolismo secundario das plantas, agente fitotoxico quando se liga com outras açucars oi hidroxiacidos, envolvido em eliminação de toxinas e ou armazenamento de fitoalexinas	BENGOECHEA et al., 2005
6-Phosphogluconic acid	CHO; açúcar ácido	Intermediario na vía das pentosas fosfato. Em relação a enzima Glucose 6 phosphate dehydrogenase regulação das plantas em condições de estresse a seca	ESPOSITO, 2016

alpha-Aminobutyric acid	Aminoacido não proteico	Derivado da Alanina, sintetizado através da transaminação do oxobutirato, utilizado na biosíntese de peptídeos não ribossomais	Pharmacology from NCI (PUBCHEM)
D-2-Hydroxyglutaric acid	ácido carboxílico	Intermediário formação ácido cafeico e p-coumaric, compostos tóxicos para os insetos	MAURINO et al., 2015
D-Erythrose	CHO; monossacarido; tetrosa	Ligado ao fosfato participa na via do <i>shikimate</i> para síntese de aminoácidos aromáticos e compostos tóxicos (metabólitos secundários) para insetos	TOHGE et al., 2013
Ergocalciferol	Esterol; lipídeo	Vitamina D2 homeostase do Ca ²⁺	JÄPELT e JAKOBSEN, 2013
Eriodictyol	Heterocyclic; flavonoide	Regulador da expressão genica e envolve múltiplas respostas de defesa ao dano oxidativo.	JONHSON et al., 2009
Fructose-2,6-diphosphate	CHO	Coordena o fluxo de carbono em biosíntese de sacarose e amido	NIELSEN et al., 2004
Galactonic acid	CHO, açúcar ácido	Aumenta com o aumento das concentrações de sal em soja. Intermediário via antioxidativa de ácido ascórbico para evitar ROS.	ZHANG et al., 2016; SHARMA et al., 2012
Gentiobiose	CHO; dissacarido	Indutor da emissão da radícula nas sementes	TAKAHASHI et al., 2014
L-Isoleucine	Aminoacido	Ligado ao Jasmonato corresponde ao componente bioativo da via do AJ.	KANG et al., 2006
Lumichrome	Flavina; pigmentos	Estimula o desenvolvimento das plantas e altera a função dos estomas.	MATIRU e DAKORA, 2005a
Valine	Aminoacido	Precursor na síntese de glucosinolates; os níveis aumentam em resposta a patógenos	ZEIER, 2013
Malonic acid	ácido carboxílico	Via do ácido malônico para a produção de metabólitos secundários como flavonoides	MANN, 1978
Maltose	CHO; dissacarido	Osmoprotector das folhas e da raiz, aumenta em resposta a seca e ao calor	RIZHISKY, 2004; IBRAHIM e ABDELLATIF, 2016
Myricetin	Heterocyclic; flavonoide	Deterrente de parasitas das raízes	MIERZIAK et al., 2014
N-Acetylmannosamine	CHO; aminoaçúcar	Possibilita as lectinas a interagir com a superfície de glicanos de alguns vírus, bactérias, leveduras, fungos e protozoários.	De SCHUTTER et al., 2015
p-Aminobenzoic acid	ácido carboxílico; amino benzoate	PABA, media a resposta sistêmica adquirida para proteger plantas de infecções.	SONG et al., 2013
Pyroglutamic acid	Aminoacido não proteico; ácido	Promove a estabilidade das proteínas e é necessário para a formação das estruturas das proteínas	SCHILLING, 2007
Secologanin	Heterocyclic; flavonoid; glicoside; terpenoide	Os genes envolvidos na biosíntese de secologanina são sobre regulados pela via do Me-JA. A via de síntese de secologanina tem um ramo que conduz a síntese de alcaloides como <i>vinblastine</i> , <i>vincristine</i> , que tem propriedades inseticidas	SINGH e SHARMA, 2015
Selenomethionine	Aminoácido	Forma mais comum de Se encontrada nas plantas, é altamente tóxica para insetos.	DANIELS, 1996; JENSEN et al., 2006
Sphingosine	Aminoalcool, lipídeo	Atua acelerando a apoptose como mecanismo de defesa	BRODERSEN et al., 2002

Compostos como aminoácidos, carboidratos e ácidos carboxílicos, alguns deles próprios do metabolismo primário, aumentaram após a infestação em todos os genótipos (ZEIER, 2013; KANG et al., 2006), indicando que houve uma redistribuição das vias metabólicas em resposta à presença da lagarta onde estão envolvidos os aminoácidos e carboidratos (Figura 14).

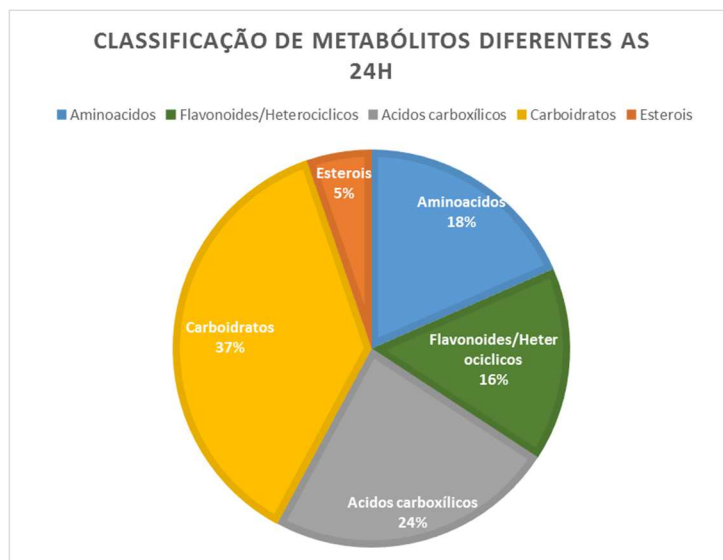


Figura 14. Classificação dos compostos diferentes entre os tratamentos de acordo com a natureza química, após 24h do início do experimento.

A secologanina e o eriodictiol estiveram entre os metabólitos que apresentaram diferenças, da mesma forma que foi determinado às 12h. Novos flavonoides com propriedades nocivas para insetos apareceram entre os metabólitos diferentes, como o Piceatannol e a Miricetina (GONZALEZ et al., 2003; MIERZIAK et al., 2014). O GABA (*Aminobutyric*) que age como molécula sinalizadora de defesa foi menor na variedade IAC 17 e maior na 105 AP e IAC 24 (SCHOLZ et al., 2015; SCHOLZ et al., 2017) (Figura 15). Todos os aminoácidos aumentaram os níveis nos tratamentos das plantas infestadas susceptíveis e resistentes (Figura 15).

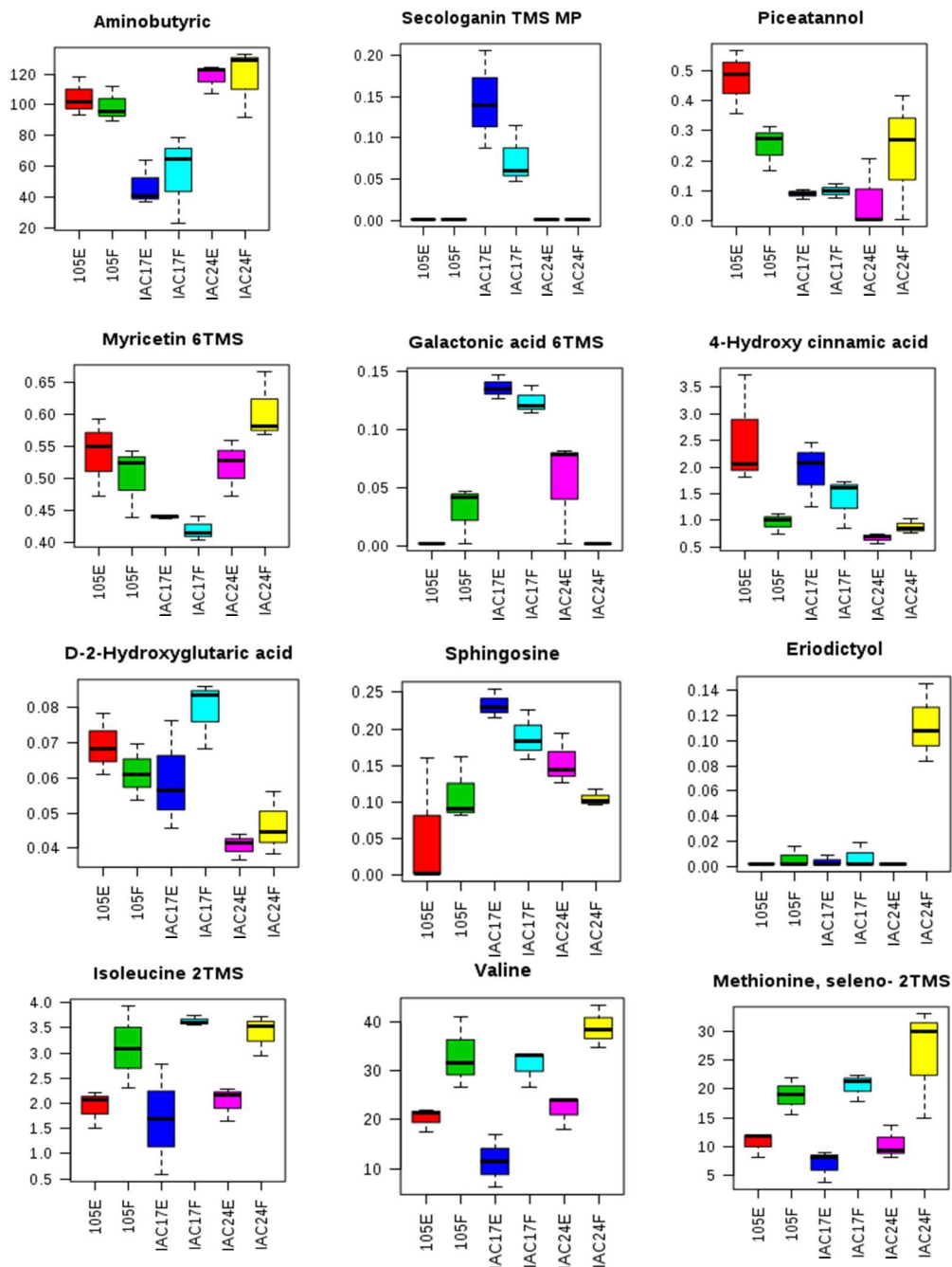


Figura 15. Box plot de alguns compostos envolvidos na defesa das plantas após 24h do início do experimento.

Finalmente ao analisar os tratamentos após 48h infestação, 18 metabólitos tiveram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de ANOVA (tabela 6). Entretanto, não foi verificado uma separação muito significativa entre os genótipos pela análise de agrupamento por PLSDA (Figura 16).

Tabela 6. Lista de metabolitos diferentes estatisticamente entre os tratamentos à 48h do início do experimento

Compound	<i>p.value</i>	<i>FDR</i>	<i>Tukey's HSD</i>
Galactonic acid	6.65E-05	0.011768	IAC24H-105G; IAC17G-105H; IAC17H-105H; IAC24G-IAC17G; IAC24H-IAC17G; IAC24G-IAC17H; IAC24H-IAC17H
4-amino-Benzoic acid	0.00026579	0.023523	IAC24G-105H; IAC17H-IAC17G; IAC24H-IAC17G; IAC24G-IAC17H; IAC24H-IAC24G
11 alpha-Hydroxyprogesterone	0.00095266	0.033108	IAC24G-105G; IAC24G-105H; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Succinate	0.00098229	0.033108	IAC24G-105G; IAC17G-105H; IAC24G-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC24G
1-O- methyl-alpha d glucoside	0.0011267	0.033108	IAC24H-105G; IAC17G-105H; IAC24G-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Leucine	0.0015979	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Sphingosine	0.001653	0.033108	IAC17G-105G; IAC17H-105G; IAC24H-105G; IAC24H-IAC24G
13-(Z)-Docosenoic acid	0.0017744	0.033108	IAC24G-105G; IAC17G-105H; IAC17H-105H; IAC24G-105H; IAC24H-IAC24G
3 beta, 17 beta-dihydroxy-Androst-5-ene	0.0018758	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H
Cembrene	0.0019521	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H
3-hydroxy-Dodecanoic acid	0.0022168	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Isoleucine	0.0022737	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Valine	0.0024316	0.033108	IAC24H-105G; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
N-acetyl-Mannosamine	0.0027175	0.034357	IAC17G-105G; IAC17G-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H
2-amino-Butanoic acid	0.0037072	0.043745	IAC24H-105G; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC24G
Pregn-5-ene-3,21-diol-20-one	0.0040606	0.04492	IAC24H-105G; IAC24H-105H; IAC24H-IAC17H; IAC24H-IAC24G
Fructose-2,6-diphosphate	0.0044542	0.04547	IAC17G-105G; IAC17H-105G; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H
Lumichrome	0.0046241	0.04547	IAC24H-105G; IAC24H-105H; IAC24H-IAC17G; IAC24H-IAC17H

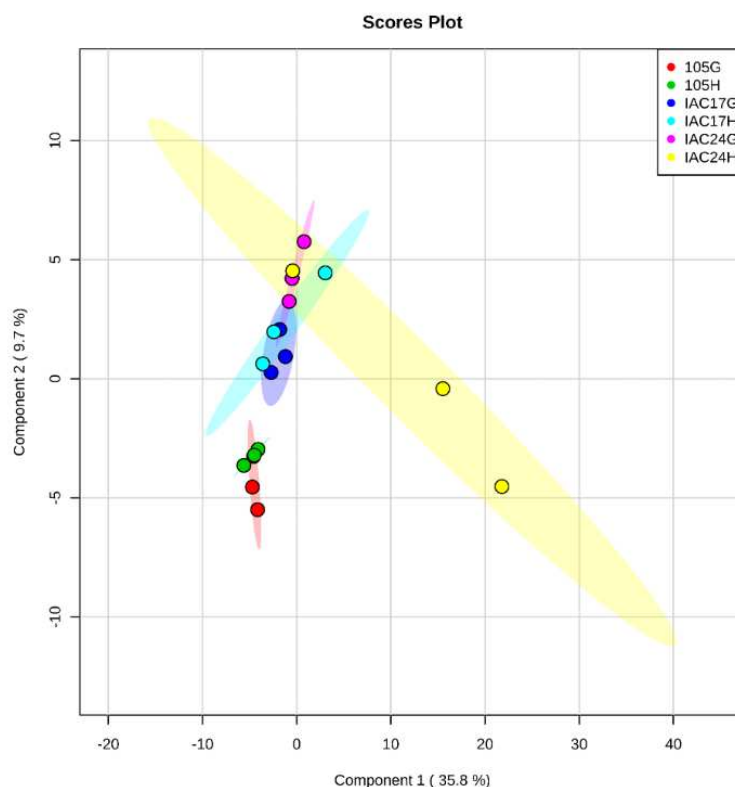


Figura 16. PLSDA depois de 48 h do início do experimento. 105G (105 AP sem infestar); 105H (105 AP infestada); IAC17G (IAC 17 sem infestar); IAC17H (IAC 17 infestada); IAC24G (IAC 24 sem infestar); IAC24H (IAC 24 infestada).

Tabela 7. Lista de metabolitos diferentes estatisticamente entre os tratamentos ás 48h do início do experimento

Compostos	Tipo de composto	Função	Referencia
Cembrene	lipídeo; Terpenoide	Composto volátil, toxico para patógenos	PIERMAN et al., 2017
Dodecanoic acid (Lauric acid)	lipídeo, acido graxo	Intermediario da vias do Me-JA	KANDEL, 2007
Fructose-2,6-diphosphate	CHO	Coordina o fluxo de carbono em biosintese de sacarosa e amido	NIELSEN et al., 2004
Galactonic acid	CHO, azucar acido	Aumenta com o aumento das concentrações de sal em soja. Intermediario via antioxidativa de ac ascorbico para evitar ROS.	ZHANG et al., 2016; SHARMA et al., 2013
L-Isoleucine	Aminoacido	Ligado ao Jasmonato corresponde ao componente bioativo da via do AJ.	KANG et al., 2006
Leucine	Aminoacido	Participa na ativação de genes de defesa depois do contacto com patógenos, cadenas repetidas de Leucina.	SHANMUGAM, 2005
Lumichrome	Flavina; pigmentos	Estimula o desenvolvimento das plantas e altera a função dos estomas.	MATIRU e DAKORA, 2005a
N-Acetylmannosamine	CHO; aminoaçucar	Possibilita as lectinas a interagir com a superficie de glicanos de alguns virus, bacterias levaduras, fungos e protozoarios.	De SCHUTTER et al., 2015
p-Aminobenzoic acid	Ácido carboxilico; amino benzoate	PABA, media a resposta sistematica adquirida para proteger plantas de infeções.	SONG et al., 2013
Sphingosine	Aminoalcohol, lipídeo	Atua acelerando a apoptose como mecanismo de defesa	BRODERSEN et al., 2002
Secologanin	Heterocyclic; flavonoid; glicoside; terpenoide	Os genes envolvidos na biosintese de secologanina sao sobre regulados pela via do Me-JA. A via de sintese de secologanina tem um ramo que conduz a sintese de alcaloides como vinblastine, vincristine, que tem propriedades inseticidas	SINGH e SHARMA, 2015
Succinate	Ácido carboxilico	Intermediario metabolico	TURNER e HANLEY, 1949

Entretanto neste tratamento os compostos que mudaram em maior medida foram os acidos carboxílicos seguido dos Carboidratos e finalmente os aminoácidos (Figura 17), o que pode representar um redirecionamento das vias.

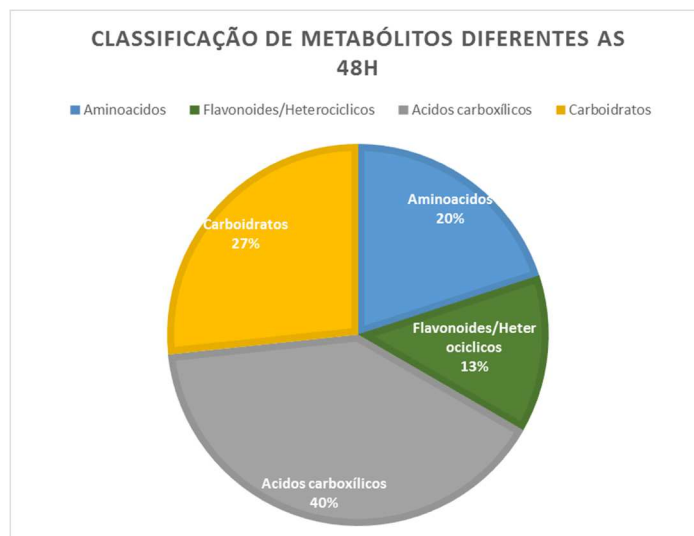


Figura 17. Classificação dos compostos diferentes entre os tratamentos de acordo com a natureza química, após 48h do início do experimento.

Neste tratamento também a secologanina foi presente entre os compostos diferentes e continuou sendo maior na variedade IAC 17. Apareceu também com maior abundância o Cembreno, no IAC 17, composto volátil envolvido na defesa à patógenos (PIERMAN et al., 2017), e o ácido galactónico que é intermediário na via dos ROS (ZHANG et al., 2016; SHARMA et al., 2013) (Figura 18).

Finalmente, os tratamentos 12, 24 e 48h, tiveram em comum a secologanina, e entre 12 e 24h compartilharam o ácido galactônico, a Isoleucina, o Lumicrome, o ácido p-aminobenzóico e a esfingosina entre os metabólitos mais destacados e relacionados à defesa das plantas.

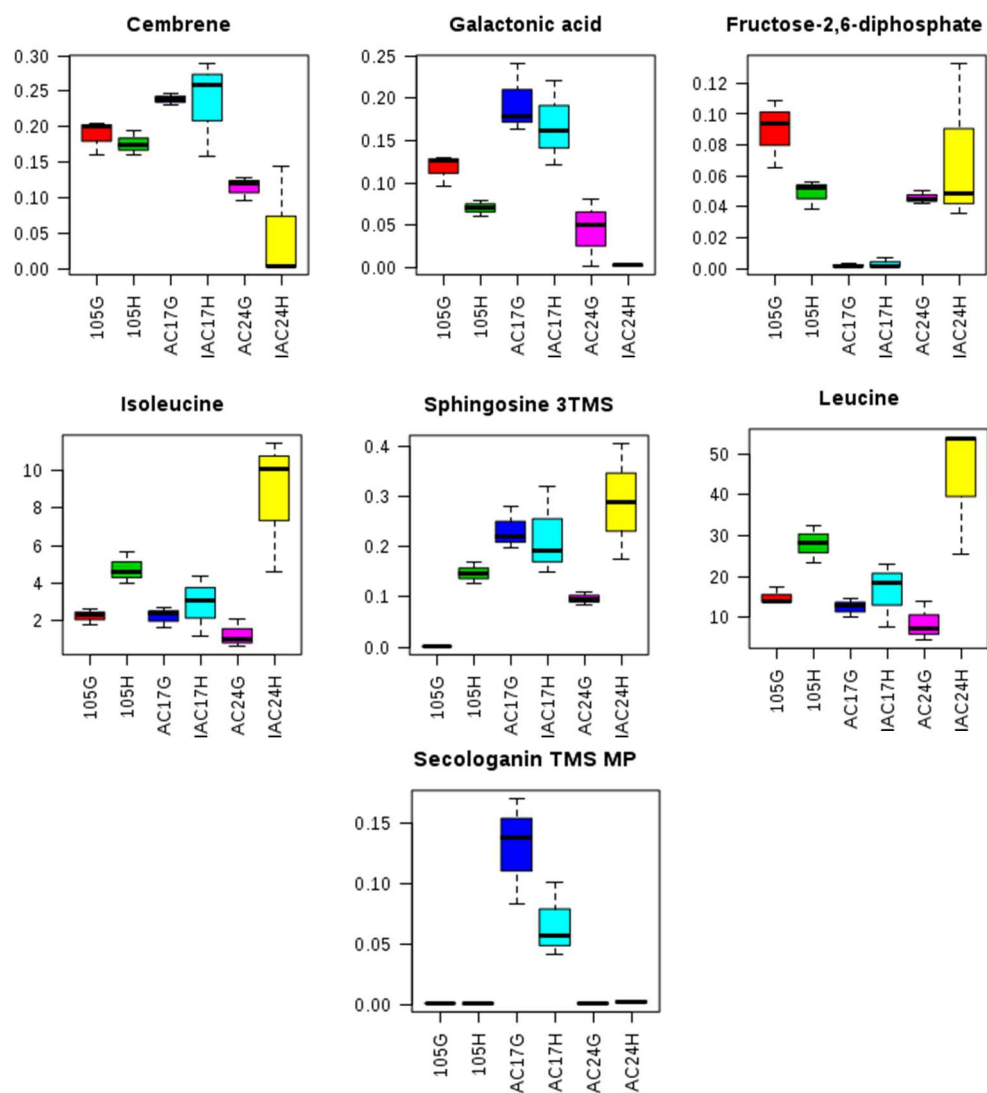


Figura 18. *Box plot* de alguns compostos envolvidos na defesa das plantas após 48h do início do experimento.

3.2.3 Fracionamento das proteínas com PEG 4000 e detecção de fosfoproteínas

Muitas proteínas depois de serem sintetizadas são processadas e uma importante mudança pós-traducionais é a fosforilação. Muitos processos biológicos são regulados por meio da fosforilação de enzimas chaves das vias metabólicas, controlando deste modo a atividade enzimática. Deste modo, proteínas fosforiladas de folhas de soja foram detectadas com o corante Pro Q Diamond. Após a precipitação de proteínas abundantes foi possível a visualização de muitos spots para proteínas fosforiladas (Figura 19). As regiões onde se localizam as proteínas identificadas estão também sinalizadas na figura 19.

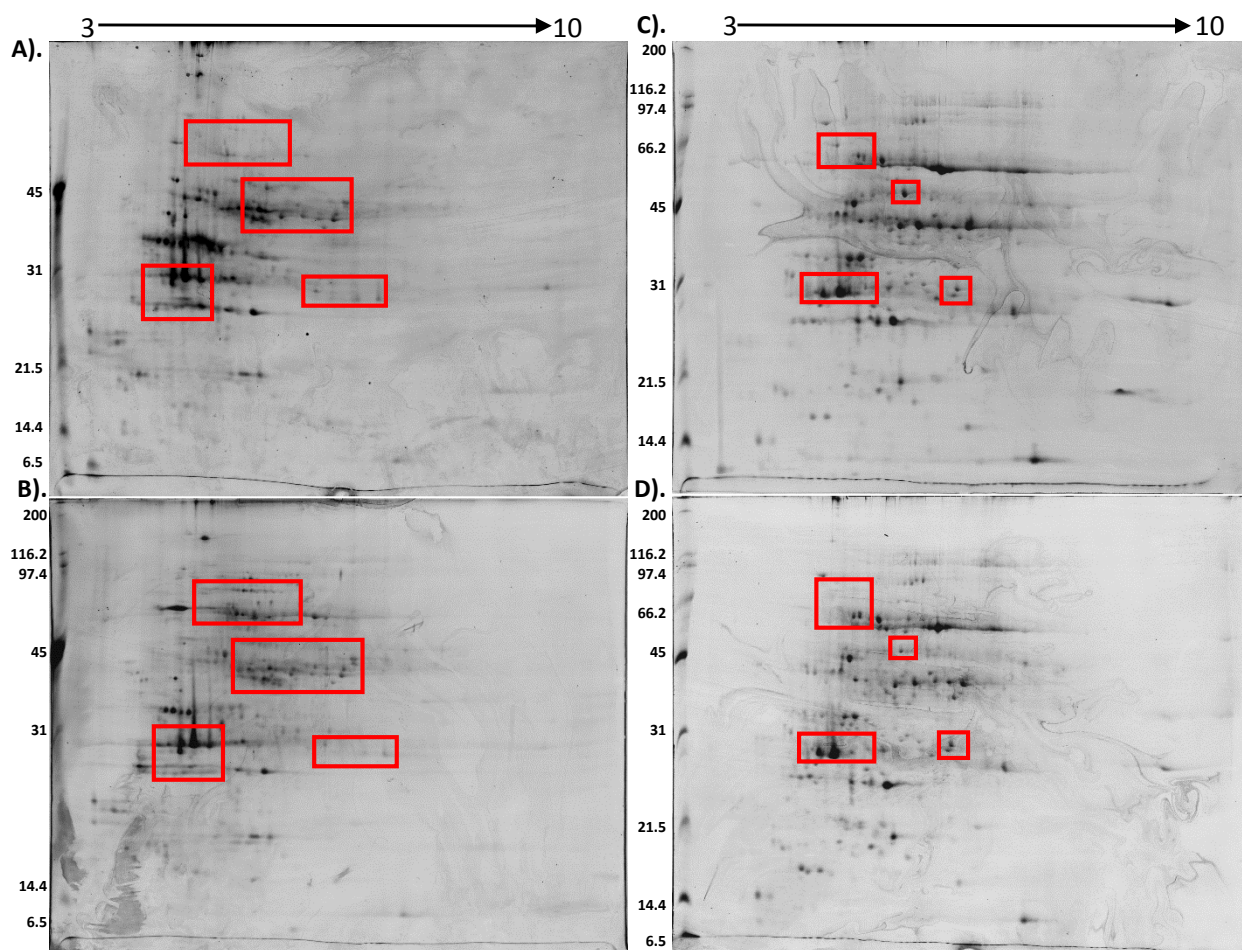


Figura 19. Fosfoproteoma dos tratamentos estudados. A). UFV TN 105AP controle; B). UFV TN 105AP 90h de infestação; C). IAC 17 controle; D). IAC 17 controle 90h de infestação. Os quadros vermelhos indicam as regiões de localização das proteínas identificadas.

3.3.4 Análises do proteoma diferencial em resposta à infestação

As imagens obtidas dos géis foram analisadas pelo pacote computacional ImageMaster (GE Healthcare), e os spots com boa resolução foram utilizados nas análises comparativas (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado geral comparações proteômica

Item	A1*	A2**	B1***	B2****
Média de <i>spots</i> por tratamento	303	287	306	331
Porcentagem de coincidência das triplicatas	95	93.6	95	93.6

*A1: UFV TN 105 AP controle **A2: UFV TN 105 AP 90h de exposição ***B1: IAC 17 controle
****B2: IAC 17 90h de exposição

Em seguida foram realizadas as análises comparativas das réplicas entre as classes para cada tratamento (Tabela 8). Na primeira comparação, correspondente a classe UFV TN 105 AP controle Vs UFV TN 105 AP 90h, foram observados 114 *spots* com abundancia diferencial ($p \leq 0.05$) e com coincidências de 94.3%. A segunda classe foi constituída da análise entre IAC 17 controle e IAC 17 90h e foram observados 138 *spots* ($p \leq 0.05$), também com coincidências de 94.3% (Figura S1). Dos 114 *spots* encontrados na primeira classe, 42 foram exclusivos do tratamento UFV TN 105 AP controle e 34 do UFV TN 105 AP 90h (Tabela 9) (Figura S1A). No caso da segunda classe, 40 foram exclusivos do tratamento IAC 17 controle e 60 do IAC 17 90h de exposição (Figura S1B). Em relação aos *spots* com abundancia diferencial e presentes em ambos os tratamentos, para a primeira classe houve 38, dos quais 13 reduziram a abundância quando foram analisados no tratamento UFV TN 105 AP 90h, e 25 aumentaram. Para a segunda classe, 38 dos *spots* apresentaram abundância diferencial, dos quais, 16 diminuiram quando foram analisados no tratamento IAC 17 90h de exposição e 22 aumentaram (Tabela 9) (Figura S1).

Tabela 9. Análise proteômica comparativa das classes das duas variedades estudadas

Item		A1* Vs A2**		B1*** Vs B2****		
Total de spots com diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$)		114		138		
Quantidade de spots exclusivos de cada tratamento		A1	A2	B1	B2	
		42	34	40	60	
Abundancia diferencial: spots com aumento da abundância nos tratamentos		13	25	16	22	
Spots diferentes estatisticamente comuns entre as duas classes (Presença)						
A1/A2/B1/B2	A1/A2/B2	A1/B1	A2/B2	A1/B2	A1/B1/B2	A1/A2/B1
12	3	6	2	3	1	1

*A1: UFV TN 105 AP controle **A2: UFV TN 105 AP 90h de exposição ***B1: IAC 17 controle ****B2: IAC 17 90h de exposição

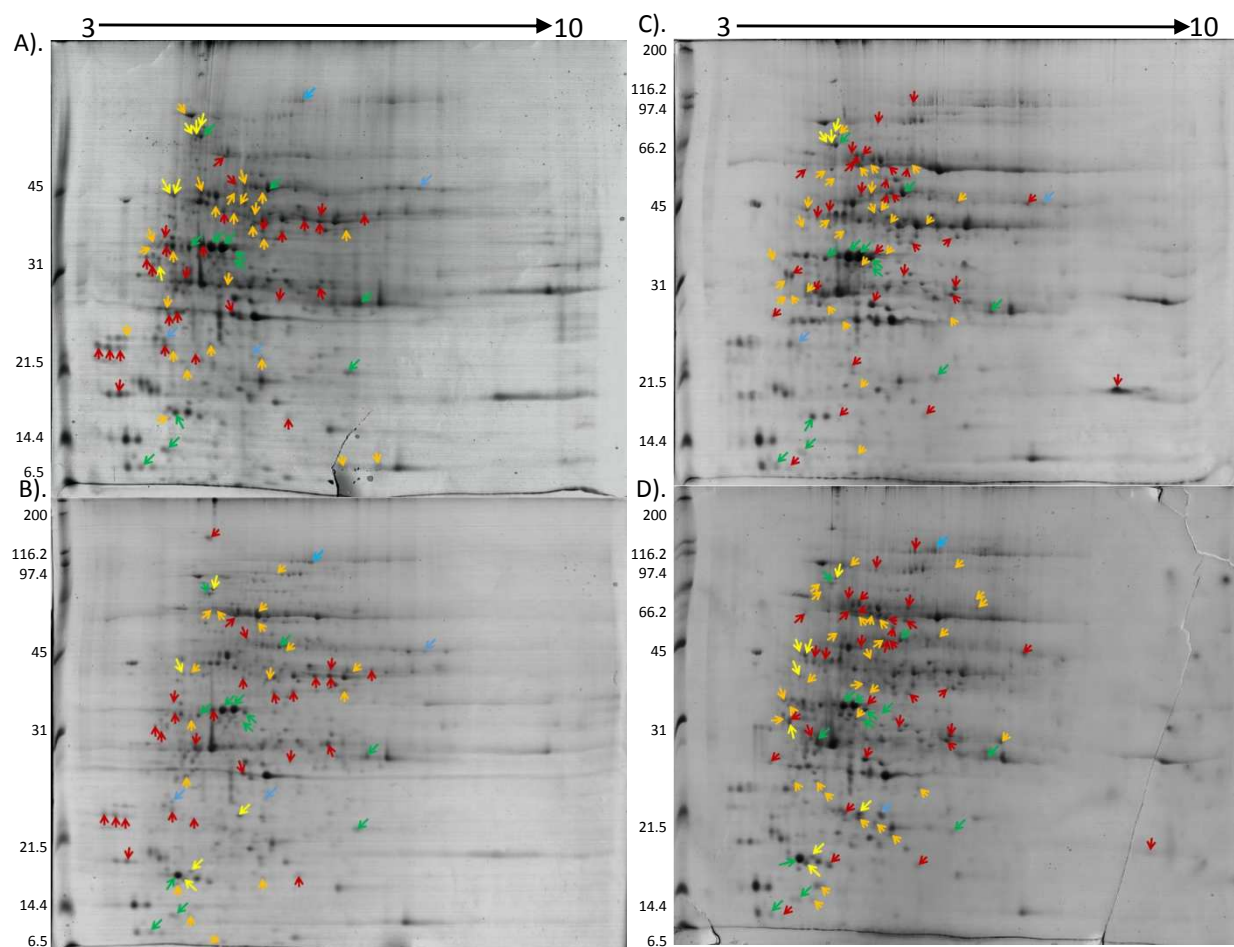


Figura S1. Imagens das análises proteômica comparativa ($p \leq 0.5$) da resposta das duas variedades de soja UFV TN 105AP e IAC à mastigação por *A. gemmatilis*. Geis de 2D-PAGE, coloridos com Azul brilhante de Coomassie. A). Comparação entre classe 1, UFV TN 105 AP controle e UFV TN 105 AP 90 h de exposição. B). Comparação entre classe 2, IAC 17 controle e IAC 17 90 h de exposição. → Spots estatisticamente diferentes comuns nos dois tratamentos presentes nas 4 réplicas. → Spots estatisticamente diferentes comuns nos dois tratamentos presentes em 3 réplicas. → Spots estatisticamente diferentes comuns nos dois tratamentos presentes em 2 réplicas. → Spots com abundância diferencial estatisticamente significativa próprios de cada tratamento. → Spots exclusivos de cada tratamento com diferencia estatisticamente significativa.

Dos 252 *spots* selecionados como diferenciais, 29 *spots* foram identificados por espectrometria de massa em modo MS/MS. com pelo uma sequência com validação estatística acima de 95% no Software SCAFFOLD. Para a identificação das proteínas foi utilizado o banco de dados de proteínas de *Glycine max*, depositadas no UNIPROT, por meio do aplicativo MASCOT. Os 29 *spots* corresponderam a 16 proteínas diferentes, sendo 13 proteínas identificadas na análise da classe 1, e 8 da classe 2. Na tabela 10 são descritos os *spots* identificados nas duas classes analisadas, além da massa molecular, pI teóricos e experimentais, e as sequencias dos peptídeos obtidas.

Tabela 10. Lista das proteínas identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em plantas de soja das variedades UFV TN 105 AP e IAC 17 expostas e não expostas à infestação por *A. gemmatilis*.

Theoretical					Experimental			Peptide number	Peptide sequence
Spot	MW	pI	Access Number	Protein name	MW	pI	Coverage		
113B	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	24	5.04	5%	1 DGIDYAAVTVQLPGGER	
114B	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	23	4.76	8%	2 DGIDYAAVTVQLPGGER VPFLFTIK	
118A	50236	7.79	I1KTX8	Phosphoglycerate kinase	31	5.58	7%	2 LASLADLYVNDAFGTAHR LVASLPDGGVLLLENVR	
118B	35327	6.02	A0A0R0KKR3	Aldo-keto reductase family 4 member C9	26	6.17	4%	1 ASFFVHETYGAYR	
139B	39619	5.00	A0A0B2QEI9	Bark storage protein A	29	4.31	5%	1 YGLGPDDTLPLEDNGDYTR	
168A	63643	5.28	A0A0B2NTV4	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	63	4.6	4%	2 GYISPFVFNPEK LADAVGLTLGPR	
240A	33201	8.48	A0A0R0GUJ1	Protein REVEILLE 8 isoform X1	25	6.41	6%	1 GITQITNSLSGVGNSTR	
244A	53778	5.29	A0A173CSR3	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	45	5.28	6%	2 FVQAGSEVSALLGR IFNVLGEPIDNLGPVDTR	
318B	59923	5.80	A0A0R4J4C8	ATP synthase subunit beta	54	4.82	12%	4 AHGGFSVFAGVGER DAEGQDVLLFVDNIFR IPSAVGYQPTLSTDLGALQER LVLEVAQHLGEGVVR	
63A	27409	5.87	A0A0R0G6T3	Protein REVEILLE 8 isoform X4	20	6.21	17%	3 VATPAQAQEVHADLR VIACIGETLEQR WVHDNVSAEVAASVR	
80A	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	23	4.8	14%	4 DGIDYAAVTVQLPGGER FEEKDGIDYAAVTVQLPGGER GASTGYDNAVALPAGGR VPFLFTIK	
81A	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	23	4.96	10%	2 DGIDYAAVTVQLPGGER GASTGYDNAVALPAGGR	
85A	53778	5.29	A0A173CSR3	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	25	5.5	3%	1 AHGGVSVFGVGER	
			I1KTX8	Phosphoglycerate kinase			0%		
91B	29433	6.72	A0A0B2P7L1	Stem 31 kDa glycoprotein	21	6.25	12%	2 IVGIIGDQWSDLLGDHR	

178A	27945	5.29	C6TLM4	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	20	4.54	3%	1 TVNQQAFFYASER
217A	35851	6.61	A0A0B2QTX6	Carbonic anhydrase	19	6.76	15%	3 FGEAVWFK EAVNVSLGNLLTYPFVR VcPSHVLDLFQPGAEFVVR YAGTGAAVEYAVLHLK
375A	35851	6.61	C6TLM4	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	22	4.33	3%	1 ELEVIHSR
77A	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	24	5.2	10%	2 DGIDYAAVTVQLPGGER GASTGYDNAVALPAGGR
78A	33332	5.73	I1MFL4	Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic	23	4.43	11%	2 ALVDSFYGTDR IPISNSNAQSWLLTTYLDEELR
80A	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	23	4.8	15%	4 DGIDYAAVTVQLPGGER FEEKDGIDYAAVTVQLPGGER GASTGYDNAVALPAGGR RLTFDEIQSK
81A	35265	6.66	A0A0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic*1	23	4.96	13%	3 DGIDYAAVTVQLPGGER GASTGYDNAVALPAGGR RLTFDEIQSK
82A	24895	6.61	C6TLM4	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	24	4.47	3%	1 ELEVIHSR
84A	40901	8.04	A0A0B2P279	Ferredoxin--NADP reductase	25	5.76	5%	1 DPNATIImLGTGTGIAPFR
89A	35546	5.29	I1M561	fructokinase-4	26	5.07	11%	3 ADGINFDQGAR APGGAPANVAIAVSR LPLWPSAEER
93A	27461	6.22	A0A0B2NYC2	Malate dehydrogenase	27	6.072	10%	2 ALEGADVVIIPAGVPR LFGVTTLDVVR
98A	38246	6.28	A0A0B2Q4F4	Putative aldo-keto reductase 1	26	6.73	4%	1 ELGIGIVPYSPLGR

Alguns dos *spots* caracterizados, além de serem identificados como a mesma proteína, ou ter diferenças estatisticamente significativas, seja por abundância diferencial em alguma das classes, ou por se encontrar exclusivamente em alguma réplica, também se encontraram em ambos os tratamentos. Na tabela 11 pode ser observado o resumo total das proteínas identificadas que inclui os spots comuns entre os tratamentos, as réplicas onde eles foram achados, e os spots identificados como a mesma proteína, agrupados. Na figura 20 são apresentados os *spots* identificados em cada réplica, indicando especificamente quais deles foram identificados como a mesma proteína.

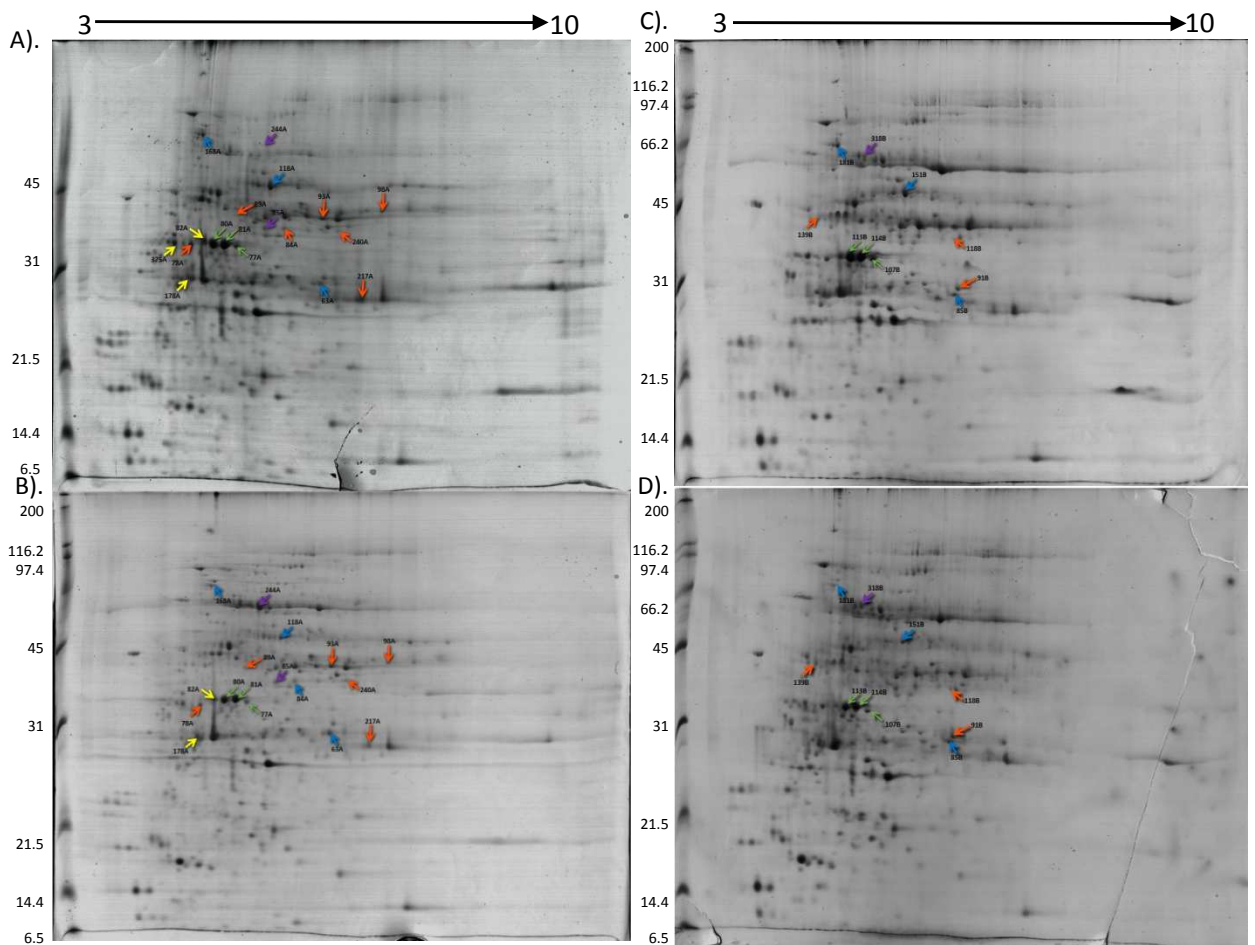


Figura 20. *Spots* identificados em todos os tratamentos e *spots* que corresponderam à mesma proteína nos tratamentos. → *Spots* identificados presentes nos dois tratamentos. → *Spots* identificados presentes nos dois tratamentos (Ver tabela 4). → *Spots* 80A, 81A, 77A, 113B, 114B, 107B, Identificados como Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic. → *Spots* 244A, 85A, 318B, Identificados como ATP synthase subunit beta, chloroplastic. → *Spots* 178A, 375A, 82A, Identificados como Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic.

Tabela 11. Resumo das proteínas identificadas, encontram-se as réplicas onde foram achados os *spots* comuns entre os tratamentos, e agrupados os identificados como a mesma proteína

#	ID de Spots	A1	A2	B1	B2	Nome da proteína identificada
1	81A = 113B 80A = 114B 77A = 107B 118A =	X	X	X	X	A0A0B2Q0P6 Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic
2	151B	X	X	X	X	I1KTX8 Phosphoglycerate kinase
3	118B			X	X	A0A0R0KKR3 Aldo-keto reductase family 4 member C9
4	139B 168A =			X	X	A0A0B2QE19 Bark storage protein A RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic
5	181B	X	X	X	X	A0A0B2NTV4
6	240A		X			A0A0R0GUJ1 Protein REVEILLE 8 isoform X1
7	244A 85A 318B		X			A0A173CSR3 ATP synthase subunit beta, chloroplastic
8	63A = 85B	X	X	X	X	A0A0R0G6T3 Protein REVEILLE 8 isoform X4
9	91B			X	X	A0A0B2P7L1 Stem 31 kDa glycoprotein
10	178A 375A 82A	X	X			C6TLM4 Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
11	217A	X	X			A0A0B2QTX6 Carbonic anhydrase
12	78A	X	X			I1MFL4 Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic
13	84A	X	X			A0A0B2P279 Ferredoxin--NADP reductase
14	89A	X	X			I1M561 Fructokinase-4
15	93A	X	X			A0A0B2NYC2 Malate dehydrogenase
16	98A	X	X			A0A0B2Q4F4 Putative ald-keto reductase 1

A1:** UFV TN 105 AP controle *A2:** UFV TN 105 AP 90h de exposição *****B1:** IAC 17 controle
******B2:** IAC 17 90h de exposição

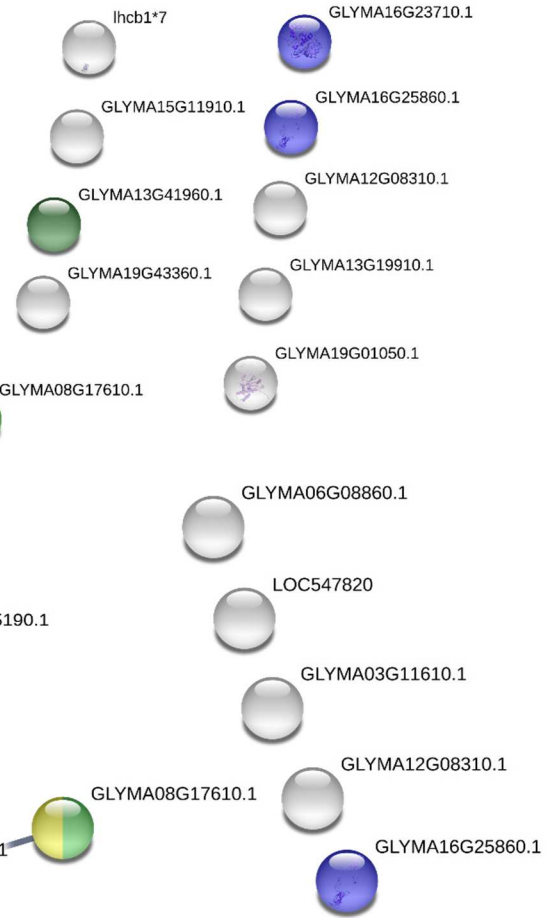
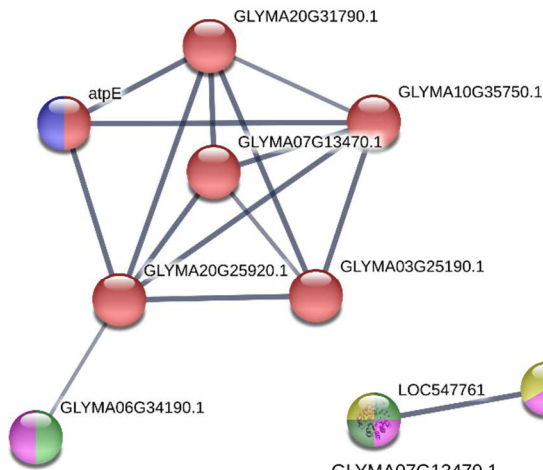
Os spots 80A, 81A, 77A, 113B, 114B, 107B foram identificados como Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (A0A0B2Q0P6) e corresponderam aos mais abundantes do proteoma. Os spots 244A, 85A, 318B foram identificados como ATP synthase subunit beta, chloroplastic (A0A173CSR3) e os spots 178A, 375A, 82A (C6TLM4) foram Identificados como Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic. Este resultado pode indicar a existência de isoformas das proteínas. A existência de spots identificados com as mesmas proteínas ocorreu pelas mudanças de PI nas proteínas, desta forma são modificações pós-tradicionais da mesma proteína. A maioria das mudanças de PI observadas em gel 2DE tem sido relacionadas a diferentes níveis de fosforilação, como observado nos perfis de fosfoproteoma (Figura 19). A grande maioria das proteínas

identificadas foram fosforiladas, com exceção do spot 85A. No caso do spot 168A do primeiro tratamento e seu equivalente no segundo tratamento 181B, identificados como RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic, em ambos tratamentos existe fosforilação quando as plantas não foram ainda submetidas à infestação, sendo claramente maior no segundo tratamento, mas, depois da infestação, a fosforilação diminuí consideravelmente nos dois tratamentos até quase desaparecer.

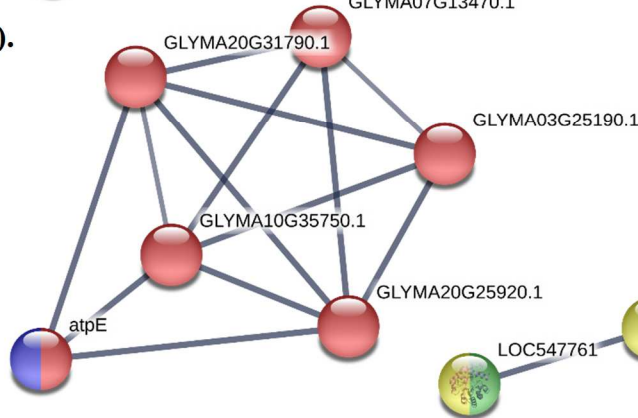
3.3.5 Caracterização funcional das proteínas

As interações proteína-proteína foram avaliadas usando o banco de dados STRING visando obter informações adicionais sobre a atuação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas no metabolismo das duas variedades de soja expostas à infestação pela lagarta *A. gemmatilis*. Ainda foram poucas as proteínas identificadas algumas delas exibiram interações funcionais entre si nos dois tratamentos (Figura 21).

A).



B).



PROTEINA	UNIPROT/BLASTP IDENTIFICAÇÃO	T1	T2	STRING	STRING IDENTIFICAÇÃO
0B2Q0P6	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	X	X	GLYMA16G25860.1	Uncharacterized protein
A173CSR3	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	X	X	GLYMA20G25920.1	ATP synthase subunit beta ; Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane
I1KTX8	Phosphoglycerate kinase	X	X	GLYMA08G17610.1	Phosphoglycerate kinase
A0A0B2NTV4	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	X	X	GLYMA12G08310.1	Uncharacterized protein
A0A0R0G6T3	Protein REVEILLE 8 isoform X4	X	X	LOC547761	Triosephosphate isomerase
C6TLM4	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	X		lhcb1*7	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic
A0A0B2P279	Ferredoxin--NADP reductase	X		GLYMA16G23710.1	Ferredoxin--NADP reductase
A0A0R0GUJ1	Protein REVEILLE 8 isoform X1	X		GLYMA13G19910.1	Uncharacterized protein
A0A0B2QTX6	Carbonic anhydrase Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic	X		GLYMA19G01050.1	Carbonic anhydrase ; Reversible hydration of carbon dioxide
I1MFL4	Fructokinase-4	X		GLYMA15G11910.1	Uncharacterized protein
I1M561	Fructokinase-4	X		GLYMA13G41960.1	Uncharacterized protein
A0A0B2NYC2	Malate dehydrogenase	X		GLYMA06G34190.1	Malate dehydrogenase
A0A0B2Q4F4	Putative aldo-keto reductase 1	X		GLYMA19G43360.1	Uncharacterized protein
A0A0R0KKR3	Aldo-keto reductase family 4 member C9		X	GLYMA03G11610.1	Uncharacterized protein
A0A0B2QEI9	Bark storage protein A		X	GLYMA06G08860.1	Uncharacterized protein
A0A0B2P7L1	Stem 31 kDa glycoprotein	X		LOC547820	Stem 31 kDa glycoprotein ; May function as somatic storage protein during early seedling development

Figura 21. Redes de interação funcional das proteínas identificadas de cada tratamento feitas na plataforma STRING e tabela de identificação das proteínas. A). Redes de interação do primeiro tratamento. B). Redes de interação do segundo tratamento, **O Fosforilação oxidativa**; **O Fotossíntese**; **O Fixação de carbono**; **O Glicólise / gliconeogênese**; **O Metabolismo do carbono**; **O Metabolismo de frutose e manose**.

Utilizando um padrão de não mais de 5 interações e com uma confiança de 0.700, as proteínas identificadas estiveram envolvidas nos processos metabólicos de fosforilação oxidativa (6), fotossíntese (3), fixação de carbono em organismos fotossintéticos (3), metabolismo de carbono (3), metabolismo de frutose e manose (2) e glicólise / gliconeogênese (2) (figura 21A). Para o segundo tratamento e utilizando o mesmo padrão as proteínas identificadas estiveram envolvidas nos processos metabólicos de fosforilação oxidativa (6), fotossíntese (2), fixação de carbono em organismos fotossintéticos (2) e glicólise / gliconeogênese (2), vias de metabolismo primário semelhantes nos dois tratamentos. A maior rede para ambos os tratamentos, corresponde à via da fosforilação oxidativa.

As proteínas de cada tratamento foram classificadas no *EuKarioto Orthologous Groups* (KOG) (Figura 22).

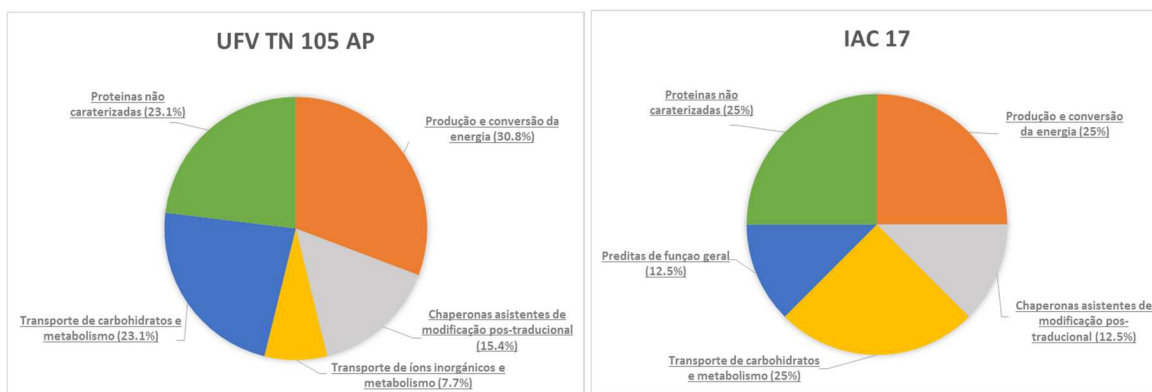


Figura 22. Classificação funcional das proteínas feito no KOG, das duas variedades de soja agrupadas conforme as classes funcionais das proteínas identificadas. Genótipo UFV TN 105 AP e IAC 17.

Para o genótipo UFV TN 105AP a classificação funcional das proteínas identificadas mostrou que 30.8% tem função na produção e conversão da energia, 15.4% são Chaperonas assistentes de modificação pos-traducional, 7.7% atuam no transporte de íons inorgânicos e metabolismo, 23.1% no transporte de carboidratos e metabolismo e 23.1% das proteínas foram não caracterizadas. Para o genótipo IAC 17, a classificação funcional das proteínas identificadas mostrou que 25% tem função na produção e

conversão da energia, 12.5% são Chaperonas assistentes de modificação pos-traducional, 25% no transporte de carboidratos e metabolismo, 12.5% de função geral e 25% das proteínas foram não caracterizadas (Figura 20). Estes resultados obtidos corresponderam as proteínas que conseguiram se identificar, espera-se continuar no processo para assim conseguir identificar mais proteínas e assim determinar maiores redes de interação nos tratamentos.

3.4 Referencias

AGRAWAL, G.K.; THELEN, J.J. 'A high-resolution two dimensional Gel-and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling', *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*. 2009. 3-19.

ALIFERIS, K.A., CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. **Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives**. *Metabolomics*. 2011. 7: 35-53.

ALIFERIS, K.A., FAUBERT, D., JABAJI, S. **A Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense against Fungal Pathogens**. PLoS ONE. 2014 9(11), e111930. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111930>

AMAZONAS, L. **Soja. In: Perspectivas para a agropecuária**. *Perspec. Agropec.* Brasília. 2017; 5:95-111.

ARIMURA, G.I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. **Chemical and Molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions**. *Plant. Cell. Physiol.* 2009. 50, 911-923.

ARYAL, U.K., KROCHKO, J.E. ROSS, A.R.S. 'Identification of phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* leaves using polyethylene glycol fractionation, immobilized metal-ion affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry', *J. prot. Res.* 2011.11: 425-37.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool**. *J. mol. Biol.* 1990. 215: 403-410.

AZEVEDO, L.A.S.; JULIATTI, F.C.; BARRETO, M. **Resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi***. *Sum. Phytop.* 2007. 33, 252-257. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052007000300007>

BARAH, P., BONES, A.M. **Multidimensional approaches for studying plant defence against insects: from ecology to omics and synthetic biology**. *J. Exp. Bot.* 2015. 66: 479-93. doi: 10.1093/jxb/eru489. Epub 2014 Dec 22.

BENGOECHEA, L., HERNÁNDEZ, T., QUESADA, BARTOLOMÉ, C. B., ESTRELLA, I., GÓMEZ-CORDOVÉS, C. **Structure of hydroxycinnamic acid**

derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*. 1995. 41: 94. <https://doi.org/10.1007/BF02274201>

BRODERSEN, P., PETERSEN, M., PIKE, H. M., OLSZAK, B., SKOV, S., ØDUM, N., ... MUNDY, J. **Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense.** *Genes & Development*. 2002. 16: 490–502. <http://doi.org/10.1101/gad.218202>

CUADROS-INOSTROZA, A., CALDANA, C., REDESTIG, H., KUSANO, M., LISEC, J., PEÑA-CORTÉS, H., WILLMITZER, L., HANNAH, M.A. **'TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data'**, *BMC bioinformatics*, 2009. 10: 428.

DA SILVA, D., HOFFMANN-CAMPO, C., DE FREITAS BUENO, A., DE FREITAS BUENO, R., DE OLIVEIRA, M., MOSCARDI, F. **Biological characteristics of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) for three consecutive generations under different temperatures: Understanding the possible impact of global warming on a soybean pest.** *Bul. Ent. Res.* 2012. 102: 285-292. doi:10.1017/S0007485311000642

DANIELS, L.A. **Selenium metabolism and bioavailability.** *Biological Trace Element Research*. 1996. 51: 185–199.

DAS, A., RUSHTON, P. J., & ROHILA, J. S. **Metabolomic Profiling of Soybeans (Glycine max L.) Reveals the Importance of Sugar and Nitrogen Metabolism under Drought and Heat Stress.** *Plants*. 2017. 6: 21. <http://doi.org/10.3390/plants6020021>

DE VOS, R.C., MOCO, S., LOMMEN, A., KEURENTJES, J.J., BINO, R.J., et al. **Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** 2007. *Nat Prot* 2: 778–791.

DE SCHUTTER, K., VAN DAMME, E.J. **Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity.** *Molecules*. 2015. 20: 9029-53. doi: 10.3390/molecules20059029.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. **Plant volatiles: Recent Advances and Future Perspectives.** *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006. 25: 417-440.

ESPOSITO, S. **Nitrogen Assimilation, Abiotic Stress and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: The Full Circle of Reductants.** *Plants*. 2016. 5: 24. <http://doi.org/10.3390/plants5020024>

FALCONE FERREYRA, M.L., RIUS, S.P., CASATI, P. **Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications.** *Front. Plant Sci.* 2012. 3: 222. doi:10.3389/fpls.2012.00222.

KANG, J.H., WANG, L., GIRI, A., BALDWIN, I.T. **Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*.** *Plant Cell*. 2006. 18: 3303–20. doi: 10.1105/tpc.106.041103.

KELLER, A., NESVIZHSHKII, A.I., KOLKER, E., AEBERSOLD, R. **Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.** *Anal. Chem.* 2002. 74: 5383-5392.

KOMATSU, S., NAKAMURA, T., SUGIMOTO, Y., SAKAMOTO, K. **Proteomic and metabolomic analyses of soybean root tips under flooding stress.** *Protein. Pept. Lett.* 2014. 21: 865-84.

GILL, R.S.; GUPTA, K.; TAGGAR, G.K.; TAGGAR, M.S. **Role of oxidative enzymes in plant defenses against herbivory.** *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 2010. 45: 277-90. <http://dx.doi.org/10.1556/APhyt.45.2010.2.4>

GIRON, D., GLEVAREC, G. **Cytokinin-induced phenotypes in plant insect interactions: Learning from the bacterial world.** *J. Chem. Ecol.* 2014. 40: 826–835.

GONZALEZ UREÑA G., OREA J., MONTERO C., JIMENEZ J., GONZALEZ J., SANCHEZ A., et al. **Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol.** *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51: 82–89
10.1021/jf020663v

HARTMAN, G.L., WEST, E.D., HERMAN, T.K. **Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests.** 2011. *Food Security* 3: 5–17.

HOWE, G.A.; JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59: 41-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, 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. 70p. (Circular Técnica, 30).

IBRAHIM, H.A. E ABDELLATIF Y.M.R. **Effect of maltose and trehalose on growth, yield and some biochemical components of wheat plant under water stress.** *Annals of agricultural Sciences.* 2016. 61: 267-274.

JÄPELT, R. B., JAKOBSEN, J. **Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis.** *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 136. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00136>

JENSEN, P.D., JOHNSON, L.R., TRUMBLE, J.T. **Individual and joint actions of selenate and methylmercury on the development and survival of insect detritivore *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae).** *Arch. Env. Cont. Tox.* 2006. 50: 523–530.

JOHNSON, J., MAHER, P., HANNEKEN, A. **The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase II gene expression.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009. 50: 2398–2406. <http://doi.org/10.1167/iovs.08-2088>

LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L., FERNIE, A.R. **'Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants'**, *Nature protocols*, 2006. 1: 387.

LISEC, J., STEINFATH, M., MEYER, R.C., SELBIG, J., MELCHINGER, A.E. WILLMITZER, L., ALTMANN, T. **'Identification of heterotic metabolite QTL in Arabidopsis thaliana RIL and IL populations'**, *The Plant Journal*, 2009. 59: 777-88.

LOURENÇÃO, A.L.; COSTA, A S.; MIRANDA, M.A.C. **Sources of resistance to Insect pests and virus vector in the soybean gemplasm tested at Instituto Agronomico, SP, Brasil.** In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4. 1989, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Editora S.R.L., 1989. p. 1578-1581.

LOURENÇÃO, A.L.; BRAGA, N.R.; COELHO DE MIRANDA, M.A.; VALLE, G.E. PEREIRA, J.; RECO, P.C. **Avaliação de Danos de Percevejos e de Desfolhadores em Genótipos de Soja de Ciclos Precoce, Semiprecoce e Médio.** *Neotrop. Entomol.* 2002. 31: 623-630.

MANN J. **Secondary Metabolism.** Oxford: Clarendon Press; 1978. p. 316.

MATIRU V.N., DAKORA F.D. **The rhizosphere signal molecule lumichrome alters seedling development in both legumes and cereals.** *New Phytol.* 2005a. 166, 439–444. [10.1111/j.1469-8137.2005.01344.x](http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01344.x)

MAURINO, V.G., ENGQVIST, M.K.M. **2-Hydroxy Acids in Plant Metabolism. The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists.** 2015. 13: e0182. <http://doi.org/10.1199/tab.0182>

MIERZIAK, J., KOSTYN, K., KULMA, A. **Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment.** *Molecules.* 2014. 19: 16240-65. doi: [10.3390/molecules191016240](http://doi.org/10.3390/molecules191016240).

MIRANDA, M.A.C; BRAGA, N.R; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T.S; UNÊDAII, S.H.; FUMIKO M. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos.** *Bragantia.* 2003a. 62: 19-27

MIRANDA, M. A. C.; BRAGA, N. R.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, F. T. S.; UNÊDA, S. H.; ITO, M. F. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos.** *Bragantia.* Campinas. 2003b. 62: 29-37.

MARCHLER-BAUE, R A., PANCHENKO, A.R., SHOEMAKER, B.A., THIESSEN, P.A., GEER, L.Y., BRYANT, S.H. **CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure.** *Nuc. Ac. Res.*, 2002. 30: 281-283.

MIRANDA, M.A.C; BRAGA, N.R; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T.S; UNÊDAII, S.H.; FUMIKO M. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos.** *Bragantia*. 2003a. 62: 19-27

MIRANDA, M.A.C.; BRAGA, N.R.; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T. S.; UNÊDA, S.H.; ITO, M.F. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos.** *Bragantia*. Campinas. 2003b. 62: 29-37.

MITHÖFER, A., MAFFEI, M.E. **General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins.** *Plant Toxins*. 2017;3-24.

MORAES, R.M.A.; JOSÉ, I.C., RAMOS, F.G., BARROS, E.G. MOREIRA, M.A. **Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína.** *Pesq. agropec. bras.* 2006, 41: 715-729. ISSN 1678-3921. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500002>.

MUEMA, J. M., NJERU, S. N., COLOMBIER, C., MARUBU, R. M. **Methanolic extract of *Agerantum conyzoides* exhibited toxicity and growth disruption activities against *Anopheles gambiae sensu stricto* and *Anopheles arabiensis* larvae.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016. 16: 475. <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1464-7>

MUSSURY, R.M.; BETONI, R.; SILVA, M.A. SCALON, S.P.Q. **Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais.** *Rev. bras. plantas med.* 2012, 14: 37-47. ISSN 1516-0572. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000100004>.

NAKABAYASHI, R., SAITO, K. **Metabolomics for unknown plant metabolites.** 2013. *Anal Bioanal Chem*: 1–7.

NESVIZHSHKII, A.I., KELLER, A., KOLKER, E., ABERSOLD, R. **A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.** *Anal. Chem.* 2003. 75: 4646-4658.

NGUYEN, D., RIEU, I., MARIANI, C., VAN DAM, N.M. **How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory.** *Plant Molecular Biology*. 2016. 91, 727–740. <http://doi.org/10.1007/s11103-016-0481-8>

NIELSEN, T.H., RUNG, J.H., VILLADSEN, D. **Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism.** *Trends Plant Sci.* 2004. 9: 556-63.

NUNES, R.M. **Avaliação da qualidade proteica de diferentes cultivares de soja e farinha mista de soja e milho e análise proteômica da soja.** 2011. 50f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

RIZHISKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S., MITTLER, R. **When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a**

Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*. 2004. 134(4), 1683–1696. <http://doi.org/10.1104/pp.103.033431>

RIBEIRO, A.P.B., GRIMALDI, R., GIOIELLI, L.A., GONÇALVES, L.A.G. **Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: physico-chemical properties and food applications.** 2009. *Food Res. Int.* 42: 401–410.

ROSSETTO, C. J.; TISSELI FILHO, O.; CIONE, J.; GALLO, P. B.; RAZERA, L. F.; TEIXEIRA, J. P. F. **Cultivar de soja IAC 100.** Campinas, 1987.

SCHAUER, N., FERNIE, A.R. **Plant metabolomics: towards biological function and mechanism.** *Trends Plant Sci.* 2006. 11: 508–516.

SCHÄFFER, A.A., WOLF, Y.I., PONTING, C.P., KOONIN, E.V., ARAVIND, L., ALTSCHUL, S.F. **IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices.** *Bioinformatics*, 2015. 15: 1000–1011.

SCHOLZ, S.S., REICHELT, M., MEKONNEN, D.W., LUDEWIG, F., MITHÖFER, A. **Insect Herbivory-Elicited GABA Accumulation in Plants is a Wound-Induced, Direct, Systemic, and Jasmonate-Independent Defense Response.** *Frontiers in Plant Science*. 2015. 6, 1128. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.01128>.

SCHOLZ, S.S., MALABARBA, J., REICHELT, M., HEYER, M., LUDEWIG, F., MITHÖFER, A. **Evidence for GABA-Induced Systemic GABA Accumulation in Arabidopsis upon Wounding.** *Frontiers in Plant Science*. 2017. 8: 388. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00388>

SCHULTZ, J.C., APPEL, H.M., FERRIERI, A.P., ARNOLD, T.M. **Flexible resource allocation during plant defense responses.** *Frontiers in Plant Science*, 2013. 4: 324. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00324>

SHAHIDI F. **Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods.** *Trends Food Sci Technol.* 2009. 20: 376–387.

SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., AND PESSARAKLI, M. **Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.** *J. Bot.* 2012: 217037. doi: 10.1155/2012/217037

SHIVAJI. R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, P.R.; LUTHE, D.S. **Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize.** *J. Chem. Ecol.* 2010. 36: 179-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9752-z>.

SILVA, J.P.G.F., BALDIN, E.L.L., SOUZA, E.S., CANASSA, V.F., LOURENÇÃO, A.L. **Characterization of antibiosis to the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean entries.** *J. Pest. Sci.* 2013. 86: 649–657.

SMITH, C.M. **Plant resistance to arthropods molecular and conventional approaches.** 1a Edição. ISBN 978-1-4020-3702-3. Springer, Dordrecht. 2005.

SCHILLING, S., STENZEL, I., VON BOHLEN, A., WERMANN, M., SCHULZ, K., DEMUTH, H.U., WASTERNAACK, C. **Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions.** *Biol Chem.* 2007. 388: 145-53.

SCHWARTZBERG, E.G., TUMLINS, J.H. **Aphid honeydew alters plant defence responses.** 2014. 28: 386–394

SMITH, C.M., CLEMENT, S.L. **Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods.** *Annu. Rev. Entomol.* 2012. 57: 309–28.

SINGH, B., SHARMA, R.A. **Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications.** 3 *Biotech*, 2015. 5: 129–151. <http://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>

SONG, G.C., CHOI, H.K., RYU, C.M. **The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against Cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis*.** *Annals of Botany.* 2013. 111: 925–934. <http://doi.org/10.1093/aob/mct049>

SOUZA, E.F., BALDIN, E.L.L., SILVA, J.P.G.F., LOURENÇAO, A.L. **Feeding preference of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and attractiveness of soybean genotypes.** *Chilean J. Agric. Res.* 2013, vol.73, pp. 351-357. ISSN 0718-5839. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000400004>.

SOUZA, E.S., SILVA, J.P., BALDIN, E.L., PIEROZZI, C.G., CUNHA, L.S., CANASSA V.F., PANNUTI, L.E., LOURENÇÃO, A.L. **Response of Soybean Genotypes Challenged by a Stink Bug Complex (Hemiptera: Pentatomidae).** *J. Econ. Entomol.* 2015. pii: tov341. [Epub ahead of print]

SOUZA, E.S., CANASSA, V.F., BENTIVENHA, J.P.F., BALDIN, E.L.L., PIEROZZI, C.G., LOURENÇÃO, A.L., PANNUTI, L.E.R. **Variable Levels of Resistance of Soybean Genotypes on the Performance of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae).** *J. Econ. Entomol.* 2017. 110: 2672-2678. doi: 10.1093/jee/tox254.

SZKLARCZYK, D., FRANCESCHINI, A., WYDER, S., FORSLUND, K., HELLER, D., HUERTER-CEPAS, J., SIMONOVIC, M., ROTH, A., SANTOS, A., TSAFOU, K.P., KUHN, M., BORK, P., JENSEN, L.J., MERING, C.V. **STRING v10.5: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life.** *Nuc. Ac. Res.*, 2014. 43: 447-52.

TAKAHASHI, H., IMAMURA, T., KONNO, N., TAKEDA, T., FUJITA, K., KONISHI, T., ... UCHIMIYA, H. **The Gentio-Oligosaccharide Gentiobiose Functions in the Modulation of Bud Dormancy in the Herbaceous Perennial *Gentiana*.** *The Plant Cell.* 2014. 26: 3949–3963. <http://doi.org/10.1105/tpc.114.131631>

TATUSOV, R.L., FEDOROVA, N.D., JACKSON, J.D., JACOBS, A.R., KIRYUTIN, B., KOONIN, E.V., KRYLOV, D.M., MAZUMDER, R., MEKHEDOV, S.L.,

NIKOLSKAYA, A.N., RAO, B.S., SMIRNOV, S., SVERDLOV, A.V., VASUDEVAN, S., WOLF, Y.I., YIN, J.J., NATALE, D.A. **The COG database: an updated version includes eukaryotes.** *BMC Bioinformatics*, 2003.4: 1-14.

USHA, R.P., JYOTHSNA, Y. **Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense.** *Acta. Physiol. Plant.* 2010. 32: 695-701.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0449-2>.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L. **Resistência de genótipos de soja a Bemisia tabaci (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae).** *Neotrop. Entomol.* Londrina. 2002. 31: 285-295.

VERMA, V., RAVINDRAN, P., KUMAR, P.P. **Plant hormone-mediated regulation of stress responses.** *BMC Plant. Biol.* 2016. 16: 86.
doi: 10.1186/s12870-016-0771-y.

VERHAGE, A., VAN WEES, S.C.M., PIETERSE, C.M.J. **Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?.** *Plant. Physiol.* 2010, 154: 536-40
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.161570>.

VIEIRA, S.S., BUENO, A.F., BOFF, M.I.C., BUENO, R.C.O.F., HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Resistance of soybean genotypes to biotype B of the whitefly Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae).** *Neotrop. Entomol.* 2011. 40: 117-122.

WAR, AR., PAULRAJ, M.G., AHMAD, T., BUHROO, A.A., HUSSAIN, B., IGNACIMUTHU, S., SHARMA, H.C. **Mechanisms of plant defense against insect herbivores.** *Plant. Signal. Behav.* 2012. 7: 1306-20. doi: 10.4161/psb.21663.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (Arachis hypogaea L.) against Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).** *J. Plant. Growth. Regul.* 2011a; 30:512-23; <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-011-9213-0>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, Spodoptera litura (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Plant. Signal. Behav.* 2011b. 6: 1769-77.
<http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17323>.

ZEIER, J. **New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways.** *Plant Cell Environ.* 2013. 36:2085–2103.

ZHANG, J., YANG, D., LI, M., SHI, L. **Metabolic Profiles Reveal Changes in Wild and Cultivated Soybean Seedling Leaves under Salt Stress.** *PLoS ONE.* 2016. 11: e0159622. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0159622>

ZHANG, J., YANG, D., LI, M., SHI, L. **Metabolic Profiles Reveal Changes in Wild and Cultivated Soybean Seedling Leaves under Salt Stress.** *PLoS ONE.* 2016. 11: e0159622. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0159622>.

ZHANG, J., YI SHI, Y., ZHANG, X., DU, H., XU, B., HUANG, B. **Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)**. *PLoS ONE*. 2017. 138: 36-45

**Parte II: Efeito biológico da suplementação de
extratos metanólicos de soja na performance da
*A. gemmatalis***

Capítulo 4. Extratos de folhas de soja resistente a infestação afetam a capacidade digestiva de *Anticarsia gemmatalis*

Jenny D. Gómez¹, Mariana S. O. Campos¹, Juan V. Romero³, Yaremis Meriño-Cabrera¹, André L. Lourenção⁴, Jose E. Serrão³, Humberto J. O. Ramos^{1,2}, Maria G. A. Oliveira¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFV, Laboratory of Enzymology, Biochemistry of Proteins and Peptides, BIOAGRO/INCT-IPP, Viçosa-MG, Brazil; ²Center of Analysis of Biomolecules, NuBioMol, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil; ³Departamento de Biologia UFV, Viçosa-MG, Brasil; ⁴Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP.

Resumo

As plantas de soja estão expostas ao ataque de insetos pragas como é *Anticarsia gemmatalis*, que causam desfolhamento e diminui a produtividade nas lavouras. Entretanto alguns genótipos de soja têm apresentado menores níveis de infestação. Portanto é importante determinar os mecanismos moleculares que expliquem la resistência, para o desenvolvimento por engenharia genética ou melhoramento genético convencional, de genótipos de soja resistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos metanólicos obtidos de plantas de soja dos genótipos UFVTN 105AP e IAC 17 sobre a sobrevivência, atividade proteolítica e histologia intestinal de *A. gemmatalis*. Extratos metanólicos foram preparados a partir de folhas dos genótipos de soja UFVTN 105 AP (susceptível) e IAC 17 (resistente) expostas e não-expostas à infestação com *A. gemmatalis*. Os extratos foram adicionados na dieta artificial, e foi avaliada a sobrevivência de *A. gemmatalis* durante toda a fase larval. Intestinos médios das lagartas expostas aos tratamentos, foram extraídos para análises de atividade de serino e cisteino-proteases, proteases totais e análises histológicas. Foi observada a menor taxa de sobrevivência nos insetos alimentados com a dieta contendo os extratos metanólicos comparado com o controle. Entretanto, as menores taxas de sobrevivência foram verificadas para o extrato da variedade resistente IAC 17. Em adição, os extratos provenientes do genótipo resistente reduziram a capacidade digestiva como verificado pela redução da atividade proteolítica especialmente amidásica e esterásica. Além dos efeitos fisiológicos nos intestinos, foram visualizados que as células intestinais tiveram diversas malformações em suas estruturas. Compostos bioativos na redução da capacidade digestiva e sobrevivência estão presentes nas folhas de ambos os genótipos,

porém sintetizados em concentrações distintas que justificam a diferença de resistência à infestação pelas lagartas nas plantas.

Palavras chave: Sobrevivência, desfolhamento, intestino, inibição.

Abstract

Soybean plants are exposed to biotic stresses such as attacks of insect pests such as *Anticarsia gemmatalis*, which cause defoliation and decrease yields in soybean crops. However, some soybean genotypes have lower infestation levels. Therefore, it is important to determine the possible molecular mechanisms that explain the resistance, the development by genetic engineering or conventional genetic improvement of resistant soybean genotypes. The aim of this work was to evaluate the effect of methanoic extracts obtained from soybean plants genotypes UFVTN 105AP and IAC 17 on survival, proteolytic activity and intestinal histology of *A. gemmatalis*. Methanoic extracts were prepared from leaves of the soybean genotypes UFVTN 105 AP (susceptible) and IAC 17 (resistant) exposed and not exposed to *A. gemmatalis* damage. The extracts were added to the artificial insect diet, and the *A. gemmatalis* survival was evaluated, throughout the larval phase. Intestines of the larvae exposed to the treatments were extracted for analysis of serine protease and cysteine proteases activity, total proteases and histological analyzes. It was observed a lower survival rate in the insects fed the diet containing the methanoic extracts compared to the control. However, the lowest survival rates were verified for the extract of the resistant variety IAC 17. In addition, the extracts from the resistant genotype reduced the digestive capacity as verified by the proteolytic activity especially amidolytic and esterolytic (trypsin-like and cysteine-proteases enzymes activity). Besides the physiological effects in the intestines, it was visualized that the intestinal cells had several malformations in their structures. Bioactive compounds in the reduction of digestive capacity and survival are present in the leaves of both genotypes, but synthesized in distinct concentrations that justify the difference in resistance to infestation by larvae.

Key words: Survival, defoliation, intestine, inhibition

4.1 Introdução

Desde o estabelecimento da civilização, a modificação antropogênica dos habitats naturais para o estabelecimento da agricultura gerou condições apropriadas para o estabelecimento de pragas (JARJU, 2009). Estima-se que os insetos pragas podem ser responsáveis por perdas de 18% da produção agrícola (OERKE E-C, 2006), sendo que no Brasil este valor atingiu 7.7% (OLIVEIRA, et al., 2014). Como consequência tem sido necessária a utilização de grandes quantidades de inseticidas para o controle de pragas, entretanto com grandes impactos no ecossistema agrícola (BUENO et al., 2012). Assim, os biopesticidas, compostos obtidos diretamente das plantas, são uma alternativa sustentável para o manejo controlado de pragas, causando menor desequilíbrio ambiental (CARLINI, et al., 2002).

Por outro lado, a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) contribui à economia do Brasil, pois corresponde ao produto de maior exportação nos últimos anos, sendo o segundo maior produtor mundial (AMAZONAS, 2017). Estresses bióticos como o ataque de insetos pragas tem limitado o aumento da produção, incentivando por meio de melhoramento genético, o desenvolvimento de variedades resistentes (LOURENÇÃO et al., 1989; MIRANDA et al., 2003a; 2003b). Insetos como *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) constituem uma das pragas principais da soja no hemisfério Ocidental, incluindo o Brasil (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; DA SILVA et al., 2012). Este inseto mastigador conhecido como a lagarta-da-soja, ocasiona desfolhamento total das plantas, levando a perdas na produtividade (SINGH, 2010). Atualmente, no Brasil, o programa de manejo integrado de pragas da soja inclui a rotação de culturas, controle biológico, uso de inseticidas e plantio de variedades resistentes (DUPONT, 2017). Alguns exemplos de genótipos desenvolvidos que são resistentes à insetos praga são, IAC 100 (ROSSETTO et al., 1987), IAC 17, IAC 19 (VALLE e LOURENÇÃO, 2002), IAC 23 e IAC 24 (MIRANDA et al., 2003a, 2003b). Os cultivares IAC 17 e IAC 24 são resistentes especificamente para *A. gemmatalis* e outros insetos praga, mas as causas da resistência destes genótipos não são conhecidas. Alguns autores atribuem a resistência da soja a metabólitos secundários (ZHOU et al., 2011; SILVA et al., 2013), como os flavonoides (PIUBELLI et al., 2005; ZAVALA et al., 2015).

Alguns trabalhos têm demonstrado o uso de extratos de plantas como biopesticidas em lepidopteros (KNAAK et al. 2010; MARTINEZ et al., 2001; MARTINEZ, 2002; KNAAK et al., 2013), provando o efeito nocivo na biologia destes

insetos, assim como diminuição do tamanho e mudanças na morfologia do intestino médio.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos dos extratos metanólicos obtidos de plantas de soja dos genótipos UFVTN 105AP e IAC 17 sobre a sobrevivência, atividade proteolítica e histologia intestinal de *A. gemmatalis*.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Material biológico

O cultivar UFV TN 105 AP, foi fornecido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais (Brasil), e o “IAC 17”, pelo Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, (Brasil). As lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação massal do Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de proteínas e peptídeos da UFV.

4.2.2 Preparação dos extratos

Plantas de soja das variedades UFV TN 105 AP e “IAC 17” foram plantadas e mantidas em casa de vegetação a temperaturas entre 22,1 a 35,1°C, até chegar a estádios entre V4 e V6. Posteriormente, foram submetidas a desfolhação por larvas de primeiro e segundo instar de *A. gemmatalis* durante 50h. Após o período de infestação, foram coletadas as folhas injuriadas de cada genótipo e armazenadas a -80°C. Como controle foram utilizadas plantas não expostas a infestação. Os extratos foram identificados como: extrato de folhas UFV TN 105 AP sem infestar (UFVTN 105 AP T1); extrato de folhas UFV TN 105 AP infestadas (UFVTN 105 AP T2), extrato de folhas IAC 17 infestadas (IAC 17 T1) e extrato de folhas IAC 17 sem infestar (IAC 17 T2).

Para a preparação dos extratos, as folhas foram pesadas e maceradas com nitrogênio líquido. Por cada 100 mg de tecido foram adicionados 200 ul da solução extratora (metanol 75% e ácido fórmico 0,1%), submetidos a ultrassom por 30 min e centrifugados a 14.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e o procedimento repetido mais uma vez. Os extratos metanoicos foram liofilizados, e armazenados a -80C.

4.2.3 Preparação das dietas e avaliação da sobrevivência de *A. gemmatalis*

A dieta para as larvas foi preparada como é descrito por HOFFMAN-CAMPO et al. (1985) e suplementada com os extratos antes da polimerização desta. Os extratos foram solubilizados em água deionizada. Três diferentes concentrações de extratos nas dietas foram testadas, sendo 0,035 g tecido/ml dieta; 0,07 g tecido/ml dieta e 0,2 g tecido/ml dieta. O valor de 0,2 g tecido/ml dieta corresponde à quantidade estimada de tecido consumido pelas larvas durante toda a fase larval. Larvas neonatas de *A. gemmatalis* foram criadas e alimentadas com as dietas dos quatro tratamentos e como controle foi usada a dieta livre de extrato. O experimento foi conduzido em sala de criação sob condições controladas (Temperatura: 18,3 a 27,5°C; Umidade Relativa do Ar: 61 a 75% e 14:10 h (L/E)). A sobrevivência das lagartas foi avaliada a cada um a dois dias durante toda a fase larval do inseto.

As análises estatísticas de sobrevivência foram feitas com o pacote “*survival*” (THERNEAU, 1999), no software R (R CORE TEAM, 2014). A função de sobrevivência foi estimada pelo método de Kaplan-Meier, o qual é usado para calcular a função de sobrevivência de uma variável no tempo (POCHÉ, R.M., 2015). O efeito dos extratos na sobrevivência da *A. gemmatalis*, foi comparado com o Test Log-Rank, com uma probabilidade de 90 e 95%.

4.2.4 Atividade proteolítica no intestino de *Anticarsia gemmatalis*

Lagartas de *A. gemmatalis* entre o quarto e quinto instar foram escolhidas para fazer as análises enzimáticas. pois neste período os insetos estão na fase de alimentação com comportamento hiperfágico, portanto uma fase de maior atividade das enzimas digestivas (STYGAR, et al. 2010). Cinco intestinos das lagartas foram extraídos e macerados com bastão estéril de vidro, para cada 1mL de solução HCl 10⁻³ M a 4 °C, centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4°C (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005; ROSSI et al. 2009).

A atividade amidásica de tripsina-like foi determinada com o substrato cromogênico L-BApNA (N- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) em 1,2 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25°C. A mistura reacional foi composta por 400 μ L de tampão Tri-HCl 0,1 M pH 8,0; 300 μ L de substrato e 20 μ L do extrato. A atividade esterásica foi determinada com o substrato L-TAME (N- α -Tosyl-L-argininemethylesterhydrochloride) na concentração final de 0,1 mM. A

mistura reacional foi composta de 400 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 300 µL de substrato e 10 µL do extrato. A formação dos produtos foi calculada a partir dos valores de absorvância a 410 nm e 247 nm para a atividade amidásica e esterasica, respectivamente (ERLANGER et al. 1961).

A atividade de cisteíno-proteases foi determinada (método de ERLANGER et al., 1961 modificada por MENDONÇA et al., 2011) com substrato L-BApNA na concentração final de 0,5 mM, a 25°C e Tris-HCl 0,1 M pH 8,2; contendo 20 mM de CaCl₂ e 5 mM de Ditioneitol (DTT) como solução tampão. A benzamidina a 1 mM foi empregada como inibidor das serino-proteases. A absorvância foi determinada a 410 nm.

A atividade proteásica foi determinada utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0; 37°C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Em seguida, microtubos de plástico de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por cinco minutos a 25°C, para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. As absorvâncias foram determinadas a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas totais expressadas em mg/mL para a obtenção da atividade específica (TELANG, et al. 2003).

Foram empregadas análises descritivas para os dados de atividade obtidos em *A. gemmatalis*. Além disso, foram realizadas análise de variância (one-way ANOVA) para determinar diferenças entre os tratamentos em função da atividade enzimática e estabelecer diferenças entre os substratos amidásicos (BApNA e BTPNA) e esterasico (TAME e ATEE) em *A. gemmatalis*. Para estabelecer possíveis relações entre as atividades enzimáticas determinadas em *A. gemmatalis*, foi realizado uma análise de correlação de Pearson. Para todas as análises foi empregado o software estatístico R 3.4.4.

4.2.5 Análises de inibição in vitro

A atividade inibitória dos extratos vegetais foi testado sobre as tripsinas do intestino de *A. gemmatalis* e a tripsina pancreática bovina. Foi empregado o substrato cromogênico L-BApNA (N- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) em 1,2

mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25°C. A mistura reacional foi composta por 40 µL de tampão Tri-HCl 0,1 M pH 8,0; 30 µL de substrato e 20 µL do extrato e 10 µL da enzima modelo.

4.2.6 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA), na faixa de concentração de 0 a 25 mg/mL para a obtenção da curva padrão.

4.2.7 Análises histológicas do intestino de *A. gemmatalis*

Quatro larvas de quarto e quinto instar alimentadas com as dietas de cada tratamento foram coletadas. As lagartas foram dissecadas em 125 mM NaCl e transferidas a solução fixadora de Zamboni. Os intestinos médios foram extraídos das lagartas e posteriormente desidratados em diferentes concentrações de etanol (70%, 80%, 90%, 95%) e embebidos em historesina JB-4. Porções de 3 µm foram coloridas com hematoxilina e eosina e foram observadas no microscópio de luz.

As análises histológicas do intestino da *A. gemmatalis* foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular, Molecular e Centro de Microscopia do Departamento de Biologia Geral da UFV.

4.3 Resultados

4.3.1 Análise de sobrevivência

A concentração dos extratos na dieta foi determinante na sobrevivência da *A. gemmatalis* na sua fase larval. Quando as lagartas foram alimentadas com a menor concentração de extrato (3,5%) na dieta (Figura 1A), o tratamento IAC 17 T1, apresentou diferenças estatisticamente significativas nas taxas de sobrevivência com relação ao controle, diminuindo a sobrevivência em um 50% (49.2 ± 8.5) (Tabela S1, Figura 1A). A exposição das folhas da soja a infestação com as lagartas (IAC 17 T2) não alterou a taxa de sobrevivência na concentração 3,5% (69.2 ± 6.2) com relação ao controle (Tabela S1); mas na concentração de 7% IAC 17 T2 diminuiu 52% a sobrevivência (Tabela 1, Figura 1B).

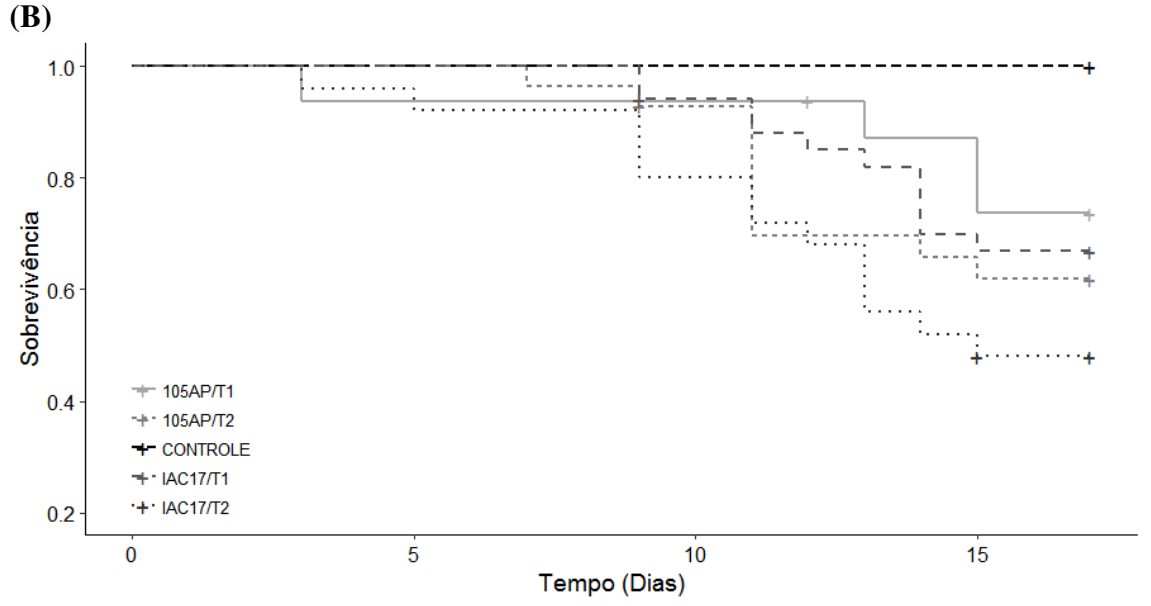
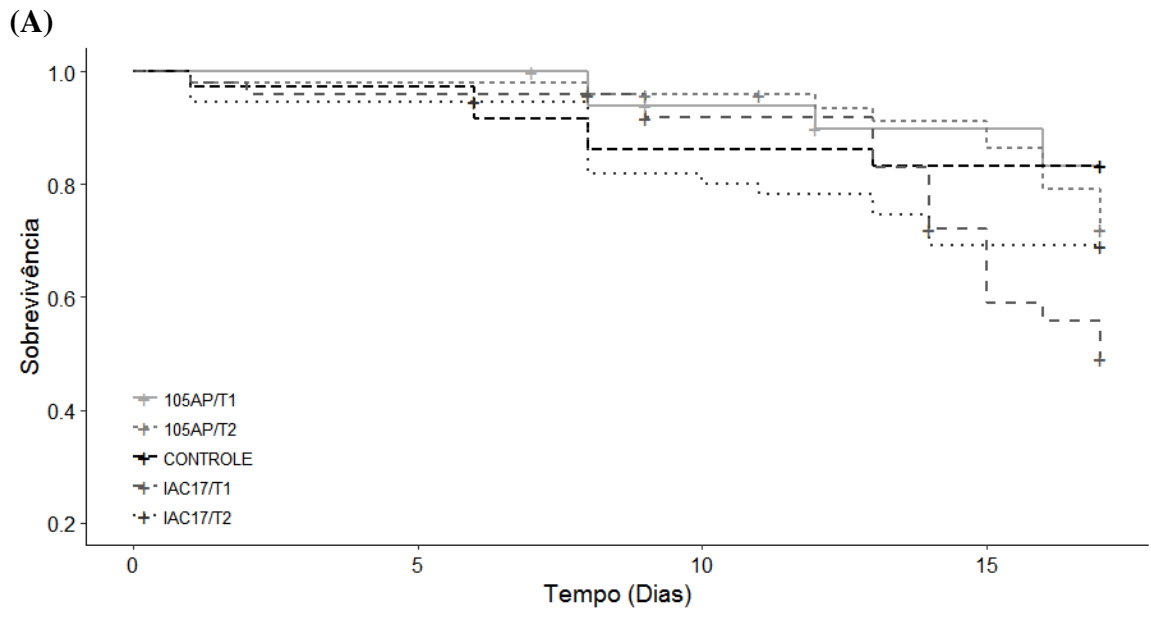
Tabela S1. Sobrevivência de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta suplementada com extratos de plantas

Tratamentos	Concentração extrato na dieta (g tecido/ml dieta)	% sobrevivência ± SE
Controle 1	NA	83.3 ± 6.2 ^a
Dieta + UFVTN 105 AP T1	0,035	83.2 ± 5.42 ^a
Dieta + UFVTN 105 AP T2	0,035	71.9 ± 6.9 ^a
Dieta + IAC 17 T1	0,035	49.2 ± 8.5 ^b
Dieta + IAC 17 T2	0,035	69.2 ± 6.2 ^{ab}
Controle 2	NA	100 ^a
Dieta + UFVTN 105 AP T1	0,07	77.7 ± 11.3 ^b
Dieta + UFVTN 105 AP T2	0,07	61.9 ± 9.5 ^b
Dieta + IAC 17 T1	0,07	66.9 ± 8.2 ^b
Dieta + IAC 17 T2	0,07	48 ± 9.9 ^b
Controle 3	NA	70.9 ± 4.3 ^a
Dieta + UFVTN 105 AP T1	0,2	24.6 ± 4.4 ^b
Dieta + UFVTN 105 AP T2	0,2	46.5 ± 5.7 ^c
Dieta + IAC 17 T1	0,2	53.9 ± 5.6 ^c
Dieta + IAC 17 T2	0,2	53.2 ± 4.9 ^c

Os resultados que têm a mesma letra indica, que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos usando a análise de Log-Rank. SE: erro padrão; NA: não aplica

O tratamento usando o extrato UFVTN 105 AP T1 na maior concentração (20%) causou a diminuição de um 75% na sobrevivência dos insetos, sendo o maior porcentagem comparado ao observado com os demais tratamentos (Tabela 1, Fig. 1C)

Ao comparar à sobrevivência ao longo do tempo foi observado o efeito da concentração do extrato adicionados à dieta (Figura 1), sendo maior ($P \leq 0,05$) para o genótipo resistente IAC 17 em relação ao genótipo tolerante UFVTN 105 AP (Figura 1A). A maior redução da sobrevivência para o genótipo UFVTN 105 AP foi observada no dia 12º, já para o genótipo IAC 17 a queda foi gradual. Não foram observadas diferenças entre os genótipos quando foram adicionadas nas dietas os extratos nas maiores concentrações (7% e 20%), entretanto a mortalidade foi estatisticamente superior que o controle (Figuras 1B e 1C).



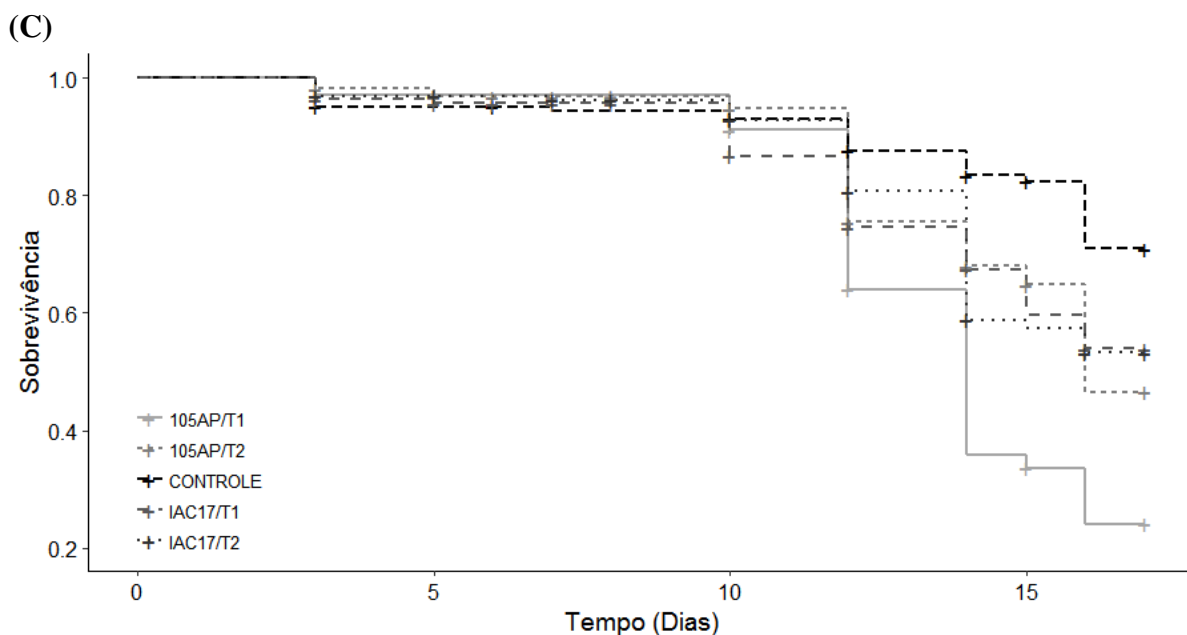


Figura 1. Curvas de sobrevivência de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas suplementadas com extratos de plantas. A). 3,5 % de extrato; B). 7% de extrato; C). 20% de extrato. CONTROLE: Dieta Artificial livre de extratos; 105 AP/T1: Dieta artificial com extrato do genótipo 105 AP sem infestar; 105 AP/T2: Dieta artificial com extrato do genótipo 105 AP exposta a infestação por 50 h; IAC 17/T1: Dieta artificial com extrato do genótipo IAC 17 sem infestar; IAC 17/T2: Dieta artificial com extrato do genótipo IAC 17 exposta a infestação por 50 h.

4.3.2 Atividade proteolítica no intestino de *A. gemmatalis*

Todas as atividades de tripsina amidásica determinadas em cada tratamento foram diferentes do controle ($P \leq 0,05$) e diferentes entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). A menor atividade ($0,31 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} / \mu\text{g}$ de proteína) ($P \leq 0,05$) foi observada no intestino das lagartas alimentadas com o extrato IAC17 T2 (Figura 2A). O mesmo comportamento foi observado para a atividade tripsina estearásica, sendo a maior inibição observada para os extratos provenientes do genótipo IAC 17 após 50 h (T2) de infestação, indicando que neste caso a presença da lagarta induziu um aumento na capacidade inibitória (Figura 2B). Já atividade de cisteino proteases foi levemente reduzida porém sem diferenças entre os genótipos (Figura 2C).

Quando se avaliou a atividade proteolítica total, observou um aumento da inibição somente quando as folhas de soja do genótipo susceptível 105AP foram expostas a infestação com lagartas (Figura 2D).

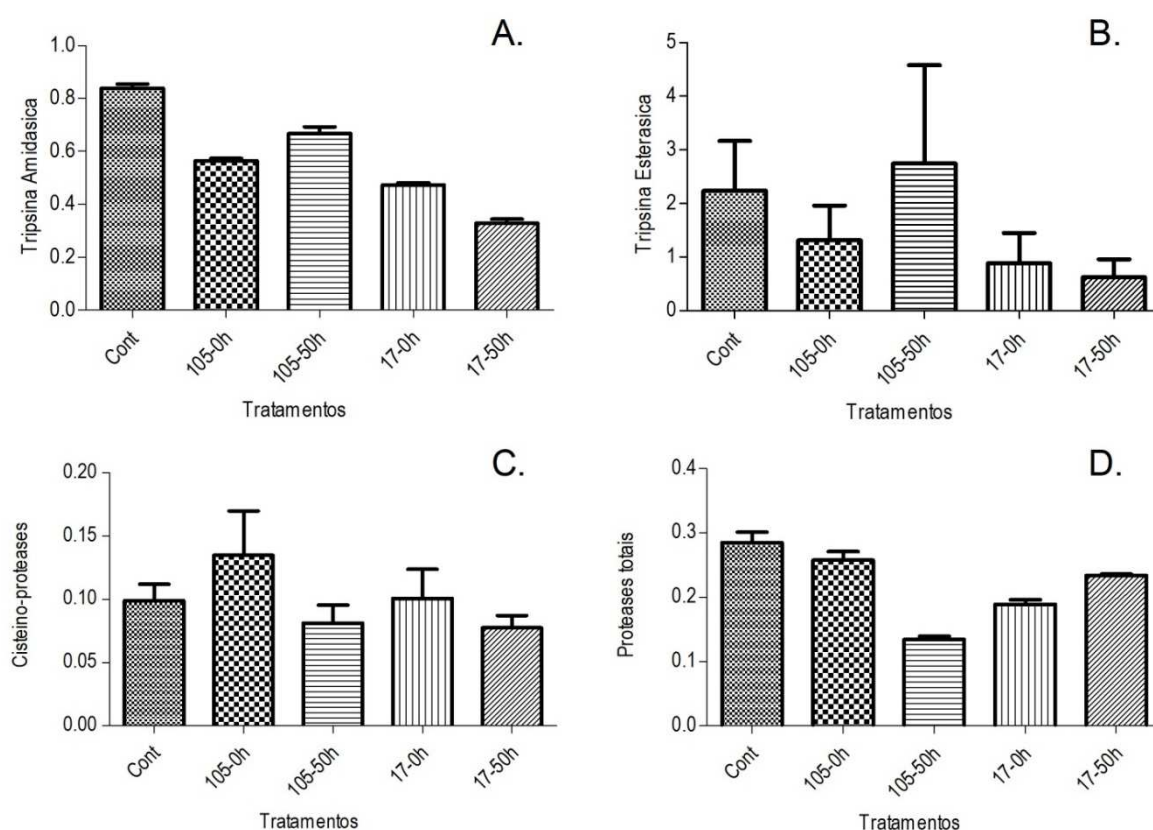


Figura 2. Gráficos de atividade enzimática dos intestinos das larvas de *A. gemmatalis* alimentados com os diferentes tratamentos. Cont: Dieta livre de extratos; 105-0h: Dieta com extrato UFVTN 105 AP T1; 105-50h: Dieta com extrato UFVTN 105 AP T2; 17-0h: Dieta com extrato IAC 17 T1; 17-50h: Dieta com extrato IAC 17 T2. A). Atividade tripsina amidásica; B). Atividade tripsina esterásica; C). Atividade cisteino proteases. D). Concentração de proteases totais.

Nas análises de inibição *in vitro* foi observado que os extratos não tiveram efeito inibitório sobre a atividade das tripsinas do pâncreas bovino (Tabela 1), mantendo os valores de atividade similares ao controle (sem presença dos extratos). Na atividade das tripsinas de *A. gemmatalis* foi encontrada uma inibição de 100% para os tratamentos 105-0h (UFVTN 105 AP T1) e 17-0h (IAC 17 T1) (Tabela 1). Já para os tratamentos com extratos das plantas 105-50h (UFVTN 105 AP T2) e 17-50h (IAC 17 T2) as atividades permaneceram similares ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição dos extratos vegetais sobre a atividade das tripsinas pancreática bovina e do intestino de *A. gemmatalis*

Tratamento	Atividade tripsinas	Inibição (%)
Tripsina Comercial		
Controle	0,24	0
105-0h	0,24	0
105-50h	0,24	0
17-0h	0,24	0
17-50h	0,24	0
Tripsinas <i>A. gemmatalis</i>		
Controle	0,12	0
105-0h	0	100
105-50h	0,12	0
17-0h	0	100
17-50h	0,12	0

4.3.4 Análises histológicas do intestino de *A. gemmatalis*

A adição dos extratos nas dietas causou alterações ultra estruturais no intestino das lagartas em relação ao controle. No tratamento controle (Figura 3A), se observa a membrana peritrófica intacta, e o epitélio simples colunar com borda estriada evidente na porção apical, com células caliciformes e colunares intactas e com os núcleos bem diferenciados. Células regenerativas pequenas arredondadas ou ovais são também visíveis (Figura 3B).

Quando observamos as micrografias do intestino médio das lagartas alimentadas com a dietas suplementadas com os extratos verificamos modificações que sugerem danos nas células para ambos os genótipos (Figura 3). O tratamento com extrato UFVTN 105AP T1 (Figura 3C), mostrou um aumento de tamanho das células caliciformes e células colunares com mudanças na posição do núcleo e grânulos no citoplasma. Embora a membrana peritrófica esteja intacta, no espaço endoperitrófico encontram-se projeções celulares. O tratamento com extrato UFVTN 105AP T2 (figura 3D) mostrou deformação do epitélio simples colunar e das células caliciformes e colunares, e presença de células vacuolizadas, a camada muscular está intacta.

O efeito da suplementação da dieta com o tratamento IAC 17 T1 no intestino médio das lagartas verifica-se a deformação das células caliciformes e colunares, que além de vacuolizadas, em conjunto mostram o dano no tecido (Figura 3E). O espaço endoperitrófico contém detritos celulares, entretanto não houve efeito nocivo na membrana peritrófica. Já quando avaliamos o tratamento IAC 17 T2, é observado um aumento nos detritos celulares, células caliciformes irregulares, mudança na posição dos núcleos das células colunares; além de camada muscular, membrana peritrófica e células regenerativas em bom estado (Figura 3F).

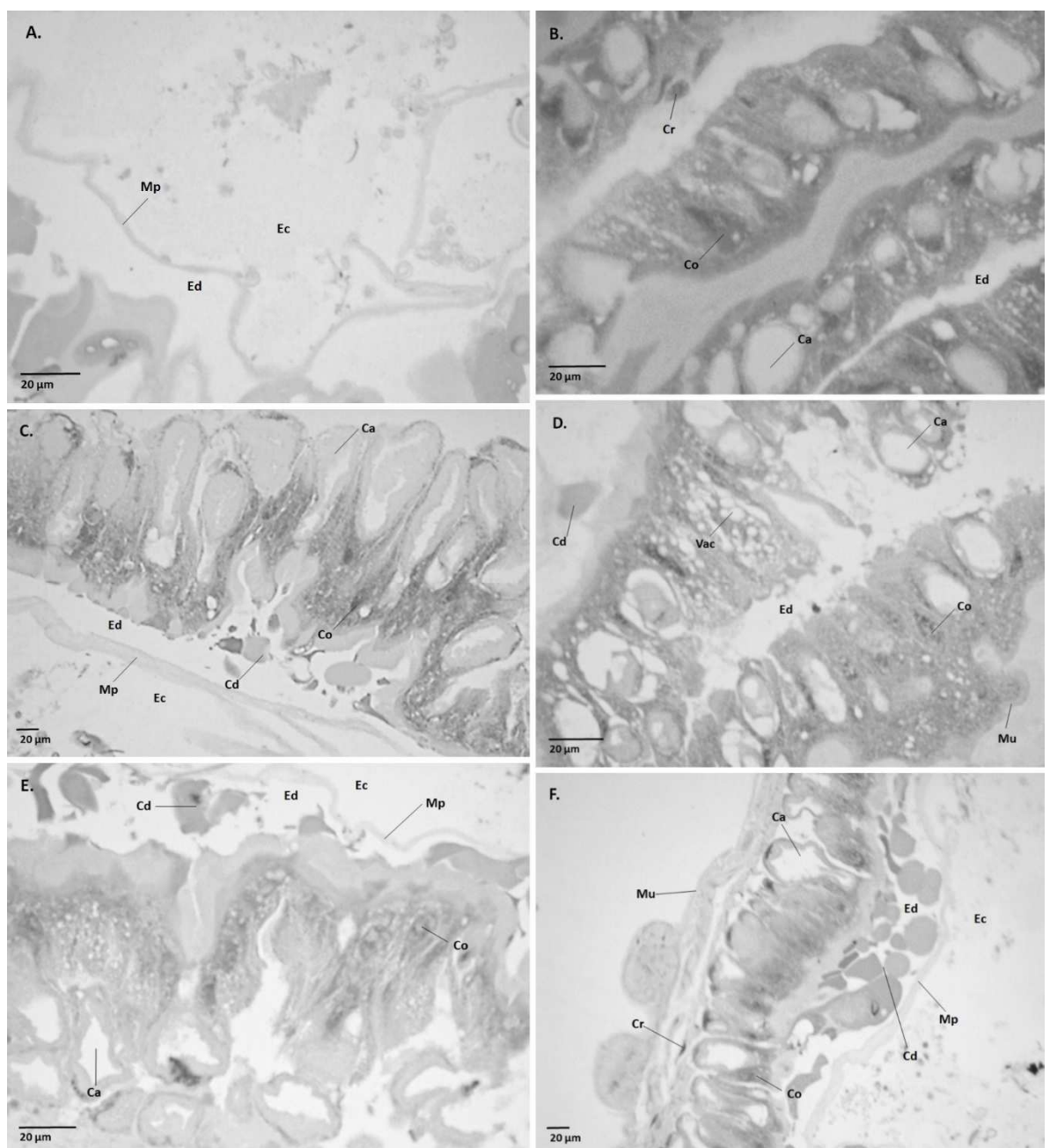


Figura 3. Intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) alimentadas com dieta artificial suplementada com extratos de folhas de soja. A e B). Controle (40x); C). UFVTN 105 AP T1 (20x); D). UFVTN 105 AP T2 (40x); E). IAC 17 T1 (40x) e F). IAC 17 T2 (20x). Mu= Camada muscular; Co= Célula colunar Cr= Célula regenerativa; Ca= Célula caliciforme; Ed= Espaço endoperitrófico; Ec= Espaço ectoperitrófico; Mp= Membrana peritrófica; Cd= Detrimentos celulares, Vac= Celulas vacuolizadas.

4.4 Discussão

Os extratos foliares de plantas tem sido amplamente usados para avaliação da presença de compostos com potencial inibitório (BROOKE et al., 2010; LINDQUIST et al., 1990; AHN et al., 1997; SADEK, 2003). Estes compostos tem a vantagem de ser ecologicamente viáveis e geralmente não são tóxicos para os mamíferos (MADHUMITHA et al., 2012). A extração metanoica favorece a separação de compostos de defesa, hidrossolúveis como alcaloides (THANIGAIVEL et al., 2017), flavonoides (FALCONE FERREYRA et al., 2012; MUEMA et al., 2016), terpenoides (AHN et al., 1997; MUEMA et al., 2016) e glucosinolatos (MUEMA et al., 2016).

Alguns desses compostos alteram a morfologia do intestino médio (VANDOCK et al. 2012) o que retarda o desenvolvimento e pode ocasionar até a morte (USHA e JYOTHSNA, 2010; WAR et al., 2011a; 2011b), como foi observado nos nossos experimentos.

As análises de sobrevivência realizada com as três concentrações diferentes de extrato adicionadas às dietas mostraram que existe uma relação direta entre o aumento da concentração e a taxa de morte das lagartas, independentemente do genótipo da planta e do tratamento analisado. Isso é um indicativo que os determinantes moleculares da inibição podem estar presentes em ambos genótipos, porem em concentrações distintas, pois a diluição reduziu a inibição de extratos provenientes do genótipo susceptível. Em adição, elevadas proporções podem ter adicionados compostos inibitórios não específicos.

De modo geral, as menores taxas de sobrevivência observadas nos tratamentos com extratos da variedade IAC 17 confirmam as características de resistência do genótipo e que a molécula bioativa está presente nos extratos metanólicos e pode ser parte do mecanismo de resistência. No entanto, não houve diferencia significativa entre os tratamentos em presença da lagarta pelo qual a origem dos compostos envolvidos pode

ser constitutiva. Como observado no capítulo I, a concentração de flavonoides bioativos não foram alteradas de modo geral em plantas de soja infestadas com lagartas.

Tem sido demonstrado a eficiência de extratos metanoicos na redução da sobrevivência de insetos pragas (SADEK, 2003; MACEDO et al., 2014; FREITAS et al., 2014; THANIGAIVEL et al., 2017), e alguns destes atribuíram a efetividade dos extratos à presença de taninos e compostos fenólicos como flavonoides com agentes anti-nutricionais (FREITAS et al., 2014; SENTHIL-NATHAN, 2013). Piubelli et al., (2005) avaliaram os extratos de folhas de diferentes genótipos de soja e os adicionados na dieta e observaram aumento na taxa de mortalidade somente para as lagartas que foram alimentadas com as variedades resistentes. Em contraste, foi observado redução da mortalidade também para o genótipo susceptível UFVTN 105 AP, entretanto foi dependente da porcentagem do extrato. Nesse estudo não se especificaram as concentrações dos extratos usadas nas dietas, e os genótipos usados foram diferentes (PIUBELLI et al., 2005). Finalmente, Piubelli et al. sugerem que os flavonoides são compostos importantes para a resistência da soja a *A. gemmatilis*.

Entretanto os extratos provenientes das folhas do genótipo resistente IAC17 também reduziram a capacidade proteolítica digestivas das lagartas. Esse efeito pode ser direto por ação de inibidores de proteases ou indireto por meio da alteração ultraestrutural dos tecidos dos epitélio intestinal das lagartas, um indicativo também da ação de compostos anti-nutricionais como flavonoides ou taninos (WAR et al., 2012).

As alterações na morfologia do intestino das lagartas alimentadas com a dieta sem adição de extratos estão em concordância com os efeitos descritos na literatura relativos a intestinos normais (LEVY et al., 2004; KNAAK et al., 2012; GOMES et al, 2013). Já quando as lagartas foram alimentadas com as dietas contendo os extratos, foram ocasionadas mudanças nos tecidos em todos os tratamentos.

Tem sido atribuído a alguns compostos, como mecanismo de resistência das plantas, a capacidade de se ligar covalentemente com proteínas das folhas, o que reduz a absorção intestinal nos insetos (BHONWONG et al., 2009) e tem um efeito direto danificando o tecido intestinal (BARBEHENN et al., 2011). Estas observações têm sido obtidas também em análises histológicas (FALCONE FERREYRA et al., 2012). Tem sido atribuído um efeito direto dos flavonoides que tem propriedades citotóxicas por meio da sua capacidade de formar complexos com enzimas hidrolíticas (TREUTTER, 2006; FALCONE FERREYRA et al., 2012), conferindo resistência às pragas (JOHNSON et al.,

2004; SIMMONDS et al., 2001). Esta observação poderia explicar por que em quase todos os tratamentos expostos aos extratos houve uma diminuição na atividade proteolítica com relação ao controle e a alteração morfológica do tecido. No entanto, as menores taxas de atividade proteolítica são atribuídas aos tratamentos utilizando os extratos obtidos do cultivar resistente IAC 17. Essas observações estão em concordância com as análises enzimáticas realizadas por PAIXÃO et al. 2016, onde foi exposto o extrato proteico bruto do intestino de *A. gemmatalis* ao extrato de diferentes cultivares de soja incluindo o IAC 17. Foi também observado uma diminuição na atividade estearásica após 48h de exposição. Apesar da variedade UFVTN 105 AP ser considerada como susceptível, os extratos metanoicos obtidos também tiveram efeito nocivo no tecido e diminuíram a atividade enzimática, o que reforça a possibilidade de semelhanças metabólicas entre as variedades e presença constitutiva de compostos que permitem às plantas se defender de insetos praga.

Embora as imagens histológicas obtidas dos tratamentos mostrarem de modo geral os mesmos efeitos tóxicos nas células, nenhum dos tratamentos teve alguma alteração específica ou ocasionou um dano maior nas estruturas celulares, o que pode explicar as pequenas diferenças nos índices de sobrevivência para os genótipos avaliados. Novamente, esta observação pode estar relacionada com o efeito de dose.

A diversidade de células dos intestinos médios das lagartas de lepidópteros tem diferentes funções para preservar a absorção de nutrientes por parte dos insetos (TERRA et al., 2005, PINHEIRO et al., 2008). Células como as colunares são responsáveis pela secreção enzimática e tiveram mudanças morfológicas em resposta à toxicidade dos extratos de plantas o que também pode explicar a diminuição das proteases totais com relação ao controle consequente deste estudo. KNAAK et al. 2010, demonstrou que um efeito da toxicidade de extratos de plantas é a vacuolização do citoplasma e mudanças nas células intestinais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), o que concorda com o observado nos nossos resultados histológicos. Outros efeitos da suplementação alimentícia com extratos de plantas foram comuns. A presença de projeções celulares alongação celular também foram descritas em *S. frugiperda* (MARTINEZ, 2012) e a desorganização e deformação celular descrita por KNAAK et al., 2013 como efeito deste tipo de extratos.

4.5 Conclusões

Os extratos metanólicos obtidos das variedades UFVTN 105 AP e IAC 17 tiveram efeito negativo na biologia e bioquímica de lagartas de *A. gemmatalis*, entretanto foi dependente da dose adicionada a dieta. Desta forma, existe compostos bioativos que estão presentes nas folhas de ambos os genótipos porém em concentrações distintas que justifiquem a diferença de resistência a infestação pelas lagartas.

4.6 Referências

AHN, Y.J., KWON, M., PARK, H.M., HAN, C.G. **Potent insecticidal activity of Ginkgo biloba derived trilactone terpenes against Nilaparvata lugens.** Phitochemical for pest control. *ACS Symp. Ser.* 1997. 658: 90–105. doi:10.1021/bk-1997-0658.ch007

AMAZONAS, L. **Soja.** In: **Perspectivas para a agropecuária.** *Perspec. Agropec.* Brasília. 2017; 5:95-111.

BARBEHENN, R.V.; CONSTABEL C. P. **Tannins in plant-herbivore interactions.** *Phytochemistry.* 2011. 72: 1551-65.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>

BHONWONG, A.; STOUT, M.J.; ATTAJARUSIT, J.; TANTASAWAT, P. **Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*).** *J. Chem. Ecol.* 2009. 35: 28-38.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10886-008-9571-7>.

BROOKE, W., BISSINGER, R., ROE, M. **Tick repellents: past, present, and future.** *Pest. Biochem. Physiol.* 2010. 96:63–79. doi:10.1016/j.pestbp.2009.09.010

BUENO, A.F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SOSA-GOMEZ, D. R.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. MIP SOJA. **EMBRAPA, SOJA.** 2013.
<http://www.cnpso.embrapa.br/helicoverpa/folder-mip.pdf>

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides.** *Toxicon.* 2002. 40: 1515-1539.

DA SILVA, D., HOFFMANN-CAMPO, C., DE FREITAS BUENO, A., DE FREITAS BUENO, R., DE OLIVEIRA, M., MOSCARDI, F. **Biological characteristics of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) for three consecutive generations under different temperatures: Understanding the possible impact of global warming on a soybean pest.** *Bul. Ent. Res.* 2012. 102: 285-292. doi:10.1017/S0007485311000642

DUPONT, PIONEER. **Quais são as Principais Lagartas da Cultura da Soja e Como Controlá-las?**, Manejo, Pragas, Soja. 2017.

<http://www.pioneersementes.com.br/blog/154/quais-sao-as-principais-lagartas-da-cultura-da-soja-e-como-controla-las>. Consultado e fevereiro de 2018.

ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. **The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.** *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. 95:271-278.

FALCONE FERREYRA, M.L., RIUS, S.P., CASATI, P. **Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications.** *Front. Plant Sci.* 2012. 3: 222. doi:10.3389/fpls.2012.00222.

FREITAS, A.F., PEREIRA, F.F., FORMAGIO, A.S.N. LUCCHETTA, J.T., VIEIRA, M.C., MUSSURY, R.M. **Effects of Methanolic Extracts of Annona Species on the Development and Reproduction of Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Neotrop. Entomol.* 2014. 43: 446-52. doi: 10.1007/s13744-014-0225-x. Epub 2014 Jul 4.

HOFFMAN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. **Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*).** Londrina, EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 10, 1985. 23p.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, 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. 70p. (Circular Técnica, 30).

JOHNSON, E.T., DOWD, P.F. **Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites.** *J. Agric. Food. Chem.* 2004. 52: 5135- 8; PMID: 15291486; <http://dx.doi.org/10.1021/jf0308049>.

JARJU, L. B., FILLINGER, U., GREEN, C., LOUCA, V., MAJAMBERE, S., LINDSAY, S. W. **Agriculture and the promotion of insect pests: rice cultivation in river floodplains and malaria vectors in The Gambia.** *Malaria Journal.* 2009. 8: 170. doi:10.1186/1475-2875-8-170.

KNAAK, N., TAGLIARI, M.S., FIUZA, L.M. **Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, 2010. 77: 83-89.

KNAAK, N., BERLITZ D.L., FIUZA, L.M. **Toxicology of the Bioinsecticides Used in Agricultural Food Production.** *Histopathology - Reviews and Recent Advances.* Dr. Enrique Poblet (Ed.). InTech. 2012. ISBN 978-953-51-0866-5. DOI: 10.5772/52070.

KNAAK, N., WIEST, L.F.S. ANDREIS, T.F. FIUZA, L.M. **Toxicity of essential oils to the larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *J. Biopest.* 6: 49-53

LEVY, S.M., FALLEIROS, A.M., GREGÓRIO, E.A., ARREBOLA, N.R., TOLEDO, L.A. **The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells.** *Braz. J. Biol.* 2004. 64: 633-8.

LEVY, S.M., MOSCARDI, F., FALLEIROS, A.M., SILVA, R.J., GREGÓRIO, E.A. **A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV).** *J. Invertebr. Pathol.* 2009. 101:17-22. doi: 10.1016/j.jip.2009.02.010. Epub 2009 Mar 9.

LINDQUIST, R.K., ADAMS, J.A., HALL, F.R., ADAMS, I.H.H. **Laboratory and greenhouse evaluations of Margosan-O against bifenthrin-resistant and susceptible greenhouse whiteflies, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae).** Proc. USDA Neem Workshop USDA-ARS. 1990.86:91-99

LOURENÇÃO, A.L.; COSTA, A S.; MIRANDA, M.A.C. **Sources of resistance to Insect pests and virus vector in the soybean gemplasm tested at Instituto Agronomico, SP, Brasil.** In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4. 1989, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Editora S.R.L., 1989. p. 1578-1581.

MACEDO, M.L.R., KUBO, C.E.G., FREIRE, M.G.M., JÚNIOR, R.T.A., PARRA, J.R. P. **Entomocidal Effects of Beech Apricot, *Labramia bojeri*, Seed Extract on a Soybean Pest, the Velvetbean Moth, *Anticarsia gemmatalis*, and Its Enzymatic Activity.** *J. Insect Sci.* 2014. 14; 27. <http://doi.org/10.1673/031.014.27>

MADHUMITHA, G., RAJAKUMAR, G., ROOPAN, S.M., RAHUMAN, A.A., PRIYA, K.M., SARAL, A.J.M., KHAN, F.R.N., KHANNA, V.G., VELAYUTHAM, K., JAYASEELAN, C., KAMARAJ, C., ELANGO, G. **Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites.** *Parasitol. Res.* 2012. 111: 2189-2199. doi:10.1007/s00436-011-2671-2

MARTINEZ, S.S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142p.

MARTINEZ, S.S., EMDEN, H.F. **Redução do crescimento, deformidades e mortalidade de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) causadas por *Azadiractina*.** *Neotropical Entomology*, 2001. 30: 113-125.

MENDONÇA E.G., VISÔTTO L.E., COSTA N.C.S., RIBEIRO F.R., OLIVEIRA J.A., OLIVEIRA M.G.A. **Caracterização enzimática de isoformas de cisteína protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818).** *Ciência e Agrotecnologia*, 2011, 35: 446-454.

MIRANDA, M.A.C; BRAGA, N.R; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T.S; UNÊDAIL, S.H.; FUMIKO M. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos.** *Bragantia*. 2003a. 62: 19-27

MIRANDA, M. A. C.; BRAGA, N. R.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, F. T. S.; UNÊDA, S. H.; ITO, M. F. **Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar IAC-24, resistente a insetos.** *Bragantia*. Campinas. 2003b. 62: 29-37.

MORAES, R.M.A.; JOSÉ, I.C., RAMOS, F.G., BARROS, E.G. MOREIRA, M.A. **Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína.** *Pesq. agropec. bras.* 2006, vol.41, n.5, pp.715-729. ISSN 1678-3921. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500002>.

MUEMA, J. M., NJERU, S. N., COLOMBIER, C., MARUBU, R. M. **Methanolic extract of *Agerantum conyzoides* exhibited toxicity and growth disruption activities against *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Anopheles arabiensis* larvae.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016. 16: 475. <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1464-7>

NUNES, R.M. **Avaliação da qualidade proteica de diferentes cultivares de soja e farinha mista de soja e milho e análise proteômica da soja.** 2011. 50f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

OERKE E-C: **Crop losses to pests.** *J. Agric. Sci.* 2006. 144: 31-43.

OLIVEIRA, C.M., AUAD, A.M., MENDES, S.M., FRIZZAS, M.R. **Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture.** *Crop Protection*. 2014. 56: 50-54.

OLIVEIRA M, SIMONE S, XAVIER L, GUEDES R. **Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*.** *Comp. Biochem. Physiol.* 2005. 140B: 369–380.

PAIXÃO, G.P., LOURENÇÃO, A.L., SILVA, C.R., CORDEIRO, G., BARROS, R A., OLIVEIRA, J.A. , VISÔTTO, L.E. , OLIVEIRA, M.G.A. **Active response of soybean to defoliator *Anticarsia gemmatilis* Hübner: strategies to overcome protease inhibitor production.** *Idesia*, v. 34, p. 69-75, 2016.

PINHEIRO, D.O., QUAGIO-GRASSIOTTO, I., GREGÓRIO, E.A. **Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae.** *Neot. Ent.* 2008. 37: 413-419.

PIUBELLI, G.C., HOFFMANN-CAMPO, C.B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S.H., DE OLIVEIRA, M.C. **Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?** *J. Chem. Ecol.* 2005. 31:1509-25.

POCHÉ, R.M., BURRUSS, D., POLYAKOVA, L., POCHÉ, D.M., GARLAPATI, R.B. **Treatment of livestock with systemic insecticides for control of *Anopheles arabiensis* in western Kenya.** *Malar. J.* 2015 Sep 17;14:351. doi: 10.1186/s12936-015-0883-0.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014.

ROSSETTO, C. J.; TISSELI FILHO, O.; CIONE, J.; GALLO, P. B.; RAZERA, L. F.; TEIXEIRA, J. P. F. **Cultivar de soja IAC 100**. Campinas, 1987.

ROSSI, G.D., SANTOS, C.D., CARVALHO, G.A., CORRÊA, A.D., ABREU, C.M.P., CARVALHO, G.A. **Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842)** (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Ciênc. agrotec.* 2009. 33: 180-190.

SADEK, M.M. **Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep.Noctuidae)**. *J. App. Ent.* 2003. 127: 396–404.

SANTOS, A.R.M. **Dialelo em geração avançada para seleção de linhagens de soja para produção de silagem**. 2013. 58f. Tese (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SENTHIL-NATHAN, S. **Physiological and biochemical effect of neem and other meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects**. *Front. Phys.* 2013. 4: 1–17.

SILVA, J.B.; LAZARINI, E.; SILVA, A. M.; RECO, P. C. **Ensaio comparativo de cultivares de soja em época convencional em Selvíria, MS: características agronômicas e produtividade**. *Biosci. J.*, 2010. 26: 747-754, Uberlândia.

SIMMONDS, M.S.J., STEVENSON, P.C. **Effects of isoflavonoids from *Cicer* on larvae of *Helicoverpa armigera***. *J. Chem. Ecol.* 2001. 27: 965-77; PMID:11471948; <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010339104206>.

SINGH, G. **The Soybean Botany, Production and Uses**. 1a ed. 2010. ISBN 978-1-84593-644-0. CAB International.

SILVA, J.P.G.F.; BALDIN, E.L.L.; SOUZA, E.S.; CANASSA, V.F.; LOURENÇÃO, A.L. **Characterization of antibiosis to the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean entries**. *J. Pest. Sci.* 2013. 86: 649–657.

STYGAR, D., DOLEZYCH, B., NAKONIECZN, Y. M., MIGULA, P., MICHALCZYK, K., ZAAK, M. **Digestive enzymes activity in larvae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae)**. *C R Biol.*, 2010, 333:725-735.

TELANG, M., SRINIVASAN, A., PATANKAR, A., HARSULKAR, A., JOSHI, V., DAMLE, A., DESHPANDE, V., SAINANI, M., RANJEKA, P., GUPTA, G., BIRAH, A., RANI, S., KACHOLE, M., GIRI, A., GUPTA, V. **Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura***. *Phytochemistry.* 2003. 63: 643-652.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. **Biochemistry of digestion**. In **Comprehensive Molecular Insect Science** (Gilbert LI, Iatrou K & Gill SS, eds). 2005. 4: 171–224. Elsevier, Oxford.

TEXEIRA, L.C.A. **Estudo genético de populações de soja como fonte de resistência à *Heterodera glycines* (raça 3) oriundas de topocruzamentos tipo alimentos x tipo grão.** 2016. Tese (Doutorado na Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2016.

THANIGAIVEL, A., SENTHIL-NATHAN, S., VASANTHA-SRINIVASAN, P., EDWIN, E.S., PONSANKAR, A., SELIN-RANI, S., PRADEEPA, V., CHELLAPPANDIAN, M., KALAIVANI, K., ABDEL-MEGEED, A., NARAYANAN, R., MURUGAN, K. **Chemicals isolated from *Justicia adhatoda* Linn reduce fitness of the mosquito, *Aedes aegypti* L.** *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2017. 94. doi: 10.1002/arch.21384. Epub 2017 Mar 7.

TREUTTER, D. **Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis.** *Plant. Biol.* (Stuttg). 2005. 7: 581-91.

THERNEAU, T.M. **A Package for Survival Analysis in R.** Mayo foundation. 1999.

USHA, R.P.; JYOTHSNA, Y. **Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense.** *Acta. Physiol. Plant.* 2010. 32: 695-701. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0449-2>.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L. **Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae).** *Neotrop. Entomol.* Londrina. 2002. 31: 285-295.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO, A.L.; PINHEIRO, J.B. **Adult attractiveness and oviposition preference of *Bemisia tabaci* biotype B in soybean genotypes with different trichome density.** *J. Pest. Sci.* 2012. 85: 431-442.

VANDOCK, K.P., MITCHELL, M.J., FIORAVANTI, C.F. **Effects of plant flavonoids on *Manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase.** *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2012. 80: 15-25.

VASCONCELOS, E.S.; REIS, M.S.; CRUZ, C.D.; SEDIYAMA, T.; SCAPIM, C.A. **Adaptability and stability of semilate and late maturing soybean genotypes in Minas Gerais state.** *Acta Sci. Agron.* 2010 32, 411-415. <https://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.8249>

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).** *J. Plant. Growth. Regul.* 2011a; 30:512-23; <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-011-9213-0>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Plant. Signal. Behav.* 2011b. 6: 1769-77. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17323>.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU S. **Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.).** *Plant. Signal. Behav.* 2011c. 6: 1787-92. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>.

WAR, AR.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A., HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C. **Mechanisms of plant defense against insect herbivores.** *Plant. Signal. Behav.* 2012. 7: 1306-20. doi: 10.4161/psb.21663.

ZHOU, Y.Y.; LUO, S.H.; YI, T.S.; LI, C.H.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y.; LI, S.H. **Secondary Metabolites from Glycine soja and Their Growth Inhibitory Effect against *Spodoptera litura*.** *J. Agric. Food. Chem.* 2011. 59: 6004-10. doi: 10.1021/jf200821p

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V.; SIMONE, S.G. **Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Eur. J. Biochem.* 2005. 102: 147–153.

ZAVALA, J.A., MAZZA, C.A., DILLON, F.M., CHLUDIL, H.D., BALLARÉ, C.L. **Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions.** *Plant Cell and Environment.* 2015. 38: 920-928.

Capítulo 5 .Broad Range Flavonoid Profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

Jenny D. Gómez ¹, Camilo E. Vital ², Maria G. A. Oliveira ¹, Humberto J. O. Ramos ^{1,2}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFV, Laboratory of Enzymology, Biochemistry of Proteins and Peptides, BIOAGRO/INCT-IPP, Viçosa-MG, Brazil,² Center of Analysis of Biomolecules, NuBioMol, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil.

humramos.ufv.br@gmail.com

Abstract

Attack by herbivores is a major biotic stress limiting the soybean crop production. Plant defenses against caterpillars include the production of secondary metabolites such as flavonoids, which constitute a diverse group of plant secondary metabolites. Thus, a more discriminate metabolic profiling between genotypes are important for a more comprehensive and reliable characterization of the plant resistance. Therefore, in this study was applied a non-targeted method LC/MS-based for analysis of flavonoid profiles of soybean genotypes contrasting to the resistance to *A. gemmatalis*. Clustering analysis revealed profiles highly distinct between the susceptible UFV 105AP and resistant IAC17 genotypes. This subtractive approach enables to identify directly from leaf extract some new compounds related to resistance, some of which were present specifically in higher abundance in the IAC17 genotype: four Quercetin conjugates, Rutin (Quercetin 3-O-Rutinoside), Quercetin-3,7-O- di-glucoside, Quercetin-3-O-rhamnosylglycoside-7-O-glucoside and Quercetin-3-O-rhamnopyranosyl-gluco-pyranoside-rhamnopyranoside; two Genistein conjugates, *Genistein-7-O-diglucoside-dimalonylated* and *Genistein-7-O-6-O-malonylglucoside*; and one Daidzein conjugate, *Daidzein-7-O-Glucoside-malonate*. The most abundant flavonoid glycoconjugates in the soybean leaves belongs to Quercetin and Kaempferol classes. However, only one from those identified compounds for the Kaempferol class, the *Kaempferol-3-O-L-rhamnopyranosyl-gluco-pyranoside*, showed high abundance in the resistant genotype IAC17. The generated metabolic profiles by LC/MS allowed the reconstruction of the flavonoid biosynthetic pathways, which revealed a constitutive character for herbivory resistance in IAC-17 genotype and a

metabolic regulation for the rechanneling of the Quercetin, Kaempferol and Genistein conjugates in soybean.

Keywords: herbivory resistance, genistein, kaempferol, quercetin, metabolic pathway.

5.1 Introduction

The soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important crops in the Brazil, which places the country as the second largest producer in the world. Biotic and abiotic factors can affect the development of this crop, which can lead to considerable economic losses [1]. *Anticarsia gemmatalis* Hubner 1818 (Noctuidae: Lepidoptera) is one of the major soybean pests in the western hemisphere, including Brazil [2]. The soybean caterpillar is a defoliation pest, consuming leaves during all its larval instars, and consequently can cause complete defoliation of plants [3], diminishing its productivity [2]. Therefore, the development of tolerant genotypes to increase the productivity is critical. Soybean genotypes with different levels of pest resistance have been developed through conventional genetic improvement [3,4]. Some examples of resistant genotypes developed are IAC 100, IAC 17 and “IAC 19” [3]. However, the genetic and molecular mechanisms of resistance have not been determinate.

Plants respond to herbivory through various morphological, biochemical, and molecular mechanisms to counter or offset the damage effects. The biochemical mechanisms of defense against the herbivores are mediated by direct and indirect defenses [5]. Direct acting compounds are either produced constitutively or in response to plant damage, and affect feeding, growth, and survival of herbivores [6,7]. Among these, many phenolic compounds has been characterized as negative agents for herbivores development and survival [5]. In this context, flavonoids play a central role in the plant defense against biotic and abiotic stresses. Flavonoids are divided into various classes; flavonols, flavones and isoflavonoids, which have been investigated as feeding deterrents against many insect pests [3,7-11].

Qualitative and quantitative profiling of flavonoids in plant extracts is a complex task because these comprise a large group of structurally diverse analyses, and formed a variety of core compounds (aglycones), that mostly occur in plants in the form of glycoconjugates (the -OH groups of flavonoid aglycones are substituted with various

saccharides). Consequently, numerous flavonoid aglycones are glycosylated at multiple sites with a variety of saccharides, thus producing several thousands of chemically distinguishable compounds [12]. Thus, the flavonoids profile analyses by HPLC or LC/MS-based traditional methods could not explore the full potential complexity of the biosynthetic pathways responding to stress [13].

Albeit to be characterized as mediators of the direct defense, the plant metabolic and signaling pathways has been under characterized [10,12,14,15]. However, some studies have showed that the overexpression of a transcription factor controlling flavonoid production in *Arabidopsis* plants conferred resistance [12,16]. Thus, studies on these secondary metabolites could lead to the identification of new signaling molecules involved in plant resistance against herbivores and other stresses. Eventually, genes and enzymes involved in the biosynthesis of these metabolites could be identified. Therefore, in this study a non-targeted method LC/MS-based [13] was applied for flavonoid profiles analysis from soybean genotypes contrasting for resistance in response to herbivory by *A. gemmatales*. This broad range approach enabled to access more complex profile directly from soybean leaf extract and efficiently identifying some new resistance related compounds. The metabolic profiles enable the reconstruction of the flavonoids biosynthetic pathways, revealing their abundance differences between contrasting genotypes for herbivory resistance. This could reflect differences in the genetic background and metabolic regulations.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Chemicals and reagents

Crystalline reference substances of flavonols (Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Catechin, Epicatechin, and Morin), flavones (Luteolin, Apigenin, Oerientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin), flavanones (Naringin, Hesperetin, Naringenin), chalcones (Phloretin) and isoflavones (Daidzein, and Genistein) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). LC/MS grade acetonitrile and methanol, acetic acid and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Water used in all of the experiments was high pure water ($18.2\text{M } \Omega\text{cm}^{-1}$) provided by a Milli-Q system (Burlington, Massachusetts, EUA).

5.2.2 Plant growth and soybean genotypes

The soybean plants were cultivated in a greenhouse and maintained isolated by cages and without addition of agrochemicals during assays. The cultivar *UFV TN 105AP* designated as “105AP” is a variety of early cycle that was developed by the Soybean Breeding Program of the Biotechnology Institute of the *Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV)* for elimination of the genes coding for the three isoforms (LOX1, LOX2 e LOX3) of lipoxygenases [12,17]. The cultivar IAC 17 is a variety of early cycle [18-20], of genealogy D 72-9601-1 x ‘IAC 8’ was considered as resistant genotype [3,21,22]. Seeds of each variety were selected and submitted to pre-germination until reaching a 0.5 - 1 cm radicle size. Germinated seeds were carefully transplanted to vessels containing 2 kg of soil. The plants were irrigated daily, and kept in a greenhouse at 25 ± 5 ° C and $70 \pm 10\%$ RH.

5.2.3 Insects

A laboratory colony of *A. gemmatalis* was started with eggs obtained from the National Research Center of Soybean (CNP-Soja, EMBRAPA, Londrina, PR, Brazil). The insects were reared on artificial diet and maintained under controlled conditions of 25 ± 5 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 14:10 (L:D) photoperiod. *Anticarsia gemmatalis* adults were kept in cages (50 x 50 cm) with paper sheets for oviposition. Adults of this insect were fed on nutrient solution with honey (10.5 g), beer (350 mL), sucrose (60 g), ascorbic acid (1.05 g), nipagin (1.05 g), and water (1050 ml), embedded in cotton placed at the bottom of the cages in a Petri dish. *Anticarsia gemmatalis* egg masses were collected every three days and first instar larvae transferred to plants.

5.2.4 Evaluation of *A. gemmatalis* survival

Plants of genotypes 105AP and IAC 17 in the vegetative stages between V4 and V6 were infested with first instar *A. gemmatalis* caterpillars (n= 20) protected by insulated and sanitized containers to avoid having other factors that could affect the larvae welfare. They were fed with plants of each genotype, and the survival was monitored daily throughout the larval stage. The infested plant was kept in the laboratory at 25 ± 5 °C and $60 \pm 10\%$ RH. The survival function was estimated by the Kaplan-Meier method [23] and survival curves compared with the Log-Rank test.

5.2.5 Caterpillar infestation assays

Plants of genotypes 105AP and IAC 17 in the vegetative stages between V4 and V6 were infested or not with first instar *A. gemmatalis* caterpillars. Each leaf was isolated with plastic cages containing or not twenty caterpillars. After 48 h of infestation, leaves were collected from control (not infested) and infested plants and stored in freezer at -80 ° C until leaves extract preparation.

5.2.6 Leaves extracts preparation

The leaves were ground with liquid nitrogen and for each sample of 100 mg were added 200 ul of extractive solution (75% methanol/ 0,1% formic acid) then subjected to ultrasound treatment for 30 min, followed of centrifugation 14.000g for 30 min to 4°C. The supernatant was collected, and the procedure repeated twice. The methanolic plant extracts were liophilized, resuspended in water and stored freezer at -80 ° C until biochemical analyzes were performed.

5.2.7 Flavonoids profile analysis by LC/MS

Aliquots of 300 uL of the extracts were placed in vials and 5 uL injected into the LC/MS system in the NuBioMol (Center for Biomolecules Analysis-UFV, Brazil). For all LC/MS analysis were used an Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC; model 1200 Infinity) with a chromatography column (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) and a flow of 0.3 mL/min, coupled online to a mass spectrometer QQQ (triple quadrupole; Agilent6430). Chromatographic separation was carried out on a column Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 2.1 x 50mm) (Agilent) and a guard column Zorbax SB-C18, 1.8 µm (Agilent). The mobile phase consisted of buffers (A) water acetic acid 0,02% and (B) acetonitrile acetic acid 0,02% and was applied a gradient of %B de: 5%/0 min; 60%/11 min; 95%/13 min; 95%/17min; 5%/19 min; 5%/20 min. The solvent flow rate was 0.3ml/min in a column at 30°C. The mass spectrometer operated by positive mode according to method for flavonoids detection. The analyses were carried out in four biological replicates.

The flavonoid profiles were generated applying three consecutive strategies: Firstly, analyzing the 21 target phenolic compounds (S1 Table). A standard curve of each compound, in a concentration range of 1 to 20,000 ng/mL, was used to convert the area values from XICs (*extracted ion chromatogram*) in ng/g of fresh leaf tissue. In this

method, the retention times and the MRM (*multiple reaction monitoring*) transitions, generated for each standard, were tabulated to format *transition list* table (S1 Table) and was used as input in the Skyline package, enabling quantitative analyses of the specific compounds in soybean leaves.

Secondly, we used a non-target method in source fragmentation ISCID (Fig 1) for the analysis of the flavonoid classes [13] with some modifications. The standards were grouped in classes based in the aglycone core (S2 Table). Insource fragmentation was applied for each compounds (S2 Table) and a *product ion scan* method was used to experimental determination of the fragment ions produced and to select which showed distinguishable relative intensity between the classes (S3 Table). Four fragments were selected and their intensities (Fig 1 IA) were computed in terms of percentages to generate relative proportions (FRI%, *fragment relative intensity*). These were used as signature (Fig 1 IB and IC) to identify the presence of compounds for each class. Followed, an insource /MRM method were generated using the representative m/z of each aglycone class and four MRM transition to enable scanning along all the LC/MS run (Fig 1 II). All flavonoids containing different glycoconjugates were linked to each class of the aglycone core (Fig 1 IIB and IIC). The LC/MS raw data generated were analyzed by Skyline package using as input a *transition list* without retention times (S3 Table), which turns possible the software to compute all the chromatogram pics generated for every MRM transition along of the entire run (S1 Fig). The most abundant XIC (*extracted ion chromatogram*) were selected for quantitative profile analysis.

Finally, a thirty method was applied to determinate the m/z values. The ions that generated the XICs were selected in the insource /MRM method (Fig 1 III). ALC/MS method was created by *precursor ion scan* for the most intensity fragment ion from each flavonoid class (S2 Table). The mass spectra generated were analyzed using the Mass Hunter package (Agilent) and the XICs (Fig 1 IIIA) observed were verified manually for the m/z values of the precursor ion (S1 Fig and Fig 1 IIIB) for those same RT were observed anteriorly for the aglycones core at the pseudo MS3/MRM method. Additionally, the retention times generated by pseudoMS3/MRM and *precursor ion scan* methods were compared to verify the corresponding aglycone and glucoconjugated flavonoid (Fig 3). Each m/z value, for the deprotonate precursor ion observed, were searched against the *Mass Bank* (<http://www.massbank.jp>), using the *Quick Source* module with exact *mass tolerance* of 0.3 Da. A search was also realized using the

flavonoid class name and the nominal mass to identify the described compounds in the literature. Additionally, each hit was verified the flavonoid class, the aglycone mass and presence in the MS/MS spectrum of the same fragments used for the generation of the FRI%.

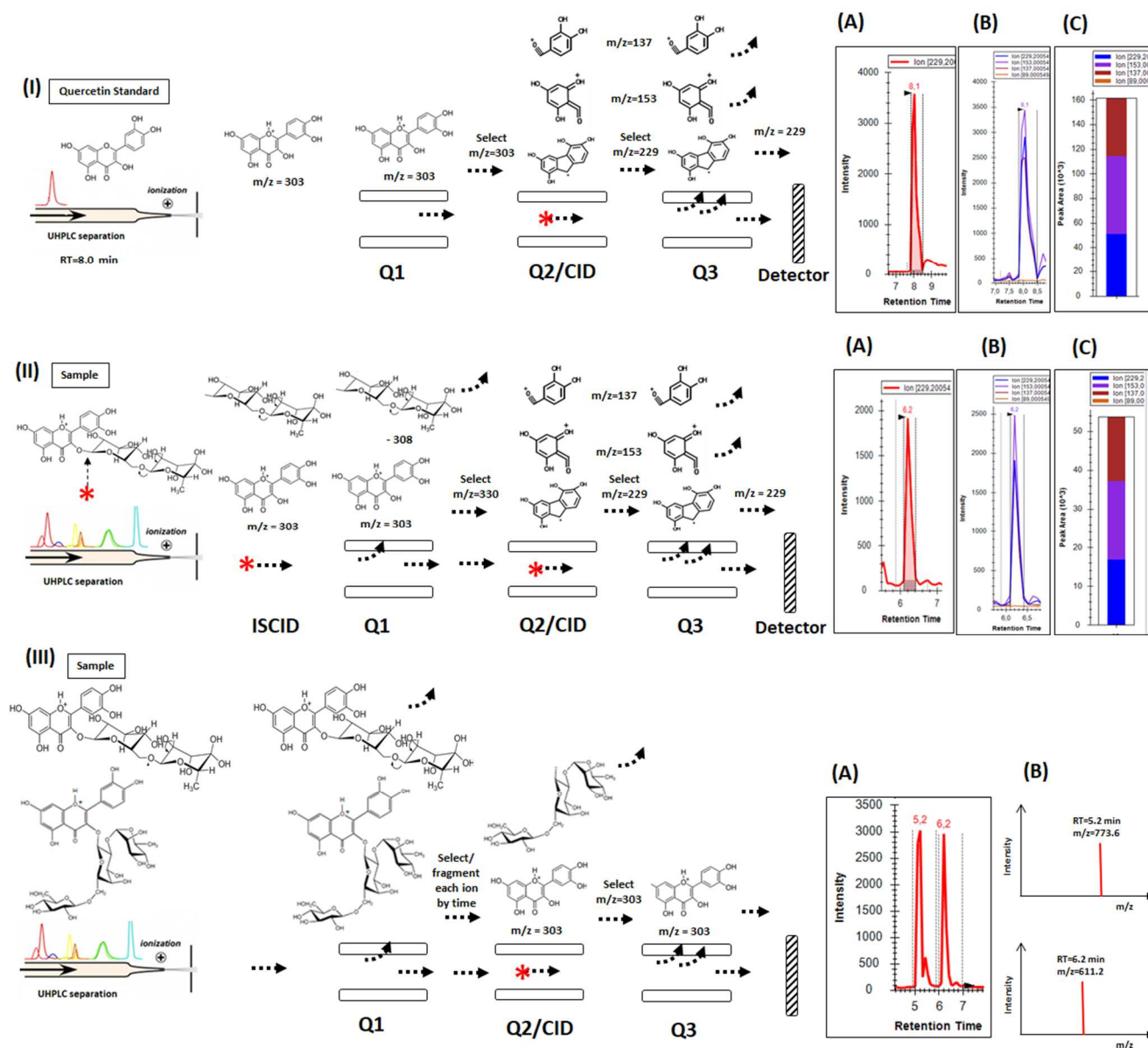


Figure 1: Schematic illustrations of the mass spectrometry approaches used for flavonoid profiling from soybean leaf. In **(I)** each standard aglycone flavonoid is injected in LC QqQ mass spectrometer, a *product scan* method is applied for determination of relative intensities of the four discriminated fragments, which will be used to generate the RFI% specific for each class in **(C)**. The area from each MRM transition is processed using Skyline package in **(A)**, **(B)** and **(C)**. In **(II)** a non-target method is applied to the samples to enable the detection of all flavonoids compound containing each aglycone class. A in

source activation ISCID is used for fragment the glycoconjugate and to release the aglycone core, which is selected in first quadrupole (**Q1**), fragmented at the second (Q2/CID) and the product ions are monitored by four MRM transition for the ions that discriminate for each class determinate at the method describe in (**I**). In the example of the figure the compound ionizing by ESI release a specific mass of $m/z=303$, which RFI% generated (**A**, **B** and **C**) share high similarity with the standard Quercetin (**IC**). Thus, this compound eluted at $RT=6.2$ min is characterized as a Quercetin glycoconjugate. In (**III**) a *precursor ion scan* method is applied to verify in the samples all compound having a chemical group with m/z value of 303 Da and generating the four fragments specific for Quercetin aglycone. The XIC generated in (**A** and **B**) are verified for the precursor m/z values in (**C**). Research in the mass spectrum database and literature of the mass of 611.2 Da detected at the $RT=6.2$ is indicate of the presence of the Quercetin glycoconjugate Rutin in the samples.

5.2.8 Metabolic pathways and statistical analysis of the flavonoid profiles

The abundance of the each characterized flavonoid from each genotype and treatment was combined (S4 Table) and analyzed in the MetaboAnalyst platform (www.metaboanalyst.ca). Quality filters based on the standard deviation method were used to automatic remove of the low-quality data, then the intensity values were normalized by sum. The data were analyzed using the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) to generate 2D Score Plots displaying genotypes and treatments effects on data grouping. A cluster analysis by *HeatMap* method was also performed to group each flavonoid in accordance to their relative abundances in genotypes and treatments, using the following parameters: *Distance Measure*: Euclidean; *Clustering Algorithm*: Ward; *Data Source*: Normalized Data; *Standardization*: Autoscale features; T-test/ANOVA; Options: “Show only group averages” and View Mode “Overview”. For quantitative analysis of the characterized compounds was used the “One-way Analysis of Variance (ANOVA)”, with the following parameters: *Adjusted p-value (FDR) cutoff*: 0.05; *Post-hoc analysis*: Fisher’s LSD.

Finally, the identified compounds were organized in accordance with the metabolic pathways for flavonoid biosynthesis using as reference the *Glycine max* maps from the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) repository.

5.3 Results

5.3.1 *Anticarsia gemmatalis* survival on soybean genotypes

Caterpillar survival analysis using the Kaplan-Meier method showed that the final survival percentage were 73% for caterpillars fed 105AP and 61% on IAC 17 genotypes. The higher mortality rate were observed during days 13 and 14 for the 105 AP treatment, 7 and 10 for IAC 17 (Fig 2). When comparing the survival curves with the Log-Rank test, there were a significant difference between the two treatments ($p \leq 0.05$) (Fig 2). The result agrees with that was described for soybean genotypes [3,21], thus the IAC 17 was be considerate as resistant and the 105AP as susceptible genotypes to *A. gemmatalis* caterpillars.

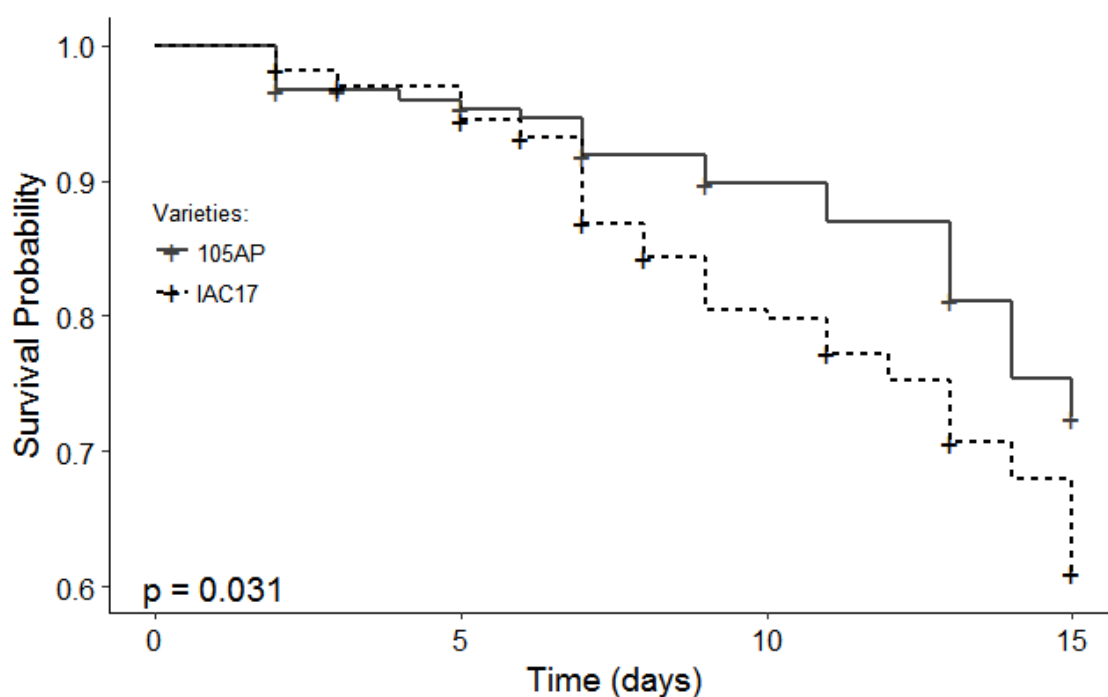


Figure 2. Survival curves of *A. gemmatalis* caterpillars fed on soybean genotypes 105AP and IAC 17, estimated using the Kaplan-Meier method and evaluated statistically by the Log-Rank test.

5.3.2 *Quantification of target compounds in soybean leaves*

From the 21 standard compounds analyzed by LC/MS, some showed mass spectrum and chromatographic signals sufficient to perform the quantitative analysis (Fig 3), while others were detected in very low concentrations or were not synthesized in the soybean leaves. Only the glycoconjugates Rutin and Naringin were observed in higher levels in the resistance genotype IAC17 than in the susceptible 105AP. For the aglycone

flavonoid standards, higher concentrations in the IAC17 were observed for Daidzein and Luteolin (Fig 3), while Genistein, Apigenin and Kaempferol were slightly higher in the susceptible genotype 105AP. The exposition of the soybean leaves to caterpillar's damage induced an increased relative concentration of Naringenin, Kaempferol, Daidzein, Genistein and Apigenin, especially in the resistant genotype IAC 17 (Fig 3). In contrast, for Rutin, Naringin and Luteolin were observed reductions in their concentrations.

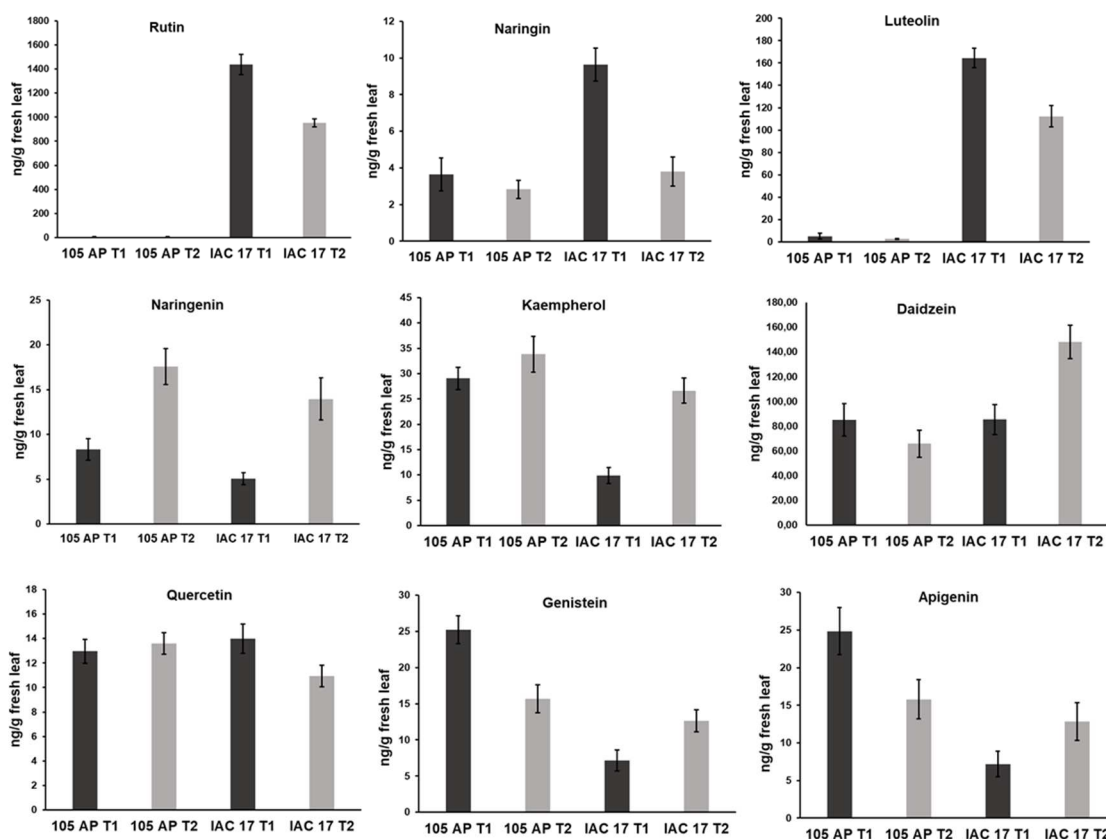


Figure 3: Absolute concentrations of the target flavonoid compounds in the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence (T2) or absence (T1) of the *A. gemmatalis* caterpillars.

5.3.3 Profiling of the non-target flavonoids in soybean leaves

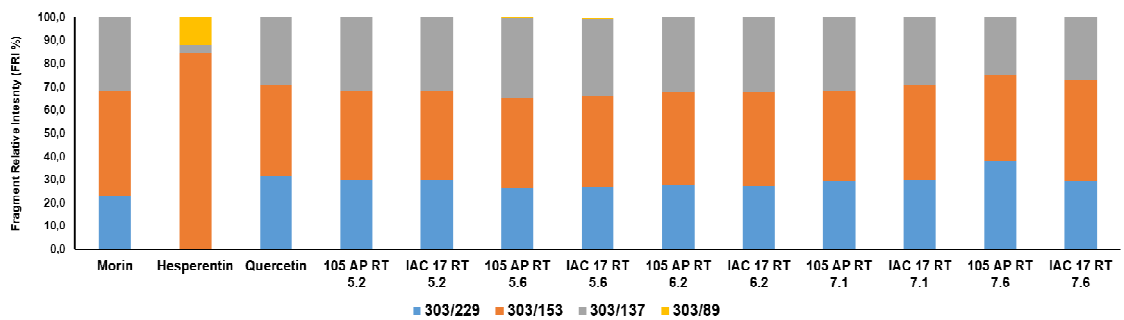
Each commercial standard flavonoid was injected in LC/MS QqQ to generate a pseudo MS³ spectrum of the aglycone cores. The fragment relative intensities (FRI%) between the ions were then evaluated manually to determinate which m/z values that are distinguishable between the aglycone isomers (Fig 4A, 5A, 6A and 7A and S3 Table). For example, for Morin the pseudo-MS³/MRM produced the fragment relative intensities (FRI%) of the 22.9% (303>229), 45.1% (303>153), 32.0% (303>137) and 0.1%

(303>89). However, for Hesperetin were produced 31.2% (303>229), 39.7% (303>153), 28.8% (303>137) and 0.2% (303>89) and for Quercetin were produced 31.6 % (303>229), 39.2% (303>153), 29.0% (303>137) and 0.1% (303>89). These fragmentation patterns allowed identify the aglycone from the glycoconjugates eluted at the RT=5.2, RT=5.6, RT=6.2, RT=7.1 and RT=7.6 min (Fig 4B) as conjugate of the Morin or Quercetin, because the RFI% were highly similar (Fig 4A). The RT=6.2 min was the same observed for the commercial standard of the glyconjugate Rutin (Fig 3 and S1 Table). However, the glyconjugate for RT=5.2 min and RT=5.6 min were only detect by pseudoMS3/MRM method and observed in higher abundance for the resistance genotype IAC17 (Fig 4B and 4C). Applying the same approach for others flavonoid classes, new compounds showing different retention times were detected. Five XICs with RT of 5.6, 5.9, 6.2, 6.7 and 7.9 min showed RFI% similar to aglycone Kaempferol (Fig 5A) and none for Luteolin. These Kaempferol glycoconjugates were observed with high intensity in the soybean leaves, however the relative abundances were similar between genotypes (Fig 5B and 5C). Some XICs generated for this class showed slightly higher abundance (over 10^3) in the susceptible genotype 105 AP (Fig 5B and 5C), except for RT= 6.7 and 7.9 min that was higher in IAC17 (Fig 5C). For Daidzein, we observed RFI% matching with the XICs at RT=4.5, 5.6 and 6.2 min for both genotype (Fig 6A e 6B). However, for the XIC at RT=6.5 and 7.6 min the RFI% match only for the ions from IAC 17 genotype. Likewise as observed for Kaempferol class, some signals of the XICs detected for Daidzein class shown higher abundance in the susceptible genotype 105 AP (Fig 6B, RT= 6.5 min). However, the profile was more complex for the IAC 17 showing several XICs in different retention times (Fig 6B). The RFI% for RT=5.6 were similar for both genotypes which is an indicative to be the same compound (Fig 6A) and their relative abundances were slightly similar for both genotypes (Fig 6C). The RFI% for the RT=6.5 min was distinct for the genotypes (Fig 6A) and the abundances were higher for the susceptible 105AP genotype (Fig 6B and 6C). Thus, for the RT=6.5 for example, the direct interpretation of the XIC signals without consider the RFI% matches could be erroneous, because the XIC observed can not be the same molecule or flavonoid, albeit have been eluted from LC column at the same RT. In this case, is correct indicate that this glycoconjugate from Daidzein eluted at RT=6.5 min was detect only in the resistance genotype.

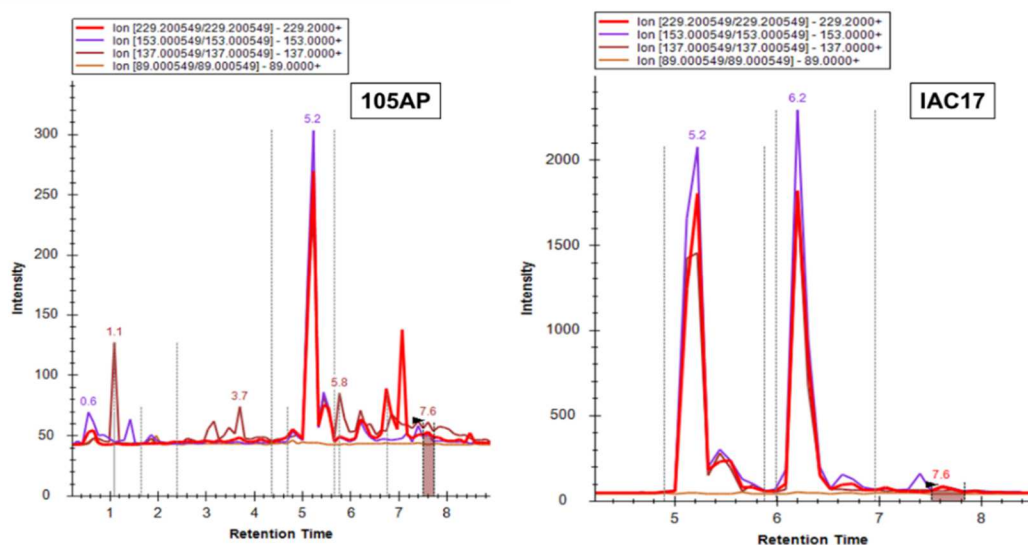
When applying the pseudo-MS3/MRM method to detect glyconjugates for Genistein and Apigenin, five XICs with high intensities were observed (Fig 7A and 7B). The XICs of the RT=5.3 min was characterized as a Genistein for both genotypes, while for the RT of 6.7, 7.2 and 8.6 min as Apigenin only from the 105AP genotype, while Genistein were only from the IAC17 (Fig 7A and 7B). The XIC of the RT=6.4 min showed RFI% for Genistein from 105AP genotype (Fig 7A). In general, the compound abundances were higher for the 105AP genotype (Fig 7C), however the XICs for the RT=6.7, 7.2 and 8.6 min could not be compared directly, because the fragment used for quantitative analysis showed different intensities for Agigenin and Genistein, as indicate in fig 7A. Thus, each genotype has high relative content for specific flavonoids (Fig 7C).

For Myricetin, Phloretin, Catechin and Naringenin classes were not possible to apply the pseudo-MS3/MRM method, because the mass spectrometry signals were very low (data not showed).

(A)



(B)



(C)

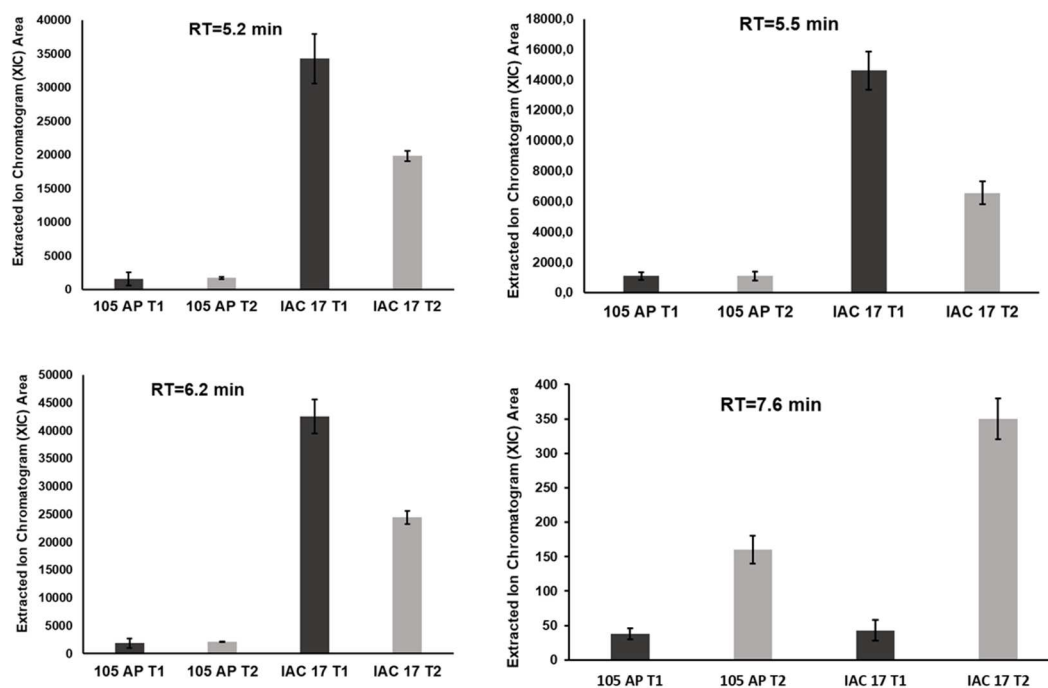
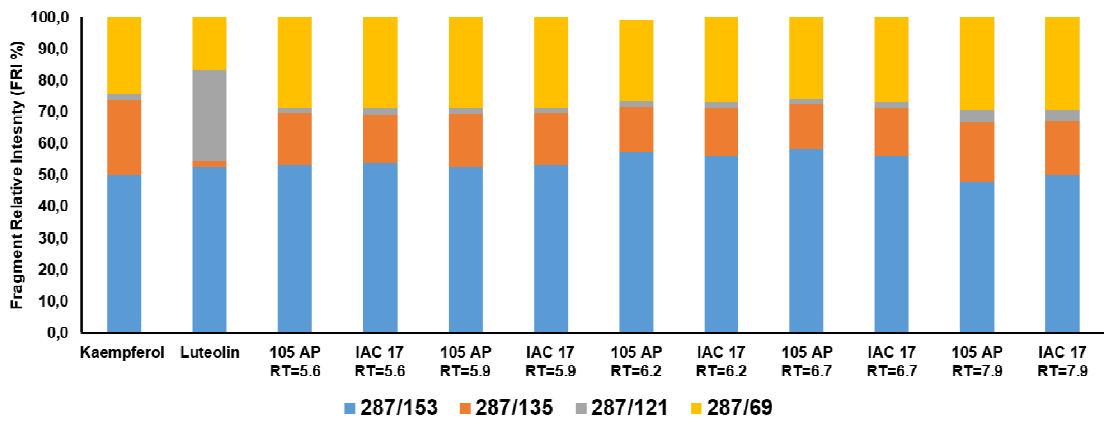
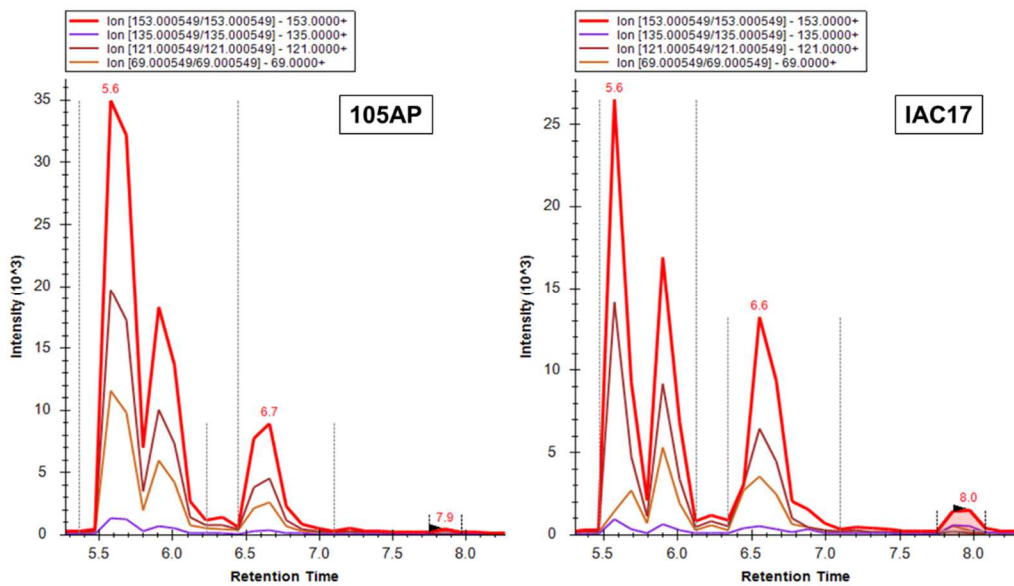


Figure 4. Nontarget analysis of the flavonoids belonging to the classes Morin-Hesperetin-Quercetin in the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars. In (A) the compounds detected for each genotype, the retention times (RT) observed and their RFI% calculated as in Fig 1 and S1 Fig. The compounds that sharing the same RFI% patterns related to standard were considering belonging to a glycoconjugate for those class. In (B) the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In (C) the relative abundances of the some flavonoid compounds characterized as Quercetin conjugates in (A) in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

(A)



(B)



(C)

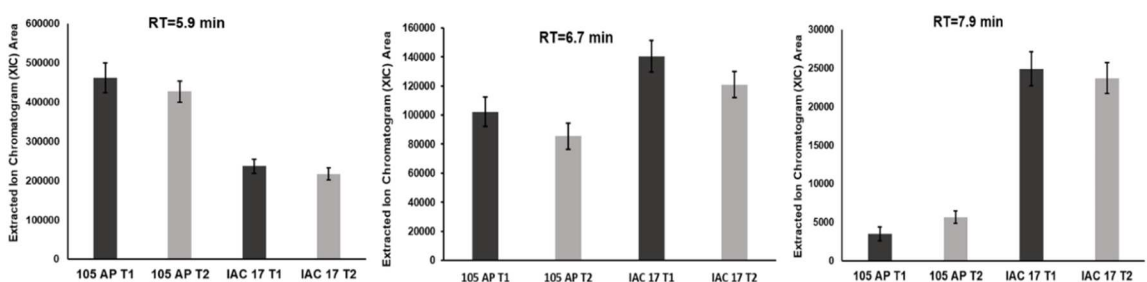
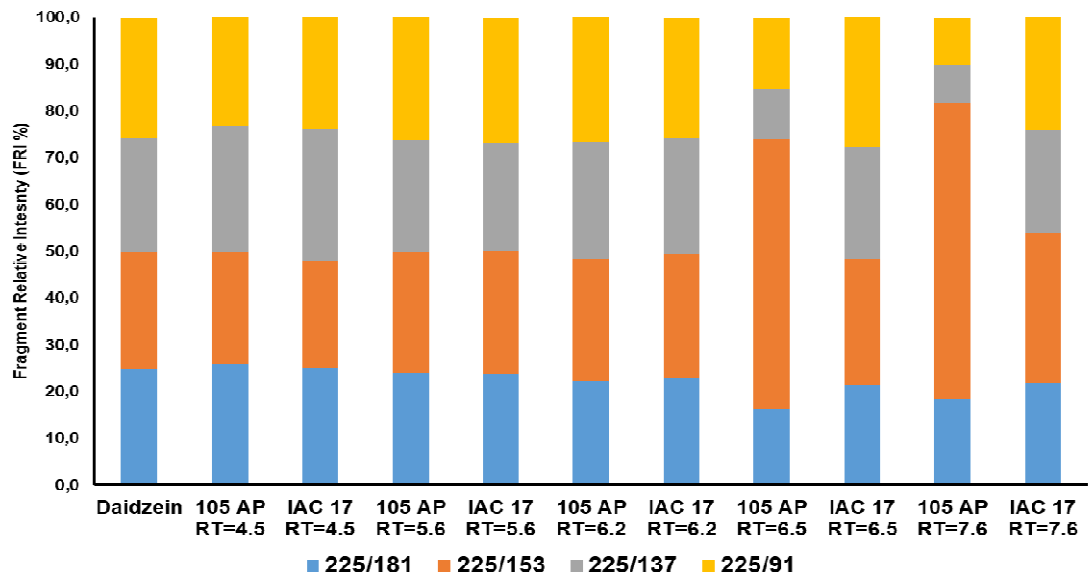


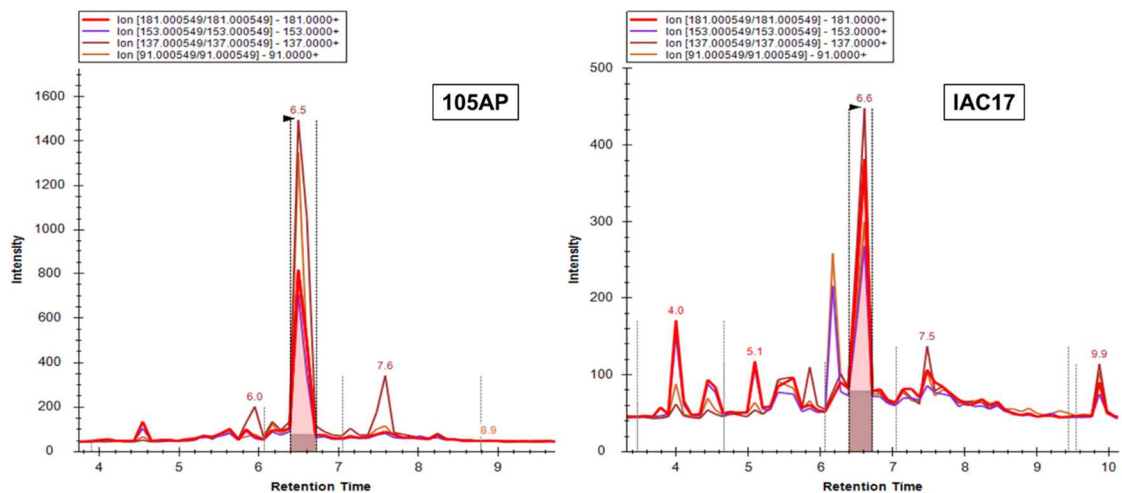
Figure 5: Nontarget analysis of the flavonoids belonging the classes Kaempferol-Luteolin in the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars. In (A) the compounds detected for each genotypes, the retention times (RT) observed and their RFI% calculated as in Fig 1 and S1 Fig . The compounds that sharing the same RFI% patterns related to standard were

considering belonging to a glycoconjugate for those class. In **(B)** the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In **(B)** the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In **(C)** the relative abundances of the some flavonoid compounds characterized as Kaempferol conjugates in **(A)** in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

(A)



(B)



(C)

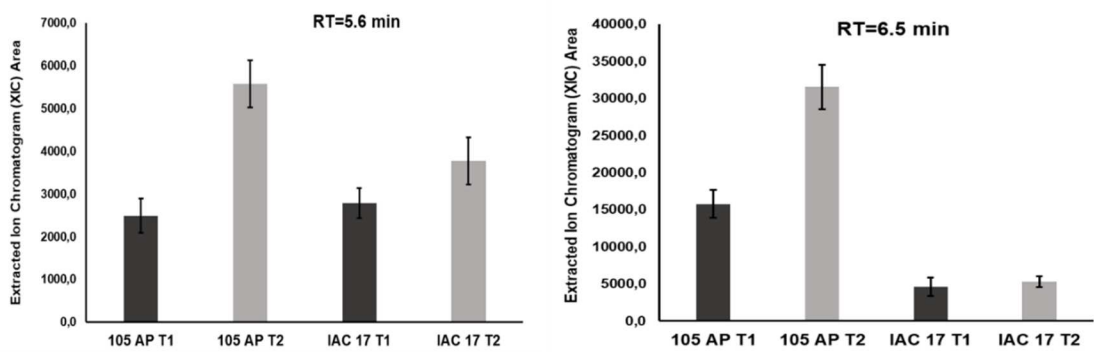
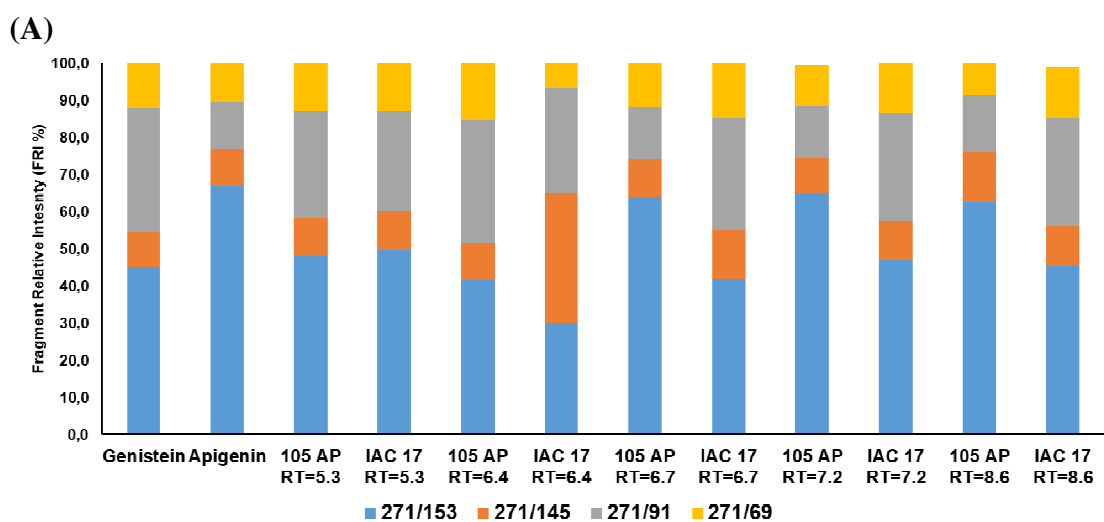
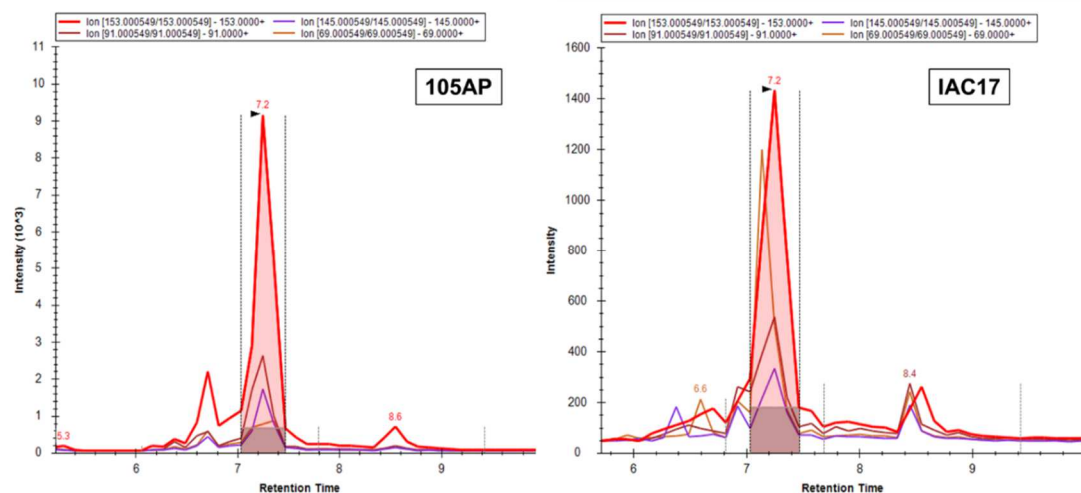


Figure 5: Nontarget analysis of the flavonoids belonging the classes Kaempferol-Luteolin in the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars. In (A) the compounds detected for each genotypes, the retention times (RT) observed and their RFI% calculated as in Fig 1 and S1 Fig . The compounds that sharing the same RFI% patterns related to standard were considering belonging to a glycoconjugate for those class. In (B) the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In (B) the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In (C) the relative abundances of the some flavonoid compounds characterized as Kaempferol conjugates in (A) in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.





(C)

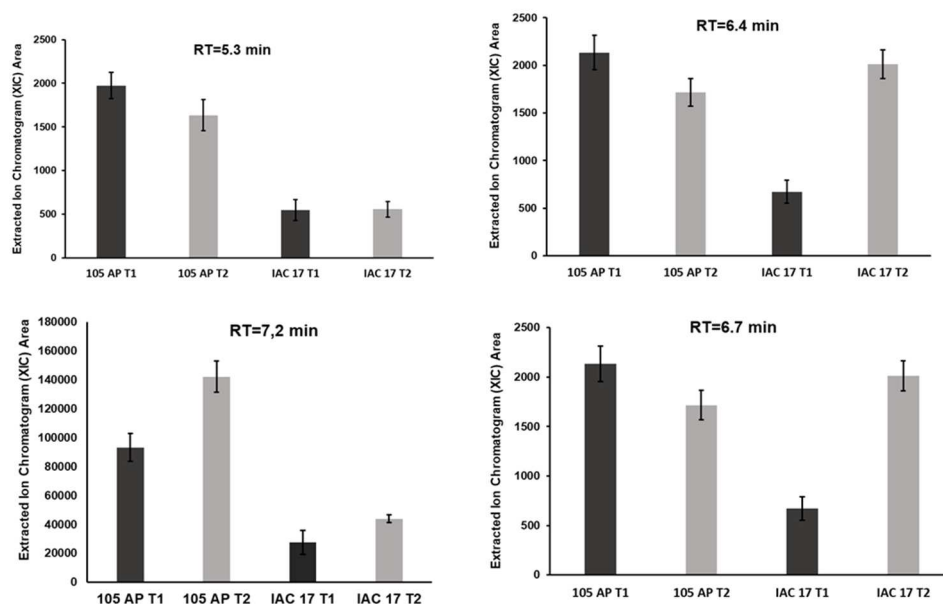


Figure 7: Nontarget analysis of the flavonoids belonging to the classes Genistein-Apigenin in the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars. In (A) the compounds detected for each genotype, the retention times (RT) observed and their RFI% calculated as in Fig 1 and S1 Fig. The compounds that share the same RFI% patterns related to standard were considered to belong to a glycoconjugate for those classes. In (B) the XICs and the RT of the compounds present in the extracts of the soybean genotypes. In (C) the relative abundances of some flavonoid compounds characterized as Genistein or Apigenin conjugates in (A) in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

5.3.4 Determination of the glyconjugate compounds by LC/MS precursor ion scan analysis

The pseudoMS3/MRM method only provides structural information about the aglycone core. Therefore, a LC/MS *precursor ion scan* method was applied to determine which mass molecules were present in the soybean leaves that generated the fragmentation patterns used to characterize the flavonoid classes (item 3.3). The m/z values observed for each XIC (S1 Fig) were searched in the mass spectra database *Mass Bank* (<http://www.massbank.jp>) or in the literature to verify which flavonoids share the same mass observed in the *precursor ion scan*. When the *precursor ion scan* was applied to the Morin-Hesperetin-Quercetin class (m/z 303 for aglycone), precursors $m/z=773.6/RT=5.2$ and $m/z=773.6/RT=6.2$ (S1A, S1B and S1C Fig) with high intensity (10^4) for the IAC17 genotype (Fig 4A and 4B) and which the database search Table 1 returns as a result for Hesperidin or Rutin (mass of 610.1 Da) (Fig 4B). It is in accordance with the result observed in the standard analysis (Fig 3) and in the class analysis (Fig 4), for the aglycone interpretation from the XIC $RT=6.2$ min, as a Quercetin glycoconjugate (Rutin is a Quercetin-3-O-rutinoside).

Table 1: Precursor ions detected by *precursor ion scan* method and the database identification.

Flavonoid Class	Precursor m/z	RT (min)	Conjugate (m/z)	Relative Abundance in XIC (%)	Sugar Moiety (mass)	FRI% Match	Mass Bank Database/Literature
Daidzein	255	6.5	503.3	100	248.3	+/-	Daidzein 7-O-glucoside-O-6-malonate ¹
	255	7.6	700.1	100	445.1	+/-	NH
	255	7.6	647.7	55	392.7	+/-	NH
	255	6.2	503.3	100	248.3	+	Daidzein 7-O-galactoside-O-6-malonate ¹
	255	6.2	581.7	37.35	326.7	+/-	NH
	255	4.5	417.3	100	162.3	+	Daidzein-7-O-glucoside ¹
	255	4.5	452.0	61.94	197	-	NH
	255	5.6	757.1	100	502.1	+	NH
	255	5.6	417.1	85.88	162.1	+	Daidzein-7-O-glucoside ¹
	255	5.6	549.4	47.53	294.4	-	NH
Genistein-Apigenin	271	7.2	519.0	100	248	105AP IAC17	Apigenin 7-O-6-O-malonylglucoside 3 Genistein 7-O-6-O-malonylglucoside 1, 3
	271	6.7	433.0	100	162	105AP	Apigenin-7-O-glucoside ⁴
	271	6.7	565.3	18.23	294.3	105AP	Apigenin 6--xyloside-8—glucoside ⁴
	271	6.7	767.3	14.2	496.3	IAC17	Genistein O-diglucoside dimalonylated ⁴
	271	6.4	565.8	100	294.8	+	Genistein 6-C-xyloside-8-C-glucoside ⁴
	271	6.4	595.2	42.4	322.2	+	Genistein 4,0-7-diglucoside ³
	271	5.3	594.8	100	323.8	+	NH
	271	8.6	519.3	100	248.3	105AP IAC17	Apigenin 7-O-6-O-malonylglucoside 3 Genistein 7-O-6-O-malonylglucoside ³
Luteolin-Kaempferol	287	5.6	757.4	100	470.4	+	Kaempferol-3-O-glucopyranosyl-O-rhamnopyranosyl-galactopyranoside ^{7,8}
	287	5.9	611.4	100	324.4	+	Kaempferol-3-O-digalactopyranoside ^{7,8}
	287	5.9	741.4	41.67	454.4	+	Kaempferol-3-O-dihydroxyphenyl-galactopyranoside ^{7,8}
	287	5.9	595.4	28.33	308.4	+	Kaempferol-3-O-rhamnopyranosyl-galactopyranoside ^{7,8}
	287	6.7	595.3	100	308.3	+	Kaempferol-3-O-rhamnopyranosyl-galactopyranoside ^{7,8}
	287	6.2	785.4	100	498.4	+	NH
	287	6.2	611.2	97	324.2	+	Kaempferol 3-O-beta-diglucoside ^{6,7}
	287	6.2	757.4	68	454.4	+	Kaempferol-3-O-glucopyranosyl-rhamnopyranosyl-galactopyranoside ^{5,7}
	287	7.9	967.0	100	680.8	+	Kaempferol-3-feruloyl-diglucoside-7-glucoside ⁶
	Morin-Hesperetin-Quercetin	303	5.2	773.6	100	470.6	+
303		5.5	627.5	100	324.5	+	Quercetin-di-glucoside ^{2,3}
303		5.5	757.3	71.59	454.3	+	Quercetin-3-O-rhamnopyranosyl-

303	7.1	465	100	162	+	glucopyranoside- rhamnopyranoside ^{2,4} Isoquercetin ^{4,6}
303	6.2	611.2	100	308.2	+	Rutin ^{4,6}
303	7.6	647,5	100	444.5	+	NH

¹ describe by Wu et al., 2004; ² describe by Lin et al., 2008; ³ describe by Boue et al., 2003; ⁴ describe in Mass Bank. ⁵ Zhou et al., 2014 ⁶ Olsen et al 2012 ⁷ Ho et al, 2002 ¹²⁻⁻⁸ Song et al., 2014. +: when the FRI% match for both genotype. +/-: when the FRI% match only for one genotype. NH: no hit in database or literature. Relative Abundance in the XIC (%): percentage of the relative intensity in mass spectrum as showed in the Fig. S1.

Also were observed glyconjugates for Daidzein: Daidzein-7-O-glucoside (m/z 417.3 for the RT=4.5 and 5.6 min) and Daidzein 7-O-glucoside-O-6-malonate (m/z=503.3 and RT=6.2 and 6.5 min). The same m/z values eluted at different retention times is an indicative of the presence of isomers for the same Daidzein glycoconjugate (Table 1) or containing different sugar moieties. For some m/z values were not found flavonoids describes in the database or literature that share the same nominal mass Table 1. In addition, were observed for some XICs more than one ion, which the m/z values and the relative intensities are indicated in the Table 1. For example, for Daidzein class were detected at RT=5.6 min the ions m/z 756.1, 417.1 and 549.4, that is an indicative that different molecules were co-eluted from analytical column. Others glycoconjugate flavonoids that were also identified in the database or literature belonging the classes Genistein-Apigenin and Luteolin-Kaempferol are also indicated in the Table 1.

5.3.5 Global analysis of the flavonoid profiles

The PLSA-DA method was used to analyze the samples according to the most significant variables and was observed a differential grouping for the contrasting genotypes and caterpillar treatment (Fig 8). As can be observed in the Fig 8, the experimental variance was separated in two distinct groups which reflect mainly the genotype differences. The first principal component (PCA 1) explained the greatest variance (93%) across the data and separated the samples based on genotypes. The second principal component (PCA2) also separated the data but based in the treatment, however with a lower variance (1.9%) and was attributed to a reduced effect of the treatment with caterpillar over the abundance of characterized compounds (Fig 8).

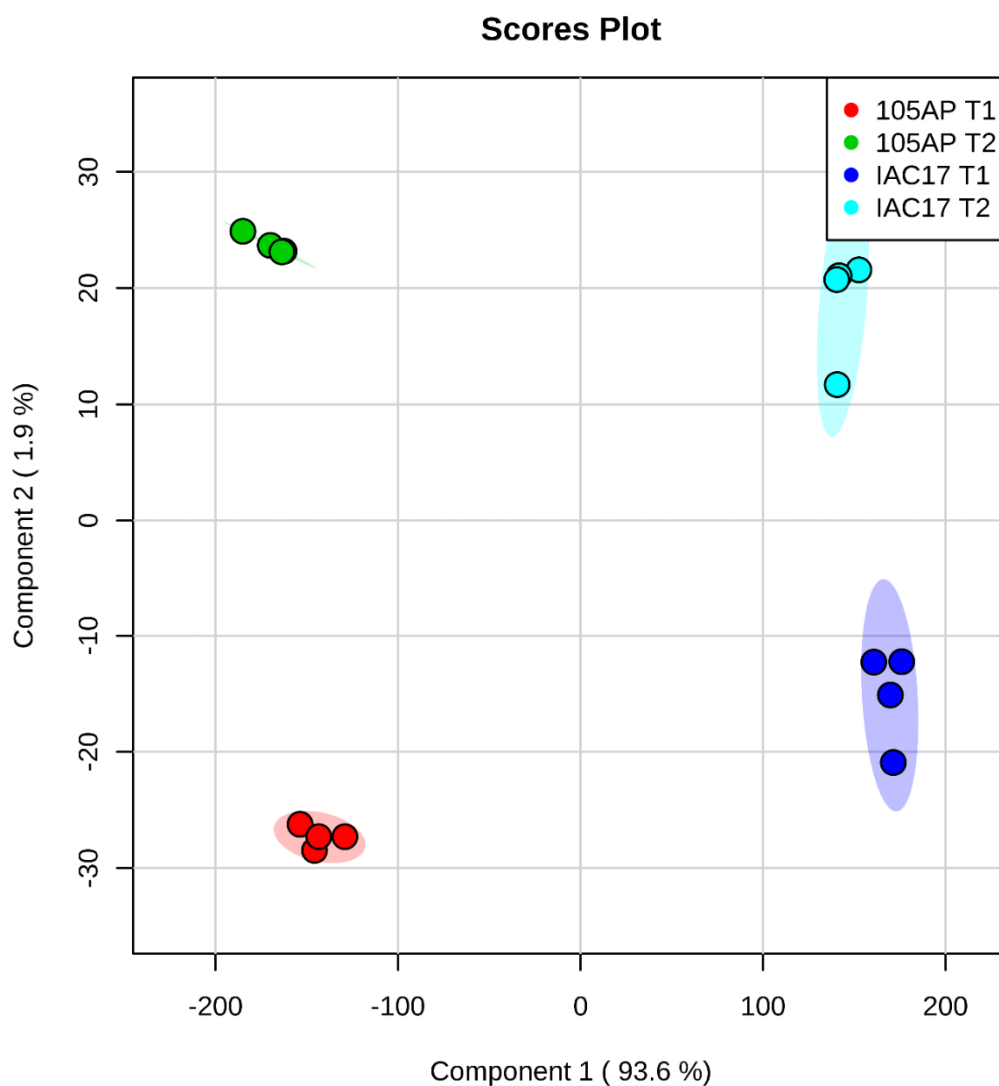


Figure 8: Clustering analysis by *PLSDA* method of the characterized flavonoids of the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

These differences could be also observed in the *HeatMap* analysis, which indicate that some compounds in higher abundance in the specific genotypes and was increased when the presence of the caterpillar (Fig 9). Clearly, is possible to see a first cluster formed by 12 compounds: Genistein-6.7, -7.2 and -8.6; Daidzein-7.6 and -6.5; Kaempferol-7.9 and -6.7; Quercetin-5.2, -5.5 and -6.2 and Luteolin, which showed higher concentrations in the resistance genotype IAC17. In contrast, a second cluster was observed by 9 compounds that were detected in lower relative concentrations in the IAC17: Apigenin-8.6, -5.3, -6.7 and -7.2; Apigenin, Genistein and Quercetin aglycones;

Kaempferol-5.6; Daidzein-6.2 (Fig 9). In a thirty group, were observed compound increased in similar proportions in both genotypes when in the presence of the caterpillar.

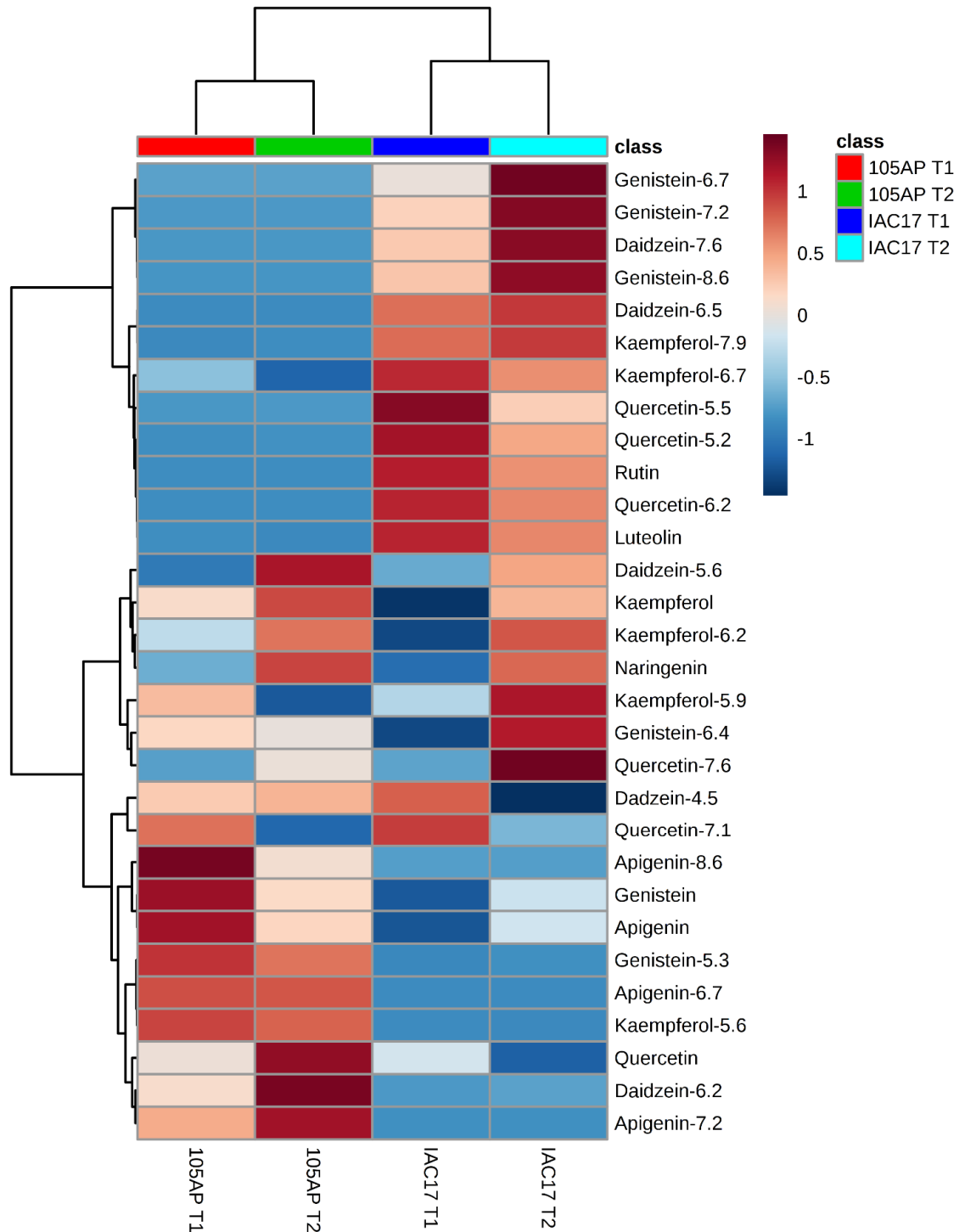


Figure 9: Clustering analysis by *HeaMap* method of the characterized flavonoids of the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

Profiles can also be represented in a metabolic pathway map to the flavonoid biosynthesis (Fig 10), which made possible to see the classes that have been altered by differences in the metabolism of the genotypes and in response to caterpillar damage. Four Quercetin glyconjugates displayed high relative abundances in the resistance IAC17 genotypes, including Rutin and Quercetin 3-*O*-rhamnosylglycoside-7-*O*-glucoside, that likewise Rutin, was observed in highest concentration in the IAC17 (Fig 3). Thus, this pathway for biosynthesis of the compounds was highly active in this genotype. Pathways for the Glyconjugates of Genistein, Dadzein and Kaempferol were also active (Fig 10). Some glyconjugates were identified in the soybean leaves, however are not describe in the soybean reference KEEG database, and could be a new flavonoid, such as Kaempferol-3-feruloyl-diglucoside-7-glucoside RT=7.9) (Fig 10), present in high abundance in the resistance genotype IAC17 (Fig 10 and Fig 5).

FLAVONOID BIOSYNTHESIS

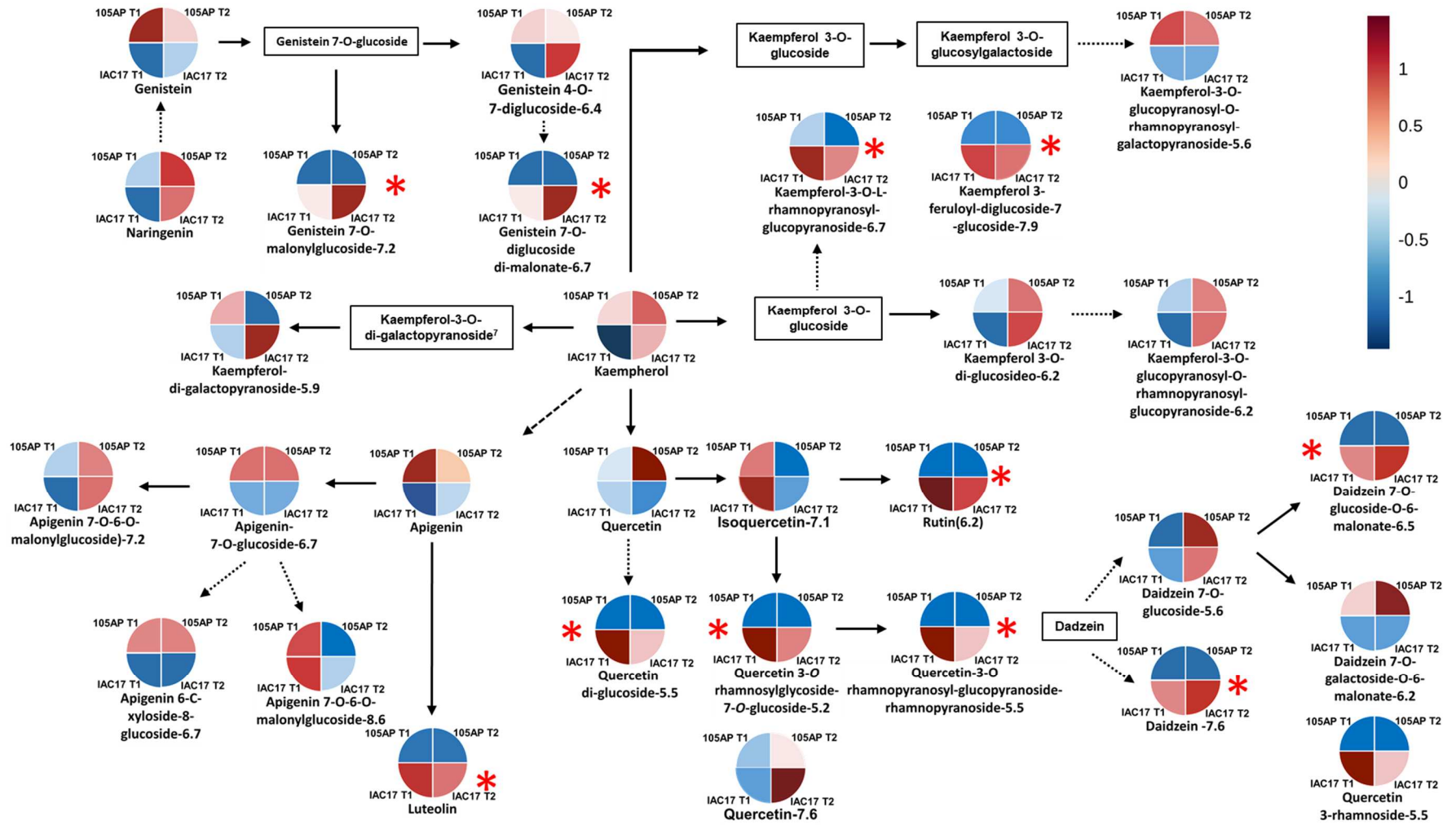


Figure 10: Overview of the flavonoid biosynthesis pathway reconstructed from the characterized compounds from of the soybean leaves from the 105 AP and IAC 17 genotypes, in presence or absence of the *A. gemmatalis* caterpillars.

Each quadrant of the circle represent to each genotype and treatment. The color of the each quadrant follow the same pattern from the HeatMap (Fig 9) and is an indicative of the correlation analysis and express the levels of increase and decrease on the abundance of flavonoid for each genotype and treatment. A red asterisk indicates those compounds that were more abundant specifically in the resistance genotype IAC 17.

1.4 Discussion

The plant flavonoids functions range from physiological development to plant responses for abiotic and biotic stresses [5,6,12]. Moreover, due to their health-promoting effects flavonoids are of pharmaceutical interest. Herbivores damage is a major biotic stress for terrestrial plants. In order to survive to this stress, plants have evolved various defenses including the production of secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids, flavonoids, and glucosinolates [12]. Thus, a more discriminate metabolic profiling between genotypes is important for a more comprehensive characterization of the resistance to insect damage. However, the study of flavonoid content in plants is challenging, because their chemical complexity and the traditional methods based in LC/MS are time-consuming [24] and could underestimated the full chemical diversity in plant tissues.

When using a target method based in 21 commercial standards, only three flavonoids were observed; Rutin, Luteolin and Daidzein (Fig 3) in high abundance in soybean leaves from the IAC17 resistance genotype. When applying the standard-based method, the Rutin were characterized (RT= 6.2 min) as the major Quercetin glyconjugate present in high concentrations (Fig 3). However, when applying non-target method were also detected, beyond of the Rutin, others five glycoconjugates from Quercetin class in similarly high relative abundance (Fig 4B and 4C), as evidenced at RT=5.2 min. Thus, target method underestimated the complexity for the Quercetin class.

Flavonoid profiles from soybean tissues can variate when applying different traditional LC and LC/MS methods and also due to evaluated standards, as well as, soybean genotypes with different genetic backgrounds [9,25-27], plant structure and developmental stages [24,26,28,29]. Distinct profiles for the 105AP and IAC 17 genotypes were also observed, revealed by PLSDA analysis (Fig 8). However, the full extension of these variations was possible to access using the non-target methods. Ho et al. (2002) verified that the flavonoids in the soybean leaves were mainly Kaempferol glycosides, whereas in the soybean seed were mainly isoflavone glycosides and derivatives. While the Piubelli et al. (2005) verified high Rutin (Quercetin 3-O-rhamnosyl glucoside) and Genistin (genistein 7-O-glucoside) contents from soybean leaves of different genotypes. In the generated profiles were detected Kaempferol glycoconjugates, but also found high abundances for Rutin, some Genistein and Daidzein glycoconjugates (Fig 3 and Fig 7). In addition, the signals for the Kaempferol conjugates were higher (10^3)

indicating that are the most abundant flavonoids in the soybean leaves (Fig 5B) from both genotypes. The non-target method showed to be efficient, as well as for allowing the detection of several glycoconjugates and flavonoids analysis directly from metabolic extracts, without the applying of purification stapes [24]. However, for compounds at very low concentration the fragments used to generate the RFI% could be absent or with a signal/noise relation that will produce fluctuation at the relative proportion, as evidenced for RT=7.1 min (Fig 4A and 4B). Thus, the homogeneity and reproducibility of the RFI% need to be verified (S2 Fig).

Distinct profiles between soybean genotypes could also be verified for Genistein and Apigenin classes, which Genistein were more abundant in the resistance genotype IAC17, while Apigenin was in the sensitive 105AP (Fig 7 and Fig 10). The highest distinct flavonoid profiles were also indicated by PLSDA and *HeatMap* analysis (Fig 8 and Fig 9), with an expressive separation between the genotypes (over 95% of variance observed), and correlated with the survival curve behavior of *A. Gemmatalis* caterpillars fed with the soybean leaves (Fig 2). The mortality was higher for caterpillars fed on IA17 genotype than 105AP, which was characterized as resistance. However, this correlation can not be attributing to all evaluated flavonoids, because some compounds were detected in similar or lower abundance in the resistance genotype (Fig 9). Thus, these cluster analysis indicated which compounds could specifically affect the caterpillar survivor (Fig 9 and Fig 10) and were identified some glycosylate flavonoids belonging to Quercetin, Daidzein, Genistein and Kaempferol classes (Fig 10).

Flavonols such as Rutin and its Glycosylated forms have been reported to enhance the mortality rate and inhibit the growth of *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Noctuidae: Lepidoptera) caterpillars on groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Arabidopsis* [30,31] and *A. gemmatalis* [3,9]. Extracts from leaves of resistant soybean genotypes negatively affected the caterpillars' physiology and behavior of *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) *Trichoplusiani* (Hübner, 1800) (Noctuidae: Lepidoptera) [32,33] and *A. gemmatalis* [9]. Soybean extracts added to artificial diets was mainly composed of Rutin, Quercetin 3-O-glucosylgalactoside and genistin (genistein 7-O-glucoside) [9]. Compounds observed in present profiles. The non-target method turns possible to detect others derivatives also in high abundances in the resistant genotypes (Fig 9 and Fig 10). Beyond those active compounds in the diet, three more Quercetin conjugates were observed: Quercetin 3-rhamnoside, Quercetin 3-O-rhamnosylglycoside-7-O-glucoside

and Quercetin-3-O-rhamnopyranosyl-glucopyranoside-rhamnopyranoside; and two more Genistein conjugates: *Genistein-7-O-diglucoside-dimalonylated* and *Genistein-7-O-6-O-malonyl glucoside* (Fig 10); that were detected in high relative abundances in genotype IAC17 (Fig 4). The non-target applied method allowed broader comparisons between contrasting genotypes, because all compounds belonging to flavonoid classes and present in high concentrations were included. This subtractive approach specific all indicate possible candidate compounds for *in vitro* biological activity assays, especially those compounds present in high relative concentrations. Thus, the non-target method is more appropriate for a broad range profiling when contrasting genotypes are evaluated and when aims to correlate these profiles with biological activities.

The flavonoids are phenolic compounds with addition of sugar moiety that differ mainly at the position and conformation of the chemical groups. Albeit ions intensity from different molecules are not directly comparable, these compounds will have similar proton affinities. Thus, the XIC signals from different flavonoid classes (for example for Quercetin, Genistein, Kaempferol and Daidzein) could reflect the relative concentration in the soybean leaves. Taking this into account, the most abundant flavonoid in soybean leaves belongs to the Kaempferol and Quercetin classes. However, only the Kaempferol-3-O-L-rhamnopyranosyl-glucopyranoside and Kaempferol-3-feruloyl-diglucoside-7-glucoside were higher in the resistant genotype IAC17. In contrast, four Quercetin glycosylates were higher in the IAC 17 (Fig 8 and 9) and their derivatives can be responsible for caterpillar inhibition observed *in vitro* and *in vivo* assays [3,9,11,34,35].

In the metabolic pathways analysis (Fig 10), the biosynthetic pathway for Quercetin derivatives were active just in the resistance genotype, albeit their relative abundances slightly decreased in presence caterpillar damage (Fig 4 and Fig 10). Beetle damage induced significantly increased concentrations of Naringenin methyl hexose, Kaempferol diglycoside, Kaempferol triglycoside, and Quercetin triglycoside in soybean leaves [26]. However, it was slightly 30% more abundant in the elicited soybean foliage. In soybean resistance genotypes infested with *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Pentatomidae: Hemiptera) concentrations of Rutin and Genistein flavonoids had a little increased [36].

For some flavonoids show in high relative abundance in the IAC17 genotype were observed a concentration decreased after caterpillar damage (Fig 8 and 9). Thus, the caterpillar damage does not elicit the plant defense responses so the resistance properties

are apparently a constitutive characteristic of this genotype. The synthesis decrease could be also justify by metabolic adjustment induce by phytohormones like jasmonic acid. In another way, biosynthesis of some flavonoids (Daidzein-7-O-glucoside, Genistein-4,0-7-diglucoside, Kaempferol-3-O-rhamnopyranosyl-glucopyranoside, Kaempferol-3-O-beta-di-glucosideo, Kaempferol-3-O-glucopyranosyl-rhamnopyranosyl-glucopyranoside, Kaempferol-3-O-di-galactopyranoside, Kaempferol-3-O-di-O-rhamnopyranosyl-galactopyranoside, Kaempferol-3-O-rhamnopyranosyl-galactopyranoside) were significantly increased by caterpillar damage (Fig 9 and Fig 10).

Spodoptera litura damages on soybean leaves displayed an induced accumulation of the flavone and isoflavone aglycones 4',7-dihydroxyflavone, daidzein, formononetin, and the isoflavone glucoside daidzin [27]. Also reduction of kaempferol-3,7-dirhamnoside (KRR) corresponded to an increased susceptibility of *Arabidopsis* plants to *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) (Pieridae: Lepidoptera) caterpillars that also had their grow affected on artificial diet containing KRR [10]. The function of this compound is supported by a direct defense against this specialist caterpillar. Thus, the complex profile of the Kaempferol glyconjugate observed in soybean leaves (Fig 10) could be a response to a specialist herbivory as *A. gemmatalis*.

The fine regulation of flavonoid biosynthesis is achieved by combinatorial action of transcription factors, belonging to different transcription factor families, involved in the transcriptional control of flavonoid biosynthesis genes [10,12,37]. Stracke et al. (2010) demonstrate a differential influence of the transcriptional factors MYB11, MYB12 and MYB111 on the spatial accumulation of specific flavonol derivatives in *Arabidopsis* leaves, such as Quercetin 3-O-rhamnoside, Quercetin 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside, Quercetin 3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside. In accordance, in the present profiles the difference of genetic background between genotypes and the elicitation by the caterpillar damage culminate in alteration of the relative abundance of Quercetin/Kaempferol conjugates (Fig 10). Onkokensung et al. (2014) also showed in *Arabidopsis* that enhancing the activity of the anthocyanin pathway results in alterations of Quercetin/Kaempferol derivatives, which has a negative effect on the accumulation of Kaempferol-3,7-dirhamnoside, a novel defensive metabolite against a specialist caterpillar.

5.5 Concluding Remarks

Considering *A. gemmatilis* survival percentages the soybean IAC 17 were characterized as an antibiosis-type resistance, and UFV 105AP was indicated to be a genotype more suitable for insect development. Applying a combination of the target and non-target method LC/MS-based, several flavonoids were characterized from the soybean leaves. However, the non-target method showed a broad range of the compounds in the profile and was efficient to characterize the metabolic response involving flavonoids of contrasting genotypes for resistance to *A. gemmatilis*. Some flavonoid glyconjugates for Quercetin, Genistein, Kaempferol and Dadzein showed higher concentrations in soybean resistant genotype, being Kaempferol and Quercetin the most abundant. Nevertheless, just one Kaempferol conjugate was higher in resistant genotype IAC17, in contrast to three glycosylated Quercetin. Metabolic pathways analysis elucidated the biosynthetic pathway for Quercetin derivatives and showed to be more active in the resistance genotypes. In another way, the susceptible cultivar 105AP showed higher abundance of Kaempferol-based flavonoids. It can be an indicative of the genetic background for plant defenses against caterpillar damages related to biosynthetic pathway activity for secondary compounds, eliminated after successive crosses. The broad range overview of the profiles generated by the non-target method could be used as basis for directing the genetic studies related to regulatory mechanisms of these pathways, as well as to support breeding programs for herbivory resistance in soybean.

5.6 Acknowledgments:

The authors would like to thank to NuBioMol (Center of Analyses of Biomolecules-UFV, Brazil) for the infrastructure and technical assistance. This study was supported by the National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interaction (INCT-IPP), The Brazilian Soybean Genome Consortium (GENOSOJA), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5.7 References

1. Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by

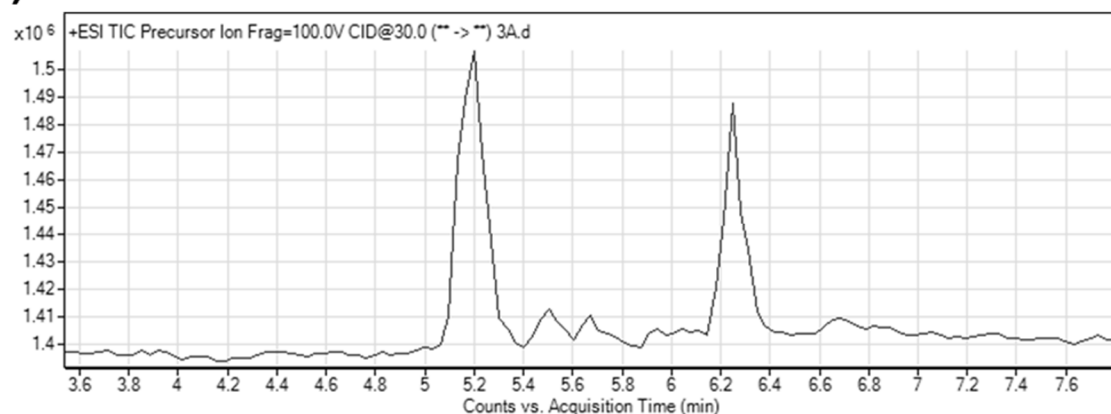
- Exploiting Physio-morphological Traits. *Front Plant Sci.* 2017;8:537. doi: 10.3389/fpls.2017.00537. eCollection 2017.
2. Bortolotto OC, Pomari-Fernandes A, Bueno RCO de F, Bueno AF, Kruz YKS; Queiroz AP, Sanzovo A, Ferreira RB. The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agron Sci Biotech.* 2015;1: 25 – 32.
 3. Fugi CG, Lourenção AL, Parra JRP. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agrícola. Piracicaba.* 2005. 62: 31-35.
 4. Lourenção AL, Costa AS, Miranda MAC. Sources of resistance to Insect pests and virus vector in the soybean gemplasm tested at Instituto Agronomico, SP, Brasil. In: *WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4.* 1989, Buenos Aires. *Anais...* Buenos Aires: Editora S.R.L. 1989. p. 1578-1581.
 5. War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav.* 2012;7:1306-20. doi: 10.4161/psb.21663. Epub 2012 Aug 20.
 6. Dar AS, Rather BA, Wani AR, Ganie MA, Resistance against Insect Pests by Plant Phenolics and their Derivative Compounds. *Chem Sci Rev Lett.* 2017;6:1941-1949.
 7. Mithöfer A., Maffei M.E. General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins. *Plant Toxins.* 2017;3-24.
 8. Hoffmann-Campo CB, Harborne JB and McCaffery AR. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomol Experiment Appli,* 2001;98: 181–194. doi:10.1046/j.1570-7458.2001.00773.x
 9. Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, de Oliveira MC. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?. *J Chem Ecol.* 2005;31:1509-25.
 10. Onkokesung N, Reichelt M, van Doorn A, Schuurink RC, van Loon JJ, Dicke M. Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*. *J Exp Bot.* 2014;65:2203-17. doi: 10.1093/jxb/eru096. Epub 2014 Mar 11.
 11. Silva TRB, Sousa AC, Lima T, Silva AR, Freitas, Sousa S, Jesus FG. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Sci., Agron.* [online]. 2016;38:165-170. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27956>.
 12. Ferreira CCA, Oliveira MGA, Brumano MHN, Guedes RNC, Silva CHO, Moreira MA. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense by reproductive tissue removal. *Biosci J.* 2005;21:49-55.

13. Abrankó L, Szilvássy B. Mass spectrometric profiling of flavonoid glycoconjugates possessing isomeric aglycones. *J. Mass Spectrom.* 2015;50:71–80.
14. Farag MA, Huhman DV, Dixon RA, Sumner LW. Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* 2008; 46:387-402. Epub 2007.
15. Stracke R, Ishihara H, Huel G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal.* 2007; 50:660-677. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x.
16. War et al., 2015. War AR, Paulraj MG, Ignacimuthu S, Sharma HC. Induced resistance to *Helicoverpa armigera* through exogenous application of jasmonic acid and salicylic acid in groundnut, *Arachis hypogaea*. *Pest Manag Sci.* 2015; 71:72-82. doi: 10.1002/ps.3764. Epub 2014 Apr 4.
17. Juhász AC, Ciabotti S, Teixeira LCAA. Breeding for Nutritional Quality. In: Lopes da Silva F, Borèm A, Sedyama T, Ludke WH (Org.). *Soybean Breeding*. 1ed.: Springer International Publishing. 2017;1:375-393.
18. Lourenção AL, Reco PC, Braga NR, Valle JGE, Pinheiro JB. Produtividade de genótipos de soja sob infestação da lagarta-da-soja e de percevejos. *Neotrop. Entomol.* 2010. 39, 275-281
19. Valle GE, Lourenção AL. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop. Entomol. Londrina.* 2002. 31: 285-295.
20. Souza EF, Baldin ELL, Silva JPGF, Lourençao AL. Feeding preference of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and attractiveness of soybean genotypes. *Chilean J. Agric. Res.* 2013; 73:351-357. ISSN 0718-5839. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000400004>.
21. Matos Neto FC, Zanuncio JC, Cruz I, Torres JB. Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. *Rev Bras entomol* 2002; 46: 237-241.
22. Paixão GP, Lourenção AL, Silva CR, Cordeiro G, Barros RA, Oliveira JÁ, Visôto LE, Oliveira MGA. Active response of soybean to defoliator *Anticarsia gemmatilis* Hübner: strategies to overcome protease inhibitor production. *Idesia.* 2016;34: 69-75.
23. Goel MK, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *International Journal of Ayurveda Research.* 2010; 1:274-278. doi:10.4103/0974-7788.76794.

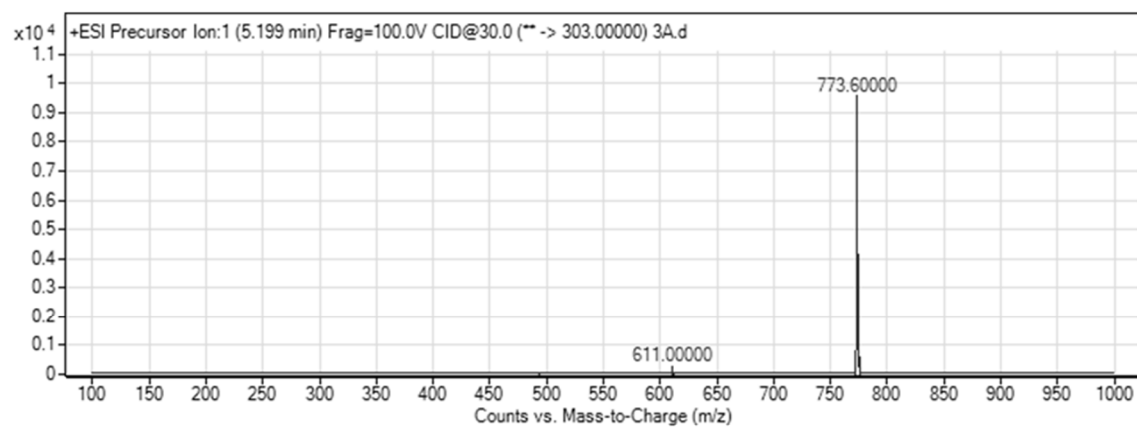
24. Ho HM, Chen RY, Leung LK, Chan FL, Huang Y, Chen ZY. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:289-95.
25. Wu Q, Wang M, Sciarappa WJ, Simon JE. LC/UV/ESI-MS analysis of isoflavones in Edamame and Tofu soybeans. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2763-9.
26. O'Neill BF, Zangerl AR, Dermody O, Bilgin DD, Casteel CL, Zavala JA, DeLucia EH, Berenbaum MR. Impact of elevated levels of atmospheric CO₂ and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). *J Chem Ecol.* 2010;36:35-45. doi: 10.1007/s10886-009-9727-0.
27. Murakami S, Nakata R, Aboshi T, et al. Insect-Induced Daidzein, Formononetin and Their Conjugates in Soybean Leaves. *Metabolites.* 2014; 4:532-546. doi:10.3390/metabo4030532.
28. Boué SM, Carter-Wientjes CH, Shih BY, Cleveland TE. Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2003;991:61-8.
29. Song HH, Ryu HW, Lee KJ, Jeong IY, Kim DS, Oh SR. Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage. *Metabolomics.* 2014;10:833. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0640-3>.
30. Mallikarjuna N, Kranthi KR, Jadhav DR, Kranthi S, Chandra S. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. 2004;128: 321–328.
31. Misra P, Pandey A, Tiwari M, et al. Modulation of transcriptome and metabolome of tobacco by arabidopsis transcription factor, AtMYB12. Leads to Insect Resistance. *Plant Physiol.* 2010;152:2258–2268.
32. Hoffmann-Campo CB. Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hubner). Reading: University of Reading, 1995. 165p. Ph.D. Thesis.
33. Hoffmann-Campo CB, Harborne JB, Mc Caffery AR. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Ent Exp et Applic.* 2001; 98:181-194.
34. Hoffmann-Campo CB, Ramos Neto JA, Oliveira MCN, Oliveira LJ. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2006. 41; 1453-1459. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006001000001>
35. Salvador MC, Boiça AL Jr, de Oliveira MC, da Graça JP, da Silva DM, Hoffmann-Campo CB. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)?. *Neotrop Entomol.* 2010; 39:774-83.

36. Bentivenha JPF, Canassa VF, Baldin ELL, Borguini MGG, Lima PPG, Lourenção AL. Role of the Rutin and Genistein Flavonoids in Soybean Resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) *Arthropod-Plant Interactions*. 2017; 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9578-5>
37. Stracke R, Jahns O, Keck M, Tohge T, Niehaus K, Fernie AR, Weisshaar B. Analysis of production of flavonol glycosides-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation. *New Phytol*. 2010; 188:985-1000. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03421.x. Epub 2010 Aug 20.

(A)



(B)



(C)

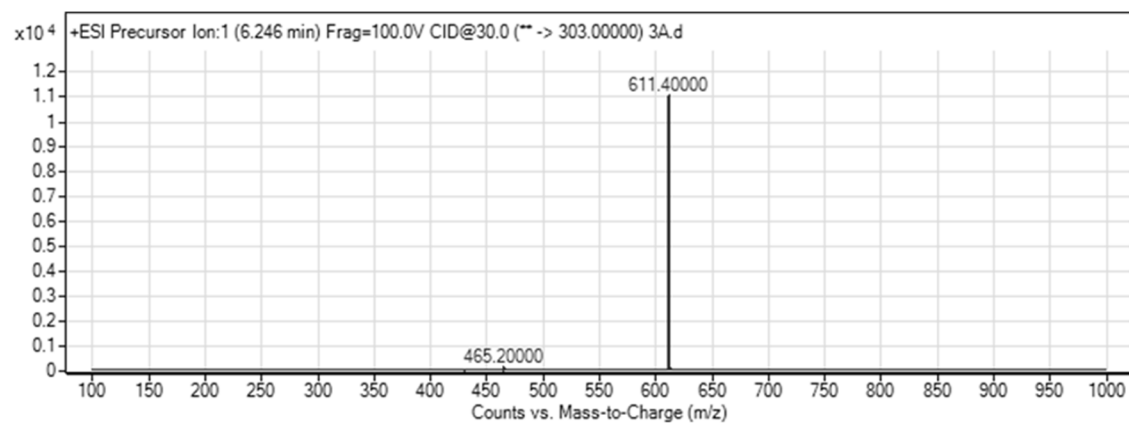


Figure S1.

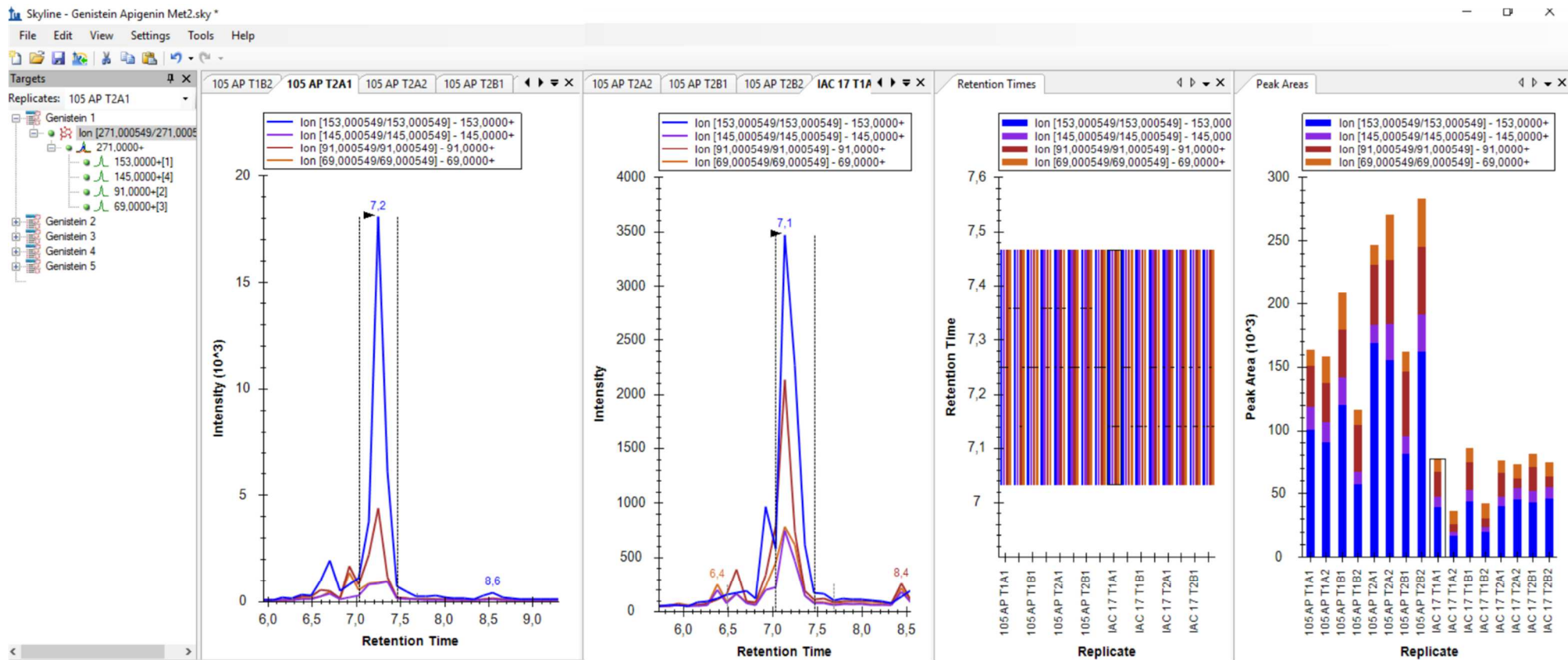


Figure S2.

Table S1: Transition list used as input for skyline analyzes of the commercial phenolic compound used as standard.

Molecule Name	Precursor Charge	Product m/z	Product charge	Precursor RT	Precursor CE	Precursor m/z	Polarity
Hesperidin	1	303	1	6.8	30	611	Positive
Rutin	1	303	1	6.2	30	611	Positive
Naringin	1	273	1	6.8	30	581	Positive
Orientin	1	329	1	5.8	30	449	Positive
Isoorientin	1	299	1	5.6	30	449	Positive
Vitexin	1	313	1	6.2	30	433	Positive
Isovitexin	1	283	1	6.2	30	433	Positive
Myricetin	1	153	1	7.2	30	319	Positive
Morin	1	153	1	8	30	303	Positive
Hesperetin	1	153	1	6.8	30	303	Positive
Quercetin	1	153	1	8	30	303	Positive
Epicatechin	1	139	1	5	30	291	Positive
Catechin	1	139	1	4.2	30	291	Positive
Kaempferol	1	153	1	8.6	30	287	Positive
Luteolin	1	153	1	7.9	30	287	Positive
Phloretin	1	107	1	7.1	30	275	Positive
Narigenin	1	153	1	8.4	30	273	Positive
Genistein	1	153	1	8.4	30	271	Positive
Apigenin	1	153	1	8.4	30	271	Positive
Daidzein	1	137	1	9.6	30	255	Positive
Chalcone	1	104	1	11.2	30	210	Positive

Table S2: Transition list used as input for Skyline in the analysis flavonoid classes.

Molecule List Name	Precursor Charge	Product m/z	Product charge	Precursor RT	Precursor CE	Precursor m/z
Daidzein Class	1	137	1	6.5	30	255
Genistein Apigenin Class	1	153	1	7.25	30	271
Phloretin Class	1	79	1	8.33	30	275
Kaempferol Luteolin Class	1	153	1	5.58	30	287
Epicatechin Catechin Class	1	69	1	0.57	30	291
Morin Herperentin Quercetin Class	1	229.2	1	5.23	30	303
Myricetin Class	1	153	1	5.65	30	319
Naringenin Class	1	153	1	7.34	30	273

Table S3: Transition list used as input in the Skyline analysis for the profiling of the flavonoid compounds in the soybean leaf.

Molecule Name	Precursor Charge	Product m/z	Product charge	Precursor RT	Precursor CE	Precursor m/z
Daidzein Class 1	1	137	1	7.7	30	255
Daidzein Class 1	1	181	1	7.7	30	255
Daidzein Class 1	1	153	1	7.7	30	255
Daidzein Class 1	1	91	1	7.7	30	255
Apigenin Class 2	1	153	1	8.55	30	271
Apigenin Class 2	1	145	1	8.55	30	271
Apigenin Class 2	1	91	1	8.55	30	271
Apigenin Class 2	1	69	1	8.55	30	271
Genistein Class 2	1	153	1	8.44	30	271
Genistein Class 2	1	145	1	8.44	30	271
Genistein Class 2	1	91	1	8.44	30	271
Genistein Class 2	1	69	1	8.44	30	271
Phloretin Class 3	1	150.7	1	7.11	30	275
Phloretin Class 3	1	107	1	7.11	30	275
Phloretin Class 3	1	79	1	7.11	30	275
Phloretin Class 3	1	77	1	7.11	30	275
Luteolin Class 4	1	153	1	7.97	30	287
Luteolin Class 4	1	135	1	7.97	30	287
Luteolin Class 4	1	121	1	7.97	30	287
Luteolin Class 4	1	69	1	7.97	30	287
Kaempferol Class 4	1	153	1	8.73	30	287
Kaempferol Class 4	1	135	1	8.73	30	287
Kaempferol Class 4	1	121	1	8.73	30	287
Kaempferol Class 4	1	69	1	8.73	30	287
Catechin Class 5	1	161	1	4.26	30	291
Catechin Class 5	1	123	1	4.26	30	291
Catechin Class 5	1	119.2	1	4.26	30	291
Catechin Class 5	1	69	1	4.26	30	291
Epicatechin Class 5	1	161	1	5.02	30	291
Epicatechin Class 5	1	123	1	5.02	30	291
Epicatechin Class 5	1	119.2	1	5.02	30	291
Epicatechin Class 5	1	69	1	5.02	30	291
Quercetin Class 6	1	229.2	1	8.05	30	303
Quercetin Class 6	1	153	1	8.05	30	303
Quercetin Class 6	1	137	1	8.05	30	303
Quercetin Class 6	1	89	1	8.05	30	303
Hesperentin Class 6	1	229.2	1	7.94	30	303
Hesperentin Class 6	1	153	1	7.94	30	303
Hesperentin Class 6	1	137	1	7.94	30	303
Hesperentin Class 6	1	89	1	7.94	30	303

Morin Class 6	1	229.2	1	7.83	30	303
Morin Class 6	1	153	1	7.83	30	303
Morin Class 6	1	137	1	7.83	30	303
Morin Class 6	1	89	1	7.83	30	303
Myricetin Class 7	1	245	1	7.39	30	319
Myricetin Class 7	1	217	1	7.39	30	319
Myricetin Class 7	1	164.8	1	7.39	30	319
Myricetin Class 7	1	153	1	7.39	30	319
Naringenin Class 8	1	153	1	8.54	30	273
Naringenin Class 8	1	147	1	8.54	30	273
Naringenin Class 8	1	119	1	8.54	30	273
Naringenin Class 8	1	91	1	8.54	30	273

Table S4: Intensities of the characterized flavonoids in the non-target analysis for each genotypes and treatment used as input in the MetaboAnalyst platform.

Name	105 AP T1A1	105 AP T1A2	105 AP T1B1	105 AP T1B2	105 AP T2A1	105 AP T2A2	105 AP T2B1	105 AP T2B2	IAC 17 T1A1	IAC 17 T1A2	IAC 17 T1B1	IAC 17 T1B2	IAC 17 T2A1	IAC 17 T2A2	IAC 17 T2B1	IAC 17 T2B2
sample	105AP T1	105AP T1	105AP T1	105AP T1	105AP T2	105AP T2	105AP T2	105AP T2	IAC17 T1	IAC17 T1	IAC17 T1	IAC17 T1	IAC17 T2	IAC17 T2	IAC17 T2	IAC17 T2
Dadzein-4.5	496	551	623	557	651	484	555	530	523	399	563	766	300	243	332	252
Daidzein-5.6	2787	1717	2761	2422	5703	5392	5457	5278	2505	2490	2616	2853	4194	2957	4559	3366
Daidzein-6.2	20122	15102	21479	18901	14600	46593	36856	49377	3619	5431	5006	5970	4826	6310	4648	5457
Daidzein-6.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3619	5431	5006	5970	4826	6310	4648	5457
Daidzein-7.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	829	980	1090	1090	1561	2075	1650	2010
Genistein-5.3	1819	1523	2315	1886	1703	1566	1632	1627	443	551	573	726	480	622	538	581
Genistein-6.4	1728	1295	2435	1819	1822	1431	1631	1640	377	495	720	1287	2188	1324	2526	2000
Genistein-6.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	912	1292	1029	885	4219	1324	3880	1400
Apigenin-6.7	17864	16684	22950	19166	16198	18951	18240	19571	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Genistein-7.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	29880	16832	22156	19756	40287	45754	43452	46134
Apigenin-7.2	101020	90390	120153	103854	168844	155626	162243	162260	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Genistein-8.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1387	1994	1962	2505	1712	7183	1928	3168
Apigenin-8.6	6659	22361	8706	12575	3436	5818	4807	5167	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Quercetin-5.2	1694	287	2156	1379	1627	1728	1713	1784	32854	30800	33179	35884	19518	19578	20206	19991
Quercetin-6.2	164	168	201	177	155	186	182	205	24196	23152	24904	27364	17008	17668	17555	17948
Quercetin-5.5	386	271	432	363	372	321	364	401	4410	4606	4614	4826	2323	2346	2291	1868
Quercetin-7.1	492	243	581	383	142	121	131	131	295	450	302	614	172	244	117	196
Quercetin-7.6	33	58	34	42	144	178	161	161	60	25	41	38	305	278	339	373
Kaempferol-5.6	452751	415116	506208	458025	416431	426100	429746	446709	228314	235439	236761	246531	214238	219520	210521	224124

Kaempferol-5.9	186514	172484	198907	185968	140366	139823	142218	146466	138892	151602	151880	165146	166228	176144	163839	175537
Kaempferol-6.2	6769	6991	6897	5868	12648	8371	13311	8932	1357	1579	2396	985	7804	8527	10638	12009
Kaempferol-6.7	105675	109251	111831	108919	73266	90019	85184	92268	120691	156742	146156	161037	121875	137677	105497	118648
Kaempferol-7.9	1669	1834	1942	1815	1851	515	1997	3626	11590	14752	14745	17894	13005	13966	15878	18093
Rutin	805	945	799	849	701	923	840	895	156558	168880	168758	180836	109076	118272	110006	112806
Naringin	10	24	44	26	15	23	20	21	82	70	64	41	37	23	13	31
Luteolin	1274	664	463	800	436	328	283	384	17428	21924	22522	28214	11844	15458	16612	19649
Naringenin	546	710	519	591	331	1779	1248	1636	299	384	364	410	960	1229	823	977
Kaempferol	1313	1359	685	1119	1067	1720	1459	1591	305	372	370	434	677	1139	952	1388
Daidzein	42	41	11	31	35	13	21	14	23	25	26	31	48	56	50	39
Quercetin	185	57	104	115	266	78	125	30	97	116	101	89	76	113	69	71
Genistein	9476	15396	9453	11441	6208	9073	7860	8299	2286	3344	3269	4177	3158	11336	3674	5195
Apigenin	9266	14883	9309	11152	6155	9073	7842	8299	2286	3344	3269	4177	3158	11336	3674	5253

Table S5: Results of the statistical analysis by ANOVA using the MetaboAnalyst platform.

Compound	f.value	p.value	-log10(p)	FDR	Fisher's LSD
Rutin	19929	1.9151e-22	21718	5.3622e-21	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Quercetin-6.2	1162.5	4.7613e-15	14322	6.6658e-14	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Apigenin-6.7	686.92	1.1014e-13	12958	8.4937e-13	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2
Quercetin-5.2	675.86	1.2134e-13	12916	8.4937e-13	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Apigenin-7.2	642.11	1.6467e-13	12783	8.5344e-13	105AP T2 - 105AP T1; 105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2
Quercetin-5.5	620.36	2.0222e-13	12694	8.5344e-13	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Luteolin-5.6	614.8	2.1336e-13	12671	8.5344e-13	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2
Daidzein-7.6	339.69	7.2514e-12	11.14	2.538e-11	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Luteolin-5.9	248.12	4.6454e-11	10333	1.4452e-10	105AP T1 - 105AP T2; 105AP T1 - IAC17 T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Daidzein-6.5	189.63	2.2589e-10	9.6461	6.3248e-10	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Genistein-7.2	158.43	6.4705e-10	9.1891	1.647e-09	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Quercetin-7.6	112.85	4.6483e-09	8.3327	1.0846e-08	105AP T2 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; 105AP T2 - IAC17 T1; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Luteolin-7.9	104.14	7.391e-09	8.1313	1.5431e-08	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2
Genistein-5.3	102.5	8.0987e-09	8.0916	1.5431e-08	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2
Luteolin	102.14	8.2664e-09	8.0827	1.5431e-08	IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Luteolin-6.7	56145	2.4641e-07	6.6083	4.3122e-07	105AP T1 - 105AP T2; IAC17 T1 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Daidzein-5.6	22485	3.2472e-05	4.4885	5.3483e-05	105AP T2 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Daidzein-6.2	15177	0.00021882	3.6599	0.00034038	105AP T2 - 105AP T1; 105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T2
Kaempferol	11648	0.00072288	3.1409	0.0010653	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T1; IAC17 T2 - IAC17 T1

Apigenin-8.6	9.5239	0.0016958	2.7706	0.0023333	105AP T1 - 105AP T2; 105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2
Quercetin-7.1	10.034	0.0013667	2.8643	0.0019816	105AP T1 - 105AP T2; 105AP T1 - IAC17 T2; IAC17 T1 - 105AP T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Genistein-6.7	9.4512	0.00175	2757	0.0023333	IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Genistein-6.4	9.2083	0.0019459	2.7109	0.0024767	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T2 - IAC17 T1; IAC17 T2 - 105AP T2; IAC17 T2 - IAC17 T1
Genistein-8.6	7.8813	0.0036001	2.4437	0.0043827	IAC17 T2 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T2
Kaempferol-6.2	23.44	2.6323E-5	4.5797	4.6452E-5	105AP T2 - 105AP T1; 105AP T1 - IAC17 T1; IAC17 T2 - 105AP T1; 105AP T2 - IAC17 T1; IAC17 T2 - IAC17 T1
Dadzein-4.5	6.89	0.0059582	2.2249	0.0069513	105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T2; IAC17 T1 - IAC17 T2
Naringenin	6.6865	0.0066429	2.1776	0.00744	105AP T2 - 105AP T1; IAC17 T2 - 105AP T1; 105AP T2 - IAC17 T1; IAC17 T2 - IAC17 T1
Genistein	5.6616	0.011853	1.9262	0.012765	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1
Apigenin	5.4642	0.013337	1.8749	0.013831	105AP T1 - IAC17 T1; 105AP T1 - IAC17 T2; 105AP T2 - IAC17 T1

CONCLUSÕES GERAIS

O genótipo de soja que mostrou ser mais eficiente contra a *A. gemmatalis* foi o IAC 17. Essa variedade afeta o desenvolvimento do inseto dimiu e pode levar até a morte dele.

Os níveis fito-hormonais do AS nas plantas resistentes são maiores do que são nas plantas susceptíveis, ao contrário do AJ onde os maiores níveis são encontrados nas plantas susceptíveis, o que indica que nem todas as respostas de defesa encontram-se associadas ao AJ.

Existem mudanças no metaboloma das plantas quando são expostas à herbivoria por *A. gemmatalis*, de forma que alguns dos compostos de defesa mudam ao longo do tempo e na presença da lagarta especialmente nas plantas resistentes. Essas plantas mostraram maiores níveis de metabólitos relacionados com toxicidade aos insetos ao comparar com as susceptíveis, mas nem sempre foram na presença da lagarta.

Se identificaram proteínas envolvidas com processos de fotossíntese e metabolismo primário quando as variedades de soja foram expostas às lagartas, o que concorda com o resultado obtido na metabólomica onde se evidenciaram diferenças no metabolismo primário entre os genótipos estudados.

Os extratos metanólicos das folhas de soja tem efeito negativo na sobrevivência e foram nocivos para o intestino do inseto, como se evidenciou nas análises histológicas. Portanto, se evidencia a presença de compostos bioativos dependentes da dose, tanto nas variedades suscetíveis quanto nas resistentes, muitas vezes produzidos de forma constitutiva. Alguns dos exemplos de flavonoides glicoconjugados, já descritos, com efeito tóxico nos insetos, são os flavonoides com aglicone da classe Quercetina, daidzeína e kaempferol, os quais tiveram maiores níveis no genótipo “IAC 17”