

EDUARDO GÓES CORDEIRO

**RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO ATAQUE DO PERCEVEJO
MARROM *Euschistus heros* (F.) E INJÚRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2011

EDUARDO GÓES CORDEIRO

**RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO ATAQUE DO PERCEVEJO
MARROM *Euschistus heros* (F.) E INJÚRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em 01 de junho de 2011.

Raul Narciso Carvalho Guedes
(Coorientador)

Anderson Martins Pilon
(Coorientador)

Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli

Camila Rocha da Silva

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Maria do Carmo e Élio, ao meu irmão Érick e ao meu filho Francisco.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Maria Goreti pela orientação e a oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa.

Ao professor Raul pela co-orientação, supervisão, conselhos e a ajuda em diversas situações.

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Alberto, Isabela, Danúbia, Vagner, Hudson, Hipólito, Lucas, Ronnie, Júlio, Natália Leite, Katherine Girón e Nelsa.

Aos amigos do laboratório de Enzimologia: Camila, Anderson, Fabrício, Franciny e Eduardo.

Aos amigos: Felipe de Lemos, Vinícius Ferreira, Elaine Ferrari, Rodrigo Amaral, Pedro Togni, Lívia, André, Evandro de Lara, Rodrigo Lima, Rodrigo Carvalho, Davi Feital, Tomás, Augusto, Samuel, Silvia Menezes, Daniel Albeny, Juliana Noveli, Natallia, Daniela Duarte, Pedro Reis, Niltom, João Francisco, Renato Zocal, Antonio, Cassiano Rosa, Camila Moreira, Aline Pedrosa e Tate Lana.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS	16
3.1. Extrato de grãos	16
3.1.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	16
3.1.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias	23
3.2. Extrato de vagens.....	25
3.2.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	25
3.2.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias	35
3.3. Extrato de folhas	37
3.3.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	37
3.3.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias s.....	40
4. DISCUSSÃO	45
4.1. Extrato de grãos	45
4.1.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	45
4.1.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias	47
4.2. Extrato de vagens.....	48
4.2.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	48
4.2.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias	49
4.3. Extrato de folhas	49

4.3.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo	49
4.3.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

CORDEIRO, Eduardo Góes Cordeiro. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2011. **Resposta de plantas de soja ao ataque do percevejo marrom *Euschistus heros* (F.) e injúrias.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Angelo Pallini Filho.

As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxireductase, EC 1.13.11.12) catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema cis, cis -1,4- pentadieno dos ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes. Estes hidroperóxidos estão envolvidos em reações enzimáticas que tem como produto aldeídos e cetonas, que são liberados e causam o “*beany flavor*” nos produtos de soja. Os produtos dessas enzimas participam também dos primeiros passos da rota de síntese do ácido jasmônico e ácido traumático, importantes sinalizadores sistêmicos de injúrias nas plantas, induzindo a síntese de compostos de defesa, como exemplo, os inibidores de proteases após injúrias e provocadas pela alimentação insetos herbívoros. O efeito da eliminação genética das lipoxigenases feita em plantas de soja, com o objetivo de reduzir o “*beany flavor*”, foi verificado na indução de defesa quando a planta é infestada com o herbívoro *E. heros* ou injuriada artificialmente através da comparação plantas normais. A atividade enzimática do “pool” de lipoxigenase e níveis de inibidores de protease foram determinados após 8 horas, no controle sem injúria e após injúrias nos grãos e nas folhas e infestadas com o percevejo marrom da soja *E. heros*. Foi também verificada a atividade de lipoxigenases e os níveis de inibidores de proteases em função do tempo no, genótipo regular para presença da enzima nos grãos. Os resultados desse trabalho sugerem que a ausência de lipoxigenases nos grãos afeta a indução de defesas nas plantas quando esta sofre injúrias e quando infestadas com o herbívoro. A diferença é ainda maior quando a resposta foi medida no local de ocorrência da injúria. As plantas de soja normais para presença das enzimas nas sementes responderam aos tratamentos

de injúrias e infestação com *E. heros* com redução do “pool” de lipoxigenases e aumento nos níveis de inibidores de proteases no local onde foram aplicados os tratamentos.

ABSTRACT

CORDEIRO, Eduardo Góes Cordeiro. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June 2011. **Response of soybean to brown stink bug *Euschistus heros* (F.) and injuries.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Angelo Pallini Filho.

The lipoxygenases (linoleate: oxygen oxidoreductases, EC 1.13.11.12) catalyze the addition of molecular oxygen to pentadiene of polyunsaturated fatty acids, forming hydroperoxides of related fatty acids. These hydroperoxides are involved in enzymatic reactions producing aldehydes (hexanal and nonenal) and ketones, which are released and cause the beany flavor in soy products. The products of these enzymes may also participate in the first steps of the jasmonic acid and traumatic acid pathway, eliciting response to systemic plant injury by inducing the synthesis of defense compounds such as protease inhibitors after injuries caused by artificial feeding herbivorous insects. The effect of genetic elimination of lipoxygenases made in soybean plants, aiming to reduce the beany flavor, was found in the induction of defense when the plant is infested with the herbivore *E. heros* or artificially injured by comparing normal plants. The enzyme activity of lipoxygenase and levels of protease inhibitors was measured after 8 hours in the control and without injury after treatment with artificial injuries in the pods and leaves and infested with brown stink bug, soybean *E. heros*. It was also verified the lipoxygenase activity and levels of protease inhibitors as a function of time in cultivating normal for the enzyme in the grains. The results of the study suggest that the absence of lipoxygenase in the grains affects the induction of defenses in plants when it suffers injuries and artificial when infested with the herbivore. The difference is even greater when the response was measured at the site of occurrence of injury. The normal soybean plants for the presence of enzymes in seeds responded to treatments for injuries

and infestation with *E. heros* with a reduced pool of lipoxygenase and increased levels of protease inhibitors on the site where the treatments were applied.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, como organismos sésseis, necessitam de estratégias para permanecer no ambiente repleto de organismos fitófagos, como insetos e microrganismos patogênicos. Tais organismos utilizam a planta como recurso, por meio de estratégias específicas de ataque (Van der Putten *et al.*, 2001; Pieterse e Dick, 2007). Por estes, entre outros estresses presente no ambiente, foram selecionadas plantas, durante a evolução, com mecanismos de defesa com ampla capacidade de reconhecer e agir contra os diferentes organismos maléficos. Estes provocam injúrias de diversas formas, aplicando ou injetando compostos desencadeadores, o que possibilita o reconhecimento e diferenciação de estresses bióticos e abióticos (Maffei *et al.*, 2007; Koornneef e Pieterse, 2008).

Trabalhos sobre a interação entre herbívoros e patógenos com suas plantas hospedeiras mostram que o evento desencadeador do maquinário bioquímico de defesa acontece após os danos provocados pela alimentação de herbívoros ou pela infecção do patógeno (Howe e Jander, 2008; Chen, 2008). O rompimento da membrana lipídica das células vegetais, barreira física primária da planta, ativa reações em cascata que terminam com a síntese de um composto que pode atuar como parte do mecanismo de defesa direta da planta contra fitófagos (Karban *et al.*, 1997; Kessler e Baldwin, 2001; Chen, 2008).

A membrana lipídica de células vegetais é rica em ácidos graxos como o ácido linoléico e linolênico (Maffei *et al.*, 2007). Estes ácidos graxos poliinsaturados servem como substratos para as lipoxigenases (LOX), uma classe de enzimas responsáveis pelos primeiros passos do mecanismo que leva a síntese de compostos de defesa direta

(Figura 1), como inibidores de proteases (IP) (Feussner e Wasternack, 2002; Liavonchanka e Feusser, 2006; Maffei *et al.*, 2007).

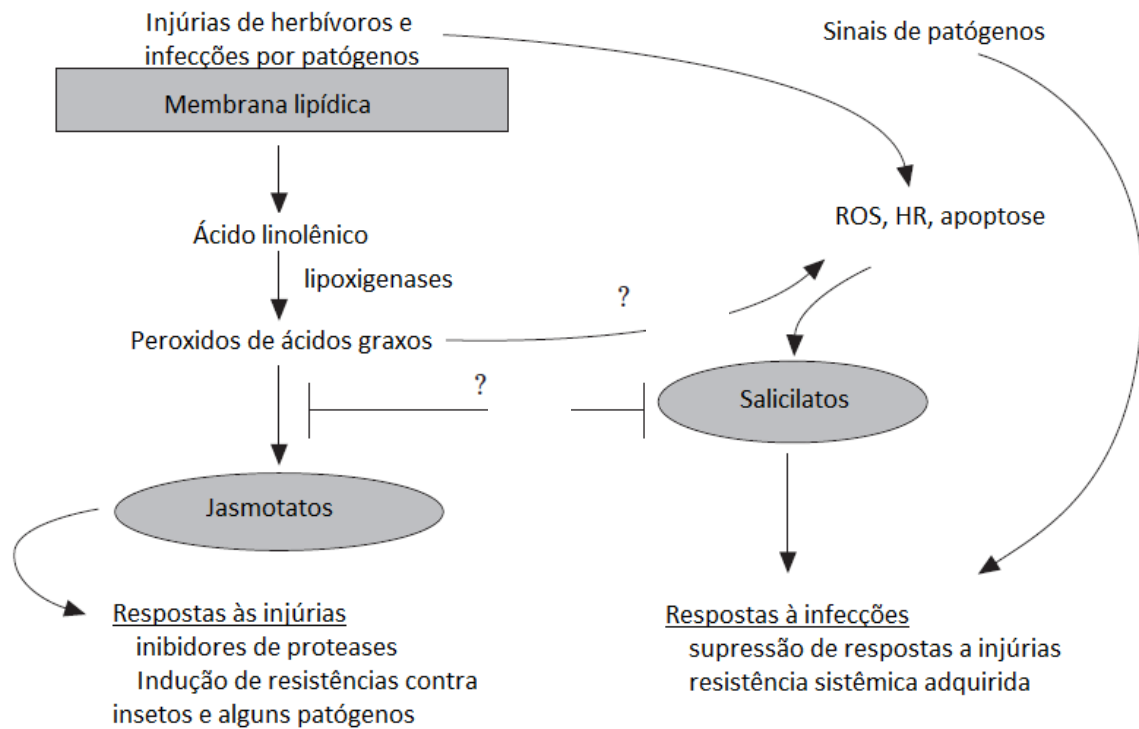


Figura 1: Modelo para a geração de sinais provocados pela alimentação de herbívoros e infecções por patógenos (Fidantsef *et al.*, 1999).

O mecanismo enzimático das lipoxigenases é amplamente estudado nas plantas (Siedow, 1991; Feussner e Wasternack, 2002; Liavonchanka e Feussner, 2006; Andreu e Feussner, 2009 e Gigot *et al.*, 2010). Estas enzimas atuam em muitos processos fisiológicos como crescimento, desenvolvimento, maturação e senescência da planta, além de estarem relacionadas com respostas metabólicas ao ataque de insetos e patógenos (Siedow, 1991; Blée, 1998; Gardner e Deighton, 2001 e Porta e Rocha-Sosa, 2002) e na produção de compostos voláteis responsáveis pelo “*beany-flavor*” em soja armazenada e nos produtos da soja (Iassonova *et al.*, 2009). As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxireductase, EC 1.13.11.12) catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema cis, cis -1,4- pentadieno dos ácidos graxos poliinsaturados, formando

hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes. (Siedow, 1991; Porta e Rocha-Sosa, 2002; Feussner e Wasternack, 2002). A adição da molécula de oxigênio ocorre especificamente no carbono -9 ou -13 da cadeia de hidrocarbonetos (Figura 2). De acordo com a posição em que a oxigenação ocorre, os hidroperóxidos formados podem seguir duas rotas diferentes, hidroperóxido liase e ciclase, dependendo do tipo de injúria sofrido pela planta. É sugerido que herbívoros mastigadores e patógenos necrotróficos são mais sensíveis às respostas mediadas pelo ácido jasmônico (AJ), responsável pela sinalização da injúria e indução de compostos de defesas como inibidores de proteases. Em contraste, infecções por patógenos biotróficos e insetos sugadores são suprimidos pelas defesas relacionadas com ácido salicílico (AS), que desencadeia reações de hipersensibilidade, levando o tecido afetado à morte (Farmer e Ryan, 1992; e Kessler e Baldwin, 2002).

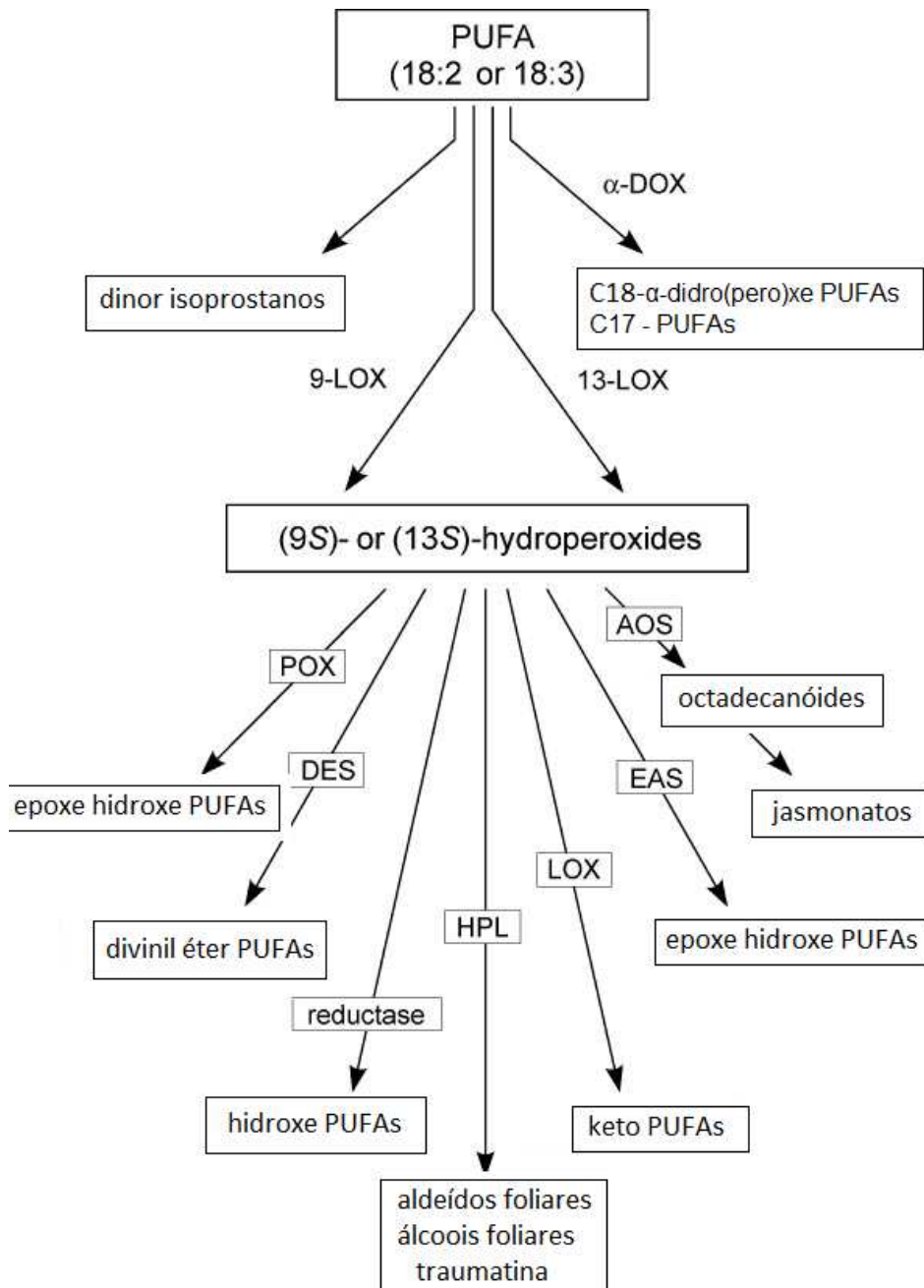


Figura 2: Modelo proposto para o metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados, levando à formação de hidróxidos dos ácidos graxos correspondentes a ação de 9-LOX e 13-LOX em plantas – pela via das lipoxigenases. AOS, aleno oxido sintase; DES, divinil éter sintase; α -DOX, α -dioxigenase; EAS, epoxe álcool sintase; HPL, hidroxeperoxido liase; LOX, lipoxigenase, POX, peroxigenase; PUFAs, ácidos graxos poliinsaturados (Feussner e Wasternack, 2002).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é amplamente utilizada na alimentação animal e humana como fonte de óleo e proteína de alta qualidade (Harada e Xia, 2004). Contudo, devido ao “*beany flavor*”, há uma baixa aceitação comercial no uso da proteína de soja para uso na alimentação humana. Desta forma, uma estratégia para melhorar a qualidade dos produtos de soja para a utilização como fonte de proteínas para o consumo humano é a eliminação genética das três isoenzimas de lipoxigenases responsáveis pelo “*beany flavor*”. Estudos recentes mostram que essa eliminação das lipoxigenases provavelmente não altera as características agrônômicas das plantas, como altura da planta, número de vagens e grãos (Martins *et al.*, 2002), tornando-se desta forma uma alternativa real para a sua produção e comercialização.

As estratégias de defesas induzidas das plantas são classificadas em duas categorias: defesas diretas e indiretas. As defesas diretas são aquelas em que a resposta de defesa por si mesma atua no parasita, como substâncias antinutritivas, tóxicas e antidigestiva. Essas substâncias afetam o comportamento, crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (Ryan, 1990; Kessler e Baldwin, 2002; Chen 2008). Defesas indiretas são aquelas em que a resposta de defesa não atua diretamente no causador das injúrias, mas funciona como atrativo para outros organismos, principalmente insetos carnívoros e parasitóides, através de compostos orgânicos voláteis que são sintetizados e liberados para atrair inimigos naturais dos herbívoros. Estes vão exercer controle da população de pragas, aumentando consideravelmente a amplitude da estratégia (Chen, 2008; Kessler e Baldwin, 2002).

A soja é alvo de herbívoros durante todo o seu desenvolvimento, desde sua semeadura (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999). Uma das pragas principais e mais abundantes encontradas no Brasil é o percevejo marrom da soja *Euschistus heros*

(Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). Esses herbívoros se alimentam de folhas e grãos de soja, provocando murcha e má formação das vagens (Panizzi e Oliveira, 1998; Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999; e Lourenção *et al.*, 2010).

O fato do silenciamento de genes que expressam lipoxigenases, no grão, para possibilitar a comercialização dos produtos de soja, deixa uma questão em aberto: qual o efeito dessa eliminação na interação entre a soja e seus herbívoros?

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar se a ausência de lipoxigenases no grão afeta a indução e síntese de compostos de defesa direta, como inibidores de proteases, em respostas à infestação do percevejo *E. heros* e a injúrias nos grãos e folhas de soja usando-se dois genótipos desta, um com supressão de lipoxigenases, e outro regular, sem esta supressão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Dois cultivares de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] foram conduzidos até o estágio R5 (estádio reprodutivo 5), momento em que ocorre o enchimento das vagens nas plantas, e momento adequado para a realização dos testes devido ao hábito alimentar de *E. heros*. O genótipo triplo nulo para a ausência de lipoxigenase TN 105 AP e o cultivar regular para as mesmas enzimas 053032 PTA 2 + 6 foram às variedades utilizadas.

Esses genótipos foram obtidos por uma série de cinco retrocruzamentos com a variedade CAC-1, como progenitor recorrente uma linhagem triplo nulo (sem as três lipoxigenases), obtida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, como progenitor doador para ausência das enzimas lipoxigenases; e uma linhagem desenvolvida pela EMBRAPA - Soja, denominada BRM 92 5262, como

doador do gene que confere ausência do inibidor de protease. No final do processo de retrocruzamentos, foram obtidos genótipos com ausência de lipoxigenases. Esses genótipos foram entrecruzados e autofecundados para se produzir um novo genótipo com ausência das três enzimas lipoxigenases. As sementes desses genótipos encontravam-se na geração F₃ quando foram plantadas.

2.2. Plantio da soja

As plantas utilizadas nos experimentos foram cultivadas em casa de vegetação localizadas na Universidade Federal de Viçosa. A semeadura foi realizada em vasos com capacidade para 4,0 Kg de solo, contendo duas sementes por vaso. O substrato utilizado foi composto por uma fração de 3:1 de solo e esterco bovino, respectivamente. A irrigação foi realizada diariamente de acordo com a necessidade. O desbaste de uma das plantas foi feito no estágio V3 de desenvolvimento, para manter apenas uma planta por vaso. Os tratamentos foram aplicados no estágio R5, que compreende a terceira semana após a antese, durante a formação das sementes ou enchimento dos grãos (Câmara, 1998).

2.3. Criação de *Euschistus heros*

A metodologia de criação do percevejo *E. heros* seguiu a metodologia descrita por Borges *et al.*, (2006). Os ovos de *E. heros* foram adquiridos na EMBRAPA Cenargen para iniciar a criação na Universidade Federal de Viçosa. Foi administrada aos insetos uma dieta natural composta de amendoim cru (*Arachis hypogaea*), grão seco de soja [*Glycine max* (L.) Merrill.], semente de girassol [*Helianthus annuus* (L.)] e vagem de feijão [*Phaseolus vulgaris* (L.)], em diferentes proporções e quantidades, dependendo do instar do inseto, como se segue.

Os ovos foram obtidos foram colocados em placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro com metade de uma vagem de feijão. Após a eclosão dos ovos, os percevejos imaturos permaneceram alimentando-se de vagem de feijão até atingir o segundo instar, onde a alimentação foi enriquecida com um grão de soja, um de amendoim e um de girassol. Quando os imaturos atingiram o 4º instar, estes foram transferidos para gaiolas plásticas para completar o desenvolvimento até a fase adulta. Após dez dias os adultos iniciam a fase reprodutiva, que pode durar até dois meses.

As gaiolas dos insetos adultos foram feitas com recipientes plásticas de 8 litros com o fundo forrado com papel-filtro e com orifícios cobertos com organza na tampa para permitir o arejamento. Na borda de cada tampa foi depositada uma camada de vaselina para impedir a fuga de insetos durante o manuseio. Os grãos de soja, amendoim e girassol foram colados em cartelas de papel (15 cm x 15 cm) com cola branca não tóxica. Duas cartelas com os grãos na proporção 1:1:1 e dois cachos com vagem de feijão (cinco vagens) foram fixadas nas paredes da gaiola e oferecidas *ad libitum*. A fixação era feita através de ganchos confeccionados com cliques número 2. Um pote com água e algodão foi colocado no fundo da gaiola para manter a umidade e como fonte de água. Ovos foram coletados a cada dois dias, retomando os procedimentos iniciais.

Os insetos foram mantidos em condições de temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo de 12 h e umidade ($\pm 80\%$) controlada em sala climatizada. A criação permaneceu no setor de Entomologia do Departamento de Biologia Animal, na sala de criações do laboratório de Ecotoxicologia.

A limpeza e troca da alimentação das placas e gaiolas foram feita duas vezes por semana. Para o experimento, foram usadas duas ninfas de quarto instar, que

permaneceram sem alimentação durante as 24 horas que antecederam o início do experimento.

2.4. Ensaio em casa de vegetação

Para a determinação das respostas das plantas de soja ao ataque do herbívoro *E. heros* e a injúrias nos grãos e nas folhas, foi realizado um experimento em casa de vegetação seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi estabelecido na forma de um fatorial 2x4x3, onde o primeiro fator foi o genótipo de soja (com supressão ou sem supressão de lipoxigenase nas sementes), o segundo fator foi o tipo de injúria na planta (infestação com o herbívoro *E. heros*, injúria nos grãos, injúria mecânica nas folhas, e controle sem injúria) e o terceiro fator foi o órgão vegetal coletado para análises (folha, vagem e grão). As amostras de cada tratamento foram coletadas 0, 8, e 24 horas após injúrias, de acordo com estudos recentes sobre indução de defesa em soja com ausência de lipoxigenases nos grãos (Fortunato *et al.* 2007). As amostras foram independentes para cada tratamento e período de tempo. Três repetições foram utilizadas para cada tratamento.

O experimento contou com as seguintes injúrias feitas nos dois genótipos, como se segue: a - duas ninfas de quarto instar foram isoladas nas vagens do 5° nó da planta utilizando sacos feitos de tecido organza; b - cinco perfurações foram feitas em todas as vagens com o auxílio de um alfinete entomológico; c - cinco perfurações foram feitas em cada folíolo com auxílio de um alfinete entomológico; e d - controle sem injúria. Figura 3, a, b, c e d, respectivamente.

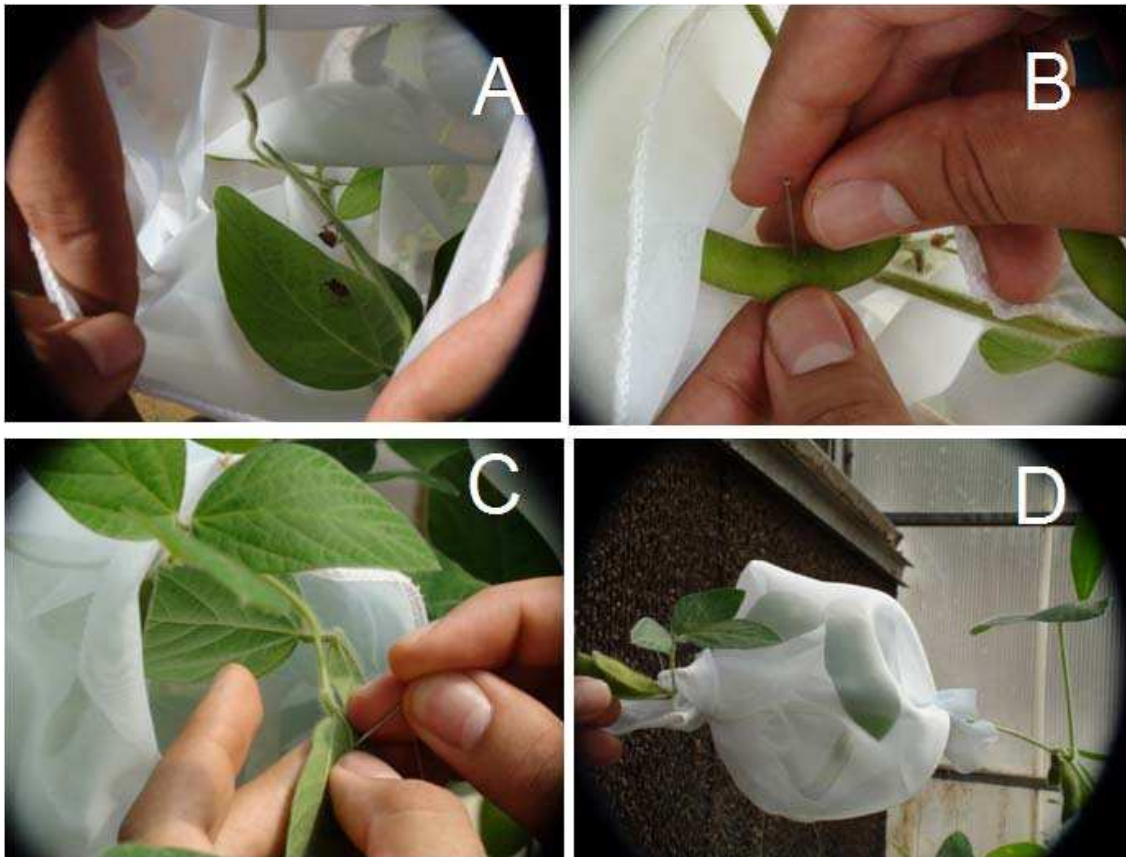


Figura 3: Tratamentos aplicados às plantas de soja. A, representa as injúrias provocadas por *E. heros*; B, injúrias provocada nos grãos; C, injúrias feita nas folhas; e D, ilustração do confinamento de *E. heros* na planta.

2.5. Coleta das amostras

As amostras (vagem, grão e folha) utilizadas para as posteriores análises enzimáticas e de IP foram coletadas 0, 8 e 24 horas após o início do experimento. A amostra de folhas foi composta pelos trifólios presentes no quinto nó da planta, assim como as vagens. As amostras foram armazenadas em envelopes de papel alumínio e congeladas imediatamente após a coleta com nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -80°C para análises posteriores, como descrito no item 2.7.

2.6. Obtenções dos extratos enzimáticos de grão, vagem e folha

Os grãos foram separados das vagens com o auxílio de um estilete durante a coleta das amostras. O extrato bruto foi preparado a 4°C, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 de acordo com o método de Ohta *et al.*, (1986).

Foi pesado 300 mg do material (grão, vagem ou folha), congelado em nitrogênio líquido e macerado em almofariz. O pó obtido foi resuspendido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v), e, em seguida, filtrado com o auxílio de uma seringa e gaze. O material foi centrifugado a 16.000 \times g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para todos os ensaios bioquímicos.

2.7. Ensaios bioquímicos

2.7.1. Atividade de lipoxigenases

A atividade de lipoxigenase foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se ácido linoléico como substrato e seguindo o método de Axelrod e Hamilton (1981). O aumento da absorbância no comprimento de onda de 234 nm foi determinado como resultado da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Preparou-se uma solução estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se como substrato o ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer de 50 mL envolvido por papel alumínio, para evitar a degradação, contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 μ L de ácido linoléico e 90 μ L de Tween 20 (SIGMA). A solução foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática de 1000 μ L para evitar a

formação de bolhas. O clareamento da solução foi feito adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel alumínio, e o volume foi aferido. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos eppendorf de 1,0 mL, envolvidos em papel-alumínio e armazenada a -20°C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, foi misturado em um tubo de ensaio 1,0 µL do extrato bruto e 4,0 µL da solução estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,5. A velocidade da reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por um período de 2,5 minutos. Sob as mesmas condições, procedeu-se com o branco, que constituiu da mesma quantidade de substrato e tampão. Os valores de absorbância obtidos foram usados para calcular as velocidades de formação dos produtos, expressas em V(M.s⁻¹), utilizando-se a seguinte equação:

$$V = \frac{A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

em que:

A_{234} = absorbância a 243 nm

ϵ = 25000 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm)

t = 2,5 minutos (tempo de análise)

l = 1 cm (caminho ótico)

Atividade específica é a atividade enzimática por miligrama de proteína. Assim, os valores de atividade específica foram obtidos dividindo-se os valores de atividade

pela concentração de proteínas e foram expressos em V(M.s⁻¹/mg). As análises foram feitas em triplicadas para cada uma das três repetições de cada tratamento.

2.7.2. Determinação de inibidores de proteases

A determinação de inibidores de proteases foi feita com base na inibição da atividade da tripsina, utilizando-se L-BApNA como substrato. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com o método de Kakade *et al.*, (1974). Foram utilizados os mesmos extratos brutos descritos no item 2.6. A presença de inibidores de proteases nos extratos obtidos a partir dos grãos, vagens e folhas foi determinada utilizando-se tripsina bovina como substrato.

A atividade trípica foi determinada através do seguinte procedimento analítico: Misturou-se em um tubo de ensaio 100 µL do extrato; 500 µL de tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50 µL de solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M foram adicionados em um tubo de ensaio de 5,0 mL. Para o controle da enzima foi adicionado, em outro tubo de ensaio, 600 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M. Essas misturas contidas em ambos os tubo foram incubados por cinco minutos, a 25°C. Após o tempo de incubação, 500 µL de cada mistura foi retirado e adicionado em outro tubo contendo 500 µL de solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas para cada uma das três repetições. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte reação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \cdot B}{C \cdot d} \cdot 1000 \cdot P$$

Em que:

A = absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 da amostra;

B = Diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL de proteína dos extratos;

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA dá uma leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (Kakade *et al.*, 1974).

2.8. Análises estatísticas

2.8.1. Reposta temporal dos genótipos de soja aos tratamentos

A resposta temporal aos tratamentos pelo genótipo regular e o triplo nulo foram analisadas separadamente. O motivo para a separação foi à perda do controle, sem injúria, no tempo 24 horas para o genótipo triplo nulo. Dessa forma, a análise da existência de indução de atividade de LOX e quantidade de tripsina inibida, no genótipo triplo nulo, foi feito em função do tempo 0 e 8 horas após a aplicação dos tratamentos. Por outro lado, a resposta temporal no genótipo regular foi analisado para o tempo 0, 8 e 24 horas. Para verificar a resposta de plantas dos dois genótipos avaliados foi feito uma análise de variância em fatorial (ANOVA) com dois fatores, sendo eles: tipo de injúria e tempo após a aplicação das injúrias. O primeiro é representado pelos níveis plantas de soja com injúrias provocadas por *E. heros*, injúrias mecânicas nas folhas, nos grãos e controle sem injúria. O segundo fator foi composto pelos períodos de tempo de duração do experimento após o início dos tratamentos, sendo os intervalos de 0, 8 e 24 horas para o genótipo regular e 0 e 8 horas para o triplo nulo. Identificada a existência de pelo

menos uma diferença entre duas médias, foi feita o teste de média Tukey HSD ($p < 0.05$). Utilizou-se o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

2.8.2. Correlação entre a atividade de LOX e quantidade de tripsina inibida

Foi feita a correlação entre a variável atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida, com o objetivo de verificar a existência de relação entre elas. O teste feito foi a Correlação de Pearson no software SigmaPlot 11.0.

2.8.3. Resposta dos genótipos de soja aos tipos de injúrias.

A análise das variáveis entre os dois genótipos de soja foi feito através de uma análise de variância em fatorial (ANOVA) com três fatores. O primeiro foi os genótipos de soja, regular e triplo nulo. O segundo fator foi o tipo de injúria, sendo compostas pelo controle (sem injúrias), plantas infestadas com *E. heros*, plantas com injúrias nos grãos e plantas tratadas com injúrias nas folhas. O terceiro fator foi o tempo após a aplicação dos tratamentos, que no genótipo regular, o tempo 24 horas foi retirado para que a comparação com o genótipo triplo nulo fosse possível. Identificada a existência de pelo menos uma diferença entre duas médias, foi feita o teste de média Tukey HSD ($p < 0.05$). Utilizou-se o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

3. RESULTADOS

3.1. Extratos de grão

3.1.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo

3.1.1.1. Genótipo regular

A ANOVA detectou diferença na média da atividade específica de LOX em função do tempo ($F_{2, 35}=59.408$; $p<0.001$, TABELA 1). A quantidade de tripsina inibida foi diferente significativamente para os fatores, tipo de injúria e tempo, bem como para a interação entre eles (respectivamente $F_{3, 35}=11.656$, $p<0.001$; e $F_{2, 35}=12.980$, $p<0.001$ e $F_{6, 35}=6.694<0.001$, TABELA 1).

TABELA 1: O resultado da ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida, em função dos fatores analisados e da interação entre eles, nos extratos obtidos a partir de grãos.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	p
injúria	3	0.425	0.737	11.656	<0.001
Tempo	2	59.408	<0.001	12.980	<0.001
injúria x tempo	6	1.741	0.155	6.694	<0.001
Residual	24				
Total	35				

Houve aumento significativo da atividade de LOX após 8 horas no controle, na plantas infestadas com *E. heros* e tratadas com injúrias nos grãos e nas folhas (respectivamente $p=0.003$, $p<0.001$, $p<0.001$ e $p<0.001$, teste Tukey HSD). Contudo, a atividade reduziu após 24 horas (respectivamente $p=0.385$, $p=0.011$, $p<0.001$, $p<0.001$, teste Tukey HSD). A atividade de LOX, 8 horas após a indução, nas plantas tratadas com injúrias nos grãos, foi maior que o em plantas sem injúrias ($p=0.029$, teste Tukey HSD, fig. 4). Porém, não foi diferente dos outros tratamentos ($p>0.05$, teste Tukey, HSD). Não houve diferença na atividade da enzima entre os tratamentos, após 24 de indução ($p>0.05$, teste Tukey HSD).

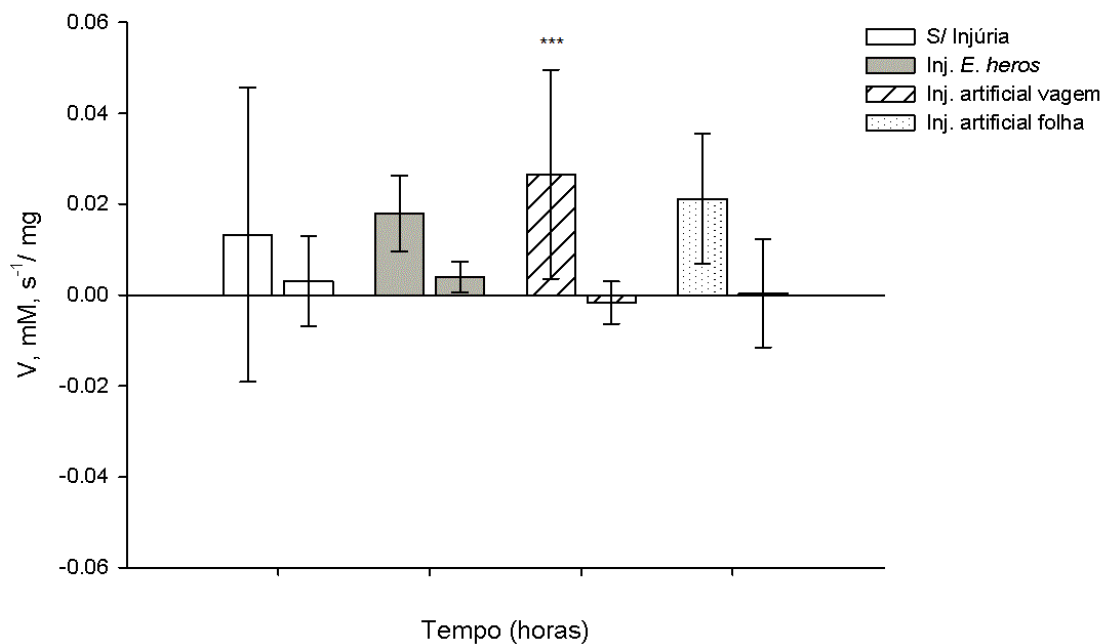


Figura 4. Atividade específica de LOX (V), em mM.s⁻¹/ mg, obtidas de extratos de grãos de soja do genótipo normal. O valor da atividade de LOX esta representado pela diferença da atividade 8 e 24 horas, após a indução, pela atividade obtida no tempo zero. A figura representa o aumento na atividade em plantas injuriadas artificialmente nos grãos, em relação ao controle, após 8 horas (***, p<0.001, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A quantidade de tripsina inibida não foi diferente, em função do tempo, no tratamento sem injúrias (p>0.05, teste Tukey HSD). Nos tratamentos em que as plantas foram infestadas com *E. heros* e com injúria nos grãos, houve redução significativa no tempo 24 horas em relação ao início, 0 horas (p<0.001, teste Tukey HSD). Plantas com injúrias nas folhas apresentaram aumento na quantidade de tripsina inibida 24 horas após aplicação das injúrias (p=0.031, teste Tukey HSD).

A quantidade de tripsina inibida nas plantas com injúrias nas folhas foram maiores do que o controle, sem injúrias, no tempo 8 e 24 horas (respectivamente $p=0.014$ e $p<0.001$ teste Tukey HSD, fig. 5). Também foi maior do que plantas infestadas com *E. heros* e com injúrias nos grãos, após 24 horas ($p<0.001$, teste Tukey HSD).

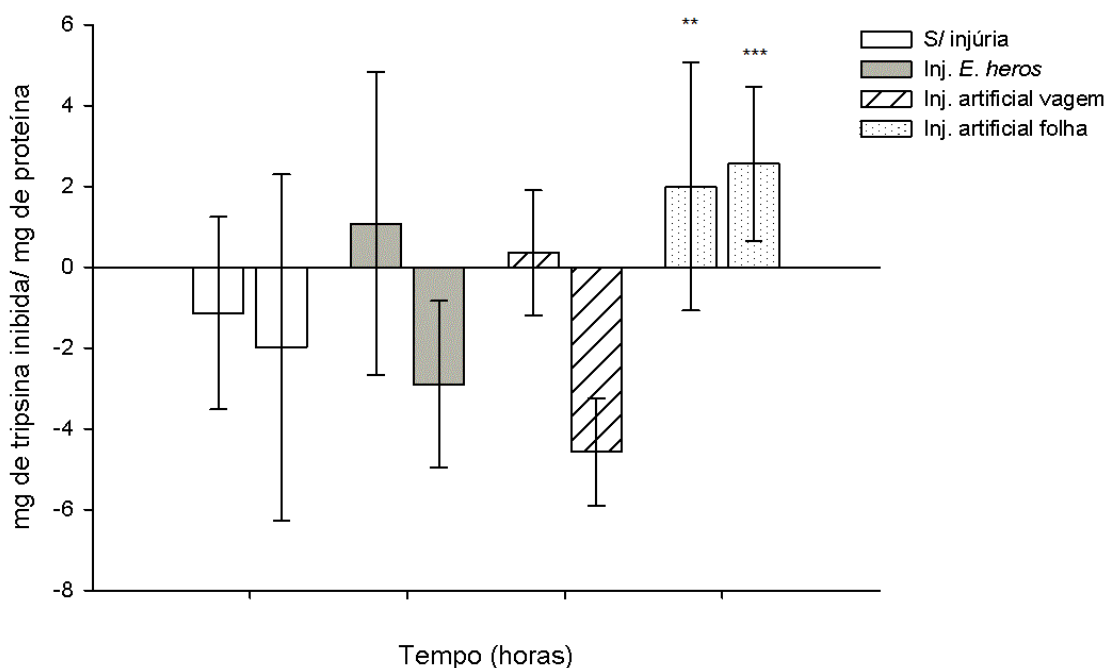


Figura 5. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de grãos de soja do genótipo normal. Os valores representados é o resultado da diferença entre a quantidade de tripsina inibida as 8 e 24 horas, após a indução, pela quantidade no tempo zero. A figura representa a diferença entre os tratamentos com injúrias nas folhas e sem injúrias (**, $p<0.01$ e ***, $p<0.001$). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A análise de correlação entre a atividade específica de LOX e a quantidade de tripsina inibida não foi significativa para nenhum dos pares testados (coeficiente de correlação=0.260; $p=0.126$) (dados não mostrados).

3.1.1.2. Genótipo triplo nulo

A ANOVA detectou diferença significativa na atividade específica de LOX em função do tempo ($F_{1,23}=74.836$; $p<0.001$, TAB. 2). O teste também detectou diferença significativa entre as médias de quantidade de tripsina inibida/ inibidores em função dos diferentes tratamentos, do tempo e da interação entre os dois fatores (respectivamente $F_{3,23}=11.605$, $p<0.001$; e $F_{1,23}=77.456$, $p<0.001$ e $F_{3,23}=11.605$, $p<0.001$, TABELA. 2).

TABELA 2: O resultado da ANOVA da atividade específica de lipoxigenase e quantidade de tripsina inibida por inibidores de proteases, para os fatores analisados e a interação entre eles nos extratos obtidos a partir de grãos do genótipo triplo

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	P	F	P
injúria	3	2.504	0.096	11.605	<0.001
tempo	1	74.836	<0.001	77.456	<0.001
injúria x tempo	3	2.504	0.096	11.605	<0.001
Residual	16				
Total	23				

A atividade específica de LOX aumentou, após 8 horas, no controle (sem injúrias), infestadas com *E. heros*, com injúrias nos grãos e nas folhas (respectivamente $p<0.001$, $p=0.029$, $p<0.001$ e $p=0.001$, teste Tukey HSD). A atividade de LOX, após 8 horas, nas plantas com *E. heros*, foi menor que a atividade de LOX de plantas sem injúrias ($p=0.008$, teste Tukey HSD, fig. 6). Não houve diferença entre os outros tratamentos ($p>0.05$, teste Tukey HSD).

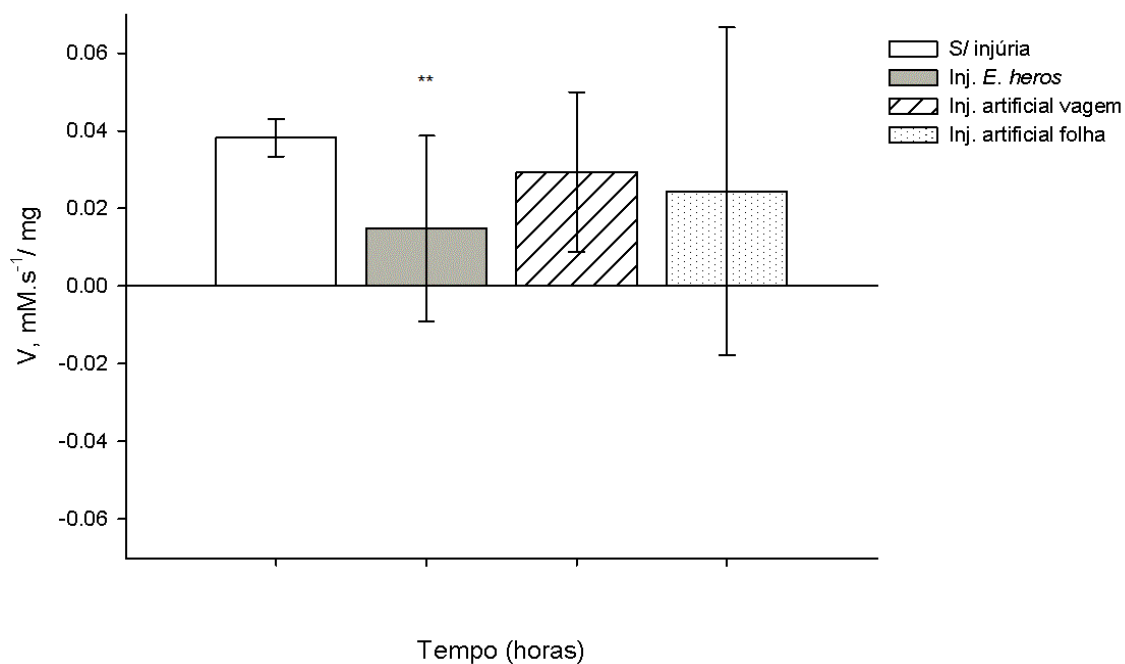


Figura 6. Atividade específica de LOX (V), em mM.s⁻¹/ mg, obtidas de extratos de grãos de soja do genótipo triplo nulo. O valor da atividade de LOX esta representado pela diferença da atividade após 8, pela atividade obtida no tempo zero. A figura representa a redução da atividade de LOX nas plantas com *E. heros*, significativamente diferente do controle, após 8 horas (**, p<0.01, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A quantidade de tripsina inibida aumentou significativamente, após 8 horas, nos extratos de plantas sem injúrias, tratadas com injúrias nos grãos e nas folhas (respectivamente p<0.001, p=0.007 e p<0.001, teste Tukey HSD). Entretanto, não houve aumento significativo nas plantas com *E. heros*.

Após 8 horas, a quantidade de tripsina inibida, nas plantas com *E. heros* e com injúrias nos grãos, foram menores do que em plantas sem injúrias, (respectivamente p<0.001 e p=0.003, teste Tukey HSD, fig. 7). Também foram menores que em plantas com injúrias nas folhas (respectivamente p<0.001 e p=0.008, teste tukey HSD). Contudo, a quantidade de tripsina inibida de plantas com *E. heros* foi significativamente

menor que em plantas com injúrias nos grãos ($p=0.044$, teste tukey HSD). Não houve diferença entre as quantidades de tripsina inibida nas plantas com injúrias nas folhas e sem injúrias ($p > 0.05$, teste Tukey HSD).

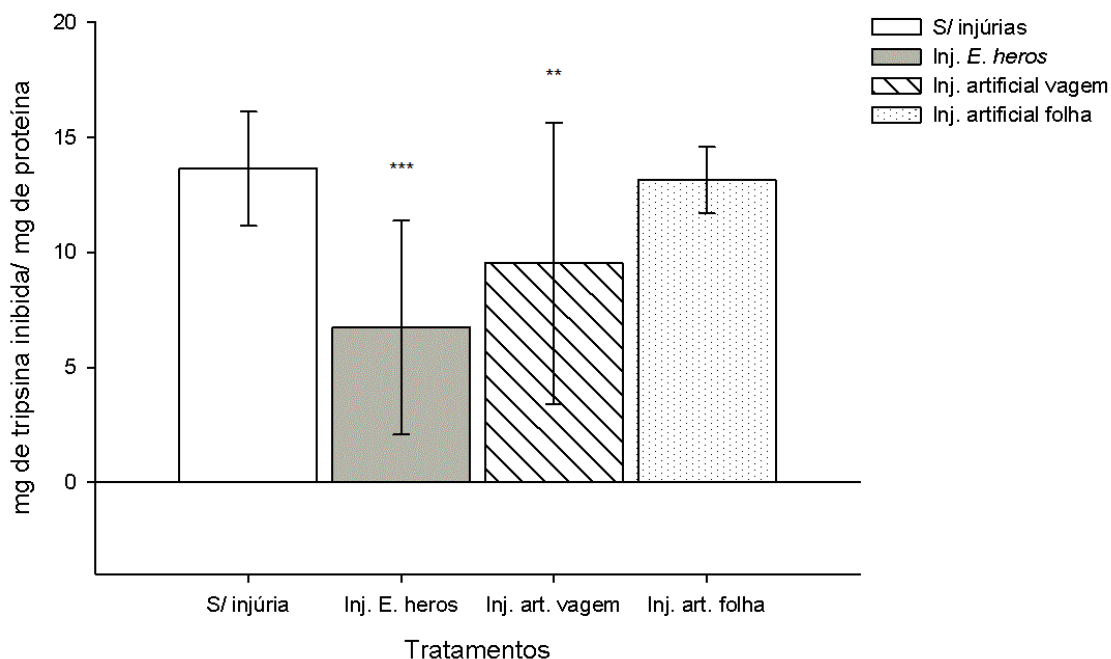


Figura 7. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de grãos de soja do genótipo triplo nulo. A quantidade de tripsina inibida representada, corresponde à diferença nas quantidades presentes no tempo 0 e 8 horas. A figura representa a diferença, na quantidade de tripsina inibida, entre as plantas sem injúrias e as plantas com *E. heros* e com injúrias nos grãos (**, $p<0.01$ e ***, $p<0.001$). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A análise de correlação entre a atividade específica de LOX e a quantidade de tripsina inibida no genótipo triplo nulo revelou que há correlação positiva entre a atividade da enzima e a quantidade de inibidor (coeficiente de correlação=0.824; $p<0.001$, Correlação de Pearson, Fig. 8).

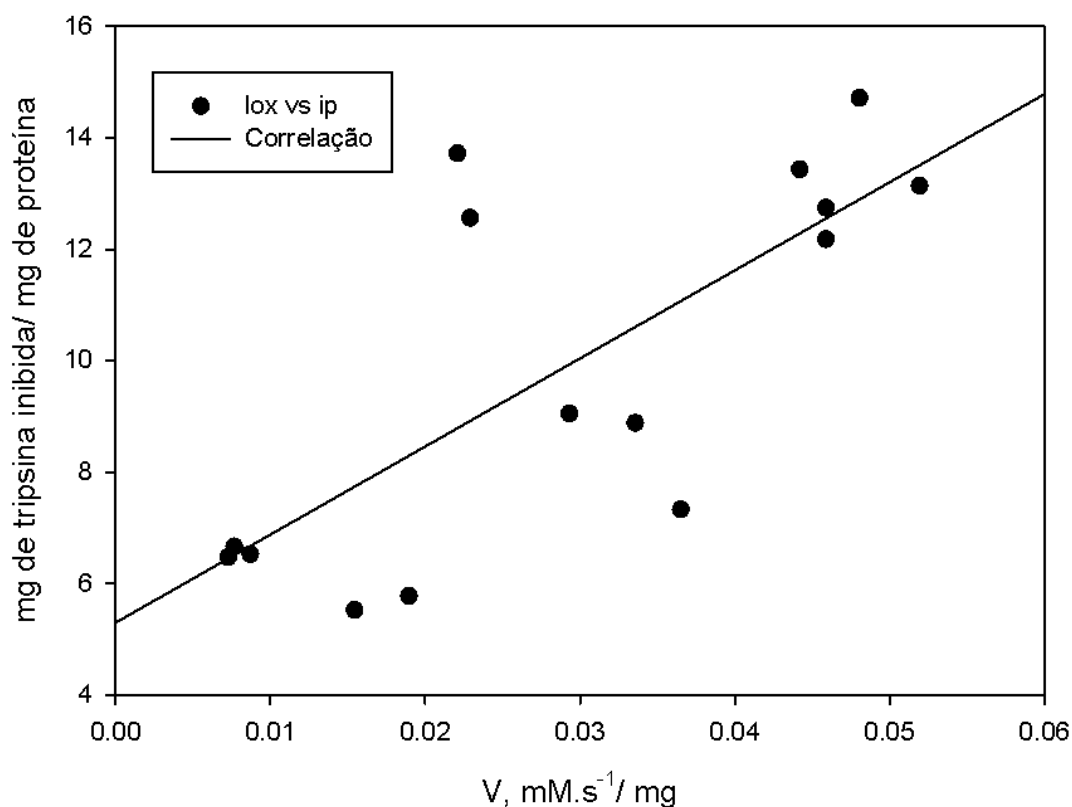


Figura 8. Correlação entre as variáveis atividade específica de LOX ($\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$) e quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/ mg de proteína) em extratos obtidos a partir de grãos do genótipo triplo nulo. A figura mostra que o aumento da quantidade de tripsina esta relacionado com o aumento da atividade de LOX.

3.1.2. Resposta do genótipo regular e triplo nulo aos diferentes tipos de injúrias

A ANOVA da atividade específica de LOX detectou diferenças significativas em função do tempo ($F_{1, 47}=153.002$; $p<0.001$, TABELA 3). Por outro lado, a quantidade de inibição de tripsina foi influenciada por todos os fatores analisados e pela interação entre eles (TABELA 3).

TABELA 3: O resultado da ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do genótipo, injúria e tempo e da interação entre os fatores, em extratos obtidos de grãos.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	p
Genótipo	1	4.084	0.052	58.136	<0.001
Injúria	3	1.607	0.207	5.458	0.004
Tempo	1	153.002	<0.001	49.058	<0.001
Genótipo x injúria	3	2.379	0.088	7.822	<0.001
Genótipo x tempo	1	1.062	0.311	28.388	<0.001
Injúria x tempo	3	1.607	0.207	5.458	0.004
Genótipo x inj. x tempo	3	2.379	0.088	7.822	<0.001
Residual	32				
Total	47				

A atividade de LOX não foi diferente entre os dois genótipos de soja, o qual foi o objetivo dessa análise ($F_{1, 47}=4.084$; $p=0.052$). A diferença encontrada em função do tempo foi representada anteriormente (itens 3.1.1.1 e 3.1.1.2.).

A quantidade de tripsina inibida, no tempo 0, foi significativamente maior no genótipo triplo nulo ($p<0.001$, testes Tukey HSD). Após 8 horas, a diferença permaneceu em plantas sem injúria, e nas plantas infestadas com *E. heros* (respectivamente $p<0.001$ e $p<0.001$, teste Tukey HSD, Fig. 9).

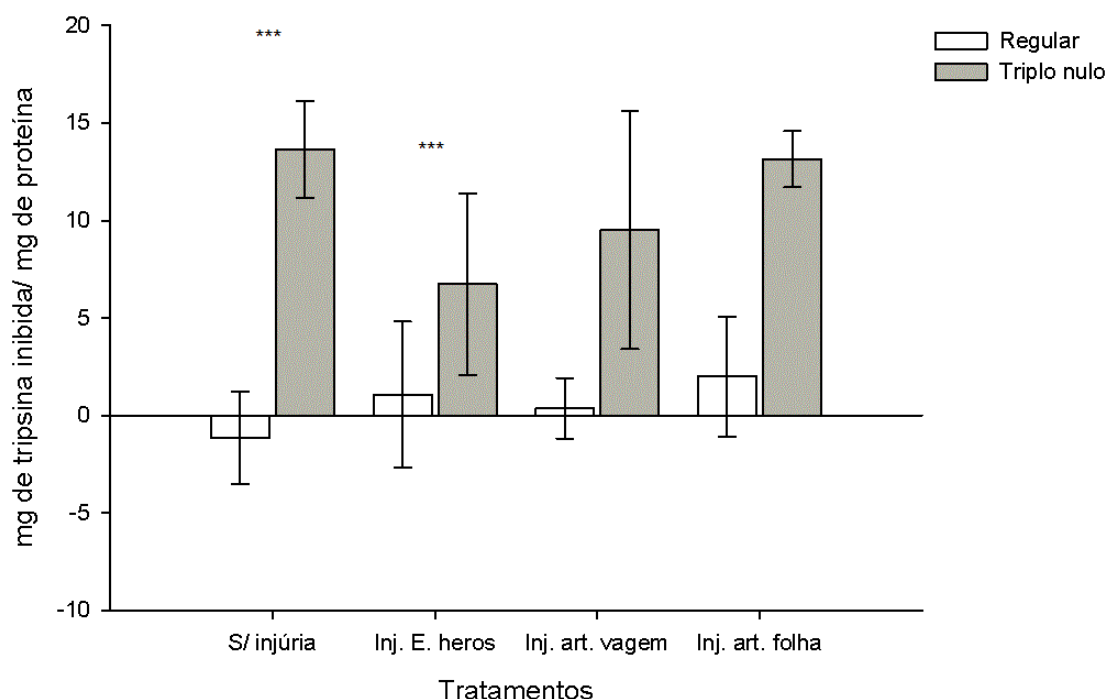


Figura 9. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de grãos de soja do genótipo regular e triplo nulo. A quantidade de tripsina inibida representada, corresponde à diferença nas quantidades presentes no tempo 0 e 8 horas. A figura representa a diferença, entre os dois genótipos, em plantas sem injúrias e as plantas com *E. heros* (***, $p < 0.001$). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

3.2. Extrato de vagem

3.2.1. Resposta temporal do genótipo de soja regular e triplo nulo

3.2.1.1. Genótipo regular

A atividade específica de LOX foi diferente significativamente em função do tempo, e da interação entre injúria e tempo (respectivamente $F_{2, 35} = 11.567$; $p < 0.001$ e $F_{6, 35} = 3.111$; $p = 0.021$, TABELA 4). Também houve diferença significativa, na quantidade de tripsina inibida, em função do tipo de injúria e da interação entre o tipo

de injúria e o tempo (respectivamente $F_{3, 35}=32.394$; $p<0.001$ e $F_{6, 35}=20.434$; $p<0.001$, TABELA 4).

TABELA 4: O resultado da ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do tipo de injúrias, tempo e da interação entre os fatores, nos extratos de vagens de soja do genótipo regular.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	P
Injúria	3	2.748	0.065	32.394	< 0.001
Tempo	2	11.567	< 0.001	0.222	0.802
Injúria x tempo	6	3.111	0.021	20.434	< 0.001
Residual	24				
Total	35				

As plantas que permaneceram sem injúrias, não apresentaram alterações na atividade de LOX durante as 24 horas ($p<0.05$, teste Tukey HSD). A infestação com *E. heros* e injúrias nas folhas também não afetaram a atividade de LOX ($p > 0.05$, testes Tukey HSD). Por outro lado, a atividade de LOX, após 8 horas, aumentou nas plantas com injúrias nos grãos ($p<0.001$, teste tukey HSD). Após 24 horas, houve redução significativa da atividade de LOX ($p<0.001$, teste Tukey HSD).

O aumento significativo na atividade de LOX após 8 horas, nas plantas com injúrias nos grãos, pode ser observado quando comparado com plantas sem injúrias ($p<0.001$, teste Tukey HSD, Fig. 10), e também com plantas com *E. heros* e com injúrias nos grãos (respectivamente $p=0.002$ e $p=0.02$, teste Tukey HSD).

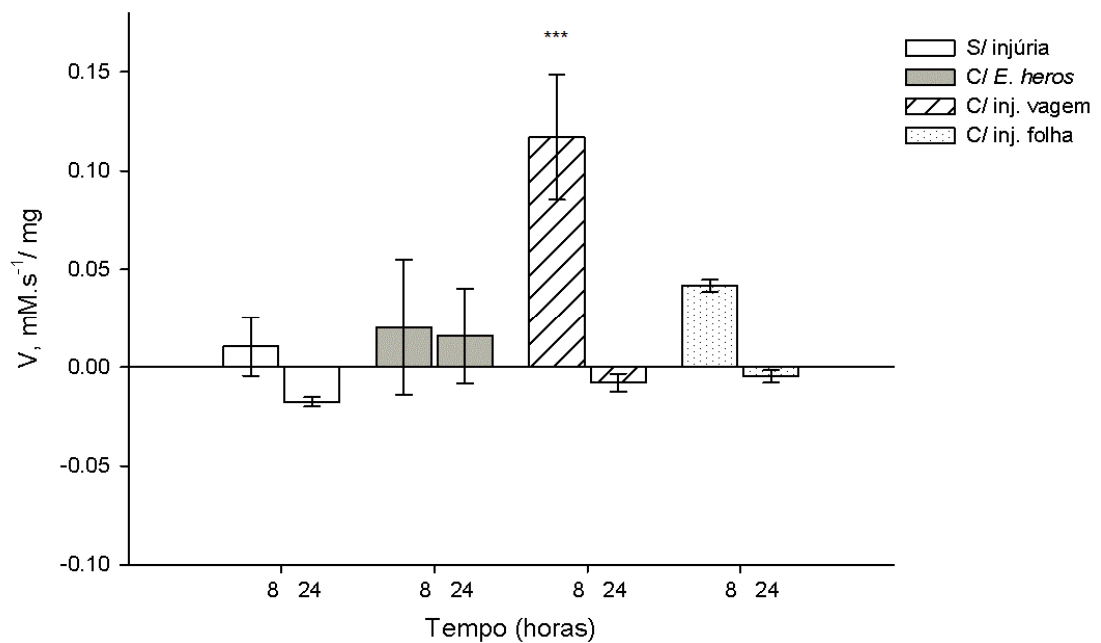


Figura 10. Atividade específica de LOX (V), em mM.s⁻¹/ mg, obtidas a partir de extratos de vagens, de soja do genótipo regular. O valor da atividade de LOX esta representado pela diferença da atividade, após 8 e 24 horas, pela atividade obtida no tempo zero. A figura representa a aumento da atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos, significativamente diferente do controle, após 8 horas (***, p<0.01, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A quantidade de tripsina inibida em plantas sem injúrias foi menor, que o controle, após 8 horas e permaneceu menor que o controle após 24 horas (respectivamente p=0.001 e p=0.042, teste Tukey HSD). A quantidade de tripsina inibida em plantas com *E. heros* diminuiu significativamente após 8 horas (p=0.019, teste Tukey HSD) e aumentou significativamente após 24 horas, se aproximando do encontrado no tempo zero (p<0.001, teste Tukey HSD). A quantidade de tripsina inibida

aumentou em plantas com injúrias nos grãos após 8 horas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD) e reduziu significativamente após 24 horas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD), se aproximando do valor encontrado no tempo zero. Injúrias nas folhas não provocaram alteração na quantidade de tripsina inibida ($p > 0.05$, teste Tukey HSD).

A quantidade de tripsina inibida nas plantas com injúrias nos grãos e nas folhas foram maior que em plantas sem injúrias, após 8 horas (respectivamente $p < 0.001$ e $p = 0.005$, teste Tukey HSD, Fig. 10). Também foram maiores que em plantas com *E. heros* (respectivamente $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). Após 24 horas, a quantidade de tripsina inibida nas plantas com *E. heros*, injúrias nos grãos e nas folhas foram maiores que em plantas sem injúrias (respectivamente $p = 0.002$, $p = 0.003$ e $p = 0.013$, teste Tukey HSD, Fig. 11).

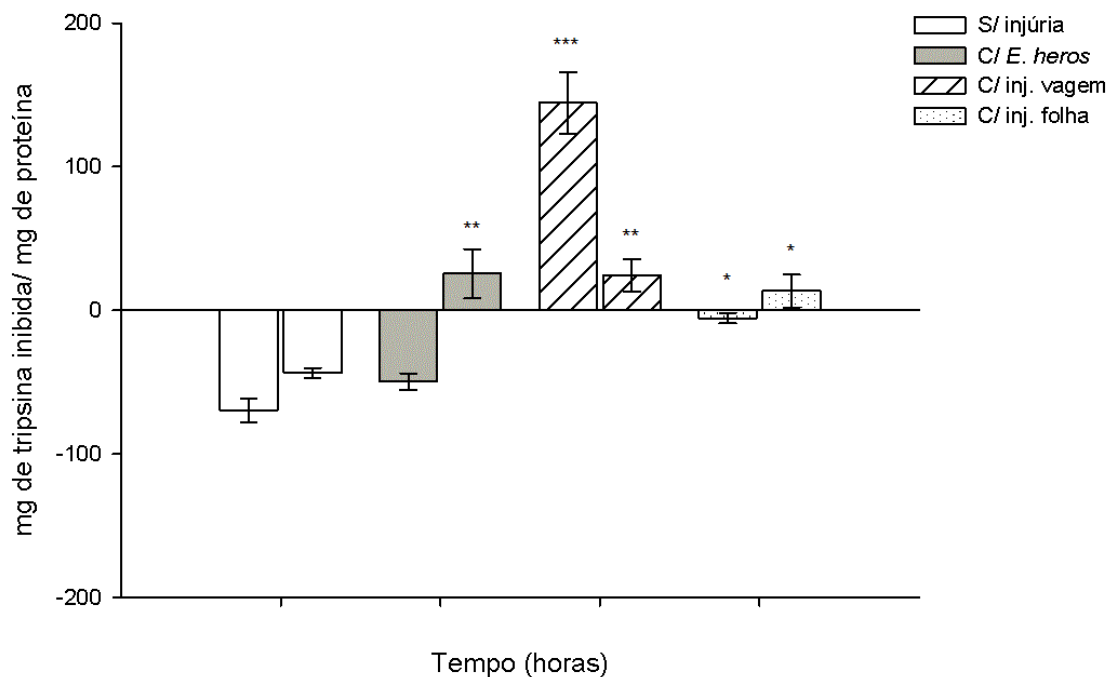


Figura 11. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de vagens de soja do genótipo regular. A quantidade de tripsina inibida representada, corresponde à diferença nas quantidades presentes no tempo 0 da quantidade presente 8 e 24 horas depois. A figura mostra que após 24 horas, as plantas com injúrias nos grãos e nas folhas, apresentam maior quantidade de tripsina inibida que plantas sem injúrias. Após 24 horas houve redução da quantidade nas plantas com injúrias nos grãos, mas que permaneceu superior a quantidade presente em plantas sem injúrias, juntamente com plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas (*, $p < 0.05$, **; $p < 0.001$ e ***, $p < 0.001$). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A análise de correlação entre as duas variáveis, atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida, mostrou que existe correlação positiva entre a atividade específica de LOX e a quantidade de tripsina inibida (Coeficiente de Correlação=0.689; $p<0.001$, Correlação de Pearson, Fig. 12).

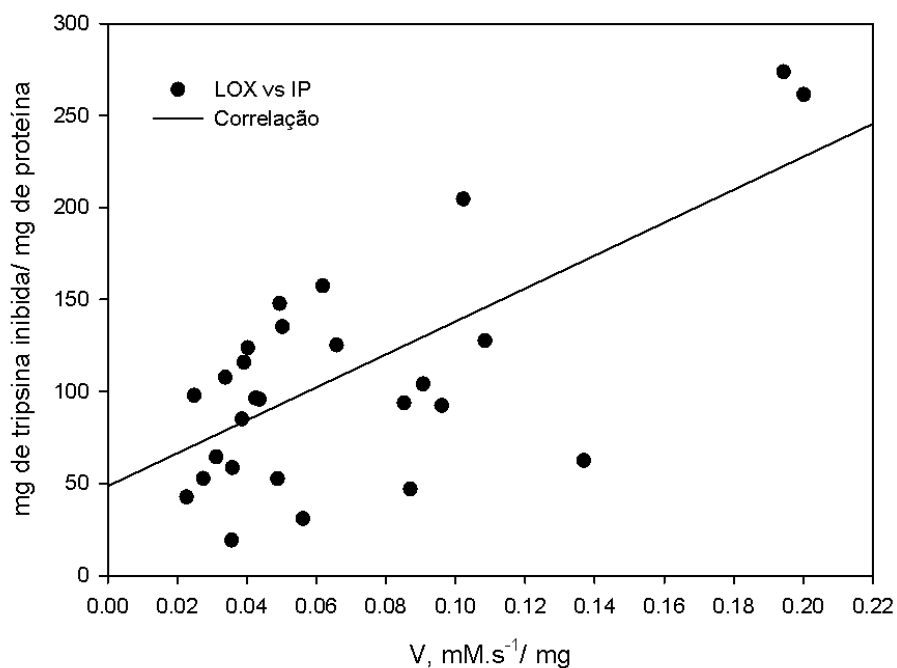


Figura 12. Correlação entre as variáveis atividade específica de LOX ($\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$) e quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/ mg de proteína) em extratos obtidos a partir de vagens do genótipo regular.

3.2.1.2. Genótipo triplo nulo

A atividade específica de LOX foi diferente significativamente em função do tempo ($F_{1, 23}=23.269$; $p<0.001$, TABELA 5). Houve diferença significativa, na quantidade de tripsina inibida, em função da injúria, do tempo e da interação entre os fatores (respectivamente $F_{3, 23}=10.890$; $p<0.001$, $F_{1, 23}=18.972$; $p<0.001$ e $F_{3, 23}=10.890$, TABELA 5).

TABELA 5: Resultado da ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do tipo de injúrias, tempo e da interação entre os fatores, nos extratos de vagens de soja do genótipo triplo nulo.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	P
Injúria	3	1.841	0.180	10.890	<0.001
Tempo	1	23.269	<0.001	18.972	<0.001
Injúria x tempo	3	1.841	0.180	10.890	<0.001
Residual	16				
Total	23				

A atividade de LOX nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos aumentou após 8 horas (respectivamente $p=0.003$ e $p=0.003$, teste Tukey HSD, Fig. 13). Não houve alteração na atividade de LOX nas plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas ($p>0.05$, teste Tukey HSD). Não houve diferença entre os tratamentos nos dois períodos de tempo ($p>0.05$, teste Tukey HSD).

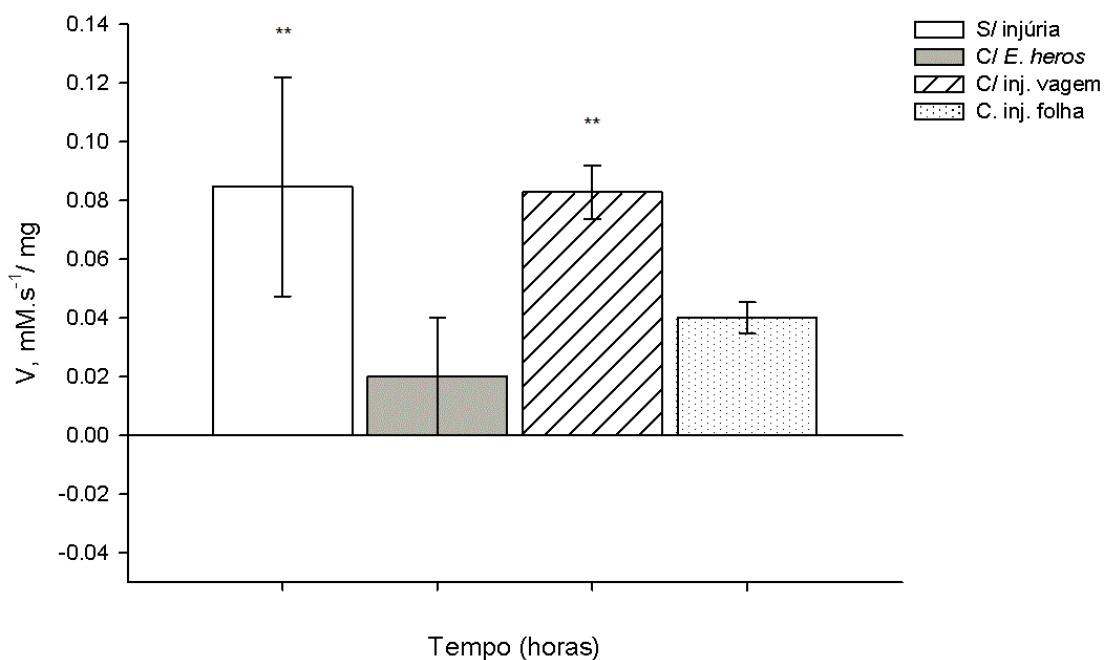


Figura 13. Atividade específica de LOX (V), em mM.s⁻¹/ mg, obtidas de extratos de vagens de soja do genótipo triplo nulo. O valor da atividade de LOX que esta representado é a diferença entre a atividade no tempo 0 e 8 horas. A figura mostra que não houve alteração da atividade de LOX nas plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas. Houve, portanto, aumento da atividade de LOX nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos, após 8 horas (**, p<0.01, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A quantidade de tripsina inibida aumentou, após oito horas, nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos (respectivamente p<0.001 e p<0.001, teste Tukey HSD). Não houve diferença na quantidade de tripsina inibida nas plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas (p>0.05, teste Tukey HSD). Por outro lado, as quantidades observadas nesses tratamentos são significativamente menores que em plantas sem injúrias (respectivamente p<0.001 e p=0.007, teste Tukey HSD, Fig. 14) e que plantas tratadas com injúrias nos grãos (respectivamente p<0.01 e p<0.001, teste Tukey HSD).

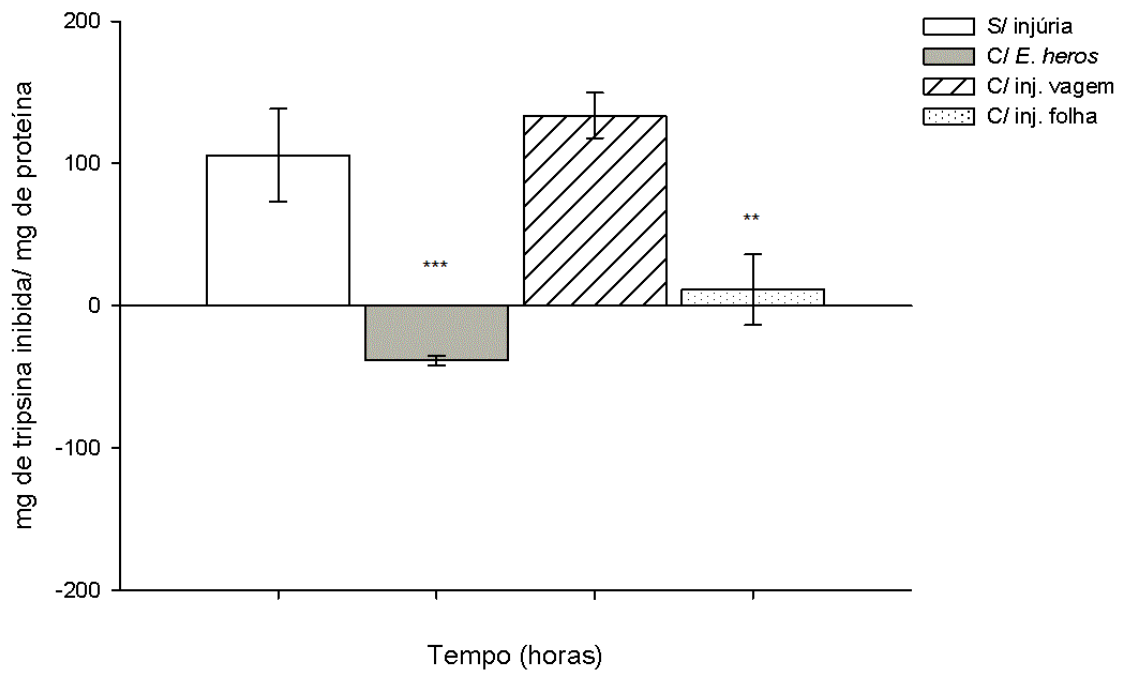


Figura 14. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de vagens de soja do genótipo triplo nulo. A quantidade de tripsina inibida que esta representado é a diferença entre a quantidade no tempo 0 e 8 horas. A figura mostra que após 8 horas, a atividade de LOX nas plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas são significativamente menores que as plantas sem injúrias (**, $p < 0.01$ e ***, $p < 0.001$). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A análise de correlação entre a variável atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida foi significativa, mostradas que os valores estão positivamente relacionados (Coeficiente de Correlação=0.813 e $p<0.001$, Correlação de Pearson, fig. 15).

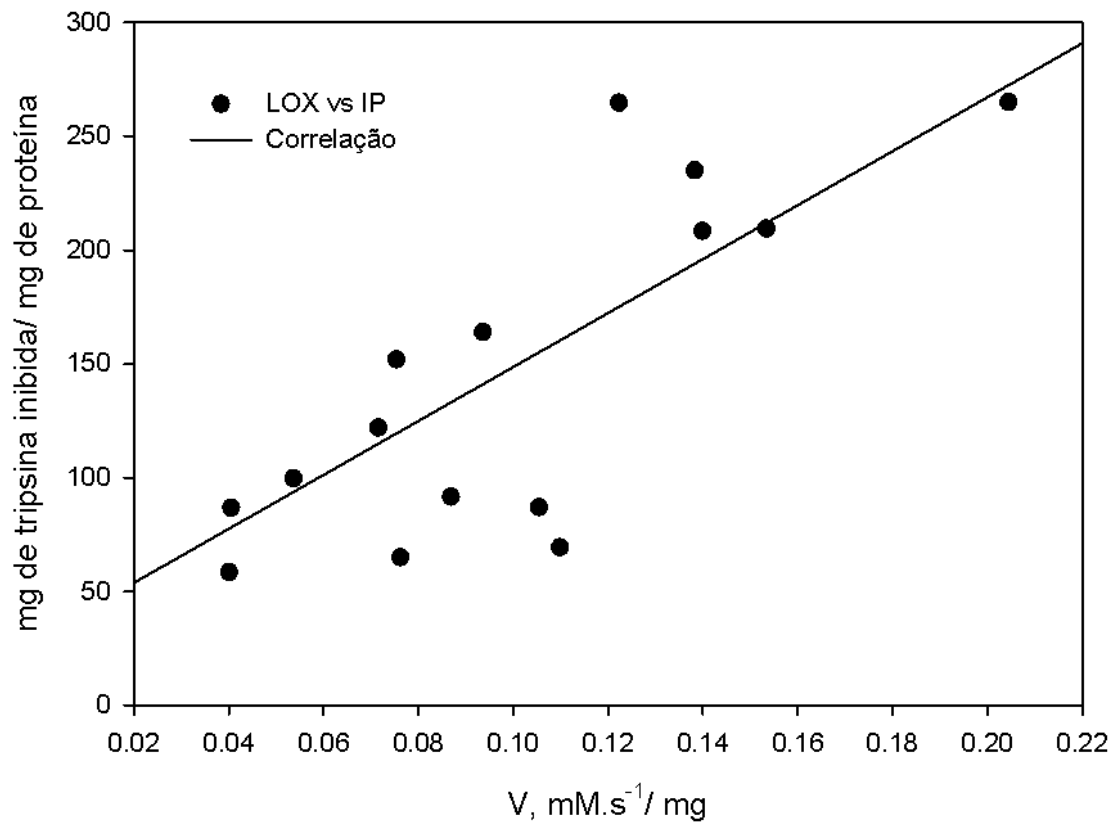


Figura 15. Correlação entre as variáveis atividade específica de LOX ($\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$) e quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/ mg de proteína) em extratos obtidos a partir de vagens do genótipo triplo nulo.

3.2.2. Resposta do genótipo regular e triplo nulo aos diferentes tipos de injúrias

Os resultados para a variável atividade específica de LOX mostram que houve diferença significativa em função do tipo de injúria, do tempo e da interação entre tipo de injúria e tempo (respectivamente $F_{3, 47}=3687$, $p=0.022$; $F_{1, 47}=35.153$, $p<0.001$ e $F_{3, 47}=3.687$, $p=0.022$). Com relação à variável quantidade de tripsina inibida, foram encontradas diferenças significativas em função de todos os fatores e da interação entre eles ($p<0.05$).

TABELA 6: Resultado da ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do tipo de injúrias, tempo e da interação entre os fatores, nos extratos de vagens de soja do genótipo triplo nulo.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	p
Genótipo	1	1.581	0.218	11.066	0.002
Injúria	3	3.687	0.022	27.704	<0.001
Tempo	1	35.153	<0.001	15.290	<0.001
Genótipo x injúria	3	1.688	0.189	8.366	<0.001
Genótipo x tempo	1	0.296	0.590	10.566	0.003
Injúria x tempo	3	3.687	0.022	27.704	<0.001
Genótipo x inj. x tempo	3	1.688	0.189	8.366	<0.001
Residual	32				
Total	47				

A atividade específica de LOX não foi diferente entre os genótipos de soja ($p>0.05$, teste Tukey HSD, dados não mostrados). As diferenças em função do tipo de injúria, tempo e interação injúria e tempo foram mostrados anteriormente.

A quantidade de tripsina inibida, inicialmente, não foi diferente entre os tratamentos nos dois genótipos ($p>0.05$, teste Tukey HSD). Após 8 horas a ANOVA detectou diferenças entre os genótipos, nas plantas sem injúrias ($p<0.001$, teste Tukey HSD, Fig. 16.).

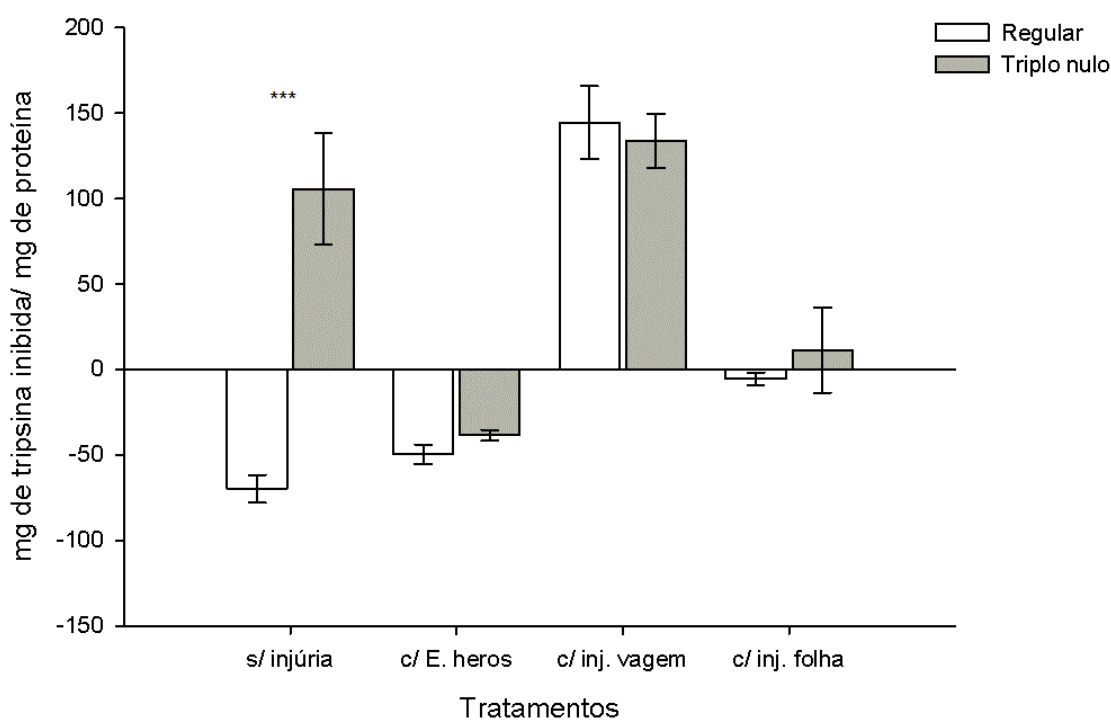


Figura 16. Quantidade de tripsina inibida, em mg de tripsina inibida/ mg de proteína, obtidas de extratos de vagens de soja do genótipo regular e do triplo nulo. A quantidade de tripsina inibida que está representado é a diferença entre a quantidade no tempo 0 e após 8 horas. A figura mostra que a quantidade de tripsina inibida é maior no genótipo triplo nulo, em plantas sem injúrias (****, $p<0.001$, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

3.3. Extrato de folhas

3.3.1. Resposta temporal dos genótipos de soja regular e triplo nulo

3.3.1.1. Genótipo regular

A ANOVA detectou diferenças significativas na atividade de LOX e quantidade de tripsina inibida em função da injúria, do tempo e da interação entre os fatores ($p < 0.05$, TABELA 7).

TABELA 7. ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do tipo de injúrias, tempo e da interação entre os fatores, nos extratos de folha de soja do genótipo regular.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	P	F	P
Injúria	3	4.115	0.014	236.383	<0.001
Tempo	3	39.037	<0.001	1111.383	<0.001
Injúria x tempo	9	5.831	<0.001	283.185	<0.001
Residual	32				
Total	47				

A atividade de LOX declinou nas plantas sem injúrias e com *E. heros* após 8 horas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). Após esse declínio, não houve diferença na atividade de LOX após 24 e 48 horas, nestes tratamentos. As plantas com injúrias nos grãos apresentaram o declínio na atividade de LOX somente após 24 horas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD), permanecendo sem alteração. A atividade de LOX também declinou após 24 horas nas plantas com injúrias nas folhas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD).

A atividade de LOX foi maior nas plantas com injúrias nos grãos e nas folhas que nas plantas sem injúrias, após 8 horas de aplicação das injúrias (respectivamente $p < 0.001$ e $p = 0.036$, teste Tukey HSD, Fig. 17). A atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos foi maior que plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas (respectivamente $p < 0.001$ e $p = 0.004$, teste Tukey HSD). Não houve diferença na atividade de LOX entre os tratamentos, 24 e 48 horas depois.

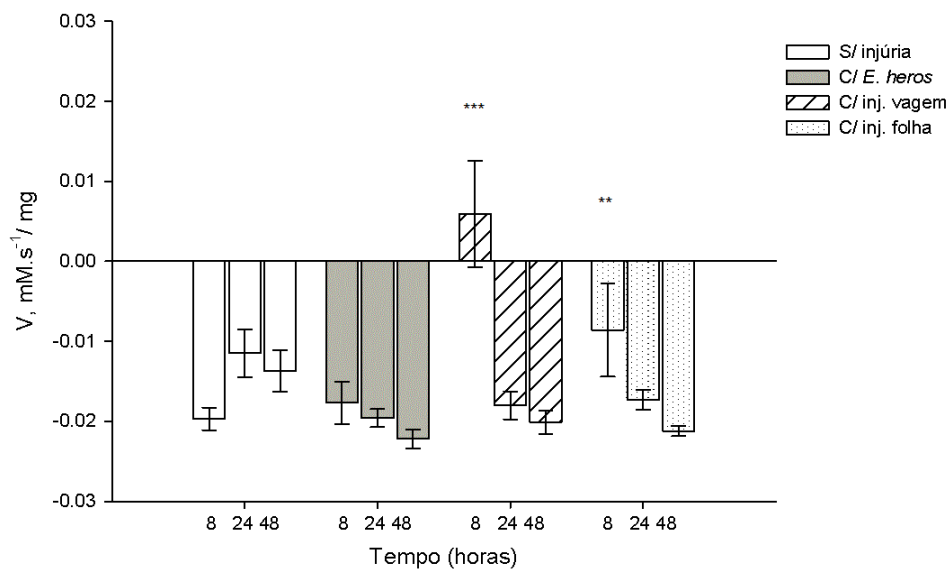


Figura 17. Atividade específica de LOX (V), em $\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$, obtidas de extratos de vagens de soja do genótipo triplo nulo. O valor da atividade de LOX representada é a obtida da diferença entre a atividade no tempo zero e a atividade no tempo 8, 24 e 48 horas. A figura mostra que a atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos e nas folhas é maior que em plantas sem injúrias (**, $p < 0.01$, e ***, $p < 0.001$, teste Tukey HSD). As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes.

A quantidade de tripsina inibida não variou significativo nas plantas sem injúrias e nem nas plantas com *E. heros*. Nas plantas com injúrias nos grãos, a quantidade de tripsina inibida após 8 horas foi maior que em plantas sem injúrias (Fig. 18). Após 24 horas houve redução para níveis significativamente menor que plantas sem injúrias (Fig. 18). Após 48 horas não houve diferença entre esses tratamentos. As médias obtidas nos tempos 8, 24 e 48 horas também foram diferentes do tempo 0 nas plantas tratadas com injúrias nas folhas (respectivamente $p < 0.001$, $p = 0.001$ e $p = 0.003$, teste Tukey HSD). A média do tempo 8 horas foi diferentes do tempo 24 e 48 horas, as quais não foram diferentes entre si (respectivamente $p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p > 0.05$, teste Tukey HSD).

O teste detectou diferença entre os tratamentos, no mesmo intervalo de tempo. No tempo 8 horas, o único tratamento que diferiu do controle foi aquele em que as plantas sofreram injúrias nos grãos e nas folhas (respectivamente $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD, Fig.18). Ainda, plantas tratadas com injúrias nas folhas foram diferentes daqueles em que as plantas foram infestadas com *E. heros* e tratadas com injúrias nos grãos (respectivamente $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). A quantidade de tripsina inibida também foi diferente entre plantas tratadas com injúrias nos grãos e infestadas com *E. heros* ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). Plantas infestadas com *E. heros* não foram diferentes do controle, sem injúrias. No tempo 24 horas, plantas infestadas com *E. heros*, tratadas com injúrias nos grãos e nas folhas, apresentaram médias diferentes significativamente do controle sem injúria (respectivamente $p = 0.002$, $p = 0.004$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD, Fig. 18). Estes tratamentos não foram diferentes entre si neste intervalo de tempo. No tempo 48 horas, apenas as plantas infestadas com *E. heros* apresentaram quantidade de tripsina inibida

diferente significativamente do controle, sem injúria ($p=0.030$, teste Tukey HSD, Fig. 18).

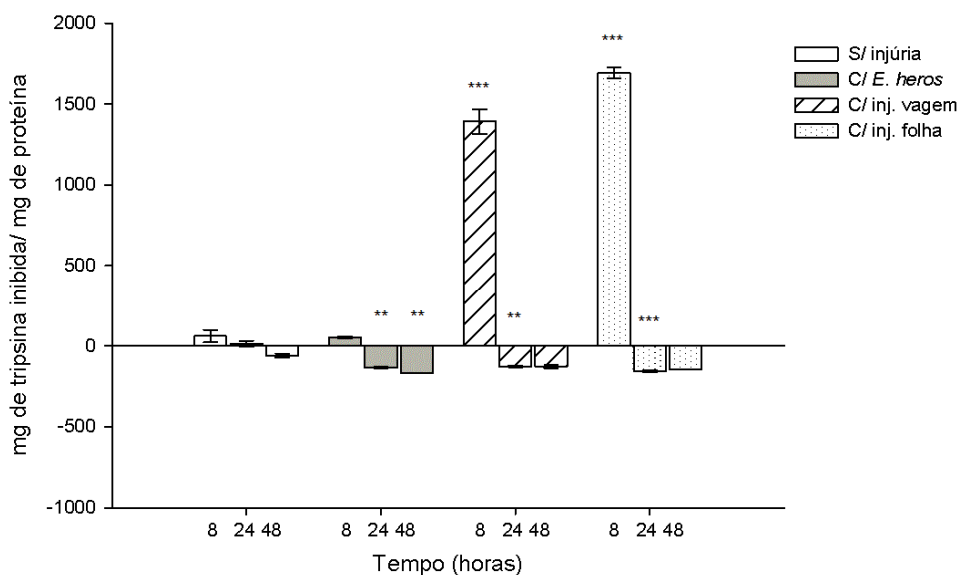


Figura 18. Quantidade de tripsina inibida, nos extratos de folhas do genótipo normal. As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes. A existência de diferença é representada por *, ** ou ***, sendo respectivamente < 0.05 , < 0.01 e < 0.001 .

3.3.1.2. Genótipo triplo nulo

A ANOVA da atividade específica de LOX apresentou diferença significativa em função do fator tempo ($p<0.001$, TABELA 8). Em relação à variável quantidade de tripsina inibida, houve diferença em função do tipo de injúria e tempo, e também na interação entre os fatores tipo de injúria e tempo ($p<0.05$).

TABELA 8. ANOVA da atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida em função do tipo de injúrias, tempo e da interação entre os fatores, nos extratos de folha de soja do genótipo triplo nulo.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	P	F	P
Injúria	3	1.762	0.181	7.416	0.001
Tempo	2	248.980	<0.001	101.734	<0.001
Injúria x Tempo	6	0.905	0.508	7.260	<0.001
Residual	24				
Total	35				

As comparações feitas dentro dos tratamentos para a atividade específica de LOX mostrou que no tratamento controle, sem injúria, a média obtida no tempo 0 foi diferente daquelas obtidas no tempo 8 e 48 horas ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). Não houve diferença entre as medias do tempo 8 e 48 horas ($p = 0.150$, teste Tukey HSD). Nas plantas infestadas com *E. heros*, as médias de atividade de LOX do tempo 8 e 48 foram diferentes estatisticamente do tempo 0 ($p < 0.001$, teste Tukey HSD), contudo não foram diferentes entre si ($p = 0.889$, teste Tukey HSD). Nas plantas tratadas com injúrias nos grãos, as médias da atividade de LOX nos tempos 8 e 48 horas foram diferentes do tempo 0 (respectivamente $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD), porém não foram diferentes entre si ($p = 0.901$, teste Tukey HSD). Em plantas tratadas com injúrias nas folhas, as médias de atividade de LOX nos tempo 8 e 48 horas foram diferentes significativamente do tempo 0 (respectivamente $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). E também não foram diferentes ente si ($p = 0.080$, teste Tukey HSD).

A análise feita entre os tratamentos, no mesmo período de tempo, não detectou diferenças significativas na média da atividade específica de LOX em função dos tratamentos.

A análise quantidade de tripsina inibida, dentro dos tratamentos, mostrou que no controle, sem injúria, houve diferença entre as médias do tempo 0 e 8 horas; 0 e 48 horas e entre 8 e 48 horas (respectivamente $p < 0.001$, $p = 0.006$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). Nas plantas infestadas com *E. heros*, também foram encontradas diferenças entre os tempos 0 e 8, 0 e 48 e 8 e 48 horas (respectivamente $p = 0.027$, $p = 0.020$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). Em plantas tratadas com injúrias nos grãos foram diferentes as médias dos tempos 0 e 48 e 8 e 48 (respectivamente $p = 0.004$ e $p = 0.033$, teste Tukey HSD). Em plantas tratadas com injúrias nas folhas foram encontradas diferenças entre as médias de 0 e 8, 0 e 48 e 8 e 48 horas (respectivamente $p < 0.001$, $p = 0.003$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD).

A análise feita entre os tratamentos, no mesmo período de tempo, mostrou que houve diferença nas médias dos tratamentos em relação ao controle sem injúrias, no tempo 8 horas. Neste intervalo, foram diferentes, com controle, as médias de plantas infestadas com *E. heros* e tratadas com injúrias nos grãos (respectivamente $p = 0.028$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD, Fig. 19). Também foi encontrada diferença entre esses dois tratamentos ($p = 0.006$, teste Tukey HSD). Plantas tratadas com injúrias nas folhas não foram diferentes significativamente do controle, sem injúria ($p = 0.967$). Contudo, foi diferente de plantas infestadas com *E. heros* e tratadas com injúrias nos grãos (respectivamente $p = 0.010$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD).

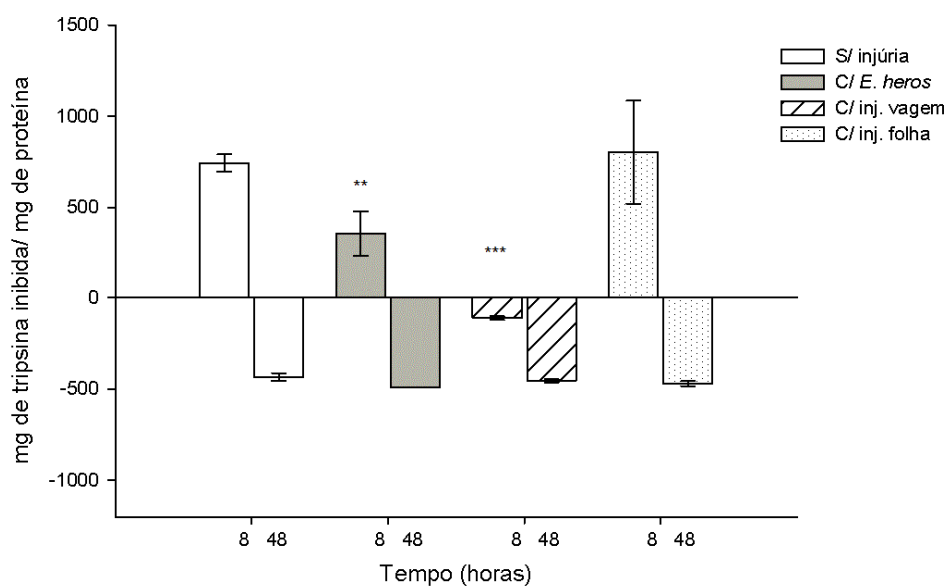


Figura 19. Quantidade de tripsina inibida, nos extratos de folhas do genótipo triplo nulo. As barras verticais representam o erro padrão da média de três amostras independentes. A existência de diferença é representada por *, ** ou ***, sendo respectivamente < 0.05 , < 0.01 e < 0.001 .

O teste de correlação entre as variáveis atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida não foi significativo (coeficiente de correlação = 0.109 e $p = 0.525$, Correlação de Pearson).

3.3.2. Resposta dos genótipos regular e triplo nulo aos diferentes tipos de injúrias

A análise feita, com o objetivo de comparar os dois genótipos, em relação à resposta das plantas desses dois genótipos em relação às variáveis atividades específica de LOX e quantidade de Tripsina inibida se encontra na TABELA 9.

TABELA 9. ANOVA da resposta de plantas de soja do genótipo regular e triplo nulo aos tipos de injúrias, ao tempo após a aplicação dos tratamentos e da interação entre estes fatores, em extratos obtidos de folhas.

Fatores	Graus de liberdade	LOX		IP	
		F	p	F	p
Genótipo	1	27.122	<0.001	19.061	<0.001
Injúria	3	4.696	0.006	29.937	<0.001
Tempo	2	240.051	<0.001	387.821	<0.001
Genótipo x injúria	3	1.560	0.211	37.207	<0.001
Genótipo x tempo	2	50.418	<0.001	17.593	<0.001
Injúria x tempo	6	3.325	0.008	30.512	<0.001
Genótipo x inj. x tempo	6	3.890	0.003	38.881	<0.001
Residual	48				
Total	71				

O teste mostrou que houve diferença na atividade específica de LOX no tempo 0, início do experimento, onde as plantas não tinham sofrido injúrias ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). Também foi encontrada diferença no tempo 8 horas em plantas tratadas com injúrias nos grãos ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). As diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo genótipo foram apresentadas nas análises anteriores.

A análise da quantidade de tripsina inibida mostrou que houve diferença significativa entre os dois genótipos no tempo 0, assim como observado na atividade específica de LOX ($p < 0.001$, teste Tukey HSD). Houve diferença entre os tratamentos nos dois genótipos no tempo 8 horas. O controle, sem injúria, plantas infestadas com *E. heros*, plantas tratadas com injúrias nos grãos e nas folhas (respectivamente $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, teste Tukey HSD). Não houve diferença entre os tratamentos no tempo 48 horas.

4. DISCUSSÃO

4.1. Extratos de grãos

4.1.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo

4.1.1.1. Genótipo regular

O aumento da atividade de LOX, após 8 horas de indução, em todos os tratamentos, incluindo o controle sem injúria, pode ser um indicativo da atividade das isoenzimas de LOX durante a maturação da semente (Loiseau et al., 2001). O fato da atividade de LOX ter sido maior nas plantas com injúrias nos grãos, em relação a plantas sem injúrias, sugere que a participação dessa enzima na resposta da planta a injúrias, (Loiseau et al., 2001). As plantas foram perturbadas durante a montagem do experimento, o que pode ser imaginado como um fator para o aumento da atividade de

LOX, se não fosse pelas respostas a injúrias serem ativadas nas primeiras horas após a injúria. Esse perfil de resposta foi encontrado em plantas de soja infestadas com *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Fortunato, 2007), *Bemisia argentifolii* (Silva et al., 2004), injuriada mecanicamente nas folhas (Vieira *et al.*, 2001), inoculada com patógenos (Silva *et al.*, 2001) ou quando tratadas com aplicações exógenas dos ácidos graxos poliinsaturados (Batista *et al.*, 2002). A redução na atividade de LOX após 24 horas em todos os tratamentos é mais uma evidência de que as respostas das plantas a distúrbios ocorrem nas primeiras horas que sucedem às injúrias.

A quantidade de tripsina inibida observada em plantas com injúrias nos grãos sugere que as LOX presentes nas sementes não induzem a síntese de inibidores de proteases, uma vez que o aumento na atividade de LOX não foi convertido no composto de defesa (figura 4 e 5). Por outro lado, o aumento na quantidade de tripsina inibida nas plantas com injúrias nas folhas, sustenta a hipótese de que LOX vegetativas participam do processo de indução de síntese de inibidores de proteases (Fortunato *et al.*, 2007), e que o efeito pode ser sistêmico, sendo reconhecido em tecidos distantes daquele afetado.

4.1.1.2. Genótipo triplo nulo

O aumento da atividade de LOX após 8 horas, em todos os tratamentos, incluindo o controle sem injúria, pode ser explicado pelos fatores descritos anteriormente (item 4.1.1.1.). A menor atividade encontrada em plantas infestadas com *E. heros* pode levantar algumas questões sobre a importância das três LOX ausentes no genótipo triplo nulo, na resposta da soja a injúrias (Figura 6). Esta suposição é reforçada pelo fato da quantidade de tripsina inibida em plantas com o herbívoro e com injúrias nas folhas serem menores que em plantas sem injúrias (Figura 7). Por outro lado, trabalhos recentes demonstraram que alguns herbívoros são adaptados para sobrepor

defesas de plantas através da manipulação das respostas (Sarmiento et al., 2011). A correlação positiva entre a atividade de LOX e a quantidade de tripsina inibida confirmou que as duas variáveis estão relacionadas, ou seja, o aumento da atividade da enzima é refletido no aumento da quantidade de tripsina inibida. O mesmo ocorre com a redução, observado nas plantas infestadas com o herbívoro.

4.1.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias

Apesar de não ter sido encontrado diferenças na atividade de LOX entre os dois genótipos, a respostas aos tratamentos foram diferentes no genótipo triplo nulo e no regular. A atividade de LOX no genótipo regular aumentou em resposta às injúrias nos grãos após 8 horas, indicado uma possível função dessas isoenzimas de LOX no mecanismo de defesa presente nos grãos (Loiseau et al., 2001). Além de não ter sido encontrado diferença na atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos, as plantas do genótipo triplo nulo ainda apresentaram redução na atividade das enzimas nas plantas com o herbívoro.

Os resultados indicam que plantas sem três LOX nas sementes apresentam maiores quantidades de IP inicialmente que plantas do genótipo regular (figura 9). Por outro lado, o aumento da quantidade de tripsina inibida nas plantas regulares com injúrias nas folhas indica a participação que as LOX presentes nas sementes podem exercer na sinalização sistêmica de injúrias. O que não foi observado no genótipo triplo nulo. O qual apresentou redução na quantidade de tripsina inibida nas plantas com o herbívoro, o que pode ser resultado da redução observada na atividade de LOX nestas plantas. Indicando a possível importância das três isoenzimas na manutenção dos mecanismos de defesas ativo.

4.2. Extratos de vagens

4.2.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo

4.2.1.1. Genótipo regular

As LOX presentes nas vagens já foram descritas desempenhando papel fisiológico nas plantas (Dubbs e Grimes, 2000 a e b). Os resultados desse trabalho sugerem que LOX de vagens podem atuar em resposta a injúrias, como observado após 8 horas nas plantas com injúrias nos grãos (figura 10). Os resultados também mostram que a reação ocorre momentos após o recebimento da injúria (Silva *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004 e Fortunato, 2007).

O resultado do aumento da atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos pode ser observado como o fator que provocou aumento da quantidade de tripsina inibida (Figura 11). Indicado uma possível importância da enzima em resposta a injúrias locais. Também podem ser importantes na sinalização de injúrias sistêmicas, observado na maior quantidade de IP nas plantas com injúrias nas folhas do que plantas sem injúrias, mesmo após 24 horas (Figura 11). O herbívoro provocou aumento na quantidade de tripsina inibida após 24 horas de infestação. Os resultados mostram que a quantidade de tripsina inibida está positivamente correlacionada com a atividade de LOX (Figura 12), mostrando que *E. heros*, injúrias locais e sistêmicas provocam alteração na fisiologia de vagens de soja do genótipo regular.

4.2.1.2. Genótipo triplo nulo

A correlação positiva entre a atividade de LOX e quantidade de tripsina inibida estão representadas na Figura 15. A atividade de LOX aumentou nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos após 8 horas (Figura 13). Plantas com o herbívoro e

com injúrias nas folhas não apresentaram essa alteração, que pode ser verificada também na quantidade de tripsina inibida (Figura 14). O que indica que o herbívoro não provoca alteração na atividade de LOX e conseqüentemente não provoca aumento na quantidade de IP. Este resultado mostra a importância das LOX presentes nos grãos em resposta a infestação por herbívoros.

4.2.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias

A ausência de diferença na atividade de LOX entre os dois genótipos não significa que eles respondem de forma semelhante. Como foi discutida anteriormente, a presença das enzimas nos grãos foi importante para o aumento da atividade de LOX e de IP em resposta a injúrias locais e sistêmicas no genótipo regular. O que não foi observado o genótipo triplo nulo, em que além de não ser sensível quanto à percepção de injúrias local e sistêmica, apresentou redução na quantidade de IP após 8 horas.

4.3. Extratos de folhas

4.3.1. Resposta temporal dos genótipos regular e triplo nulo

4.3.1.1. Genótipo regular

A atividade de LOX reduziu após 8 horas em todos os tratamentos. Por outro lado, plantas com injúrias nos grãos e nas folhas apresentaram atividade de LOX maior que em plantas sem injúrias (Figura 17), indicando a importância dessas enzimas presentes nas folhas em resposta a injúrias locais e sistêmicas. A quantidade de IP maiores nas plantas com injúrias nos grãos e nas folhas, no tempo 8 horas, corresponde à atividade de LOX. Ou seja, a quantidade de tripsina inibida, assim como a atividade de LOX, foram maiores nas plantas com injúrias nas vagens e nas folhas que nas plantas sem injúrias, no tempo 8 horas. A redução observada na quantidade de tripsina nas

plantas com *E. heros* pode indicar um efeito negativo da presença do herbívoro na indução de defesas direta na soja (Sarmiento et al., 2011).

4.3.1.2. Genótipo triplo nulo

Os resultados mostraram que houve redução da atividade de LOX após 8 horas em todos os tratamentos, permanecendo significativamente menor após 48 horas e sem diferença entre os tratamentos. A quantidade de tripsina aumentou nas plantas sem injúrias, com *E. heros* e com injúrias nas folhas após 8 horas. Nas plantas com *E. heros* e com injúrias nos grãos, a quantidade de tripsina inibida foi menor que nas plantas sem injúrias, o que pode sugerir a importância das LOX nos grãos na sinalização de injúrias sistêmicas.

4.3.2. Resposta dos genótipos aos tipos de injúrias

A atividade de LOX após 8 horas no genótipo regular, em plantas com injúrias nos grãos e nas folhas, foi maior que o observado no genótipo triplo nulo, indicando que as isoenzimas nos grãos são importantes na sinalização de injúrias locais e sistêmicas. O que pode ser reforçado pelo aumento na quantidade de tripsina inibida no genótipo regular nestes tratamentos. Além disso, a redução na quantidade de tripsina inibida nas plantas com *E. heros* pode indicar que a deficiência das três LOX pode comprometer a resposta das plantas a infestação de um herbívoro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreou, A., and Feussner, I. (2009). Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70, 1504-1510.
- Axelrod, R., and Hamilton, W. (1981). The evolution of cooperation. *Science* 211, 1390-1396.
- Batista, R.B., Oliveira, M.G.d.A., Pires, C.V., Piovesan, N.D., Rezende, S.T.d., and Moreira, M.A. (2002). Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37, 1517-1524.
- Blee, E. (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* 37, 33-72.
- Câmara, G. M. S. Ecofisiologia de soja e rendimento. **Soja: Tecnologia da Produção**. Piracicaba: USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1998. p.256-275.
- Chen, M.-S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15, 101-114.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PANIZZI, A.R. *Percevejos da soja e seu manejo*. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1999. 45p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 24)
- Dubbs WE, Grimes HD (2000a) The mid-pericarp cell layer in soybean pod walls is a multicellular compartment enriched in specific lipoxygenase isoforms. *Plant Physiol* 123:1281–1288.
- Dubbs WE, Grimes HD (2000b) Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiol* 123:1269–1279.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A. (1992). OCTADECANOID PRECURSORS OF JASMONIC ACID ACTIVATE THE SYNTHESIS OF WOUND-INDUCIBLE PROTEINASE-INHIBITORS. *Plant Cell* 4, 129-134.
- Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53, 275-297.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S., and Bostock, R.M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 54, 97-114.
- Fortunato, F.D., Oliveira, M.G.D., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., and Moreira, M.A. (2007). Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hubner). *J Pest Sci* 80, 241-247.
- Gardner, H.W., and Deighton, N. (2001). Effect of 4-hydroxy-2(E)-nonenal on soybean lipoxygenase-1. *Lipids* 36, 623-628.

- Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.L., Wathelet, J.P., Du Jardin, P., and Thonart, P. (2010). The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* 14, 451-460.
- Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59, 41-66.
- Iassonova, D.R., Johnson, L.A., Hammond, E.G., and Beattie, S.E. (2009). Evidence of an Enzymatic Source of Off Flavors in "Lipoxygenase-Null" Soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society* 86, 59-64.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E., and Puski, G. (1974). DETERMINATION OF TRYPSIN-INHIBITOR ACTIVITY OF SOY PRODUCTS - COLLABORATIVE ANALYSIS OF AN IMPROVED PROCEDURE. *Cereal Chemistry* 51, 376-382.
- Karban, R., Agrawal, A.A., and Mangel, M. (1997). THE BENEFITS OF INDUCED DEFENSES AGAINST HERBIVORES. *Ecology* 78, 1351-1355.
- Kessler, A., and Baldwin, I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291, 2141-2144.
- Kessler, A., and Baldwin, I.T. (2002). PLANT RESPONSES TO INSECT HERBIVORY: The Emerging Molecular Analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53, 299-328.
- Koornneef, A., and Pieterse, C.M.J. (2008). Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiol* 146, 839-844.
- Liavonchanka, A., and Feussner, N. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163, 348-357.
- Loiseau, J., Vu, B.L., Macherel, M.H., and Le Deunff, Y. (2001). Seed lipoxygenases: occurrence and functions. *Seed Sci Res* 11, 199-211.
- Lourencao, A.L., Reco, P.C., Braga, N.R., do Valle, G.E., and Pinheiro, J.B. (2010). Yield of Soybean Genotypes under Infestation of the Velvetbean Caterpillar and Stink Bugs. *Neotropical Entomology* 39, 275-281.
- Maffei, M.E., Mithöfer, A., and Boland, W. (2007). Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science* 12, 310-316.
- Martins, C.A.O., Sedyama, C.S., Moreira, M.A., Reis, M.S., Rocha, V.S., and Oliveira, M.G.D. (2002). Effect of genetic elimination of seed lipoxygenases on agronomic characteristics of soybean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37, 1389-1398.
- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B., and Morita, Y. (1986). Changes in Lipoxygenase Components of Rice Seedlings during Germination. *Plant Cell Physiol* 27, 911-918.
- Panizzi, A.R., and Oliveira, E.D.M. (1998). Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (pigeonpea) and soybean. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 88, 169-175.
- Pieterse, C.M.J., and Dicke, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science* 12, 564-569.

- Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2002). Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiol* 130, 15-21.
- Ryan, C.A. (1990). PROTEASE INHIBITORS IN PLANTS - GENES FOR IMPROVING DEFENSES AGAINST INSECTS AND PATHOGENS. *Annual Review of Phytopathology* 28, 425-449.
- Sarmento, R.A., Lemos, F., Bleeker, P.M., Schuurink, R.C., Pallini, A., Oliveira, M.G.A., Lima, E.R., Kant, M., Sabelis, M.W., and Janssen, A. (2011). A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters* 14, 229-236.
- Siedow, J.N. (1991). Plant Lipoxygenase: Structure and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42, 145-188.
- SILVA, F.B., OLIVEIRA, M.G.A., BUMANO, M.H.N., PIRES, C.V., OLIVEIRA, J.A., PILON, A.M., PIOVENSAN, N.D., MOREIRA, M.A., 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolii*). *Ciência e Agrotec.* 28(2): 409-416.
- Silva MD, Oliveira MGA, Lanna AC, Pires CV, Piovesan ND, Jose IC, Batista RB, Barros EG, Moreira MA (2001) Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:316-328.
- Van der Putten, W.H., Vet, L.E.M., Harvey, J.A., and Wackers, F.L. (2001). Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 547-554.
- VIEIRA, A.A., OLIVEIRA, M.G.D.A., JOSÉ, I.C., PIOVESAN, N.D., REZENDE, S.T.D., MOREIRA, M.A., and BARROS, E.G.D. (2001). Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13, 05-12.